



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**“PAPEL DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS M_1 DEL ÁREA PREÓPTICA-HIPOTALÁMICA ANTERIOR
SOBRE LA OVULACIÓN ESPONTÁNEA DE LA RATA ADULTA”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA

YADIRA LIZETHE LÓPEZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: *DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN*

Tesis Financiada por CONACyT (convenio 81898) y PAPIIT (IN214508).



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis padres, quienes me hicieron creer en la existencia de un amor puro y desinteresado, quienes me enseñaron a tomar riesgos y luchar siempre con limpieza por mis pasiones, quienes estuvieron a mi lado a pesar de no estar siempre de acuerdo en mis decisiones. A ti mamá, una mujer valiente y amorosa, que me inculcó grandes virtudes; a ti papá, un hombre disciplinado y honesto que forjó mi carácter, por que por ustedes soy lo que soy y estoy donde estoy, por que no existe magnitud contable ni hecho que supere el de ser padres, hoy es para ustedes y de ustedes mas que mio este logro.

A Kayro, mi compañero por 21 años, con quien compartí grandes momentos y un triciclo, con quien disfruté largas tardes desafiando a la muerte en un columpio, con quien preparé una caja fúnebre para nuestro irreberente perico, con quien discutí grandes y profundos debates para elegir el mejor canal de televisión de entre los tres que se veían. Me has mostrado que puedo contar contigo y por suerte hagas lo que hagas y digamos lo que digamos nunca dejaremos de ser hermanos.

A Katy, por que Dios me dio la fortuna de ser la “hermana mayor”, porque junto a ti me enfrento a nuevos y enormes retos (eres una de mis motivaciones), por que eres la mejor amiga mas joven que tengo y de la que he recibido las mas lindas muestras de cariño, lealtad y compañerismo. Eres la que mejor conoces mis silencios e interpretas mis miradas en cualquier momento y que con esto sabes apoyarme sin decir nada.

A Fabian. Cuando decidí perseguir un sueño, encontré a otro y es que cómo imaginar que al elegir este laboratorio encontraría al hombre que cambió mi vida, aquél que me hizo comprender el mundo de otra manera, el hombre que ni mandado a hacer sería mejor, gracias por todo lo vivido, por no soltar mi mano en ningún momento por difícil que pareciera y por compartir conmigo cada rincón de tu vida. Le agradezco también a tu familia por abrirme las puertas de su casa y su corazón, a la Sra. Tere y al Sr. Francisco, Abraham y Ricardo por que ahora son también mis amigos y que además gané un tío; mi “tío Güero”, el Sr. Valentín. Gracias por todo.

A la tierra donde nací, un lugar sin prisas, donde las tormentas riegan la tierra y llenan los ríos, que bajo su cielo azul encontré a las personas que marcaron mi camino y que sembraron los conocimientos mas sabios de mi existir;

- ✦ *A mis abuelos Amalia e Isidro que me mostraron la sencillez y la humildad al recibir el día bajo el sol del amanecer y saberte afortunado con sólo eso y en cada puntada de la servilleta que me enseñó a bordar mi abuelita aprendí a meditar en el atardecer todo lo que en un día se aprende. A mis abuelos Juana y Raymundo, quienes son una de las razones de este trabajo, a quienes no dejaré de reclamar por no darme rizos y un poco mas de color a mi piel.*

- ✦ *A mis tíos Coco, Rosa y Juan, Mari López, Dulia, Rupe, Beto y Estela, Dionisio, Juanita, Eva, Eloina y Mari Ramírez, por su cariño, apoyo, consejos y regaños que nunca estuvieron demás.*
- ✦ *A mis primos Nena, Salomé, Lorena, Martha, Nelsy, Iván, Juanito, Candi, Jesica, Rosa, Arminda Edgar y Jaime con quien compartí los mejores momentos de mi infancia.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy cariñosamente a aquellas personas que nos tendieron la mano enseñándonos a mi y a mi familia a caminar en esta tan difícil ambiente (Distrito Federal), siempre dispuestos y más que puestos cuando recurrimos a ellos, gracias a mis padrinos Eligio Salinas, Enelda Salinas, Raúl Ramírez y mis tíos Eva Aparicio y Salvador Barrera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que abrió mis ojos ante las oportunidades infinitas que sólo ella confiere a cada uno de sus miembros, es ella misma quien nos muestra el infinito con sus delimitaciones, la razón con la locura y nos premia siendo mejores, siempre retando tus capacidades, es en ella donde conocí el valor real de la amistad en cada práctica de campo, la lealtad en cada examen, compañerismo en un laboratorio, los nervios de un combate, la enseñanza en cada fracaso y la humildad en cada triunfo.

