



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Laboratorio De Neuroendocrinología
UMIEZ**

“Efecto del bloqueo unilateral de los receptores
muscarínicos M_2 de POA-AHA durante el ciclo
estral, sobre la ovulación de la rata adulta.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
**EDGAR MARIANO SAN AGUSTÍN
PAREDES**



MEXICO D.F.

MAYO DEL 2011

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGIA

Efecto del bloqueo unilateral de los receptores muscarínicos M₂ de POA-AHA durante el ciclo estral, sobre la ovulación de la rata adulta.

Tesis presentada por: Edgar Mariano San Agustín Paredes

Directora de tesis: Dra. María Esther Cruz Beltrán

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción

Laboratorio de Neuroendocrinología

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

INDICE	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEORICO	4
EL CONTROL NEUROENDOCRINO DE LA RATA.....	4
EVENTOS OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL.....	5
LAS FUNCIONES DEL FOLÍCULO OVÁRICO.....	7
LA ATRESIA FOLICULAR.....	14
PATRÓN DE SECRECIÓN DE ESTEROIDES OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL.....	15
PATRONES DE SECRECIÓN DE LAS GONADOTROPINAS.....	17
EVENTOS NEURALES DURANTE EL CICLO ESTRAL.....	19
CITOLOGÍA DE LA NEURONA GnRH.....	22
LA ACETILCOLINA (ACh).....	23
SÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO DE LA ACETILCOLINA (ACh).....	24
EFFECTOS FUNCIONALES ASIMÉTRICOS DEL HIPOTÁLAMO SOBRE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y LAS FUNCIONES DEL OVARIO	31
PROPÓSITO DEL ESTUDIO	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS	34
MATERIAL Y METODOS	35
RESULTADOS	37
EFFECTOS DE LA ANESTESIA.....	37
EFFECTOS DE LA MICRO-INYECCIÓN DE NaCl EN POA-AHA.....	40
EFFECTOS DE LA MICRO-INYECCIÓN DE MTC EN EL LADO IZQUIERDO DE POA-AHA.....	46
EFFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE MTC EN EL LADO DERECHO DE POA-AHA.....	50
ANÁLISIS DE RESULTADOS	54
CONCLUSIONES	58
BIBLIOGRAFIA	60

RESUMEN

Los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación reciben e integran información de tipo neural y endócrina, que se traducen en el evento fisiológico final que es la ovulación. En el hipotálamo, específicamente en las áreas preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) se localizan las neuronas que secretan el decapeptido GnRH (Hormona Reguladora de las Gonadotropinas), el cual al actuar sobre la hipófisis, estimula la secreción de gonadotropinas; estas a su vez al unirse a sus receptores en el ovario, estimulan la síntesis de hormonas esteroides y la ovulación.

El hipotálamo regula de manera asimétrica la secreción de FSH (Hormona Folículo Estimulante) y la hipertrofia compensadora del ovario *in situ* de ratas hemiovariectomizadas, sintetiza más GnRH y expresa más ARNm para la GnRH del lado derecho que del izquierdo. Además, la regulación de la secreción de la GnRH por el sistema colinérgico de POA-AHA es asimétrica y varía durante el ciclo estral de la rata.

El propósito de esta tesis fue estudiar si los receptores muscarínicos M₂ del lado izquierdo o derecho de POA-AHA regulan de manera asimétrica la ovulación espontánea de la rata adulta, y si la función de estos receptores cambia durante el ciclo estral.

Se utilizaron ratas hembras adultas, cíclicas de la cepa CII-ZV, mantenidas en condiciones controladas de luz/obscuridad (luces de 05:00 a 19:00 h) y libre acceso al agua y al alimento. A las 12:30 horas de cada etapa del ciclo estral, grupos de ocho a diez ratas fueron inyectadas con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (25 mg/kg peso). Una vez anestesiadas las ratas se colocaron en un aparato estereotáxico para introducir una aguja hacia POA-AHA e inyectar solución salina al 0.9% (1µL durante un minuto: grupo control) ó metoctramina (MTC: 10 ó 20 pg. disueltos en 1µL durante un minuto) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA entre las 13:00 y 14:00 horas. Un grupo de ratas sin tratamiento fueron utilizadas como grupo absoluto de comparación (intactas). Todos los animales tratados fueron sacrificados en el día del estro esperado, mientras que grupo de animales intactos se sacrificaron al estro vaginal. A la autopsia se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados, se disecaron los ovarios y el útero, los cuales fueron pesados en balanza analítica.

La anestesia provocó disminución del porcentaje de ratas ovulantes cuando fue inyectado en proestro (30% vs. 100%, $p < 0.05$). La microinyección unilateral de salina en el diestro-1 provocó disminución del porcentaje de animales ovulantes con respecto a los animales anestesiados (lado izquierdo: 44% vs. 88%; lado derecho: 33% vs. 84%, $p < 0.05$). De igual forma, la microinyección de salina en el lado derecho de POA-AHA en el día del estro provocó disminución del porcentaje de ratas ovulantes (38% vs. 90%, $p < 0.05$).

El número de ovocitos liberados por los dos ovarios disminuyó en los animales microinyectados con salina en el lado izquierdo de POA-AHA, cuando son tratados en estro, diestro-1 ó diestro-2, efecto que no ocurrió en las ratas tratadas en el lado derecho de POA-AHA.

La inyección de 10 pg de MTC en el lado izquierdo ó derecho de POA-AHA bloqueó la ovulación en todos los animales tratados (lado izquierdo: 0% vs. 38%; lado derecho: 0% vs. 38%, $p < 0.05$), mientras que la inyección de 20 pg en el lado izquierdo de POA-AHA aumentó el porcentaje de animales ovulantes (MTC: 65% vs. 38%, $p < 0.05$) y no lo modificó en los inyectados del lado derecho (MTC: 50% vs. 38%).

Con base en los resultados obtenidos sugerimos que los efectos del bloqueo de los receptores M_2 del lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre la ovulación dependen de la concentración de MTC utilizada, del día del ciclo en el que ésta fue inyectada y del lado de POA-AHA micro-inyectado. Las etapas del ciclo en las que los receptores M_2 participan son el estro y el diestro-1. En el día del estro, el bloqueo de los receptores M_2 con 10 pg/ μ L de MTC inhibe los eventos neuroendócrinos hipotalámicos que estimulan la ovulación. Mientras que el uso 20 pg/ μ L estimula la ovulación. Este efecto antagónico de los receptores M_2 de POA-AHA sobre la ovulación, nos lleva a considerar que en POA-AHA ocurrió el fenómeno que en farmacología se conoce como "*antagonismo no competitivo*", por lo tanto, para conocer el papel de la acetilcolina sobre la ovulación al unirse a su receptor M_2 se requiere llevar a cabo otros experimentos en los cuales se micro-inyecten dosis menores a 10 y mayores a 20 pg/ μ L en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA.

En la fase de diestro-1, la activación de estos receptores en uno u otro lado de POA-AHA inhiben la ovulación y no participan de manera asimétrica. En cambio, cuando se incrementó la dosis del fármaco, se manifestó la asimetría: la desactivación los receptores del lado izquierdo de POA-AHA resultan en la estimulación de los mecanismos neuroendócrinos hipotalámicos que culminan con la ovulación, mientras que la activación de los del lado derecho inhiben dichos mecanismos.

INTRODUCCIÓN:

En la rata, las funciones del ovario están reguladas por señales neuroendocrinas que provienen del sistema nervioso central (que incluye áreas extra-hipotalámicas e hipotalámicas), de la hipófisis y del propio ovario. Estas señales se suceden en forma secuencial y sincrónica (fenómeno en “cascada”), culminando 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 ^(1, 6, 7, 9, 10, 13, 20, 21, 49, 58, 59).

Uno de los sistemas de neurotransmisión que regula la secreción de las gonadotropinas y en consecuencia la ovulación, es el sistema colinérgico. Desde la década de los cuarenta, Everett y colaboradores ⁽¹⁷⁾ mostraron que este sistema estimula la secreción de las gonadotropinas durante la tarde del proestro. Esta regulación que ejerce el sistema colinérgico varía durante el ciclo estral ⁽¹⁴⁾. Mediante el uso de implantes unilaterales de atropina en el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) se llegó a la conclusión de que el sistema colinérgico regula la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas o GnRH ⁽⁷⁾. En la rata la cantidad de este decapeptido es asimétrica en el hipotálamo medio basal ⁽²¹⁾.

Mediante la colocación de un 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. Para el día del diestro-1, la señal de ambos lados es importante; mientras que para el día del diestro-2 es la del lado izquierdo la que regula los procesos. En cambio, en el día del proestro, el bloqueo del sistema colinérgico no altera la ovulación esperada en la mañana del día siguiente ^(7, 9).

La falta de ovulación por el bloqueo del sistema colinérgico resulta de la inactivación de los cinco tipos de receptores muscarínicos ⁽²⁹⁾. Dado que la atropina se une de manera inespecífica a los cinco receptores muscarínicos ⁽²⁹⁾, en este estudio se analizaron los efectos del bloqueo unilateral de los receptores **M₂** de POA-AHA, realizada en cada día del ciclo estral, sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.

MARCO TEÓRICO.

EL CONTROL NEUROENDOCRINO DEL CICLO OVÁRICO DE LA RATA.

En la rata, la duración del ciclo ovárico puede ser modificada en función de los ciclos de luz/obscuridad en el que se mantienen a los animales. La palabra *estro* es una adaptación al latín de la palabra “oistros” que significa frenesí. Este término fue usado primeramente por Heape ^(19, 25) que describe el “periodo especial de deseo sexual de la hembra”. Heape uso los prefijos *pro-*, *di-* y *met-*, con el sufijo *estro* para describir los estadios del ciclo ovárico durante el ciclo sexual ⁽¹⁹⁾.

La fase de proestro está caracterizada por el tiempo en el que el animal “comienza a entrar en calor”. El siguiente periodo se llama *estro*, Heape lo describe como “el tiempo en el que la hembra esta preparada para recibir al macho y tener un coito fructífero”. En ausencia de la concepción, el *estro* es seguido por un periodo corto llamado *metaestro* o también llamado *diestro-1*, es de variable duración en diferentes especies. La última etapa, llamada *diestro* o *diestro-2* es la fase en la que el ovario secreta de manera progresiva, mayores concentraciones de hormonas esteroides que preparan al útero para recibir al óvulo fertilizado.

La rata no se reproduce estacionalmente, sino que lo hace varias veces al año, de aquí que sea una especie poliéstrica que ovula de manera espontánea, es decir, la ovulación no depende de la estimulación neural provocada por los diferentes sistemas sensoriales que se activan durante las conductas de apareamiento. La ovulación ocurre cada cuatro a cinco días durante toda su vida reproductiva. Las ratas tienen un ciclo estral en promedio entre 4 o 5 días, la longitud de las fases del ciclo estral se definen en función de la citología que se observa al tomar un frotis de la vagina. Las etapas del ciclo estral son ⁽¹⁹⁾:

El ***proestro*** se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas, las que predominan en el frotis, las cuales son redondas, nucleadas y aparecen agrupadas. Ocasionalmente aparecen en baja cantidad células cornificadas escamosas. Según Freeman, el proestro tiene una duración de 12 a 14 hrs.

El **estro** es la fase en la que dominan las células escamosas cornificadas, son célula sin núcleo, su citoplasma contiene una gran cantidad de gránulos, su forma es irregular y aparecen en grupos. Según Freeman, el estro dura de 25 a 27 hrs.

En el **Diestro-1** el tipo de célula dominante es el leucocito, pero también se presentan células epiteliales nucleadas. Los leucocitos son pequeños con citoplasma granular y usualmente contienen núcleos vesiculados. Según Freeman, el metaestro o diestro 1 tiene una duración de 6 a 8 hrs.

En el día del **Diestro-2** se localizan células de todo tipo (nucleadas, cornificadas y leucocitos). Según Freeman, el Diestro 2 dura de 55 a 57 hrs ⁽¹⁹⁾.

EVENTOS OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL

El folículo ovárico es la unidad anátomo-funcional del ovario, a partir del cual se originan los tres compartimentos del órgano: el folicular, el luteal y el intersticial. Las funciones del folículo son liberar al ovulo, así como secretar las hormonas que estimulan el crecimiento y diferenciación de los órganos del sistema reproductor, la secreción de GnRH y de las gonadotropinas. El folículo está formado por el ovocito, las células de la granulosa, una membrana basal y las células tecales; estas últimas conforman la denominada teca interna, en la cual se comienza el proceso de esteroidogénesis. Por fuera de ella está la teca externa, la cual está constituida por fibras colágenas, células de tejido conectivo y fibras musculares lisas ^(11, 56).

Ovocito.- En el ratón es una célula cuyo tamaño es menor a 20 μm de diámetro en los folículos primordiales, presenta numerosas microvellosidades y está rodeado por las células de la granulosa. En el folículo con antra las células de la granulosa, forman el denominado *cumulus oophorus*, el cual es expulsado junto con el ovocito, cuyo diámetro alcanza las 70 μm en el momento de la ovulación ⁽⁵⁶⁾. Después del nacimiento, el ovocito se encuentra en la etapa de diploteno de la primera profase de la división meiótica. Antes de que se produzca la ovulación, el ovocito completa la primera fase de la meiosis y se convierte en un ovocito secundario que es expulsado en el momento de la ovulación.

En los folículos sin antro o con antro pequeño, el proceso de maduración final del ovocito está inhibido por una hormona o factor inhibidor de la maduración del ovocito (IMO), secretado por las células foliculares. La transformación del ovocito I al ovocito II es estimulada por la LH y la GnRH ^(11, 19).

Las células de la granulosa. Estas forman una capa continua que rodean completamente al ovocito y lo aísla del resto del ovario, el primer ciclo de crecimiento folicular es el aumento del tamaño del ovocito y crecimiento y proliferación de las células de la granulosa, una vez iniciado el crecimiento folicular, este no se detiene y culmina en la ovulación o la atresia ^(11, 19).

En el folículo en crecimiento las células de la granulosa proliferan rápidamente por estímulo de la FSH y los estrógenos, los cuales actúan de manera sinérgica, fenómeno en el cual los estrógenos actúan, mientras que los de LH son expresados por las células de la teca. En la rata, las células de la granulosa sólo poseen receptores a FSH, cuyo número es constante durante el ciclo estral, mientras que los de LH comienzan a expresarse en los folículos existentes en la etapa de diestro-1 y aumentan en la tarde del diestro-2, y alcanzan su máximo antes de la concentración máxima de LH en el día del proestro. En la tarde del diestro-2 y la mañana del proestro, en las células de la granulosa aparecen receptores a prolactina cuya síntesis es estimulada por la FSH, LH y la propia prolactina ^(11, 19).

Una vez que las células de la granulosa forman siete u ocho capas alrededor del ovocito, comienza a observarse la presencia del licor folicular en pequeñas acumulaciones, denominadas cuerpos de Call-Exner, que se origina por extravasación de componentes plasmáticos y secreción de células foliculares. En este se encuentran proteínas, polipéptidos, FSH, LH, prolactina, estrógenos, progesterona, gonadocrininas y noradrenalina cuyas concentraciones varían durante el ciclo estral. La acumulación del licor folicular forma el antro folicular el cual aumenta de tamaño con el desarrollo del folículo. Después de la ovulación, las células tecales se transforman en células tecoluteínicas del cuerpo lúteo ^(11, 19) (Figura 1).

Las células teco-intersticiales. Estas células tienen receptores a LH, la prolactina, la hormona adeno-corticotrófica, noradrenalina, GnRH y los estrógenos. En el folículo en crecimiento las células diferenciadas sintetizan andrógenos, los que sirven de sustrato a las células de la granulosa en la síntesis de estrógenos.

En el folículo preovulatorio, las células teca pierden la capacidad de sintetizar andrógenos y secretan progesterona, por efecto de la LH ^(11, 19).

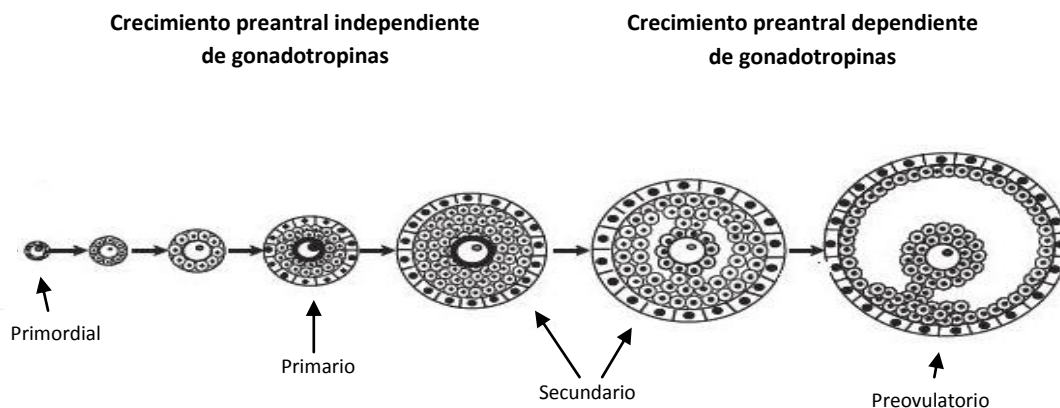


Figura 1. **Desarrollo y diferenciación del folículo ovárico en el ratón.** De izquierda a derecha se representan las modificaciones que va sufriendo el folículo desde su etapa primordial hasta la preovulatoria. (Tomada y modificada de Rajkovic ⁵⁶)

LAS FUNCIONES DEL FOLÍCULO OVÁRICO

La ovulación. Uno de los procesos en los que culmina el crecimiento y la diferenciación folicular es la salida del ovocito II; este proceso recibe el nombre de ovulación.

La ovulación es considerada como el resultado de un proceso inflamatorio localizado, ya que antes que se produzca la salida del ovocito hay edema en la teca interna, muerte celular y aumento de las prostaglandinas en el área. La secreción preovulatoria de la LH estimula la síntesis y liberación de la prostaglandina E (PGE), la que a su vez, estimula la secreción de plasminógeno. Este último activa la secreción de fibrolisina por las células de la granulosa, enzima que degrada las fibras de colágeno

que resulta en la desintegración de los desmosomas entre las células de la granulosa y de la teca. ⁽¹¹⁾

Cuando ocurre la secreción preovulatoria de la LH, la síntesis de estrógenos disminuye mientras que aumenta la de progesterona. La plasmina degrada la colágena de la pared folicular y en consecuencia disminuye su rigidez, lo que favorece la expulsión del ovocito. ^(11, 19)

La Secreción de Estrógenos.

Las hormonas esteroides se clasifican según su estructura química y su actividad biológica, en: progestágenos, andrógenos y estrógenos, los cuales tienen un núcleo esteroide compuesto por 21 átomos de carbono, agrupados en cuatro anillos tres ciclohexanos y un ciclopentano, molécula conocida como ciclo-pentano-perhidro-fenantreno ^(3, 4) (Figura 2).