- ✦ *Agradezco a Luis Ángel, Iván, Viry, Alejandro y Reyna por todos los momentos compartidos en la preparatoria, por tener siempre una sonrisa para mi, por cuidarme y confiarme sus secretos más preciados, por que con ustedes aprendí a luchar (literalmente), compartimos un tatami y nos apoyamos en cada competencia dentro y fuera de un combate.*
- ✦ *Hago lo que mejor me enseñaron; festejar los momentos felices y acompañar en los momentos difíciles, Pandola, Paulina, Barush, From, George, mi aMonch, Arianna, Chícharo, Sandunga, Jeny y Alex; por tenerme paciencia y saber escuchar sin juzgarme, por tener siempre un consejo franco para mi, por hacerme reír, dándome calma antes de entrar a un examen, por compartir “acordeones”, por darme fuerza cuando la mía se agotaba, por que simplemente me permitieron ser parte de su vida y cultivar trago a trago nuestra amistad.*
- ✦ *A mis mentores quienes desafiaron mi espíritu universitario y me hicieron entender que el sentido de mi vida es estudiar a la vida, hoy sus conocimientos es mi más preciado regalo, gracias a: Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán, Dr.*

Carlos Castillejos Cruz, M. en C. Esteban Olvera Juárez, Dra. Rebeca Chávez Genaro, Biol. Rayo del Carmen Orea Ochoa, M. Mariana Ruíz Hernández, Dr. Mauro López Armenta, Maestra Marianna Szymczak Lawrynowicz, Sr. Pedro Toledo, Fausto García Álvarez, Andrés Ortiz Álvarez, Balam Quitze Arellano e Hilario Ávila, mis agradecimientos y mi admiración es de ustedes.

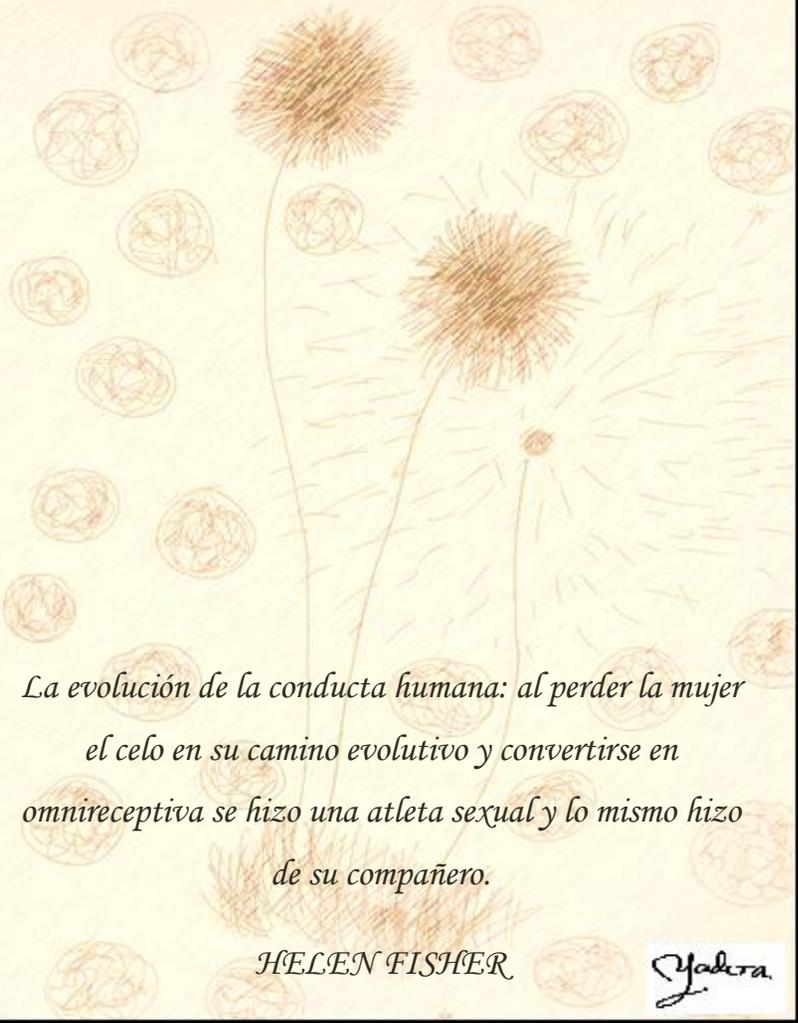
- *A mis sinodales por su paciencia, compromiso y profesionalismo por que durante la carrera sus cátedras fueron formando mi criterio y capacidad de análisis.*

M. C. Raúl Zavala Chavero

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. Leticia Morales Ledesma

M. en I. B. S. H. Angélica Flores Ramírez



*La evolución de la conducta humana: al perder la mujer
el celo en su camino evolutivo y convertirse en
omnireceptiva se hizo una atleta sexual y lo mismo hizo
de su compañero.*

HELEN FISHER

Yadira

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
CICLO ESTRAL	4
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO	7
<i>HIPOTÁLAMO</i>	<i>7</i>
Neurona GnRHérgicas	9
<i>HIPÓFISIS</i>	<i>13</i>
<i>OVARIO</i>	<i>13</i>
Esteroidogénesis	15
ACETILCOLINA	17
<i>BIOSÍNTESIS DE LA ACETILCOLINA</i>	<i>17</i>
<i>ALMACENAMIENTO</i>	<i>17</i>
<i>LIBERACIÓN</i>	<i>18</i>
<i>RECEPTORES COLINÉRGICOS</i>	<i>18</i>
Receptores muscarínicos	19

<i>NEURONAS COLINÉRGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL VINCULADAS AL HIPOTÁLAMO</i>	20
<i>PIRENZEPINA</i>	21
<i>PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO</i>	
<i>HIPÓFISIS-OVARIO</i>	22
LA ASIMETRÍA Y LATERALIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.	26
LOS ASPECTOS ASIMÉTRICOS DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA	27
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	32
OBJETIVOS PARTICULARES	32
METODOLOGÍA	33
MICROINYECCIÓN	33
PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
RESULTADOS	36
MICRO-INYECCIÓN CON CLORURO DE SODIO (NaCl), 10 Ó 100 µg de PIRENZEPINA	37
REEMPLAZO DE LA HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE	43
ADMINISTRACIÓN DE BENZOATO DE ESTRADIOL	47
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
POSIBLES RESPUESTAS A LOS EFECTOS DE LA MICRO-INYECCIÓN UNILATERAL DE NaCl EN POA-AHA	
DURANTE EL CICLO ESTRAL.	51

POSIBLES RESPUESTAS A LOS EFECTOS DE LA MICRO-INYECCIÓN UNILATERAL DE PIRENZEPINA EN

POA-AHA DURANTE EL CICLO ESTRAL----- 53

CONCLUSIONES -----57

REFERENCIAS -----58

RESUMEN

En la rata adulta, cíclica, los receptores muscarínicos (RM) del área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) regulan de manera estimulante la ovulación, este efecto cambia durante el ciclo estral y depende del lado de POA-AHA. En las etapas del estro y de diestro-2, el bloqueo unilateral de los RM de POA-AHA, por el implante de atropina, afectan asimétricamente los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación. Sin embargo, se desconoce cuál de los cinco diferentes RM desencadenan el efecto asimétrico sobre la ovulación. Estudios *in vitro* muestran que en la eminencia media de ratas cíclicas, la unión de la acetilcolina a los RM de tipo 2 inhiben la liberación de la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), mientras que los RM₁ tienen un papel estimulante.

Propósito. Por tanto, en este estudio se analizó la participación de los RM₁ del lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre la ovulación, utilizando a la rata adulta como modelo de estudio.

Metodología. Grupos de ratas en cada fase del ciclo estral fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (25 mg/Kg), colocadas en un estereotáxico y entre las 12:30 y 13:30 h se micro-inyectaron en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA con suero fisiológico (vehículo: 1 µl/min) o con 10 ó 100 µg/1µl/min de pirenzepina (PZP), antagonista M₁. Otros grupos de animales micro-inyectados con vehículo o PZP fueron inyectados con 3.7 µL de la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante sintética (LHRH, por sus siglas en inglés) a las 14:00 h del proestro esperado, o con 10 µg de Benzoato de Estradiol (BE) a las 14:00 h del diestro-2 esperado. Todos los animales fueron sacrificados entre las 10:00 y 11:00 horas del día del estro esperado; se les disecaron las trompas uterinas (para contar el número de ovocitos liberados), los ovarios y el útero (para ser pesados).