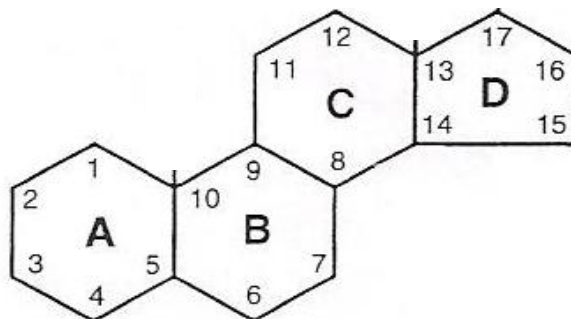


Figura 2. La molécula conocida como ciclo-pentano-perhidro-fenantreno es el núcleo básico de los esteroides. Los átomos de carbono de los esteroides están numerados y las estructuras del anillo se designan con letras ⁽⁴¹⁾.

En condiciones normales el folículo secreta progesterona (P_4), testosterona (T), estradiol (E_2) y estrona (E_1). La P_4 , tiene un núcleo esteroide pregnano de 21 átomos de carbono y un átomo de oxígeno en la posición C3 y otro con doble enlace en C-20 ^(3, 4). El andrógeno con más actividad biológica es la T, 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

(3, 4). Los estrógenos comprenden la estrona, estriol y el E₂; 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⁽⁶³⁾.

En la hembra, las hormonas esteroides son sintetizadas a partir de colesterol 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⁽³⁾. Las células con función esteroideogénica pueden obtener el colesterol de tres maneras: a) incorporarlo de la sangre a partir de las lipoproteínas circulantes, b) almacenado bajo la forma de ésteres presentes en las inclusiones de lípidos del citoplasma, y c) sintetizarlo de “*novo*” a partir de acetato⁽⁵³⁾. La mayor parte del colesterol llega unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y entra a la célula por endocitosis, formando gotitas lipídicas de ésteres de colesterol que se hidrolizan formando colesterol libre, el cual es transportado de la membrana mitocondrial externa a la interna. 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 esteroideogénesis aguda). En las membranas mitocondriales el colesterol es convertido en pregnenolona por la enzima citocromo P₄₅₀ (20, 22 desmolasa) (Figura 3).

Una vez en el retículo citoplasmático, la pregnenolona puede ser transformada al compuesto inmediato por dos rutas, la Δ_4 ó Δ_5 . En la ruta Δ_4 la pregnenolona es transformada a progesterona por la enzima 3-beta-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (3 β -HSD). La progesterona es convertida a 17 α -hidroxi-progesterona por la enzima P₄₅₀. La desmolasa (17,20-esteroide liasa) la convierte a androstenediona. Este metabolito es transformado en testosterona por la enzima 17-beta-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (17 β -HSD). Las células teco-intersticiales de los folículos son la primera fuente de andrógenos ováricos. Tanto la androstenediona como la testosterona pueden ser transformados a estrógenos por la enzima P₄₅₀. En el Sistema Nervioso Central algunas células poseen el complejo enzimático de aromatización, por lo que convierte a los andrógenos en estrógenos (Figura 4)^(12, 63, 69).

En la ruta Δ_5 la pregnenolona es transformada 17 α -hidroxi-pregnenolona por la enzima 17 α -hidroxilasa. Después, la C_{17,20}-liasa transforma 17 α -hidroxi-pregnenolona

en dehidro-epiandrosterona (DHEA), ésta a su vez es transformada a androstenediona por la enzima 17β -HSD. A partir de aquí la androstenediona sigue la ruta Δ_4 (Figura 3) (69).

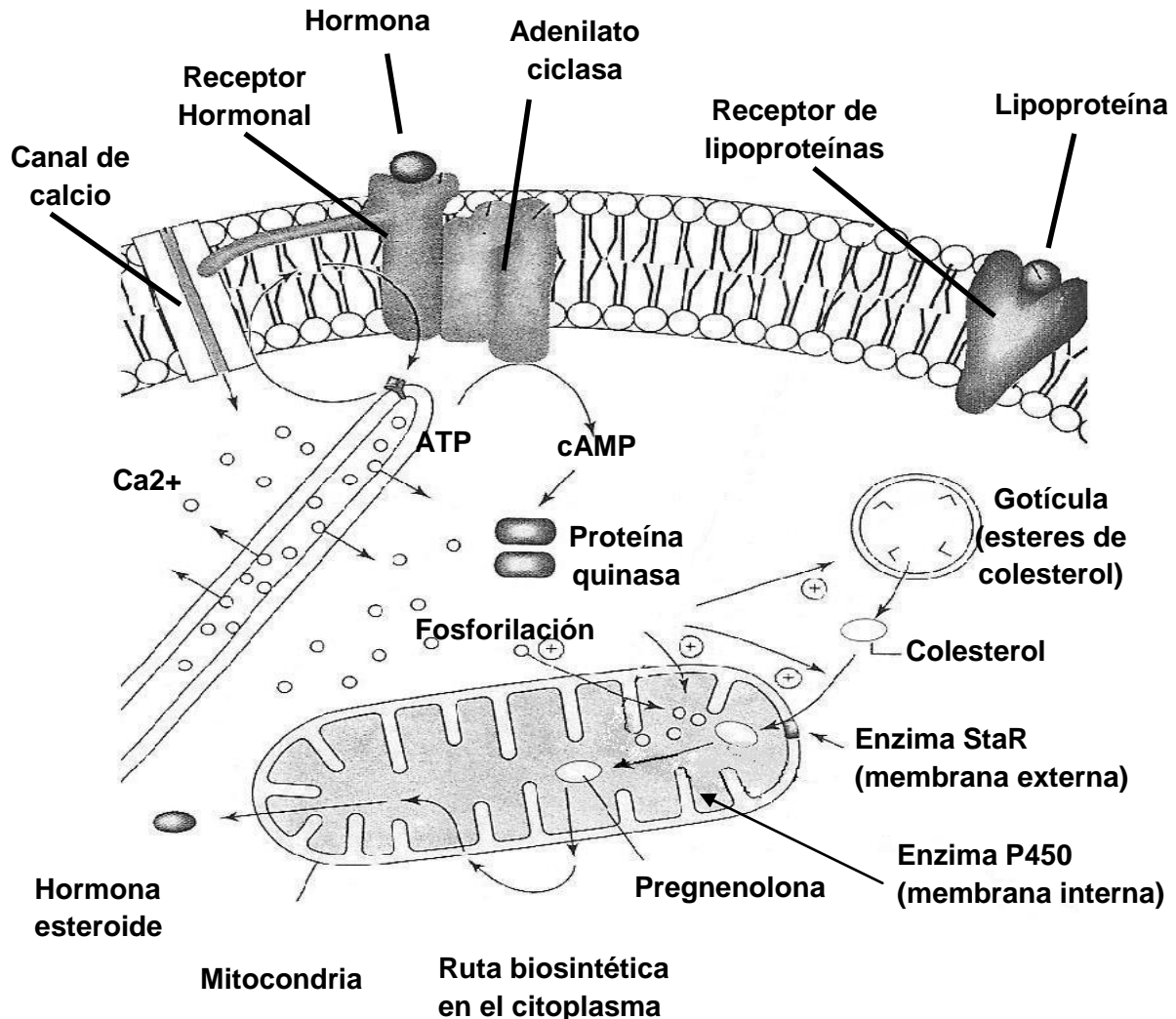


Figura 3. Biosíntesis de hormonas esteroideas. La etapa inicial es el paso de colesterol a pregnenolona que se realiza en la membrana mitocondrial por la acción de la enzima P_{450} . La unión de las LDL (lipoproteínas de baja densidad), a sus receptores específicos provoca que el colesterol penetre por endocitosis al interior de las células con actividad esteroideogénica. Parte del colesterol se almacena en gotas lipídicas que se hidrolizan produciendo colesterol libre, que es usado como sustrato. El colesterol es transportado a la membrana interna de la mitocondria por la proteína StaR (proteína reguladora de la esteroidogénesis), donde se encuentra la enzima P_{450} , la que rompe la cadena lateral de carbonos del colesterol. Una vez sintetizada la pregnenolona, sale de la mitocondria y sufre una modificación secuencial que dará lugar a la síntesis de progesterona, sustrato principal en la síntesis de los distintos esteroides (39).

En la síntesis de los estrógenos participan dos células del folículo: la tecointersticial que a partir del colesterol, que obtiene del plasma, sintetiza andrógenos, los

cuales atraviesan la membrana basal y son incorporados al citoplasma de las células de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos. Los estrógenos ejercen acciones directas sobre las células de la granulosa y el ovocitos, y otros difunden a la circulación en general ⁽⁶⁹⁾.

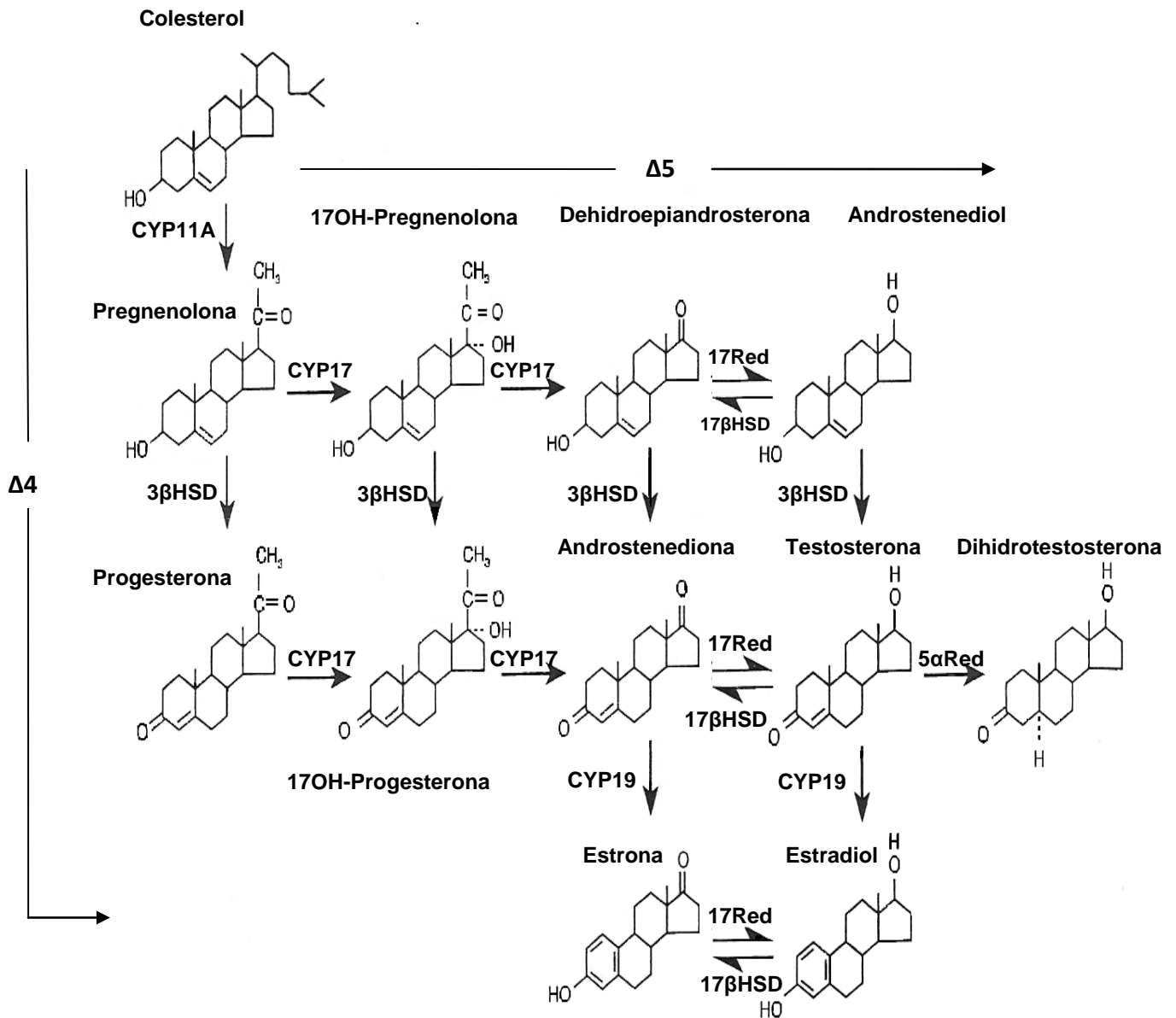


Figura 4. Vía de síntesis de las hormonas esteroides. Las enzimas son: Clivaje de la cadena lateral del colesterol (CYP11A); 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa (17 α -CYP17); 17-reductasa (17Red); 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β HSD); 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD); 5 α -reductasa (5 α Red); aromatasa (CYP19) ⁽⁴¹⁾.

En condiciones normales el folículo secreta estradiol y estrona. En la síntesis de los estrógenos participan dos células del folículo: la teco-intersticial que a partir del colesterol, sintetiza andrógenos, los cuales atraviesan la membrana y son incorporados al citoplasma de las células de la granulosa, donde son aromatizados.

Los estrógenos ejerce acciones directas sobre las células de la granulosa y del ovocito, y otros difunden a la circulación en general.

Las síntesis de los estrógenos es regulada por varias hormonas y neurohormonas que estimulan o inhiben algunos pasos específicos de la biosíntesis tanto en la célula de la granulosa como en la teco-intersticial.

La FSH estimula la síntesis de estrógenos por las células de la granulosa al unirse a su receptor en la membrana celular. Los efectos de la FSH sobre la síntesis de estrógenos son mimetizados por el AMPc. A diferencia de la FSH, la LH regula la síntesis de estrógenos por sus efectos sobre la hidrólisis del éster de colesterol, al catalizar la enzima colesterol esterasa por sus efectos estimulantes en la producción de andrógenos por las células tecaes y en la síntesis y actividad del complejo enzimático aromatasa en las células de la granulosa ⁽¹¹⁾.

La LH estimula la actividad de la aromatasa en aquellas células de la granulosa que fueron previamente estimuladas por la FSH. En el caso de la rata adulta, esto ocurre en la tarde del diestro-2. En los folículos pre-antrales, las células de la granulosa carecen de receptores a LH y su síntesis es estimulada por la FSH y los estrógenos. Según Hsueh y col. ⁽²⁸⁾, la LH es la hormona más importante en la regulación de la producción de estrógenos. Después de la secreción preovulatoria de LH, esta hormona inhibe a sus propios receptores en las células de la granulosa, lo que resulta en la disminución de la síntesis de estrógenos. La prolactina inhibe la actividad de la aromatasa y bloquea los efectos de la FSH sobre las células de la granulosa, lo que resulta en la disminución de la producción de estrógenos ⁽²⁸⁾.

La Secreción de Progesterona y Andrógenos.

Estos son sintetizados por las células tecaes. La progesterona también es secretada por las células de la granulosa, lo que depende del momento del ciclo estral en que son estudiadas y de los estímulos hormonales previos a los que son sometidas las células. En las células de la granulosa de los folículos antrales medianos y preovulatorios, la FSH estimula la síntesis de progesterona, efecto que es reforzado de manera sinérgica por la prolactina y los andrógenos, y es inhibida por la prostaglandina F-2 α (PGF_{2 α}). En el folículo preovulatorio la síntesis de progesterona por las células tecaes y de la granulosa es estimulada por la LH, la prolactina, cuyos efectos son mediados por el AMPc. La regulación de la síntesis de andrógenos es paralela a la de estrógenos ⁽¹¹⁾.

La Secreción de Gonadocrininas.

Además de las hormonas esteroideas, el ovario secreta varias hormonas de naturaleza polipeptídica que regula directa o indirectamente las funciones del folículo y de la hipófisis. Las gonadocrininas son:

- *La inhibina.* Se le define como un factor polipeptídico de origen gonadal que disminuye la tasa de secreción de la FSH. En el ovario es sintetizada por las células de la granulosa y su producción es estimulada por la FSH ⁽¹¹⁾.
- *Hormona inhibidora de la maduración del ovocito (IMO).* Es un polipéptido sintetizado por las células de la granulosa y es mayor su concentración en el licor folicular cuando es más pequeño el folículo. Su secreción es inhibida por la LH y quizá por otras hormonas que estimulan la ovulación y el reinicio de la meiosis. El IMO inhibe la diferenciación del ovocito I especialmente el reinicio del proceso meiótico y bloquea o disminuye la síntesis de progesterona por las células de la granulosa ⁽¹¹⁾.
- *La hormona inhibidora de la unión de la FSH a su receptor (IF-FSH-R).* Se trata de un polipéptido que no posee glúcidos en su molécula. No se conoce su lugar de síntesis. Su concentración en el licor folicular y sus efectos bloqueadores aumentan a medida que el folículo crece, lo que podría explicar por que la unión

de la FSH a las células de la granulosa es constante durante el ciclo estral. Su papel en la regulación de la función folicular no ha sido dilucidado, aunque podría participar activamente en la inducción de la atresia al impedir que la FSH se una a sus receptores al disminuir la aromatización de los andrógenos y las concentraciones intra-foliculares de estrógenos ⁽¹¹⁾.

- *La hormona inhibidora de la luteinización.* Es un péptido del que parecen existir dos fracciones, su concentración es mayor en los folículos grandes que en los pequeños, sus efectos mejor conocidos son el bloqueo de la síntesis de AMPc inducida por LH y la secreción de progesterona ⁽¹¹⁾.
- *La GnRH (gonadotropina) de origen ovárico.* La gonadotropina ovárica es sintetizada por las células de la granulosa. Se ha mostrado que la GnRH y sus análogos actúan directamente sobre el ovario donde estimulan la ovulación, el crecimiento y desarrollo del ovocito, inhiben la secreción de estrógenos y andrógenos y estimulan la secreción de la progesterona y de la PGE. El mecanismo de acción de la GnRH involucra la disminución del número de receptores a LH y prolactina en las células de la granulosa y la secreción del polipéptido es estimulada por la LH/HCG. El estímulo de la maduración del ovocito por parte de la GnRH se acompaña de la disminución de la concentración intra-folicular de AMPc ⁽¹¹⁾.
- *Proteína inhibidora de la actividad aromatásica del líquido folicular.* Esta proteína inhibe el aumento de la actividad aromatasa y del peso del ovario de la rata inducida por la HMG (gonadotropina menopáusica humana). Esta aumenta de modo paralelo a la concentración de estrógenos en el licor folicular y disminuye al momento en que las células de la granulosa se luteinizan y aumenta el contenido de progesterona en el licor folicular ⁽¹¹⁾.

LA ATRESIA FOLICULAR

Se define atresia folicular como el proceso normal por el cual se eliminan del ovario todos aquellos folículos que habiendo iniciado el proceso de crecimiento y

diferenciación no ovulan. El inicio de la atresia parece estar determinado por alteraciones del ovocito, el cual pierde su capacidad para mantener el control metabólico del folículo. Esta alteración sería seguida por modificaciones de las células de la granulosa al perder los receptores a FSH y LH, lo que se traduce en disminución de la capacidad de aromatización de los andrógenos. Dicho fenómeno sería uno de los pasos fundamentales en el desarrollo de la atresia, dado que la capacidad del folículo para mantener la síntesis de estrógenos es primordial para evitarla. Además de los factores considerados, existen evidencias experimentales que indican que la GnRH estimula el proceso de atresia en los folículos con antra ⁽¹¹⁾.