Resultados. La micro-inyección de vehículo en los días de diestro-1 y proestro, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, indujo el bloqueo de la ovulación. La micro-inyección de 10 µg de PZP no modificó los efectos de la micro-inyección del NaCl. En cambio, los efectos de la micro-inyección de 100 µg de PZP en uno y otro lado de POA-AHA sobre la ovulación, dependieron del día del ciclo en que se bloquearon los RM₁: En diestro-1 provocó aumento del porcentaje de animales ovulantes (%AO); en diestro-2 no tuvo efectos y en el día del estro la micro-inyección de 100 µg de PZP en uno y otro lado de POA-AHA provocó disminución del %AO. La administración de LHRH indujo la ovulación en todos los animales que no lo habían hecho por la micro-inyección de vehículo o PZP. La inducción de la ovulación en los grupos de ratas inyectadas con BE dependió del día del ciclo y del lado de POA-AHA en el que se trató al animal, sin embargo todos los animales micro-inyectados con 100 µg de PZP y BE ovularon en el estro esperado.

Conclusiones. La ovulación espontánea de la rata adulta depende de la actividad de los RM₁ de POA-AHA. El papel regulador de la acetilcolina unida a los RM₁ cambia durante el ciclo estral: es inhibitorio en la fase de diestro-1, pero es estimulante en el proestro y estro; mientras que en la fase del diestro-2 no participa. Además, la activación de los RM₁ de la porción izquierda o derecha de POA-AHA no regula de manera asimétrica la ovulación de la rata adulta.

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 dan 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, 12, 13, 16, 18, 24, 38, 42, 43, 44, 78, 79, 80 y 82).

El sistema colinérgico es uno de los sistemas de neurotransmisión que regula la secreción de las gonadotropinas y en consecuencia la ovulación. Desde la década de los cuarenta, Everett y colaboradores ⁽³⁰⁾ 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 ⁽²²⁾ y ocurre sobre la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas o GnRH, péptido secretado por neuronas que se localizan en POA-AHA del diencefalo. En la rata la cantidad de este decapeptido es asimétrica en el hipotálamo medio basal ⁽⁷⁸⁾.

Mediante la técnica de implantación de atropina (antagonista no selectivo de los RM) en POA-AHA, se ha mostrado que en el día del estro, la señal colinérgica del lado derecho de esta zona es esencial para que se lleven a cabo los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación. En el día del diestro-1, depende de la señal que surge de ambos lados; mientras que para el día del diestro-2 es la del lado izquierdo la que regula este proceso. En cambio, en el día del proestro, el bloqueo del sistema colinérgico no altera la ovulación esperada en la mañana del día siguiente ⁽¹⁶⁾.

Con la finalidad de identificar por medio de cuál de los cinco tipos de receptores muscarínicos la acetilcolina regula en forma asimétrica la ovulación, en esta tesis se analizó la participación del sistema colinérgico con el bloqueo del RM₁ del lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre la ovulación, durante el ciclo estral de la rata adulta.

MARCO TEÓRICO

El primer registro del uso de la rata con fines experimentales fue publicado en 1856. Desde su domesticación durante la primera parte de este siglo, los estudios que se han realizado utilizando a la rata como modelo de estudio han contribuido de manera sustancial en el avance de las ciencias biológicas más que cualquier otra especie de laboratorio ⁽⁷⁰⁾.

La rata es un animal fácil de usar para el estudio de la reproducción, ya que crece rápidamente, sus ciclos reproductivos son cortos, es relativamente barato y fácil de manejar. Muchos de los resultados obtenidos en la rata se pueden extrapolar a otras especies, incluida la humana, como los mecanismos relacionados con el control de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas ó GnRH (por sus siglas en inglés: Gonadotropin Releasing Hormone) por neurotransmisores, el inicio

de la secreción de gonadotropinas, los componentes celulares en los que los esteroides ejercen sus efectos, del “feedback” positivo y negativo, así como los mecanismos de regulación del cáncer de ovario, representan sólo algunos de los ejemplos ⁽⁷⁰⁾.

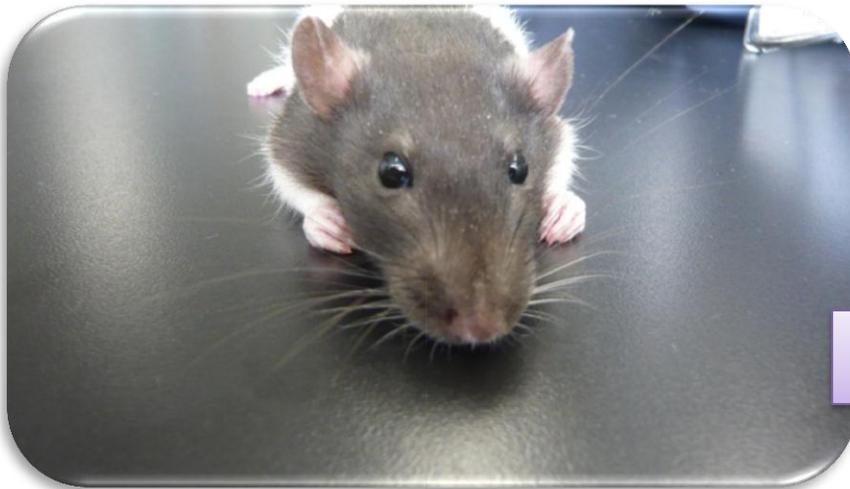


Imagen 1. Rata de la cepa CIIZ-V Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM

EL CICLO ESTRAL DE LA RATA

La rata de laboratorio no es una especie que se reproduzca estacionalmente sino que es poliéstrica, su ovulación es espontánea, la cual ocurre cada 4 ó 5 días durante todo el año, mientras no hay fecundación. El estro es una palabra latina que proviene del griego (oistrus), que significa frenesí o deseo desenfrenado. Dicho término fue utilizado por primera vez por Heape ⁽⁴⁶⁾ para describir el periodo especial del deseo sexual de la hembra y distinguirla de la del macho. Heape ⁽⁴⁶⁾ describió con más detalle las distintas etapas del ciclo y utilizó la palabra anestro como el término que define la época no reproductiva o periodo de descanso en los mamíferos hembra, es decir, cuando los ovarios y los órganos reproductivos accesorios están relativamente inactivos y los intentos de apareamiento del macho son menores. Heape ⁽⁴⁶⁾ también utiliza los prefijos pro-, di- y meta junto con el sufijo estro para describir las etapas del ciclo entre los periodos de celo durante el ciclo estral ⁽⁷⁰⁾.

A partir de una muestra de 1,999 ciclos registrados en ratas, Long y Evans ⁽⁷⁰⁾ calcularon que el ciclo estral dura en promedio 4.4 días. El estudio de la duración y caracterización de las distintas fases del ciclo estral se realiza por medio de la observación bajo el microscopio del tipo de células que se encuentran en el epitelio de la vagina. Según Freman, el proestro tiene una duración de 12 a 14 horas; el estro de 25 a 27 horas; el metaestro o diestro-1 es de 6 a 8 horas y el diestro o diestro-2 es de 55 a 57 horas ⁽⁷⁰⁾.

El proestro se caracteriza por el predominio de células epiteliales nucleadas, estas células son claramente redondas, el núcleo es visible y aparecen en racimos durante el proestro. De vez en cuando, se podrán observar pocas células epiteliales escamosas cornificadas.

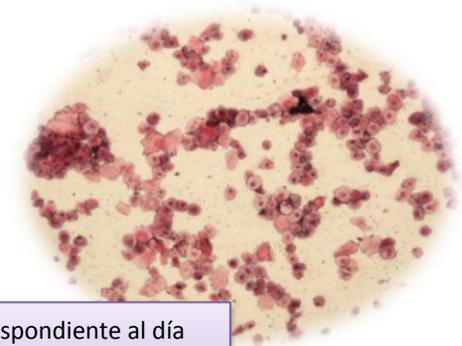
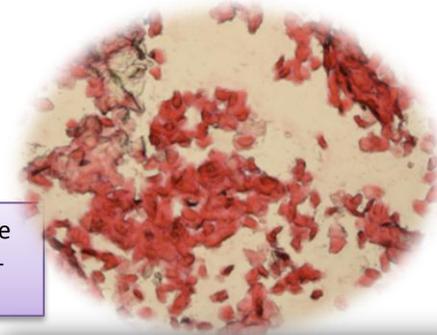


Imagen 2. Frotis vaginal correspondiente al día del proestro teñido con hematoxilina-eosina visto al microscopio (10x).