El primer cambio que se observa en los folículos atrésicos comienza en las células epiteliales que revisten el límite antral de los folículos primarios y en las células externas de la corona radiada de los folículos secundarios. En dichas células se encoge el núcleo y la cromatina se condensa, dichos cambios se conocen como picnosis. Después, cuando el núcleo de las células de la granulosa se rompe y la cromatina se desintegra formando gránulos que se expulsan de la célula, entonces se habla de cariorrésis ⁽¹⁹⁾

En los folículos antrales, los fragmentos del núcleo y las células picnóticas tienden a flotar en el líquido folicular, si las células del *cumulus oophorus* se desprenden del resto, el ovocito entra al líquido folicular. En la rata, la zona pelúcida se degenera rápidamente como resultado de la alteración del ovocito. Las células de la granulosa degeneran completamente pero la teca interna persiste como masas intersticiales, que eventualmente se rompen en pequeños grupos de células que se dispersan en la médula ^(19, 30).

PATRÓN DE SECRECIÓN DE ESTEROIDES OVÁRICOS DURANTE EL CICLO ESTRAL (Figura 5)

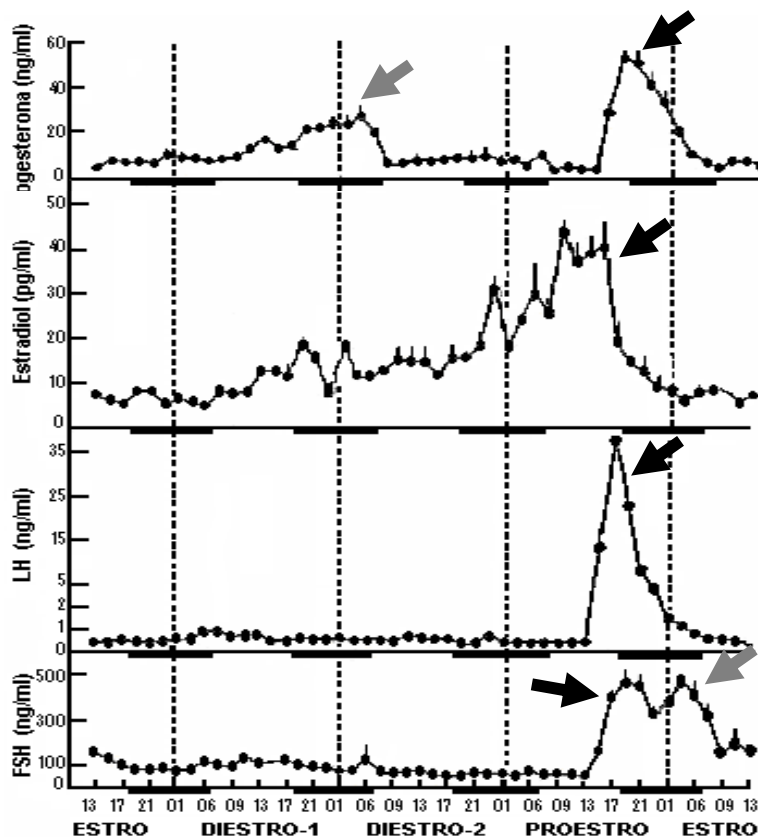
El periodo preovulatorio del ciclo estral es caracterizado por un crecimiento de los folículos ováricos y un aumento en la secreción de estrógenos. En la rata, la secreción de 17 β -estradiol en el plasma venoso del ovario es bajo en el estro, comienza a elevarse significativamente en el diestro-1 y durante la mañana del diestro-2, y alcanzan los valores más altos en la mañana y medio día del proestro, pero caen

rápidamente a concentraciones basales en la tarde del proestro, las que se mantienen hasta el estro ^(19, 61, 70).

En ratas con ciclo estral de 4 días las concentraciones en el plasma periférico de testosterona y androstenediona son similares a los patrones de estradiol ⁽¹⁹⁾.

En ratas adultas la progestina dominante secretada en la sangre de la vena ovárica durante el ciclo estral es la 20 α -hidroxipregn-4-en-3-ona, también se conoce 20 α -hidroxiprogesterona (20 α -OH-P). Esta progestina es un metabolito de la progesterona y es catalizada por la enzima 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa. La 20 α -hidroxiprogesterona es relativamente inactiva en bioensayos clásicos de progesterona ⁽¹⁹⁾.

El aumento en la concentración plasmática de progesterona y 20 α -OH-P ocurren durante la tarde del diestro-1 y ambos esteroides surgen de la formación de los cuerpos lúteos. Un segundo valor máximo en la concentración de progesterona que se origina por las células de la granulosa de los folículos preovulatorios, toma lugar durante la tarde y noche del proestro, mientras que el de 20 α -OH-P probablemente proviene de los cuerpos lúteos de ovulaciones anteriores. El incremento en la concentración sanguínea de progesterona de la tarde y noche del proestro ocurre casi



simultáneamente al incremento en la liberación de la hormona luteinizante (LH), que induce la ovulación ⁽¹⁹⁾.

Figura 5. Perfil de las concentraciones plasmáticas de progesterona, estradiol, LH y FSH durante los cuatro días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan el periodo de oscuridad en el que se encuentran los animales (18:00 - 06:00 h). Las flechas indican las concentraciones por arriba de las basales ("picos") de las diferentes hormonas, las cuales en general ocurren en el día del proestro y que son conocidas como pre-ovulatorias, excepto para progesterona en la tarde del diestro-1 y para la FSH en la madrugada del estro ⁽¹⁹⁾.

PATRONES DE SECRECIÓN DE LAS GONADOTROPINAS (Figura 5)

Patrón de secreción de LH durante el ciclo estral

Las concentraciones séricas de LH son bajas durante la mañana del estro (poco después de la ovulación), durante el diestro-1, el diestro-2 y antes del medio día del proestro⁽¹⁹⁾.

Desde el estro hasta el diestro-2, la LH se secreta de manera circádica, que consiste en una pequeña elevación de LH al medio día, con concentraciones bajas a la media noche de cada día. En la tarde del proestro, entre las 14:00 y 15:00 horas, la concentración circulante de LH comienza a incrementarse rápidamente y llega a un valor “pico”, entre las 17:00 y 19:00 horas. Después de este tiempo, la concentración circulante de LH empieza a disminuir hasta llegar a las concentraciones basales que se observan en mañana del estro. El “pico” de LH induce la ruptura folicular y la ovulación⁽¹⁹⁾.

La liberación de LH ocurre por medio de pulsos, con frecuencias de alrededor de 55 a 60 minutos, cuya amplitud varía de 15 a 40 ng/ml; concentraciones que se pueden detectar desde el diestro-1 a la mañana del proestro. Durante la tarde del proestro, la LH va a inducir la ovulación como resultado del aumento en la amplitud de los pulsos, que alcanzan hasta 600 ng/ml, sin que varíe la frecuencia de los mismos. La frecuencia y amplitud de los pulsos disminuye en la mañana del estro hasta que llegan a ser ausentes, y regresan a valores basales desde la mañana del diestro-1 y hasta el proestro^(2, 7, 19).

Patrón de secreción de FSH durante el ciclo estral

Los patrones de la secreción de FSH son similares a los de la LH. En el día del proestro la liberación de FSH aumenta simultáneamente con la de LH, entre las 14:00 y 15:00 horas, y las concentraciones llegan al máximo entre las 17:00 y 19:00 horas. Durante la mañana del estro ocurre otro aumento de FSH, la que comienza a bajar y llega a su concentración basal en la tarde del estro.

La liberación preovulatoria de FSH y de LH en la tarde del proestro depende del aumento en la amplitud y la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH hacia el

sistema porta hipotálamo–hipófisis, varias evidencias sugieren que en el segundo pico de la FSH del día del estro puede ser independiente del control hipotalámico. El primer pico en la liberación espontánea de FSH en el día del proestro es bloqueada al inyectar pentobarbital, pero al inyectar de nuevo GnRH en el día del proestro se vuelve a restaurar esta liberación de FSH. Esto indica que esta liberación de FSH depende directamente de un estímulo hipotalámico, pero el segundo pico que se da en el día del estro temprano es independiente del control hipotalámico y aparentemente es inducido por la disminución en la concentración de inhibina. ^(2, 5, 26)

La LH y la FSH son glicoproteínas que se encuentran en todos los mamíferos y están formadas por dos subunidades: la alfa, que es común para la LH y la FSH (α -gly), y otra, la beta, que es estructuralmente específica para cada gonadotropina (β -LH, β -FSH), que le confiere actividad biológica específica. Así mismo, cada gonadotropina tiene características sub-específicas en función de la cantidad de hidratos de carbono que contiene la molécula. Según Ulloa-Aguirre y col ⁽⁶⁵⁾, las isoformas de FSH tienen efectos específicos sobre las diferentes poblaciones celulares y compartimentos foliculares, así como en la maduración del ovocito. Las diferentes isoformas de FSH están determinadas por la cantidad de moléculas de carbohidratos que contenga la glucoproteína. Para el caso de la FSH, el ácido siálico afecta la actividad biológica de la FSH en dos formas: 1.- determinando su vida media en el plasma (una mayor incorporación de ácido siálico en la molécula aumenta su tiempo de circulación y por lo tanto su actividad biológica, y 2.- modificando su capacidad de unión al receptor (a mayor número de residuos de ácido siálico, menor actividad de unión ⁽¹¹⁾). Un efecto semejante se ha descrito para la LH, la diferencia radica en que para esta glucoproteína es la manosa, la que confiere las características fisicoquímicas y fisiológicas subespecíficas.

Los genes de expresión para las subunidades α -gly, β -LH y β -FSH han sido descritas en la glándula pituitaria anterior durante el ciclo estral de la rata. Durante el proestro, estro y diestro 1, el contenido del ARNm de la α -gly se mantiene bajo. ARNm de la subunidad β -LH es bajo en estro y diestro-1, aumenta a las 08:00 horas del diestro-2 y luego cae rápidamente para mantenerse bajo durante la mañana del proestro. A las 14:00 horas de este día comienza un segundo incremento que

disminuye rápidamente a las 17:00 horas; este “pico” precede a la secreción preovulatoria de LH ⁽⁶⁰⁾.

El contenido de ARNm de la cadena β -FSH aumenta a partir de las 20 hrs del proestro, alcanza el máximo a las 2 hrs del estro, retorna a concentraciones basales a las 8 hrs, permanece bajo hasta las veinte horas y aumenta a partir de las 23 hrs del mismo día y permanece elevado hasta la tarde del diestro-1. En el diestro 2, las concentraciones son menores que las observadas en los días del proestro y estro ^(19, 60, 65).

Después de la síntesis del ARNm que codifica para las subunidades β de FSH y LH, así como la subunidad α -gly, la síntesis de las hormonas polipeptídicas se lleva a cabo en los ribosomas. La estructura polipeptídica resultante es transportada al aparato de Golgi, donde suceden las modificaciones post- transduccionales que consisten en la glicosilación (adición de ácido siálico, entre otros carbohidratos, a las subunidades proteicas α y β), específica de cada gonadotropina y la sulfatación en el caso de la subunidad β -LH ⁽⁶⁰⁾.

La adición de ácido siálico a los carbohidratos terminales de las moléculas se realiza en la región “trans” del aparato de Golgi por un grupo de enzimas que pertenecen a la familia de las glicosiltransferasas, denominadas sialil transferasas ^(19, 60, 65).

EVENTOS NEURALES DURANTE EL CICLO ESTRAL

La secreción pulsátil de LH es resultado de la liberación pulsátil de la LHRH ó GnRH al sistema portal. Everett y Sawyer ⁽¹⁸⁾ mostraron que los mecanismos de la liberación de LH dependen de un control foto-periódico de 24 horas y que la administración de pentobarbital entre las 14:00 y las 15:45 horas del día del proestro bloquea la ovulación en el día del estro. El tratamiento con pentobarbital a otras horas del día no bloquea la ovulación, resultados que llevaron a los autores a sugerir que existe un “periodo crítico” y que durante ese intervalo ocurren eventos neurales que provocan la liberación de la LH y por lo tanto, la ovulación. Los periodos de luz y oscuridad actúan en la regulación del ciclo ovárico. Si la rata es mantenida en un

ambiente en el que se incrementan las horas de luz por día, gradualmente va perdiendo el ciclo (aumentan los días con frotis vaginal característico de la fase de diestro), hasta presentar cornificación vaginal o estro constante, cuando se mantienen en luz continua (17, 18, 19, 27).

Estudios previos muestran que el núcleo supraquiasmático (NSCh) del hipotálamo recibe señales que provienen del ritmo de luz/obscuridad del medio ambiente. Específicamente son conexiones neurales entre el NSCh y el ojo. La lesión o el aislamiento del NSCh evita la transmisión de fotoperiodicidad y en consecuencia altera el ciclo estral de las ratas. Uno de las señales que induce la liberación de LH, y subsecuentemente la ovulación, está dada por la duración de las horas de luz en el que se mantienen los animales y el momento en que la luz se enciende (19).

Neuronas peptidérgicas hipotalámicas que regulan el ciclo estral

En extractos de eminencia media, McCann (43) y Harris (24) sugirieron la existencia de una hormona hipotalámica que estimulaba la liberación de la hormona luteinizante (LHRH). En 1971, Schally y colaboradores (60) aislaron el decapeptido e identificaron su estructura química. Posteriormente, por medio de inmunoensayos e inmunohistoquímica se localizaron las neuronas (GnRHérgicas) responsables de la secreción de la GnRH. El decapeptido encontrado cumple con todas las características de una neurohormona: se localizan en neuronas, se libera hacia el sistema porta hipofisario y muestra actividades relacionadas con la liberación de LH y FSH en el plasma periférico (19, 24, 43, 60, 62).

Wheaton y colaboradores (67) midieron la GnRH por inmunoensayos en secciones congeladas de cerebro de rata y encontraron mayor actividad en el tallo infundibular y en la eminencia media; pequeñas pero significantes cantidades de GnRH fueron medidas en el hipotálamo anterior, el NSCh y en la zona rostral del área preóptica. La GnRH es encontrada en regiones de los órganos circunventriculares, particularmente en el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVL: estructura vascular en la punta del tercer ventrículo dentro del área preóptica).

Por medio de estudios inmunocitoquímicos se ha mostrado que las neuronas GnRHérgicas son pequeñas y se distribuyen rostro-caudalmente desde la diagonal

Banda de Broca (DBB) hacia la región premamilar y se extiende lateralmente hasta 2 mm de la línea media en la región preóptica y en el cerebro medio. Las células GnRHérgicas se encuentran concentradas en la diagonal Banda de Broca, la estría terminal, núcleo medial del septum, el área preóptica medial (MPOA), y el área hipotalámica anterior (AHA). También se ha detectado GnRH en el área supraquiasmática del hipotálamo medio basal ^(33, 64).

Las neuronas GnRHérgicas que se proyectan hacia la eminencia media (EM), están concentradas basalmente en las regiones de la línea media desde MPOA hasta el área retroquiasmática. Esas fibras terminan en los capilares del plexo primario del sistema portal hipotálamo–hipofisario ⁽⁶²⁾.

Diferentes moléculas de GnRH

En vertebrados, se han identificado 13 formas de GnRH (Tabla 1) ⁽⁴⁵⁾. Sin embargo, sólo dos o posiblemente tres pueden existir en cada especie de mamíferos. La GnRH de mamíferos (o GnRH-I) tienen un papel incuestionable en el control neural de la fertilidad. El otro deca péptido encontrado en mamíferos, la **GnRH-II** ^(45, 50) difiere en tres aminoácidos de la GnRH-I (pGlu – His – Trp – Ser – **His** – Gly – **Trp** – **Tyr** – Pro – Gly). La GnRH-II fue inicialmente aislada en el cerebro de pollo, por lo que se le denominó GnRH de pollo. La GnRH-II representa el más antiguo y es expresado en múltiples órganos del cuerpo de mamíferos ^(26, 46).

La GnRH-II participa en la regulación de la fertilidad, puede estimular la secreción de la LH y de la FSH en monos, ovejas y roedores, es más potente que la GnRH I en cuanto a la estimulación en la secreción de gonadotropinas ^(26, 44).

En la lamprea se ha identificado otro tipo de GnRH, la cual se nombró GnRH-III, que en el cerebro de humanos y ratas se distribuye de manera muy similar a la GnRH-I. La GnRH-III regula en forma muy específica la liberación de FSH ⁽²⁶⁾.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Jawed Vertebrates	Mammal	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	NH ₂
	Guinea pig	pGlu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro	Gly	NH ₂
	Chicken I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	NH ₂
	Rana d.	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	Gly	NH ₂
	Seabream	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH ₂
	Salmon	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	NH ₂
	Medaka	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH ₂
	Catfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly	NH ₂
	Herring	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH ₂
	Dogfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	NH ₂
Jawless Fish	Chicken II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly	NH ₂
	Lamprey III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly	NH ₂
	Lamprey I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly	NH ₂

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de las diversas moléculas de GnRH en diferentes especies (Tomada de Millar ⁴⁴).

CITOLOGÍA DE LA NEURONA GnRH

En varias especies, la neurona GnRHérgica es de tipo bipolar con una orientación oblicua que puede reflejar la dirección de la migración embrionaria a través del cerebro. En algunas especies tales como la oveja, la orientación y distribución se mantiene, pero son de tipo multipolar ^(26, 38, 46). En la rata, el ratón y el mono, las neuronas GnRHérgicas bipolares se han clasificado como lisas o espinosas ⁽²⁶⁾. Estructuralmente las neuronas espinosas son caracterizadas por varias protusiones citoplasmáticas y reciben conexiones sinápticas de las neuronas GnRHérgicas lisas, pero no hay diferencias en el número de sinapsis entre estos dos tipos neuronales ^(23, 26, 31, 46, 68). La relevancia funcional entre estas dos se desconoce, estos dos tipos de

células se distribuyen de igual forma en el hipotálamo, pero pueden ser modificadas por esteroides gonadales ⁽²⁶⁾.

Redes neuronales GnRHérgicas

Las neuronas GnRHérgicas reciben contactos sinápticos de neuronas que secretan glutamato, ácido gamma aminobutírico (GABA), noradrenalina (NA), GnRH, péptidos opioides y neuropéptido Y (NPY) ^(26, 45).

Glutamato.- Hay abundantes fibras glutamatérgicas en la EM y algunas establecen contactos sinápticos con la terminal de la neurona GnRHérgica ⁽²⁶⁾.

GABA.- Es el neurotransmisor inhibitorio principal en el sistema nervioso; actúa por medio de sus receptores GABA_A y GABA_B. En ratones, todas las neuronas GnRHérgicas expresan el receptor GABA_A ⁽²⁶⁾.

Liberación de GnRH

En la oveja, la liberación de la GnRH cambia de un patrón estrictamente episódico a uno no episódico, de liberación intermitente, con pulsos de alta frecuencia que se manifiestan poco antes de la liberación preovulatoria de la FSH y la LH ^(26, 45). La secreción preovulatoria de la GnRH parece estar compuesta por eventos pulsátiles de que se sobrepone a la liberación tónica de GnRH ^(26, 45). Este masivo incremento en la secreción de GnRH continua por 24 horas, más allá de la secreción preovulatoria de la LH que ella induce, antes de regresar al patrón tónico de liberación. En ratas, estudios realizados por microdiálisis en la EM, se mostró que la secreción de GnRH aumenta junto con la liberación de la LH, la cual es máxima en el día del proestro, como resultado del incremento en la amplitud y la frecuencia de los pulsos, así como en la cantidad de GnRH liberada. Se postula que este fenómeno podría ser resultado de la intensificación de la estimulación entre las neuronas GnRHérgicas, al activarse mutuamente por varias horas ⁽²⁶⁾.

LA ACETILCOLINA (ACh)

La ACh es el primer neurotransmisor descubierto. Se sintetiza a partir de la colina. La ACh está compuesta por acetato y colina, los cuales se unen mediante la

acción de la colino acetil transferasa (CAT); esta reacción tiene lugar en las terminales nerviosas de la neurona que la sintetiza ⁽²⁹⁾.

La fórmula química lineal de la ACh es: $\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{N} - (\text{CH}_3)_3$

La ACh se une a dos tipos de receptores: los nicotínicos y los muscarínicos. Los receptores nicotínicos están acoplados a canales iónicos, son más rápidos que los muscarínicos y generalmente excitatorios, se bloquean por el curare y se estimulan por la nicotina y la acetilcolina.

Los receptores muscarínicos están acoplados a la proteína G, son más lentos que los nicotínicos, son excitatorios o inhibitorios dependiendo de la célula blanco, son bloqueados por la atropina y estimulados por la muscarina, pilocarpina y acetilcolina ⁽²⁹⁾.

SÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO DE LA ACETILCOLINA (ACh)

La ACh (éster acético de la colina) es sintetizada en el citoplasma de la neurona a partir de la unión de Colina con Ácido acético, en presencia de Acetil – CoA, es almacenada en las vesículas sinápticas, las que son transportadas a las terminales nerviosas. La Colina es un alcohol nitrogenado (Trimetil-amin-cefanol), sintetizada en el hígado y transportada a la neurona por vía hemática. El ácido acético proviene de la Acetil – CoA formada primordialmente en la mitocondria. La Acetil – CoA se origina de 2 fuentes: del Piruvato, resultado de la acción de la Piruvato deshidrogenasa; o como producto de la activación de la enzima Acetil – CoA sintetasa (Acetatotiocinasa). La enzima colino-acetil-transferasa (CAT) es sintetizada en el cuerpo de la neurona y es transportada mediante flujo axoplásmico hasta los terminales, donde se activa. Esta enzima es específica de las terminaciones nerviosas colinérgicas. La ACh sintetizada es transportada y almacenada en las vesículas sinápticas. Se estima que cada vesícula contiene entre 1000 a 50 000 moléculas de ACh; y una sola terminación nerviosa motora contiene 300 000 o más vesículas. La colina es sintetizada, principalmente en el hígado y es transportada a otros órganos por vía sanguínea. La Colina libre se capta específicamente en las terminales nerviosas colinérgicas mediante una bomba de alta afinidad, dependiente de Na^+ ⁽²⁹⁾.

La Colina está presente en el espacio extracelular como resultado de la hidrólisis externa de la ACh previamente liberada. En todas las neuronas, incluso en algunas células gliales, parece existir un sistema de captación de colina de baja afinidad. La ACh, es el neurotransmisor específico en las sinapsis del Sistema Nervioso Somático (SNS) y en las sinapsis ganglionares del Sistema Nervioso Autónomo (SNA), así como en los órganos diana de la división parasimpática; y se encuentra también ampliamente distribuida en el encéfalo y es un neurotransmisor clave en la regulación de los estados de vigilia y del funcionamiento de grandes áreas de asociación. El acetato se deriva de la glucosa por vía del piruvato y del complejo piruvato deshidrogenasa mitocondrial que genera Acetil CoA. La CAT es una proteína globular se encuentra en el cerebro. La regulación de la síntesis de la ACh depende de la bomba de alta afinidad de la Colina, la cual es inhibida por un exceso de ACh y acelerada por bajas concentraciones del neurotransmisor ⁽²⁹⁾.

La ACh es degradada por la acetilcolinesterasa (AChE), la cual se une específicamente a la ACh, rompiéndola en las dos moléculas que la conforman; el acetato y la colina.

Otra fuente de colina proviene de la ruptura de fosfatidilcolina, la cual puede aumentar en respuesta a la liberación local de ACh. En el SNC estas fuentes metabólicas de colina pueden ser particularmente importantes, ya que la colina en el plasma no puede pasar la barrera hematoencefálica. Así, en el SNC, la captura de colina por transportadores de alta afinidad en las neuronas colinérgicas, no está limitada al suministro de colina, al menos durante la actividad sostenida. Esto puede ser una de las causas por la que no hay una mejora en demencias con precursores de colina como la lecitina ⁽²⁹⁾.

La liberación de ACh requiere de la entrada de Ca^{+2} extracelular, como resultado de la despolarización de la membrana e induce la movilización de las vesículas a la membrana plasmática de la terminal nerviosa. La mayoría de los investigadores creen que una corriente de Ca^{2+} dependiente del voltaje es el hecho que inicia la liberación de transmisor. Toda la ACh contenida dentro de la neurona colinérgica no se comporta como si estuviera dentro de un compartimento único. Hay al menos dos depósitos de

movilización de ACh: el depósito de movilización rápida y el depósito de reserva o estacionario ⁽²⁹⁾.

Aunque la ACh fue la primera sustancia reconocida como mensajero químico, la falta de una técnica de fluorescencia que revelara directamente la presencia de ACh en las neuronas de los sistemas nerviosos central y periférico a dificultado el estudio neuroanatómico de este sistema de neurotransmisión. Aunado la 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 se ha hecho con base en técnicas histoquímicas que revelan la presencia de enzimas de síntesis y desactivación de la ACh y apoyados posteriormente con el desarrollo de técnicas inmuno histoquímicas con anticuerpos policlonales y monoclonales, así como con marcadores radioactivos ⁽²⁹⁾.

Las neuronas colinérgicas se organizan 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 contiene los somas neuronales colinérgicos del núcleo cuneiforme de la formación reticulada mesencefálica que proyectan sus fibras hacia el tectum, el área pretectal, los cuerpos geniculados, el tálamo y el sistema límbico. La otra vía se encuentra en la sustancia negra y el núcleo tegmental ventral del cerebro medio existen neuronas colinérgicas cuyas proyecciones viajan a lo largo del haz tegmental ventral y atraviesan el hipotálamo y el subtálamo hasta llegar al tallo cerebral. En el núcleo submamilar del hipotálamo se encuentra un núcleo denso de neuronas colinérgicas ⁽²⁹⁾.

En el sistema nervioso central, la ACh está ampliamente distribuida y sus funciones son muy diversas, ya que se localiza en los núcleos cocleares, los centros respiratorios, en los pares craneales aferentes, en la formación reticular, en estructuras subtalámicas, en el núcleo cuneiforme, en los núcleos tegmentales. El papel de la acetilcolina también es importante en el diencefalo. En el hipotálamo, la activación colinérgica puede provocar hipotermia. También participa en la liberación de neurohormonas, como la antidiurética, la oxitocina, la hormona estimulante de la tiroides (TRH), la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y de la GnRH. En el

tálamo, parece prioritaria la actividad colinérgica en el funcionamiento del sistema talámico difuso y, consecuentemente, en la regulación de la actividad de vigilia de la corteza cerebral.

Los efectos centrales del bloqueo de los receptores muscarínicos provocan pérdida de la memoria y la atención, generan habla confusa y ataxia, confusión y desorientación ⁽²⁹⁾. Mediante el uso del antagonista marcado benzilato de quinuclidina (³H]QNB), se midió la cantidad de receptores muscarínicos en POA y en el hipotálamo de ratas adultas ovariectomizadas, mostrándose que hay un 30% más de receptores en POA que en el hipotálamo. Además, la cantidad de receptores muscarínicos en POA aumenta en el día del proestro y disminuye en el día del diestro-2. En cambio, en el hipotálamo no se observaron cambios significativos durante el ciclo estral. El tratamiento con estradiol aumentó en un 42% la unión del antagonista en POA y un 17% en el hipotálamo ⁽⁵²⁾.

El número de receptores a acetilcolina es regulado por hormonas esteroides. Rainbow ⁽⁵⁴⁾ demostró que el 17 β -estradiol incrementa la unión de la ³H]QNB en el hipotálamo y en el hipotálamo ventro medial ⁽⁵⁴⁾ de ratas hembras. Esta hormona también regula la actividad enzimática de la CAT y la AChE (acetilcolinesterasa), ya que la administración de benzoato de estradiol a ratas ovariectomizadas provoca un aumento en la actividad de ambas enzimas en POA ^(48, 52, 54). En el hipotálamo de ratas adultas ovariectomizadas, se mostró que el betanecol (agonista muscarínico) incrementa el número de receptores a estradiol. El tratamiento previo con sulfato de atropina (antagonista específico muscarínico) bloquea los efectos del betanecol ⁽³⁶⁾.

El análisis de saturación de la unión de la ³H]QNB en POA y en el hipotálamo de ratas ovariectomizadas hembras, mostró que en POA la unión es más alta que en el hipotálamo. Durante el ciclo estral, la unión no cambia en el hipotálamo pero sí en POA, siendo el proestro, la fase del ciclo en la que la actividad de unión es la más alta ⁽³⁶⁾.

La Colina es transportada del plasma a las neuronas por medio de un sistema de transporte de alta afinidad exclusivo de neuronas colinérgicas que depende de la concentración extracelular de sodio ⁽²⁹⁾.

En los ganglios del SNA, la ACh es la sustancia encargada de la transmisión de impulsos nerviosos de las neuronas preganglionares a las postganglionares. En el sistema nervioso parasimpático también media la transmisión entre la neurona post – ganglionar y el órgano efector. Además, es el mediador de la transmisión nerviosa de la placa motora terminal ⁽²⁹⁾.

La actividad de las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central, específicamente en POA tiene un ritmo sincronizado con el ciclo estral de la rata, ya que las concentraciones de ACh en esta área aumentan significativamente durante el periodo crítico del día del proestro ^(58, 16).

Estudios neurofarmacológicos sugieren la existencia de un componente colinérgico que regula la secreción de gonadotropinas, ya que la inyección subcutánea de sulfato de atropina bloquea la ovulación al inhibir la liberación de gonadotropinas ⁽¹⁶⁾.

Mediante el uso de betanecol se mostró que el número de sitios de unión al estradiol aumenta en el hipotálamo, estos resultados llevaron a sugerir a los autores que la droga regula el número de receptores a estrógenos, y que no interfiere con la modulación que ejercen la dopamina y la noradrenalina sobre los sitios de unión al estradiol. El betanecol puede elevar el número de sitios de unión a estrógenos al inducir la síntesis de nuevos receptores, ya que el betanecol no altera el número de sitios de unión al estradiol en el hipotálamo de la rata macho ⁽³⁵⁾.

La atropina es un antagonista muscarínico no selectivo porque se une a sus cinco receptores muscarínicos ^(12, 29). En el hipotálamo, los receptores que predominan son los muscarínicos M₂ ⁽²⁹⁾. Mediante estudios *in vitro* se ha mostrado que los antagonistas M₂ (metoctramina y AF-DX-116) estimulan la liberación de GnRH por la eminencia media, cuyos efectos son mayores en el día del estro y los mínimos en los de diestro ⁽³⁵⁾.

Los resultados experimentales sobre el papel del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas no son concluyentes dado que su función depende de la hora del día, de la fase del ciclo estral y de la porción izquierda o derecha de POA-AHA que se considere. Las primeras evidencias de la participación del

sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas provienen de los experimentos realizados por Everett y Sawyer⁽¹⁸⁾, al mostrar en la coneja (un animal de ovulación refleja) que el bloqueo del sistema colinérgico, por la inyección subcutánea de atropina, interrumpía la ovulación, cuando se administraba inmediatamente después del coito. En el caso de la rata, un animal de ovulación espontánea, cuando se inyecta en la mañana del proestro^(18, 42).

En la rata, la inyección subcutánea del sulfato de atropina (70 mg/100 g de peso), o su aplicación directa al tercer ventrículo cerebral (250 µg), entre las 11:00 y 13:00 hrs del proestro bloquea la secreción de LH, FSH y 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 en el sistema nervioso central, y que el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos alteran la secreción normal de GnRH⁽³⁷⁾.

En POA existen diferencias sexuales en el número de sitios de unión a los agonistas muscarínicos, siendo mayor en los machos que en las hembras. Por medio de estudios *in vitro* mostraron que en POA de la rata hembra, el número de receptores muscarínicos varían durante el ciclo estral. En la mañana del proestro aumenta la proporción de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos (60%), comparando a lo observado en diestro-2 o en la tarde del proestro (35%). Cuando porciones homogenizadas de POA se ponen en presencia de 17β-estradiol, los sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos cambian a sitios de unión de baja afinidad. 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⁽³⁵⁾.

Únicamente las hormonas sexuales (17β-estradiol y 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. Estos resultados llevaron a sugerir a los autores un vínculo entre el sistema colinérgico muscarínico y los mecanismos por los cuales los esteroides ováricos inducen la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis ⁽¹⁵⁾.

Evidencias experimentales muestran que el sistema colinérgico de POA–AHA presenta cambios cíclicos durante el ciclo estral, en el contenido de ACh, la actividad de las enzimas CAT y AChE, así como en el número y la afinidad de los receptores muscarínicos en POA – AHA ^(6, 8, 58). Durante el ciclo estral de la rata hembra, en POA-AHA existe un ritmo colinérgico endógeno. En el día del diestro-1 se observan las concentraciones máximas de ACh y en diestro-2 las mínimas. El número y la afinidad de los receptores muscarínicos también varía durante el día del ciclo estral. El marcaje con el agonista muscarínico [³H]-N-metil escopolamina muestra que la unión específica (B_{max}) y la constante de disociación (k_d) para dicho fármaco son máximas en el día del estro y disminuyen progresivamente en los demás días del ciclo estral ⁽⁵⁸⁾.

Domínguez y col. ⁽¹⁴⁾ mostraron que la sensibilidad del sistema colinérgico al sulfato de atropina varía durante el ciclo estral y la dosis necesaria para bloquear la ovulación en el 100% de los casos depende del día del ciclo y la hora en que se administre, siendo el diestro-1 el día más sensible, ya que en este día se requiere únicamente de 100 mg/kg peso para bloquear la ovulación.

El bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos (con atropina) impide la liberación de gonadotropinas inducida por la inyección de 2 mg de progesterona a animales ovariectomizados tratados con estrógenos ⁽³²⁾. El implante unilateral de acetilcolina en POA medial indujo un incremento significativo de las concentraciones plasmáticas de LH, 5 horas después ⁽³²⁾.

Los implantes de acetilcolina en la cama del núcleo de la estría terminal o en la amígdala medial incrementa la concentración sérica de LH. En cambio, el implante de noradrenalina en el septo lateral indujo la liberación de LH ⁽³²⁾.

EFFECTOS FUNCIONALES ASIMÉTRICOS 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 los ovarios, es asimétrica.

Núcleos o áreas específicas del hipotálamo responden de manera asimétrica a las hormonas esteroides, ya que el implante de estradiol en lado derecho del POA o del núcleo ventromedial, de ratas hembras de cinco 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 las zonas hipotalámicas del lado izquierdo ocurre defeminización (los animales no tienen ciclos estrales) ⁽⁵¹⁾.

En la rata adulta hemiovariectomizada, el lado derecho del área hipotalámica anterior (AHA) parece jugar un papel preponderante en la regulación del proceso de hipertrofia compensadora del ovario (HCO) que ocurre en el ovario *in situ*, ya que en la rata con ovariectomía unilateral, la lesión por radiofrecuencia del lado derecho de esa área hipotalámica previene la HCO, en tanto que la lesión del lado izquierdo no la modifica ⁽²⁰⁾.

En la rata prepúber, la HCO parece estar controlada por el hipotálamo izquierdo, ya que su deaferentación bloquea este proceso, en tanto que la deaferentación del hipotálamo derecho no la modifica ⁽⁴⁹⁾. La lesión unilateral de esa misma área del hipotálamo con ácido kainico, bloquea HCO sólo si la lesión y la ovariectomía unilateral se hacen del mismo lado ⁽⁴⁹⁾.

Los receptores muscarínicos de POA–AHA regulan en forma asimétrica la secreción de la GnRH y la ovulación, asimetría que cambia durante el ciclo estral ^(7, 9). Esta afirmación se basa en los siguientes hechos:

- A las 13:00 horas del estro, el implante de atropina en la porción derecha de POA–AHA bloquea la ovulación, mientras que el implante del lado izquierdo no lo hace.

- Si el fármaco se coloca en el día del diestro-1, ambos implantes (los del lado izquierdo y lado derecho) bloquean la ovulación
- En el día del diestro-2, sólo los implantes del lado izquierdo interrumpen la ovulación.
- En proestro ninguno de los implantes, izquierdo o derecho, la modifican

La estimulación del sistema colinérgico de POA-AHA, mediante implantes de pilocarpina, tiene un efecto opuesto al bloqueo con atropina ⁽⁴⁰⁾:

- En estro, los implantes de pilocarpina en el lado izquierdo provocan el bloqueo de la ovulación, mientras que las del lado derecho no la afectan.
- En los días de diestro, tanto el implante del lado izquierdo como el derecho impiden la ovulación.
- En proestro los efectos son muy semejantes a los observados en el día del estro.

La falta de ovulación en animales con el implante unilateral de atropina en POA-AHA modifica la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de LHRH sintético a las 14 hrs de ese día, induce la ovulación en ratas ⁽⁷⁾.

Esta modificación en la secreción fásica de la GnRH parece ser el resultado de una alteración en el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos en la porción derecha de POA-AHA, ya que al restablecer esta señal ovárica en la tarde del diestro-2 (inyección sc. de 10 µg benzoato de estradiol), induce la ovulación sólo en aquellos animales con implante de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA ⁽⁷⁾.

La actividad neural del sistema colinérgico que regula la ovulación varía de manera circádica y asimétrica durante el ciclo estral, ya que en el lado derecho de POA-AHA la actividad de la CAT cambia significativamente durante el ciclo estral, la mayor actividad se observa en el día del estro y la menor en diestro-2. Mientras que la actividad de la enzima del lado izquierdo se mantiene constante durante todo el ciclo ⁽⁵⁸⁾.

En la rata (tanto en el macho como en la hembra), la cantidad de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal (HMB) es significativamente mayor que en el izquierdo ⁽²¹⁾. En POA-AHA la cantidad de ARNm para RE α tiene un máximo en la tarde del estro (17:00 hrs), seguido de un aumento de menor magnitud al medio día del diestro-2 (13:00 hrs). Mientras que para el RE β y para GnRH, la máxima expresión del gen se observa al medio día del diestro-2 (13:00 hrs). Estas variaciones durante el ciclo estral son asimétricas de tal forma que el lado de POA-AHA que expresa más ARNm para el RE α o para la GnRH es el lado derecho, mientras que para el RE β no existe asimetría. Sin embargo, en el lado izquierdo la expresión máxima del ARNm para el RE β ocurre de las 09:00 a las 13:00 hrs; en cambio en el lado derecho el “pico” para este mensajero sólo ocurre a las 09:00 hrs del diestro-2 ⁽¹⁾.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

POA-AHA regula en forma asimétrica la secreción de las gonadotropinas y la ovulación. En esta regulación diferencial entre una porción y otra del hipotálamo participa el sistema colinérgico, el cual es asimétrico en su función (expresada como actividad de la CAT, la cantidad de acetilcolina, el número y afinidad de los receptores muscarínicos) y varía durante el ciclo estral ⁽⁶⁾. Previamente se ha mostrado que el bloqueo unilateral de los cinco tipos de receptores muscarínicos de POA-AHA, mediante el implante de atropina a las 13:00 horas de los días del estro o del diestro-2 provoca efectos asimétricos sobre la ovulación. Mientras que en los días del diestro-1 y del proestro no se observa esta asimetría ⁽⁹⁾.