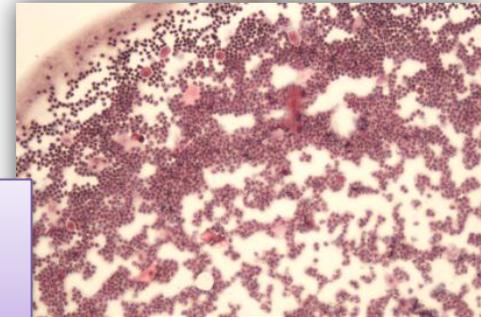
Al día siguiente, en el estro, las células principales visibles al microscopio son del tipo epitelial, escamosa y cornificada, dichas células no presentan núcleo, contiene un citoplasma altamente granular y su forma es irregular.

Imagen 3. Frotis vaginal correspondiente al día del estro teñido con hematoxilina-eosina visto al microscopio (10x).



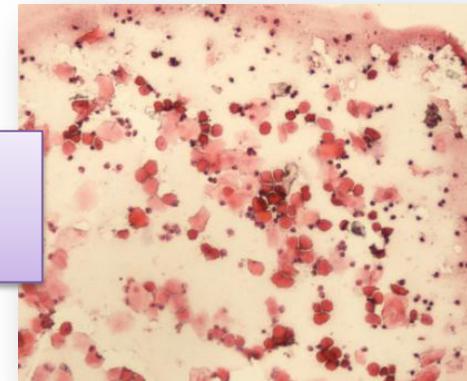
Durante el metaestro o diestro-1, el tipo de célula predominante es el leucocito, que aparece junto a un número significativo de células epiteliales nucleadas. Los leucocitos son pequeños, con citoplasma granular y si se examina a mayor aumento generalmente contienen un núcleo vesiculado.

Imagen 4. Frotis vaginal correspondiente al día del diestro-1 teñido con hematoxilina-eosina visto al microscopio (10x).



Finalmente el día del diestro-2, se caracteriza por la presencia de los tres tipos de células presentes en los anteriores días; células epiteliales nucleadas, leucocitos y células epiteliales escamadas.

Imagen 5. Frotis vaginal correspondiente al día del diestro-2 teñido con hematoxilina-eosina visto al microscopio (10x).



En animales con ciclos de 5 días se puede presentar un día adicional de cornificación (estro) o un día adicional de infiltración de leucocitos (diestro) ⁽⁷⁰⁾.

En ratas con ciclos estrales de 4 días, cada etapa se caracteriza por las concentraciones plasmáticas de progesterona (P_4), 17β -estradiol (E_2), de la hormona estimulante del folículo o FSH (por sus siglas en inglés: Follicle-Stimulating Hormone) y de la hormona folículo estimulante LH (por sus siglas en inglés: Luteinizing Hormone) (Imagen 6).

En el día del proestro, se observan las máximas concentraciones de P_4 , E_2 , FSH y LH, denominadas como “picos” o secreciones pre-ovulatorias. Entre la mañana y el medio día, las concentraciones plasmáticas de E_2 alcanzan su “pico” máximo, el que disminuye drásticamente hacia las 14:00 h. Este cambio en la concentración de E_2 induce la secreción de la GnRH, la que a su vez, estimula la secreción pre-ovulatoria de FSH y LH hacia la tarde de este día ($\approx 17:00$ h).

En el día del *estro* la ovulación ocurre en la madrugada (entre las 01:00 y 03:00 h), las concentraciones de P_4 , E_2 , y LH disminuyen a valores mínimos (concentraciones basales). En cambio, las concentraciones de FSH alcanzan un segundo máximo en la mañana de este día.