Estos efectos resultan de la alteración en la secreción fásica de GnRH, ya que el reemplazo de esta hormona a ratas implantadas con atropina en POA-AHA, provoca que el 100% de las ratas ovulen en la mañana del estro esperado ⁽⁷⁾. En estos grupos experimentales, la inyección de hCG induce la ovulación en todos los animales que no habían ovulado por el implante unilateral de atropina en POA-AHA ⁽⁷⁾.

La atropina es un antagonista muscarínico no selectivo, es decir que se une a los cinco receptores de este tipo ⁽²⁹⁾. En el hipotálamo, los receptores que predominan son los muscarínicos M₂ ⁽²⁹⁾. Mediante estudios *in vitro* se ha mostrado que los antagonistas

M₂ (metoctramina y AF-DX-116) estimulan la liberación de GnRH por la eminencia media, cuyos efectos son mayores en el día del estro y los mínimos en los de diestro (35).

Con la finalidad de estudiar cual de los receptores muscarínicos generan los efectos asimétricos en la ovulación, en este estudio se analizarán los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos M₂ en los lados izquierdo o derecho de POA-AHA, durante el ciclo estral, sobre la ovulación de la rata adulta.

HIPÓTESIS

Dado que el número y la afinidad de los receptores muscarínicos en el hipotálamo cambia durante el ciclo estral, que el bloqueo de estos receptores, mediante el implante unilateral de atropina en POA-AHA, provoca efectos asimétricos sobre la ovulación espontánea de la rata durante el ciclo y que el bloqueo de los receptores muscarínicos M₂ estimula la secreción de la GnRH en la eminencia media, entonces el bloqueo de estos receptores estimulará la ovulación espontánea de la rata, en función del lado y del día del ciclo estral estudiado.

OBJETIVO

Estudiar los efectos del bloqueo unilateral de los receptores muscarínicos M₂ de POA-AHA durante el ciclo estral, sobre la ovulación, el peso de los ovarios y del útero de la rata adulta.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ★ Estudiar en cada uno de los días del ciclo estral, los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos M₂, por la micro-inyección de metoctramina, en el lado **izquierdo** de POA-AHA sobre el porcentaje de animales que ovulan al estro esperado, el número de ovocitos liberados, el peso de los ovarios y del útero.
- ★ Estudiar en cada uno de los días del ciclo estral, los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos M₂, por la micro-inyección de metoctramina, en el lado **derecho** de POA-AHA sobre el porcentaje de animales que ovulan al estro esperado, el número de ovocitos liberados, el peso de los ovarios y del útero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas (190-230 g) 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) y al agua. A las



12:30 horas del estro, diestro-1, diestro-2 o del



proestro, grupos de ratas (n= 8-10) fueron anestesiados con 25 mg/kg de pentobarbital sódico (Pb) por vía intraperitoneal. Una vez anestesiados se colocaron en un aparato estereotáxico (Kopf Instruments, Modelo 900, Sweeden), se rasuró la zona dorsal de la cabeza (donde

se localizan los huesos parietales) con una navaja de acero inoxidable, se realizó una incisión en el cuero cabelludo, se esterilizó por medio de la aplicación de agua oxigenada y se eliminó el exceso de tejido con un hisopo de algodón. Una vez limpia el área, se ubicó el punto Bregma (punto donde coinciden la unión de los dos huesos parietales con el frontal), o punto cero del Atlas del cerebro de la rata ⁽³⁵⁾. Las coordenadas utilizadas para llegar a POA-AHA fueron: AP= -0.04 mm, LM= \pm 0.06 mm y V= 8.6 mm a partir de la meninge.

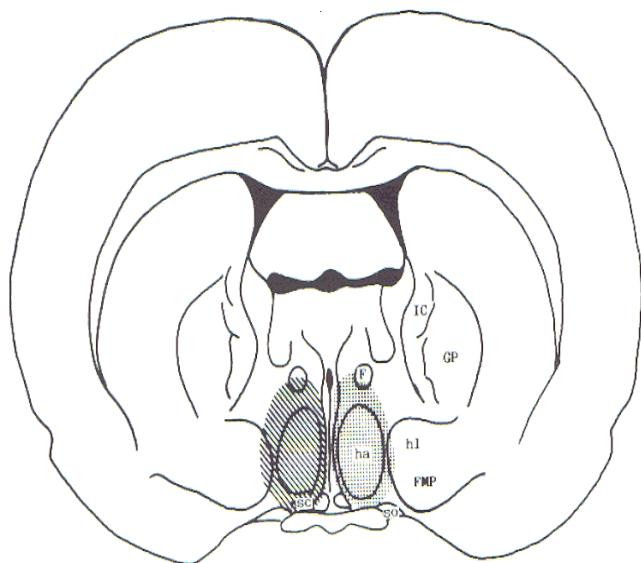


Una vez en la zona de estudio, a cada animal se le inyectó 1 μ l de una solución de 10 ó 20 pg metocramina (MTC₁₀, MTC₂₀) durante un minuto, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. Los grupos de animales con operación simulada recibieron 1 μ L de solución salina. Otro grupo de comparación fue el de animales intactos, que no recibieron ningún tratamiento y que fueron sacrificados en el día del estro.

Procedimiento de autopsia

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 10:00 y 11:00 horas del día del estro esperado del ciclo estudiado. A la autopsia se extrajeron las trompas uterinas, en cada una de ellas se contó el número de ovocitos con ayuda de un microscopio estereoscopio. Se disecaron y pesaron el útero y los ovarios.

El cerebro de todos los animales fue disecado, colocado en formaldehído al 4% durante 48 horas. Después de este tiempo se enjuagó con agua corriente para eliminar el exceso de formol y se colocó en un vibrátomo. Los cerebros fueron cortados en secciones coronales, de forma seriada a 30 μm . Posteriormente, bajo un microscopio estereoscopio se ubicó el trayecto y la zona de la aguja de inyección. Sólo se utilizaron los resultados de los animales cuya inyección se ubicó en la zona de estudio.



Zona de estudio: Área Preóptica Hipotalámica Anterior (POA-AHA), parte izquierda y derecha (Tomada de König y Kilpel⁽³⁴⁾).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

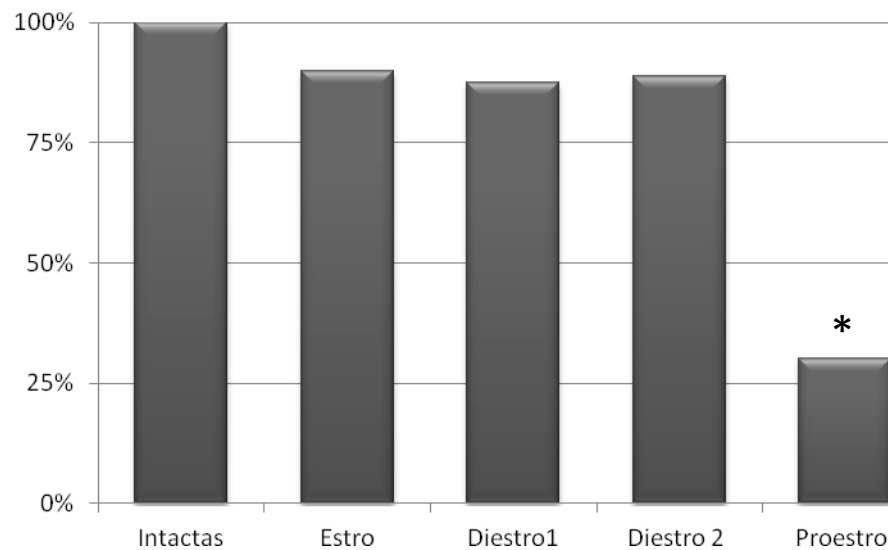
Los resultados del número de animales que ovularon con respecto a los que no lo hicieron se analizaron por medio de la prueba de χ^2 ; los resultados del número de ovocitos liberados se analizó por la prueba de Kruzkall-Wallis seguida de la prueba de "U" Mann-Withney. Mientras que los datos del peso de los ovarios y del útero se analizaron mediante la prueba de análisis de varianza (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 $\leq 5\%$.

RESULTADOS

1.- Efectos de la Anestesia provocado por la administración de pentobarbital sódico.

Animales Ovulantes:

Con respecto al grupo de ratas intactas, la inyección del pentobarbital sódico a las 12:30 hrs del proestro bloqueó la ovulación en la mayoría de los animales tratados (Gráfica 1).

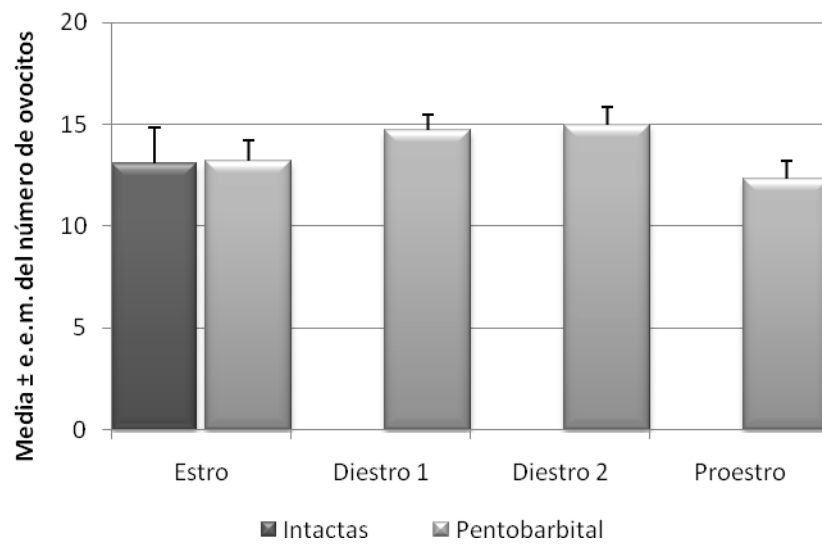


* $p < 0.05$ vs. Intactas (Prueba χ^2)

Gráfica 1. Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado, después de ser inyectados por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico.

Ovocitos Liberados:

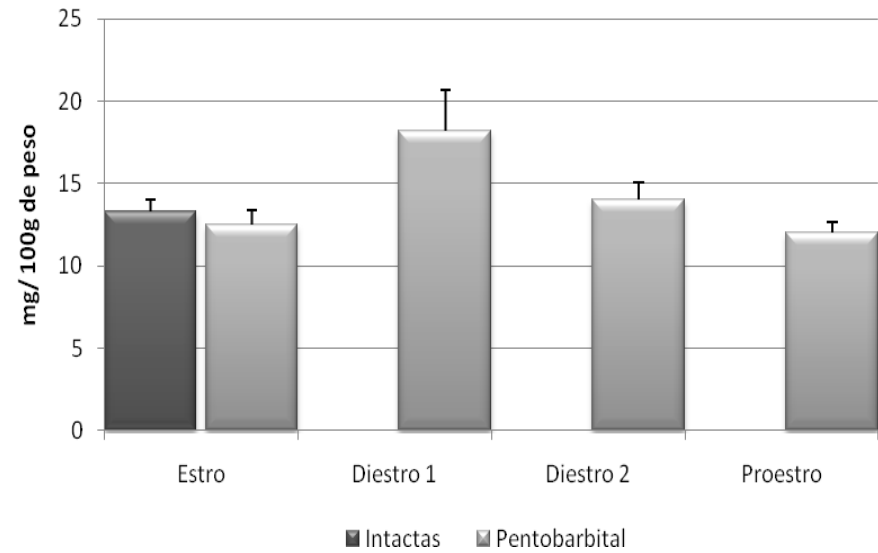
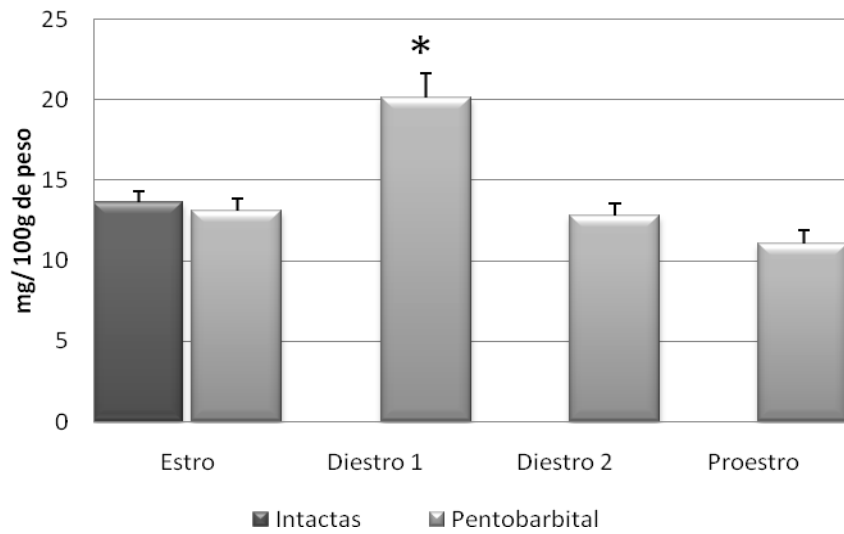
El número total de ovocitos liberados por animal ovulante no se modificó por la anestesia en ninguno de los días del ciclo estral (Gráfica 2).



Gráfica 2. Efecto de la anestesia sobre el número de ovocitos liberados por animal ovulante.

Peso de los Ovarios:

Con respecto a los animales intactos sacrificados en el día del estro, el peso del ovario izquierdo aumentó en los animales anestesiados en el diestro-1 (Gráfica 3). En cambio, el del ovario derecho no se modificó (Gráfica 4).



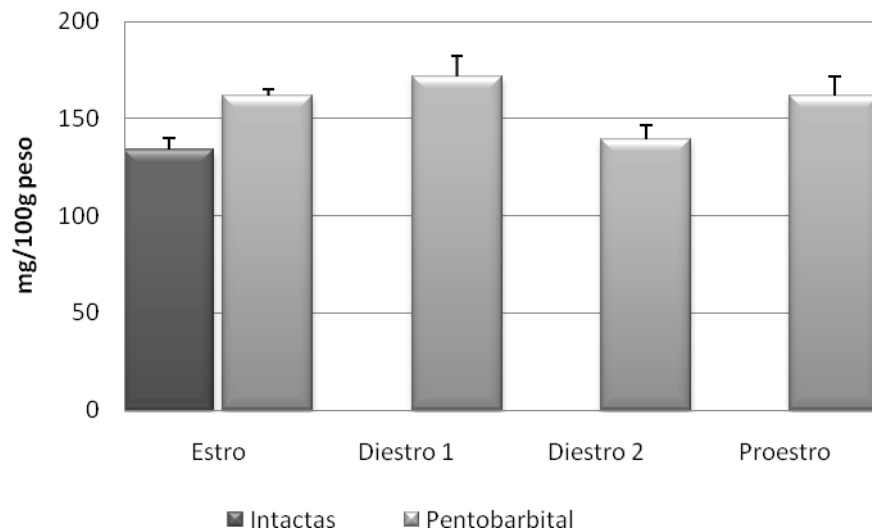
* $p < 0.01$ vs. Intactas (ANDEVA, seguida de la Prueba Tukey-Kramer)

Gráfica 3. Efecto del pentobarbital sódico sobre el peso del ovario izquierdo (media \pm e.e.m.)

Gráfica 4. Efecto del pentobarbital sódico sobre el peso del ovario derecho (media \pm e.e.m.)

Peso del Útero:

El peso del útero no se modificó en los animales anestesiados en las diferentes fases del ciclo estral (Gráfica 5)

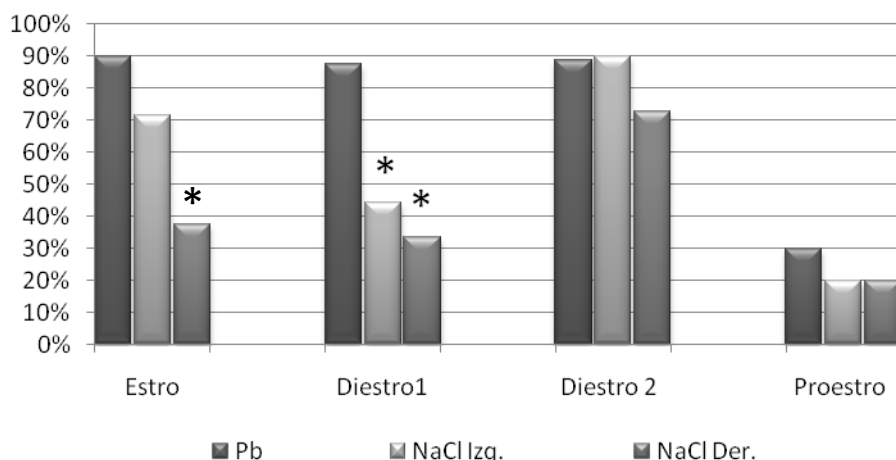


Gráfica 5. Efecto de la anestesia sobre el peso del útero (media ± e.e.m.)

Efectos de la micro-inyección de NaCl en POA-AHA

Animales Ovulantes:

Con respecto a los animales anestesiados, cuando los animales se inyectaron en diestro-1, la micro-inyección de **NaCl** en el lado izquierdo de POA-AHA provocó que menos animales ovularan en el día del estro esperado. Un efecto semejante se observó cuando los animales fueron microinyectados en la porción derecha de POA-AHA en el día del diestro-1 o del estro (Gráfica 6).

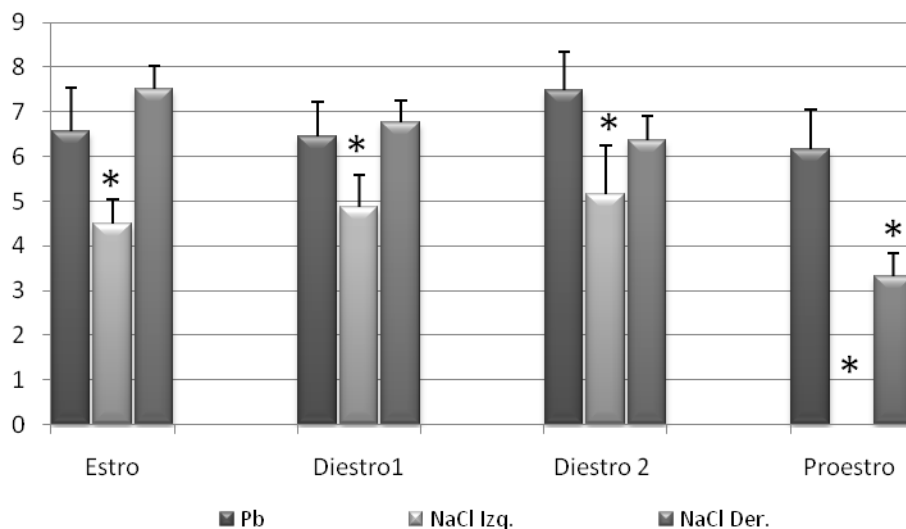


* $p < 0.05$ vs. Pb (Prueba χ^2)

Gráfica 6. Efecto de la microinyección de suero fisiológico en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado

Ovocitos Liberados:

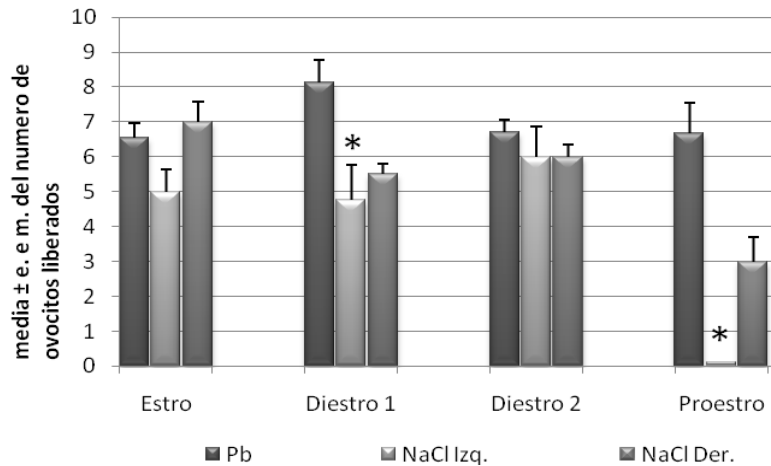
Con respecto al grupo de animales anestesiados, la micro-inyección de NaCl en el lado izquierdo de POA-AHA en las fases de estro, diestro-1 y diestro-2 provocó disminución del número total de ovocitos liberados, en el día del proestro ovuló solo un animal 11 ovocitos, mientras que el tratamiento realizado en la porción derecha, disminuyó los ovocitos liberados únicamente cuando se realiza en el proestro (Gráfica 7).



Gráfica 7. Efecto de la micro-inyección de NaCl en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre el número total de ovocitos liberados (media \pm e.e.m.)

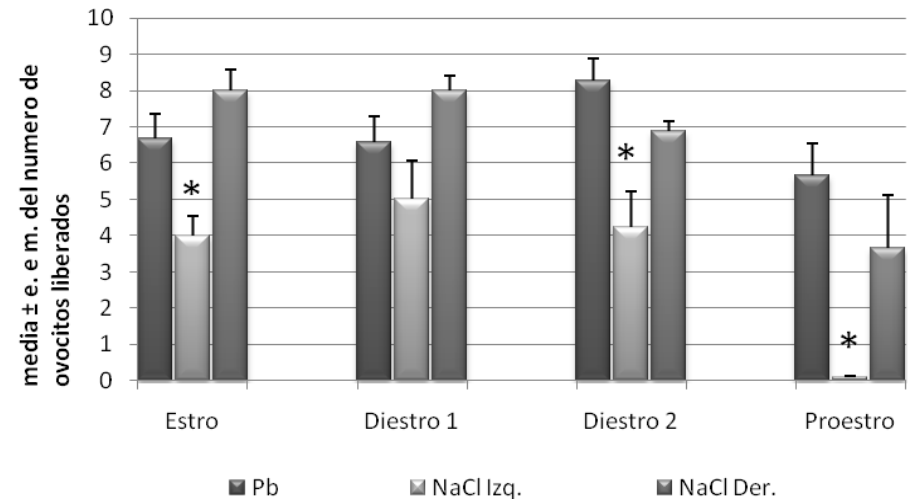
* $p < 0.05$ vs. Pb (Prueba Kruskal-Wallis seguida de "U" de Mann-Withney)

Cuando se analizan los resultados del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo se observó que las ratas inyectadas con la solución salina en el lado izquierdo de POA-AHA, en la fase del diestro -1 provocó que este ovario liberara menos ovocitos con respecto a los del grupo de ratas anestesiadas, en el día del proestro solo ovularon 2 animales con 6 y 5 ovocitos liberados en el ovario izquierdo, mientras que en el lado derecho se liberaron 5 y 6 ovocitos (Gráfica 8). Mientras que al inyectar la solución salina del lado derecho de POA-AHA provocó una disminución en el número de ovocitos en los días del estro, diestro -2 y el día del proestro (Gráfica 9).



* $p < 0.05$ vs. Pb (Prueba Kruskal-Wallis seguida de "U" de Mann-Withney)

Gráfica 8. Efecto de la micro-inyección de NaCl en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo.

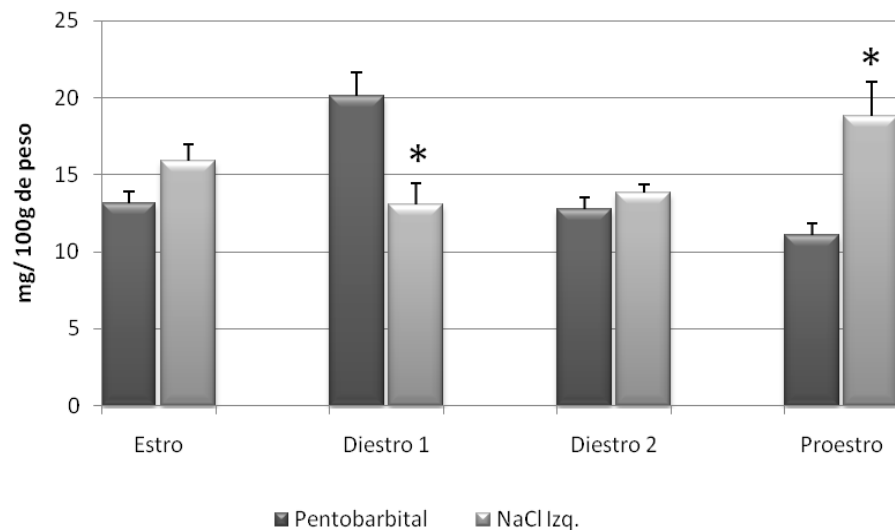


* $p < 0.05$ vs. Pb (Prueba Kruskal-Wallis seguida de "U" de Mann-Withney)

Gráfica 9. Efecto de la micro-inyección de NaCl en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre el número de ovocitos liberados por el ovario derecho.

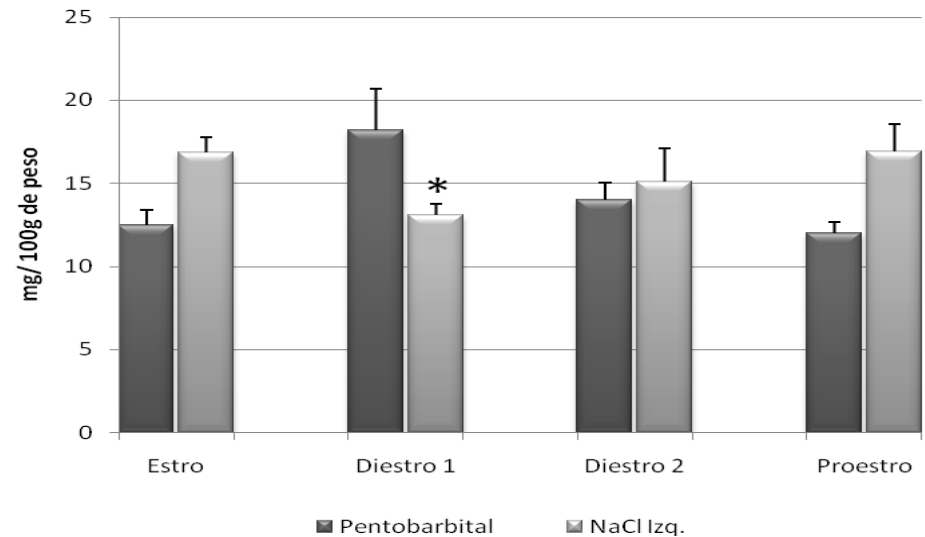
Peso de los Ovarios:

La microinyección de NaCl en el lado izquierdo POA-AHA, llevada a cabo en el día del proestro, aumentó el peso del ovario **izquierdo** con respecto al grupo de animales anestesiados con el barbitúrico (Gráfica 10). En cambio el peso del ovario derecho no se modificó por este tratamiento experimental (Gráfica 11).



* $p < 0.01$ vs. pentobarbital (ANDEVA seguida de la Prueba Tukey-Kramer)

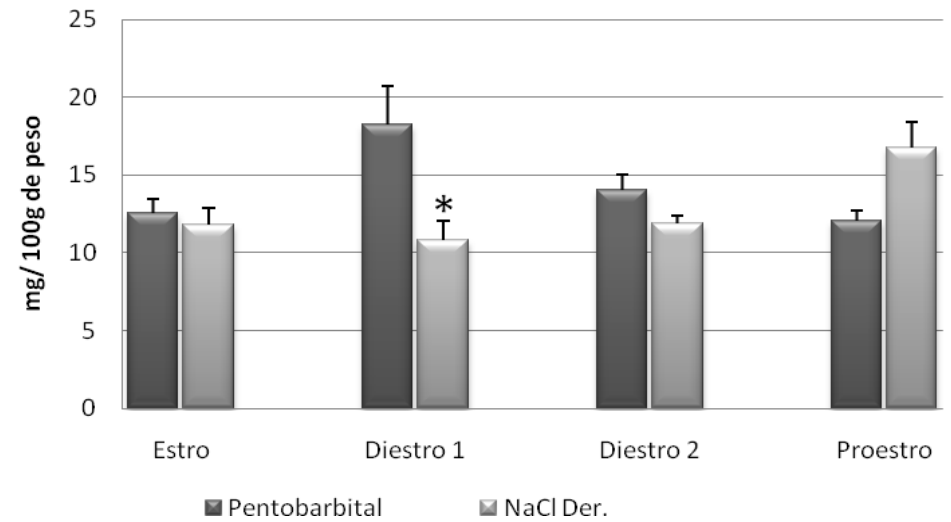
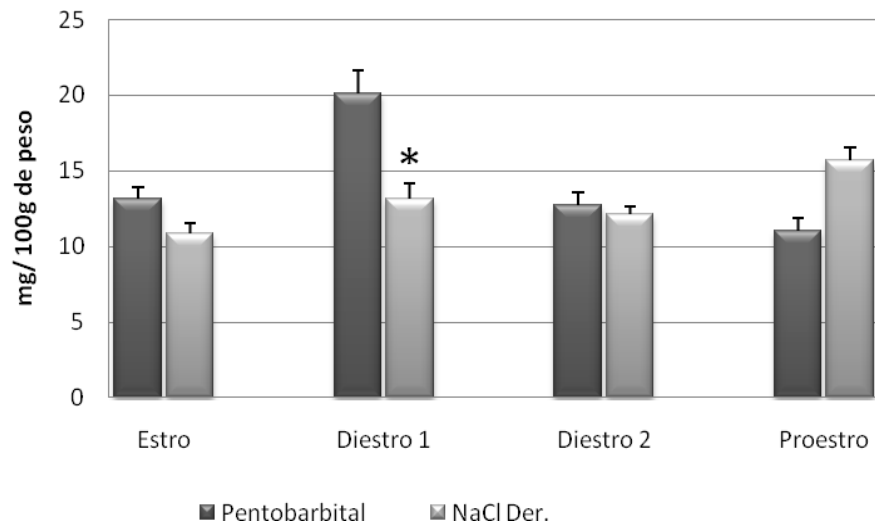
Gráfica 10. Efectos de la microinyección de NaCl en el lado izquierdo de POA-AHA sobre el peso del ovario izquierdo (media \pm e.e.m.).



* $p < 0.01$ vs. pentobarbital (ANDEVA seguida de la Prueba Tukey-Kramer)

Gráfica 11. Efectos de la microinyección de NaCl en el lado izquierdo de POA-AHA sobre el peso del ovario derecho (media \pm e.e.m.).

La microinyección de NaCl en el lado **derecho** de POA-AHA, realizada en la fase de diestro-1, disminuyó tanto el peso del ovario izquierdo (Gráfica 12) como el derecho (Gráfica 13), con respecto a los animales anestesiados.



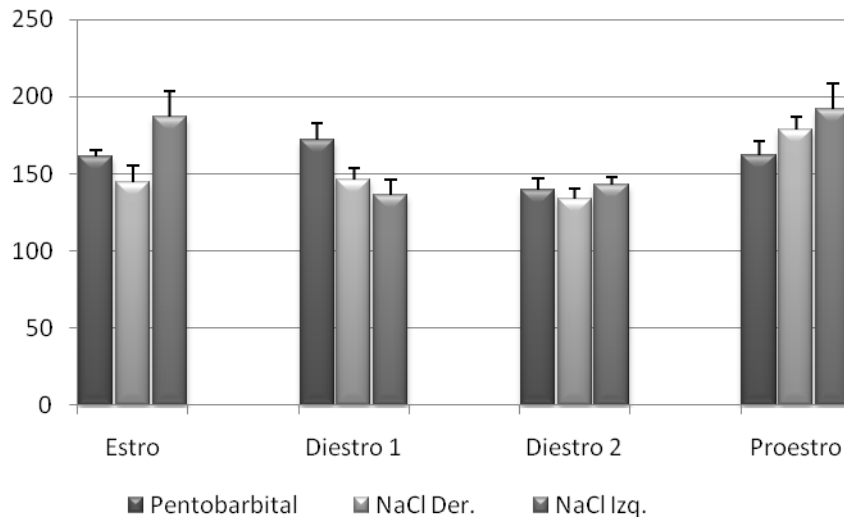
* $p < 0.001$ vs. pentobarbital (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey-Kramer)

Gráfica 12. Efectos del NaCl inyectado del lado derecho de POA-AHA sobre el peso del ovario izquierdo (media \pm e.e.m.).

Gráfica 13. Efectos del NaCl inyectado del lado derecho de POA-AHA sobre el peso del ovario derecho (media \pm e.e.m.).

Peso del Útero:

La microinyección NaCl en uno u otro lado POA-AHA no modifico el peso del útero (Gráfica 14).

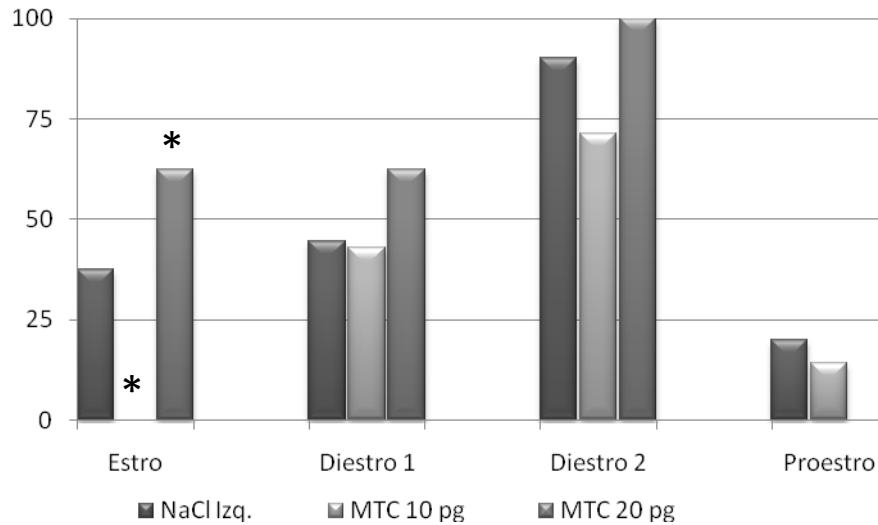


Grafica 14. Efectos de la micro-inyección de NaCl en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre el peso del útero (media ± e.e.m.).

Efectos de la microinyección de MTC en el lado izquierdo de POA-AHA

Porcentaje de Animales Ovulantes:

Con respecto a los animales microinyectados con NaCl, en el día del estro, la microinyección de 10 pg de MTC en POA-AHA del lado izquierdo resultó en un menor porcentaje de animales que ovularon. En cambio, la inyección de 20 pg provocó aumento del porcentaje de animales ovulantes (Gráfica 15).

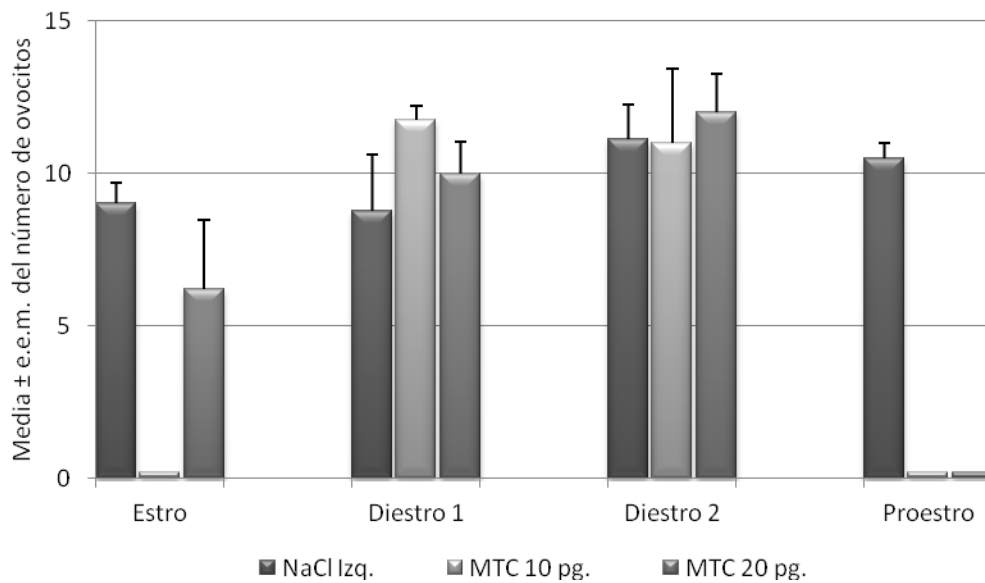


* $p < 0.0001$ vs. NaCl. Izq. (Prueba χ^2)

Gráfica 15. Efectos de la MTC en POA-AHA del lado izquierdo sobre el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado.

Ovocitos liberados:

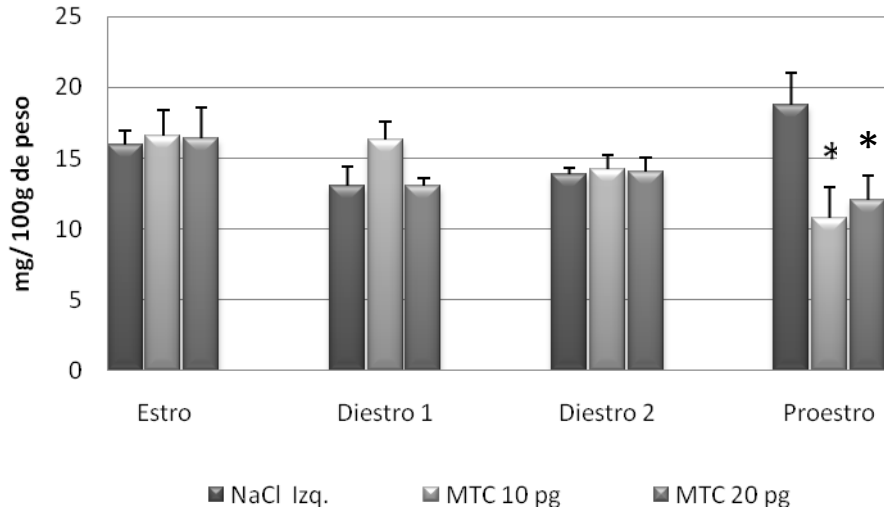
En los animales microinyectados con MTC en el lado izquierdo de POA-AHA no se modificó el número de ovocitos liberados con respecto a los microinyectados con NaCl (Grafica 16).