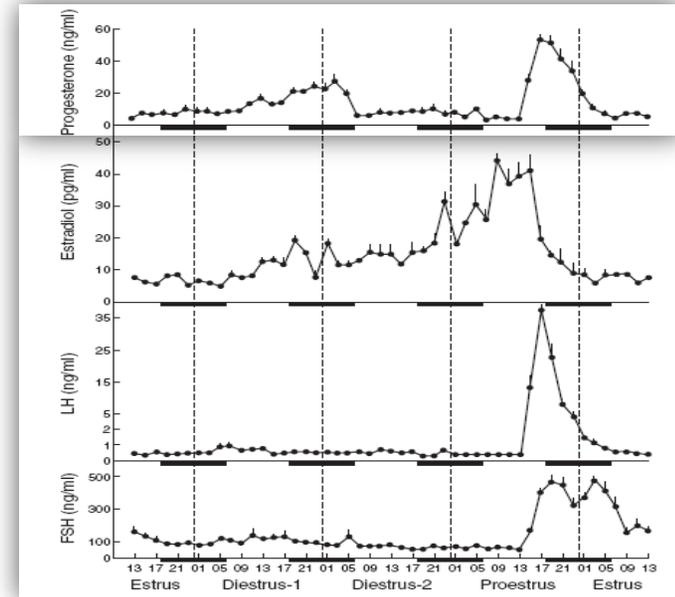


Imagen 6. Perfil de las concentraciones plasmáticas de P_4 , E_2 , LH y FSH durante los cuatro días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan el periodo de oscuridad⁽⁶⁹⁾.

En el día del *diestro-1*, la hormona que alcanza un segundo “pico” es la P_4 . Mientras que E_2 , LH y FSH se mantienen en concentraciones basales.

En el día del *diestro-2* la P_4 , E_2 , FSH y LH, se encuentran en concentraciones mínimas, aunque para la tarde de este día, el E_2 comienza a aumentar paulatinamente. Los cambios en la concentración de las hormonas antes descritos son el

resultado de una “cascada” de señales tanto nerviosas como endócrinas que ocurren entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario, también denominado *Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario* (Imagen 6) ^(53, 70).

EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es el “centro” responsable de la coordinación de los mecanismos neurales que regulan el sistema endocrino. Recibe información de la corteza cerebral y del sistema nervioso autónomo y traduce los estímulos ambientales en señales neuroendocrinas ⁽⁷²⁾.

El hipotálamo es relativamente muy pequeño con respecto a otras estructuras del sistema nervioso central (SNC), pero es una zona extremadamente importante del diencefalo que regula funciones endócrinas, autónomas y conductuales, como son: la temperatura corporal, la ingesta de agua y comida, la conducta sexual y la reproducción, así como, respuestas emocionales ⁽⁷²⁾.

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, por debajo del tálamo y separado por el tercer ventrículo en dos estructuras laterales, la porción izquierda y la derecha. La cara ventral del hipotálamo se localiza en la base del cerebro, se extiende desde el límite rostral del quiasma óptico hasta el límite caudal de los cuerpos mamilares ⁽⁷²⁾; lateralmente está rodeado por el subtálamo, centralmente por la lámina terminal y en la parte dorsal por la comisura anterior ⁽¹⁰³⁾. Según Palkovists ⁽⁸⁵⁾, el hipotálamo se divide rostro-caudalmente en tres regiones organizadas:

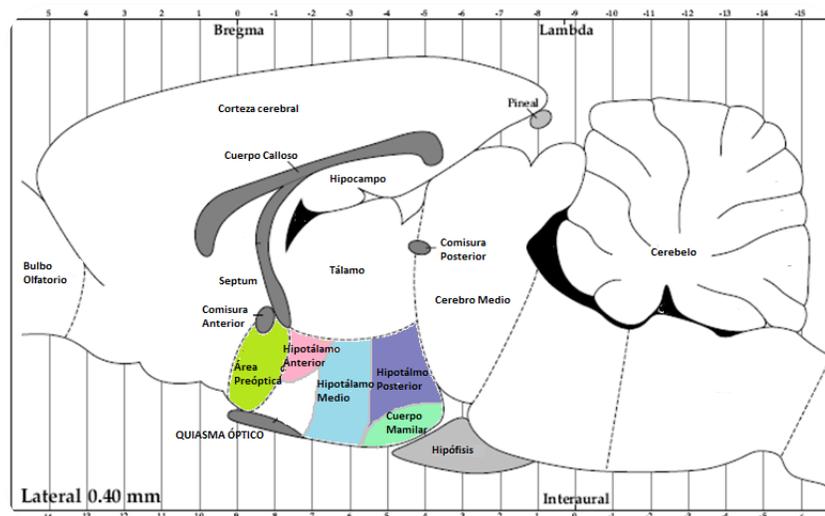


Imagen 7. Corte sagital de cerebro de rata ⁽⁸⁷⁾.