Grafica 16. Número de ovocitos liberados en los animales microinyectados con MTC en POA-AHA del lado izquierdo durante el ciclo estral.

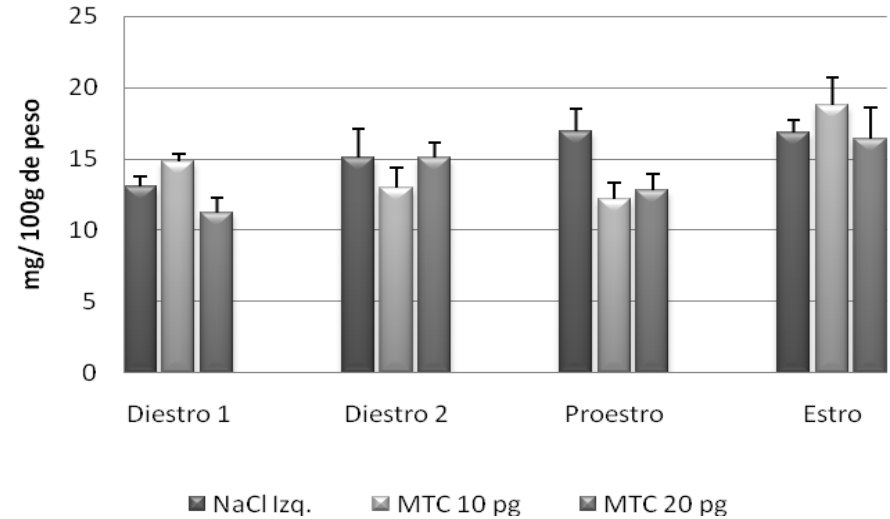
Peso de los Ovarios:

La microinyección de MTC del lado izquierdo de POA-AHA disminuyó el peso del ovario izquierdo sólo en el día del proestro (Gráfica 17), con respecto a la microinyección de NaCl; mientras que en el ovario derecho no tuvo efectos (Gráfica 18).



* $p < 0.01$ vs. NaCl Izquierdo (ANDEVA seguida de la Prueba de Tukey-Kramer)

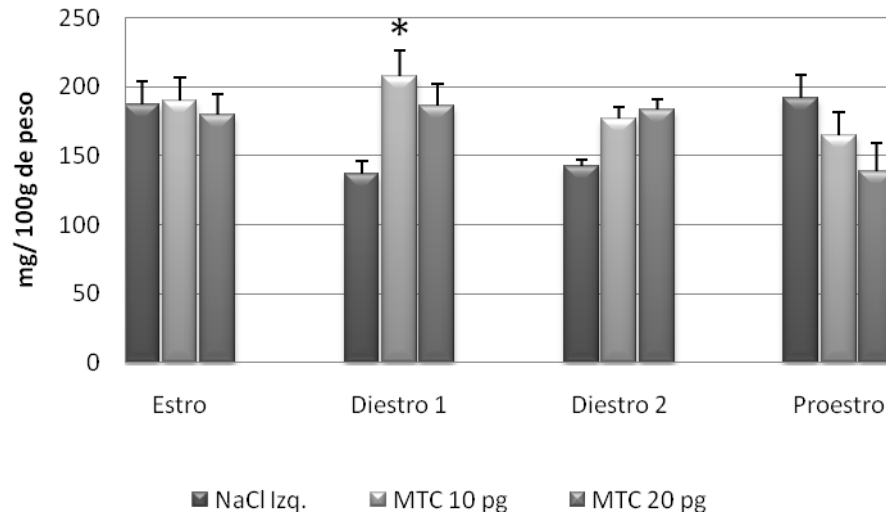
Gráfica 17. Media \pm e.e.em. del peso del ovario izquierdo en los animales microinyectados con MTC en POA-AHA del lado izquierdo durante el ciclo estral.



Gráfica 18. Media \pm e.e.em. del peso del ovario derecho en los animales microinyectados con MTC en POA-AHA del lado derecho durante el ciclo estral.

Peso del Útero:

La microinyección de 10 pg de MTC en POA-AHA del lado izquierdo, realizada en el día del diestro 1 provocó aumento del peso del útero (Gráfica 19).



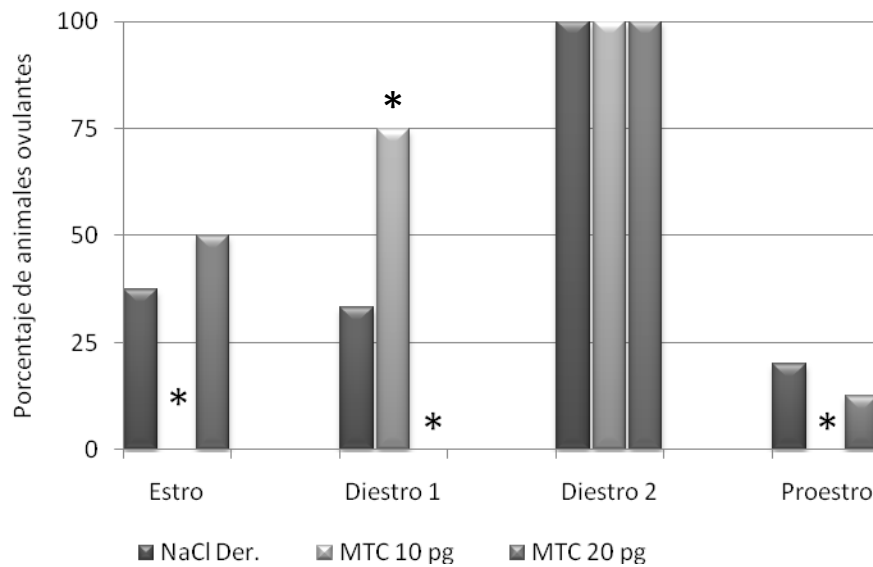
* $p < 0.01$ vs. NaCl Izquierdo (ANDEVA seguida de la Prueba de Tukey-Kramer)

Gráfica 19. Media \pm e.e.em. del peso del útero en los animales microinyectados con MTC en POA-AHA del lado izquierdo durante el ciclo estral.

Efectos de la microinyección de MTC en el lado derecho de POA-AHA

Porcentaje de animales ovulantes:

Con respecto a los animales microinyectados con NaCl, la micro-inyección de 10 pg de MTC en el día del estro disminuyó significativamente el porcentaje de animales ovulantes. En cambio en el día del diestro-1 provoco un efecto contrario, es decir, aumentó el porcentaje de animales ovulantes. La microinyección de 20 pg de MTC en el día del diestro-1 bloqueó la ovulación (Gráfica 20).

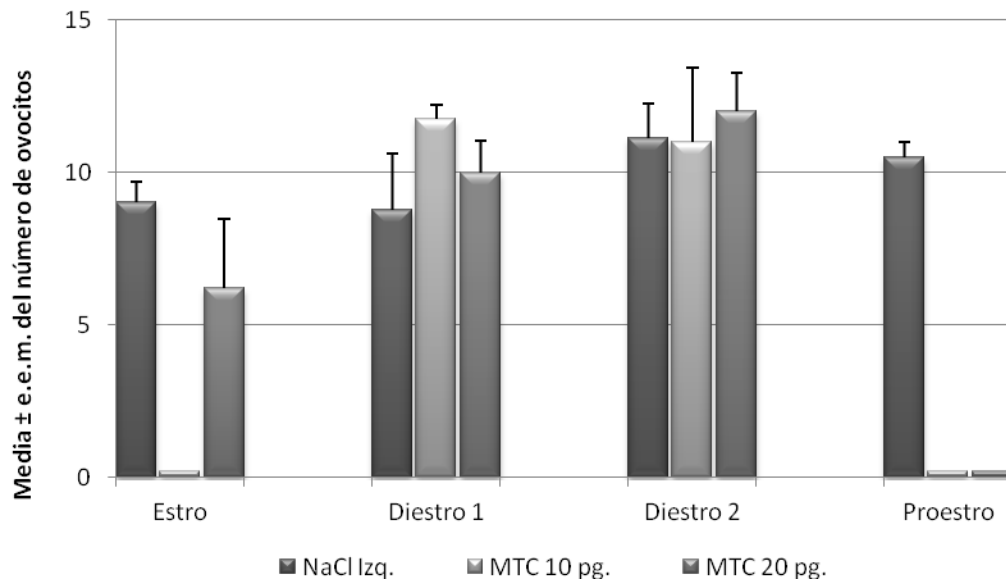


* $p < 0.05$ vs. NaCl (Prueba χ^2)

Gráfica 20. Efectos de la MTC en POA-AHA del lado derecho sobre el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado.

Ovocitos liberados:

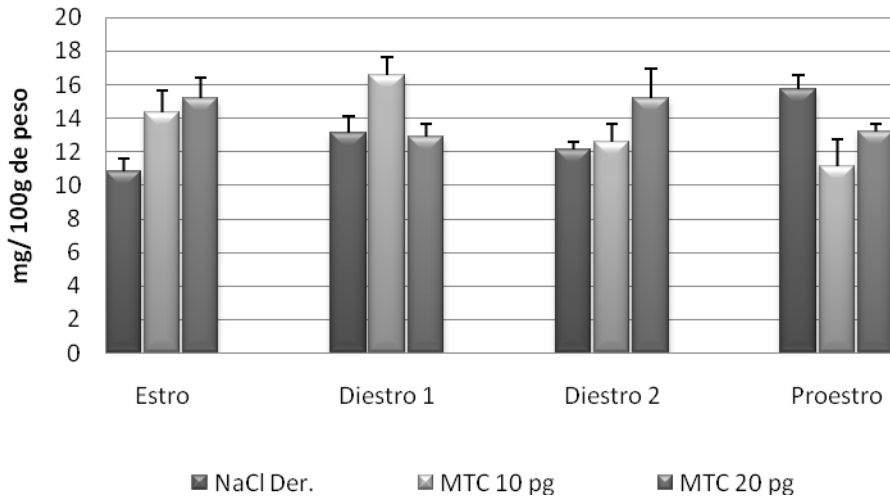
En los animales microinyectados con MTC en el lado izquierdo de POA-AHA no se modificó el número de ovocitos liberados con respecto a los microinyectados con NaCl (Grafica 21).



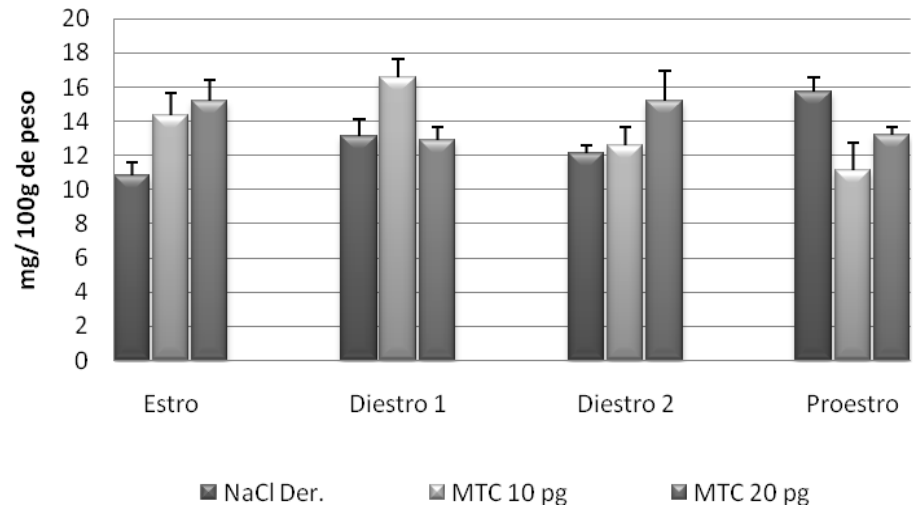
Grafica 21. Número de ovocitos liberados en los animales microinyectados con MTC en POA-AHA del lado izquierdo durante el ciclo estral.

Peso del Ovario Izquierdo:

La microinyección de MTC en POA-AHA del lado derecho durante el ciclo estral no provocó ningún efecto sobre el peso de los ovarios (Gráfica 22 y 23).



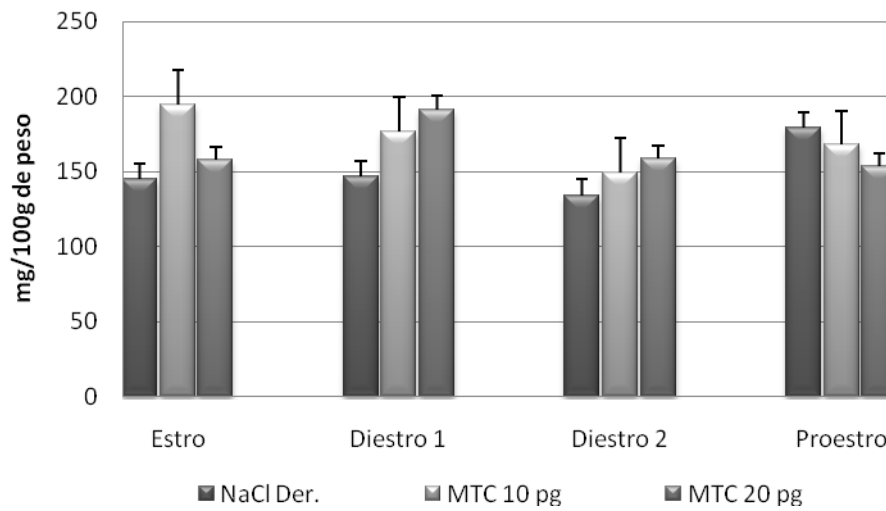
Grafica 22. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo en los animales microinyectados con MTC en POA-AHA del lado izquierdo durante el ciclo estral.



Grafica 23. Media \pm e.e.m. del peso del ovario derecho en los animales microinyectados con MTC en POA-AHA del lado izquierdo durante el ciclo estral.

Peso del Útero:

La microinyección de MTC en POA-AHA del lado derecho no modificó el peso del útero (Gráfica 24).



Gráfica 24. Media \pm e.e.m. del peso del útero en los animales microinyectados con MTC en POA-AHA del lado derecho durante el ciclo estral.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La inyección de pentobarbital en la mañana del proestro bloquea la ovulación, posiblemente como resultado del bloqueo de la secreción fásica de la GnRH y por ende de las gonadotropinas, ya que este anestésico atraviesa la barrera hematoencefálica y modifica el componente lipídico de la membrana, provocando el fenómeno de fluidificación, e interfiriendo con el intercambio rápido de los iones cloro, sodio, potasio, calcio y con la liberación de neurotransmisores ⁽⁶⁶⁾. Otra explicación es que la falta de ovulación sería resultado del efecto inhibitorio provocado por el sistema GABA (ácido gamma aminobutírico) sobre la neurona GnRH, ya que los barbitúricos facilitan los efectos de este neurotransmisor al prolongar el tiempo de apertura del canal para el cloro ⁽⁶⁶⁾.

El crecimiento folicular es un evento dinámico y constante que dura aproximadamente 19 días ⁽¹⁹⁾. Si consideramos que en cada fase de estro (es decir, cada 96 horas) un grupo de folículos empiezan a madurar como resultado del efecto estimulante del segundo “pico” de FSH, entonces en el ovario siempre hay folículos en diferentes etapas del desarrollo. Por lo que el aumento en el peso de los ovarios como resultado de la inyección de pentobarbital, al medio día del diestro-1, podría ser explicado como resultado del aumento en el número de folículos o incremento en la masa del tejido intersticial, lo que implicaría que en este día del ciclo estral, la anestesia indujera un aumento en la secreción tónica de las gonadotropinas y por consecuencia de folículos.

Sin embargo, dado que el número de ovocitos liberados por estos animales no fue modificado, es posible que el efecto del pentobarbital haya ocurrido en folículos en crecimiento, ya que se ha sugerido que la degeneración de los folículos durante la etapa prepuberal se debe a la presencia de un umbral en las concentraciones de FSH que induce el desarrollo de la etapa antral, pero insuficiente para mantener el crecimiento folicular hasta su término ⁽⁵⁵⁾.

La inyección de la salina en POA-AHA sobre la ovulación depende de la fase del ciclo estral en la que sea inyectada: En el estro y el diestro-1, la inyección de NaCl posiblemente provocó la alteración en la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, hecho que dependió de la sensibilidad de cada animal utilizado, ya que la inhibición de la ovulación no ocurrió en el 100% de los animales tratados. Con base en los resultados obtenidos, la inyección de salina en el lado izquierdo de POA-AHA en cada etapa del ciclo estral regula el número de ovocitos liberados, ya que los animales liberan un menor

número de ellos. Sin embargo, este efecto no ocurre en ambos ovarios, lo que depende de la etapa del ciclo estral en el que la rata es expuesta al estrés quirúrgico. En las etapas de estro y diestro-2, el ovario afectado es el derecho, mientras que en diestro-1 lo es el izquierdo. Estos resultados nos permiten sugerir que desde POA-AHA existe una conexión nerviosa que llega directamente a cada ovario y que regularía la respuesta de los folículos a las gonadotropinas circulantes, la cual es asimétrica y se activa de manera alterna en función de la fase del ciclo estral. Una hipótesis semejante fue planteada por De la Iglesia y colaboradores ⁽¹⁰⁾, al señalar que la estimulación asimétrica que ejerce el núcleo supraquiasmático (NSCh) a las neuronas GnRHérgicas proviene del núcleo ipsilateral, pero se va alternando el del lado izquierdo y el derecho en dicha estimulación.

La vía de señalización nerviosa involucrada en la conexión POA-AHA y el ovario antes sugerida podría ser por medio del nervio ovárico superior ⁽⁴⁷⁾. En la rata adulta se ha observado que la información neural que transcurre por el nervio ovárico superior aumenta el valor de la masa ovárica y el desarrollo folicular ⁽⁴⁷⁾. Tampoco se puede descartar la idea de que factores de crecimiento ováricos estén regulados por las gonadotropinas. Se ha sugerido que el número final de folículos que ovulan depende de FSH y de las concentraciones intrafoliculares de GDF9 (Factor 9 de Diferenciación del Crecimiento) y MBP15 (Proteína 15 Morfogénica del Hueso) ⁽⁵⁵⁾.

Con base en nuestros resultados, sugerimos que en el día del diestro-1, la micro-inyección de NaCl alteraría la secreción de las gonadotropinas, ya que su inyección en el lado izquierdo o en el derecho provocó disminución del peso de ambos ovarios. Otra explicación sería la existencia de alteraciones en el número de receptores a la LH en los folículos en crecimiento, lo que resultaría en modificaciones en el crecimiento y diferenciación de los folículos ⁽⁵⁵⁾.

El bloqueo de los receptores M_2 del lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre la ovulación dependió de la concentración de MTC utilizada, del día del ciclo en el que ésta fue inyectada y del lado de POA-AHA micro-inyectado. En el día del estro, el bloqueo de los receptores M_2 con 10 pg/ μ L de MTC bloqueó la ovulación independientemente del lado de POA-AHA, resultados que nos llevaría a sugerir

que la acetilcolina, al unirse a los receptores M_2 , estimula la secreción de GnRH y las gonadotropinas. El hecho de que al inyectar el doble de esta dosis (20 pg/ μ L) de MTC en el estro, haya estimulado la ovulación, nos lleva a considerar que en POA-AHA ocurrió el fenómeno que en farmacología se conoce como “*antagonismo no competitivo*”, que señala que si el antagonista se liga al mismo sitio que el agonista pero lo hace de manera irreversible o pseudo-irreversible (disociación lenta sin enlace covalente), originará una disminución de la respuesta máxima con algunas concentraciones del antagonista ⁽²²⁾. Por lo tanto, para conocer el papel de la acetilcolina sobre la ovulación al unirse a su receptor M_2 se requiere llevar a cabo otros experimentos en los cuales se micro-inyecten dosis menores a 10 y mayores a 20 pg/ μ L en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA.

Los efectos alostéricos surgen cuando un ligando se une a un sitio diferente en el receptor, lo que resulta en la inhibición o la potenciación de la reacción. Dicho efecto es saturable; la inhibición llega a un valor “límite” cuando se han ocupado por completo los sitios alostéricos ⁽²²⁾.

En la fase del estro, la unión de la acetilcolina a los receptores M_2 de POA-AHA, no regula de manera asimétrica la ovulación, ya que la micro-inyección de 10 pg del antagonista- M_2 en uno u otro lado de la zona de estudio resultó en el bloqueo de la ovulación, mientras que con 20 pg ésta fue estimulada. Cruz y colaboradores ⁽⁹⁾ mostraron que en ésta fase del ciclo, el implante de atropina en el lado derecho de POA-AHA bloquea la ovulación, mientras que el tratamiento del lado izquierdo no la altera. La discrepancia entre este conjunto de resultados podrían ser explicados si se considera que la cantidad y la afinidad de los receptores M_2 en uno y otro lado de POA-AHA son diferentes (Figura 5). Cruz y colaboradores ⁽⁶⁾ mostraron que a las 13:00 h del estro la cantidad de receptores muscarínico (B_{max}) es semejante en cada lado de POA-AHA, pero su afinidad (constante de disociación: K_d) es mayor en el lado izquierdo que en el derecho ⁽⁶⁾.

Con base en los resultados de esta tesis, cabe la posibilidad de que los receptores muscarínicos M_2 de POA-AHA en la fase de estro jueguen un papel inhibitorio de la ovulación, función que estaría acorde a los resultados obtenidos por Koren y colaboradores ⁽³⁵⁾, quienes mediante la incubación de la eminencia

media proveniente de ratas en cada fase del ciclo estral, mostraron que en estro, los receptores muscarínicos M_2 inhiben la secreción de GnRH al medio de incubación.

En la fase de diestro-1, la micro-inyección de 10 ó 20 pg de MTC en el lado derecho de POA-AHA resulta en un efecto “en espejo” con respecto al ocurrido en la fase del estro, y es sólo de este lado de POA-AHA en donde se manifestó el “*antagonismo no competitivo*”.

Estos resultados se explican si consideramos que la actividad del sistema colinérgico muscarínico cambie con respecto a la fase del ciclo estral. En el día del diestro-1, la cantidad de acetilcolina en POA-AHA es casi el doble en el lado derecho que en el lado izquierdo, a pesar de que los parámetros de unión y afinidad de los receptores muscarínicos totales sean semejantes a los observados en estro ⁽⁶⁾. Luego entonces, con 10pg de MTC no se logra bloquear a todos los receptores M_2 y por lo tanto la acetilcolina endógena activaría al receptor estimulando la ovulación. Cuando se incrementó la dosis a 20 pg, se logro bloquear a todos los receptores M_2 y por lo tanto la acetilcolina se unió a estos receptores y como resultado se bloqueó la ovulación. Por lo tanto en esta fase del ciclo, la acetilcolina por medio de los receptores muscarínicos M_2 regula de manera estimulante y asimétrica la ovulación: siendo el sistema muscarínico M_2 del lado derecho de POA-AHA del que depende que el animal ovule en el día del estro de ese ciclo.

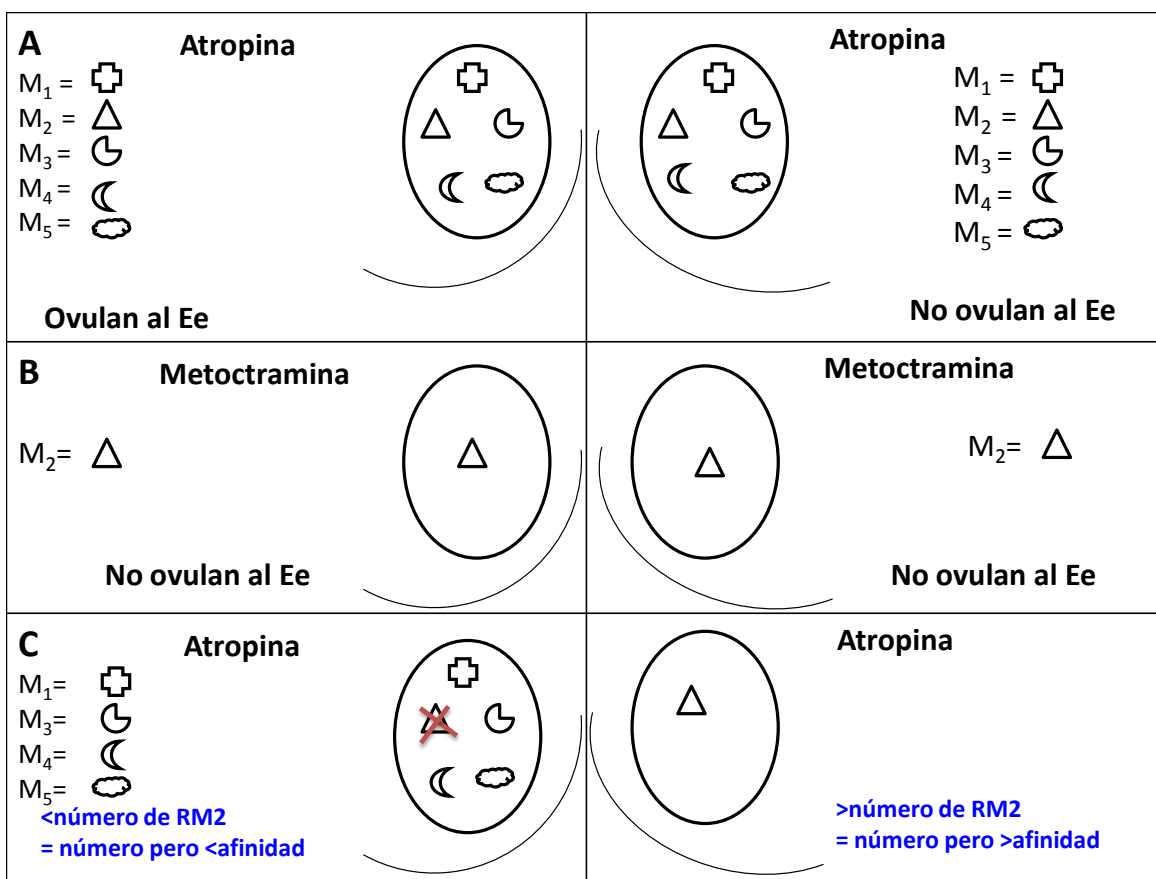
CONCLUSIONES

- El suero fisiológico inyectado en POA-AHA altera la ovulación y sus efectos dependen del día del ciclo estral del que se inyecte.
- El diestro 1 es la fase del ciclo en que la inyección del suero en POA-AHA afecta en mayor grado las funciones del ovario.
- El suero fisiológico inyectado en POA-AHA en la fase del estro, provoca efectos asimétricos sobre la ovulación de la rata adulta
- En la fase del estro, la unión de la acetilcolina a los receptores M_2 de POA-AHA, no regula de manera asimétrica la ovulación
- En la fase de diestro-1, la acetilcolina por medio de los receptores muscarínicos M_2 regula de manera estimulante y asimétrica la ovulación, siendo el sistema muscarínico M_2 del lado derecho de POA-AHA del que depende que el animal ovule en el día del estro de ese ciclo.

Figura 6. Modelo conceptual que explica el efecto de los implantes de atropina ⁽¹⁰⁾ y la micro-inyección de la metoctramina en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, realizada en la fase del **estro**, sobre la ovulación en el día del estro esperado inmediato al tratamiento.

POA-AHA IZQUIERDA

POA-AHA DERECHA



Bibliografía

1. Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Mendoza-Rodríguez CA, Cruz ME (2003). Differential mRNA expression of alfa and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine* 21: 251-260.
2. Barraclough CA, Collu R, Massa R, Martini L (1971). Temporal interrelationships between plasma LH. Ovarian secretion rates and peripheral plasma progesterin concentrations in the rat: Effects of Nembutal and exogenous gonadotropins. *Endocrinology* 96:37-44.
3. Brown TR (1999). Steroid hormones, Overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U. S. A. Vol 4, 634 – 644.
4. Burris TP (1999). Progestins. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic press. U. S. A. Vol 4, 23 – 30.
5. Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974) Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94:1704-1708.
6. Cruz ME, Arteaga PR, Huerta ML, Sánchez MA, Domínguez R (1997). 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.
7. Cruz ME, Castro J, Domínguez R (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanism regulating ovulation, affected by unilateral implant of atropine in the preoptic–anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Endocrinology* pp 133:205-10
8. Cruz ME, Chávez R, Rosas P, Lujambio VM, Morán JL, Domínguez R (1990). Diurnal changes in hypothalamic acetylcholinesterase activity during the oestrus cycle of the rat. *Medical Science Research* 18: 137 – 138.
9. Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R (1989). Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of Endocrinology* 123: 437 – 439.
10. De la Iglesia OH, Meyer J, Schwartz WJ (2003). Lateralization of circadian pacemaker output: Activation of left- and right sided Luteinizing Hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. *Journal of Neuroscience* 23 (19): 7412-7414.
11. Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Editor: Domínguez R. Porrúa-UNAM. Cap VII, pp. 163 – 188.

12. Domínguez R (1997). Endocrinología de las Gónadas. En: Curso de Actualización en Fisiología. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas y Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM, México, p.p. 271 – 279.
13. Domínguez R, Morales L, Cruz ME (2003). Ovarian Asymmetry. *Annual Rev. Biomed. Sci.* 5: 95 – 103.
14. Domínguez R, Riboni L, Zipitría D, Revilla R (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *Journal of Endocrinology* 95: 175 – 180.
15. Egozi Y, Kloog Y (1985) Muscarinic receptors in the preóptica area are sensitive to 17 β estradiol during the critical period. *Neuroendocrinology* 40: 385 – 392.
16. Egozi Y, Kloog Y, Sokolovsky M (1986). Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rats hypothalamus is synchronized whit the estrous cycle. *Brain Res.* 383: 310 – 313.
17. Everett JW (1949). Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 43: 389 – 405.
18. Everett JW, Sawyer CH (1950). A 24-hour periodicity in the “LH-release apparatus” of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 47:198-218.
19. Freeman ME (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. Edición, vol.2, cap.46, Raven Press, New York pp 613 – 658.
20. Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: Unilateral hypothalamic lesion and compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroscience Letter*; 51: 367-370.
21. Gerendai I, Rotsztejn W, Marchetti B, Córdón C, Scapagnini U. 1978. Unilateral ovariectomy induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neurosci Lett* 9: 333-336
22. Goodman L, Gilman A. (2003). *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Farmacodinámica. Vol. I. Interamericana.* pp. 42-47.
23. Grove-Strawser D , Sower D, Ronsheim SA, Connolly JB, Bourn CG, Rubin BS (2002). Guinea pig GnRH: Localization and Physiological activity reveal that it, not mammalian GnRH, is the major neuroendocrine form in guinea pigs. *Endocrinology.* 143, 1602-1612.
24. Harris GW (1961). The pituitary stalk and ovulation. En: *Control of Ovulation*. Vilee CA. Ed. London: Pergamon Press, p.p. 56-74.
25. Heape, W. (1900). The “sexual season” of mammals and the relation of the “pro-oestrum” to menstruation. *Quart. J. Micr. Sci.* 44, 1-70.

26. Herbison AE (2006). Physiology of the gonadotropin–releasing hormone neuronal network. En: Knobil and Naill’s Physiology of Reproduction, 3^a ed. Cap. 28; 1415 – 1456.
27. Hoffman JC (1968). Effect of photoperiod on estrous cycle length in the rat. *Endocrinology* 83: 1355-358.
28. Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulose cell. *Endocr. Rev*; 5: 76 – 127.
29. <http://fundacionannavazquez.wordpress.com/2007/08/30/sistema-de-aminoacidos-neurotransmisores/>
30. Ingrand DL (1962). Atresia. En: The Ovary. Zuckherman S Ed. Academic Press, New York :247-274
31. Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *J. Comp. Neurol.* 232, 534-547.
32. Kawakami M, Arita J, Kimura F, Hayashi R. (1979). The stimulatory roles of catecholamines and acetylcholine in the regulation of gonadotropin release in the ovariectomized estrogen-primed rats. *Endocrinologica Japonica*: 26(2); 275-284.
33. Kink JC, Tobet SA, Snavely FL, Arimura AA (1982). LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *J. Comp. Neurol.* 209, 287-300.
34. König JFR, Klippel RA. (1967). The rat brain a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Robert E. Krieger Publishing Co. Inc. 58-63.
35. Koren D, Egozi Y, Sokolovsky M (1992). Muscarinic involvement in the regulation of gonadotropin–releasing hormone in the cyclic rat. *Molecular and Cellular Endocrinology* 90: 87 – 93.
36. Lauber AH, Whalen RE (1988). Muscarinic cholinergic modulation of hypothalamic estrogen binding sites. *Brain Research* 443: 21 – 26.
37. Lazar ZK, Mores N, Navarro CE, Saeed AS, Krishan AK, Catt KJ (2008) Muscarinic regulation of intracellular signaling and neurosecretion in gonadotropins – releasing hormone neurons. *Endocrinology* 139: 4037 – 4043.
38. Lehman MN, Robinson JE, Karsch FJ and Silverman AJ (1986). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrous and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J. Comp. Neurol.* 244, 19-35.
39. Litwack G, Schmidt TJ (2000). Bioquímica de las hormonas II: Las hormonas esteroides. En: Bioquímica. Editor: Devlin MT. 3^a Edición, Ed. Reverte S.A. España, pp. 893-917.

40. López E, Cruz ME, Domínguez R (1997). Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic–anterior hypothalamic Area on spontaneous ovulation of the adult rat. *Archives of Medical Research*. 28: 343 – 348.
41. Malley BW, Strott ChA (2001). Hormonas esteroides: Metabolismo y mecanismo de acción. En: *Endocrinología de la Reproducción: Fisiología, Fisiopatología y Manejo Clínico*. Ed:Yen SSC, Jaffe RB y Barbieri Ri. Médica Panamericana. Argentina, p.p. 118 – 143.
42. Markee JE, Sawyer CH, Hollinshead WH (1947). Adrenolytic block of the release of luteinizing hormone following copulation in the rabbit. *Anat. Rec.* 99:597.
43. McCann SM (1962). A hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor. *Am J Physiol.* 202: 395-400.
44. Millar R, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Mausley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E, Kats A (2001) A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9636 – 9641.
45. Millar RP, Pawson AJ, Morgan K, Rissman EF, Zhi-Liang L (2008). Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol* pp. 24.
46. Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H (1984). Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropins secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 3874- 3878.
47. Morales L, Chavez R, Dominguez R. (1993). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepuberal rat. Differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med Sci Res* 21: 15-17.
48. Morales A, Diaz M, Ropero AB, Nadal A, Alonso R (2003). Estradiol modulates acetylcholine–induced Ca^{+2} signals in LHRH–releasing GT1–7 cells through a membrane binding site. *European Journal of Neuroscience*; 18: 2505–2514.
49. Nance DM, Bhargava M, Myatt GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Res. Bull.* 13: 651-655.
50. Neill JD, Duck LW, Sellers JC and Musgrove LC (2001). A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 2822, 1012-1018.
51. Nordeen EJ, Yahr P (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science* 218: 391-393.

52. Olsen KL, Edwards E, Schechter N, Whalen RE (1988). Muscarinic receptors in preoptic area and hypothalamus: effects of cyclicity, sex and estrogen treatment. *Brain Research*. pp. 223 – 229.
53. Pedernera E (1993). Cooperación Celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: *Comunicación Neuroendocrina, Bases Celulares y Moleculares*. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México. pp. 33 – 46.
54. Rainbow TC, Snyder L, Berck DJ, McEwen BS (1984). Correlation of muscarinic receptor induction in the ventromedial hypothalamic nucleus with the activation of feminine sexual behavior by estradiol. *Neuroendocrinology* 39 (1984) 476 – 480.
55. Rajkovic A, Choi Y (2006). Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*. 63:579-90.
56. Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM (2006). Follicular development: mouse, sheep and human models. Tomado de: *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*, Third Edition. 10:383-423
57. Rolla M, Andreoni A, Belliti D, Chistofani R, Ferdeghini M, Müller EE (1991). Blockade of Cholinergic Muscarinic Receptors by Pirenzepine and GnRH – Induced GH Secretion in the acute and Recovery Phase of Anorexia Nervosa and Atypical Eating Disorders. *Biol. Psychiatry* 29: 1079 – 1091.
58. Sánchez MA, López-García JC, Cruz ME, Tapia R, Domínguez R (1994). Asymmetrical Changes in the coline acetyltransferase activity in the preoptic–anterior hypothalamic area during the oestrus cycle of the rat. *NeuroReport* 5: 433 – 434.
59. Sánchez MA, Manjarrez J, Cruz ME, Alvarado R, Domínguez R (1996). EEG asymmetry in the preoptic–anterior hypothalamic area related with the body postural position in rats. *Medical Science Research* 24: 655 – 656.
60. Schally AV, Arimura A, Baba Y (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 393-39.
61. Shaikh AA (1971). Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* 5:297-307.
62. Silverman J, Livne I, Witkin JW (1994). The gonadotropin–releasing hormone (GnRH), neuronal systems: inmunocytochemistry and *in situ* hibridation. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. Edición, vol.1, cap.28, Raven Press, New York: 1683 – 1692.
63. Smith CL (1999). Estrogens, Overview. En *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neil D (eds.) Academic Press U. S. A. 2: 119 – 126.
64. Tobet SA, Bless EP, Schwarting GA (2001). Developmental aspect of the gonadotropin-releasing hormone system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 185: 173-84.

65. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Barrios-de-Tomasi J, Maldonado A, Nayudu P (2003). Impact of Carbohydrate Heterogeneity in Function in Follicle-Stimulating Hormone: Studies Derived from in Vitro and In Vivo Models. *Biology of Reproduction* 69, 369-379.
66. Velasco MA, Alvarez GFJ (1988). Compendio de Psiconeurofarmacología, Ed. Diaz de Santos. Madrid. pp 135.
67. Wheaton JE, Krulich L, Mc Cann SM (1975). Localization of luteinizing hormone releasing hormone in the Preoptic Area and Hypothalamus of the rat using radioimmunoassay. *Endocrinology* 97: 30-38.
68. Witkin JW, Demasio K (1990). Ultrastructural differences between smooth and thorny gonadotropin-releasing hormone neurons. *Neuroscience* 34: 777-783.
69. 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.
70. Yoshinaga K, Hawkins RA, Stocker JF (1969). Estrogen secretion by the rat ovary *in vivo* during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology* 85:103-112.