- *ÁREA PREÓPTICA*: Aunque su origen embrionario es diferente al del hipotálamo, desde el punto de vista funcional se considera parte del mismo, en ésta área se localizan los núcleos preópticos medial, preóptico periventricular y el órgano vasculoso de la lámina terminal.
- *HIPOTÁLAMO ANTERIOR*: Se considera la continuación del área preóptica. Conformada por los núcleos periventricular, supraquiasmático, hipotálamo anterior, periventricular y en la parte lateral se encuentran el núcleo supraóptico.
- *HIPOTÁLAMO MEDIO*: Se establecen tres zonas:
 - Basal: Incluye tanto a la eminencia media como a los núcleos arcuato y ventromedial.
 - Dorsal: Solo se encuentra definido el núcleo dorsomedial.
 - Lateral: Se encuentra al borde de la zona medial y lateral el núcleo perifornical.

En la zona del hipotálamo medio también se ubica a la eminencia media en la base del tallo hipofisario. En la capa externa de la eminencia media se reciben los capilares del sistema portahipofisario, fuera de la barrera hematoencefálica, donde las neuronas parvicelulares depositan hormonas hipotalámicas que regulan ciertas funciones adenohipofisarias. La eminencia media contiene arterias que cuentan con una vasta red capilar, parte de estos capilares se extiende hacia arriba hasta el suelo del tercer ventrículo, mientras que otros capilares más cortos se disponen en forma de “capa”. Los vasos porta con sangre arterial conteniendo neurohormonas hipotalámicas descienden por el tallo hipofisario en los denominados vasos porta “largos”, los cuales alcanzan e irrigan la adenohipófisis.

- *HIPOTÁLAMO POSTERIOR*: También conocido como región premamilar, representa una pequeña parte del hipotálamo que incluye a los núcleos; premamilar dorsal y ventral, tuberomamilar, supramamilar, arcuato e hipotálamo posterior.

El hipotálamo realiza su papel regulador en la reproducción del individuo a través de un tipo de neurona ubicada principalmente en POA-AHA, que secreta GnRH, neuronas que reciben el nombre de neuronas GnRHérgicas ⁽¹⁰²⁾.

Neuronas GnRHérgicas

En vertebrados se han identificado trece variantes de la GnRH, nueve más en protocordados y una más en una especie de pulpo. En las 23 moléculas, la longitud del decapeptido y los dominios amino y carboxilo terminal son semejantes ⁽⁷⁴⁾. En algunos mamíferos se pueden identificar al menos dos de las moléculas de GnRH ⁽¹¹⁴⁾: la GnRH clásica, también llamada GnRH-I (pGlu-His-Trp-Ser-**Tyr**-Gly-**Leu**-Arg-Pro-Gly-NH₂) que estimula la secreción de la FSH y de la LH; y la GnRH-II (segunda

molécula de GnRH identificada por primera vez en el pollo) que difiere en tres aminoácidos con la GnRH-I (pGlu-His-Trp-Ser-**His**-Gly-**Trp**-**Tyr**-Pro-Gly-NH₂), la cual se ha localizado en diferentes órganos y estructuras del SNC de monos y del humano. En el ratón se han detectado células inmunoreactivas para la GnRH-II en la eminencia media, por lo que se sugiere que esta hormona también regula la secreción de gonadotropinas ⁽⁴⁸⁾. Sin embargo, se ha sugerido que la potencia de regulación de la GnRH-II sobre la secreción de las gonadotropinas sería diferente como se ha mostrado en el carnero, especie en la que la GnRH-II libera más FSH que LH cuando se comparan los efectos con la GnRH-I ⁽⁷³⁾. La GnRH-II también es un potente modulador de los canales de potasio en neuronas del ganglio simpático de la rana ^(9, 57) y en la musaraña, regula la ingesta de alimento y el comportamiento reproductivo ^(59, 107).

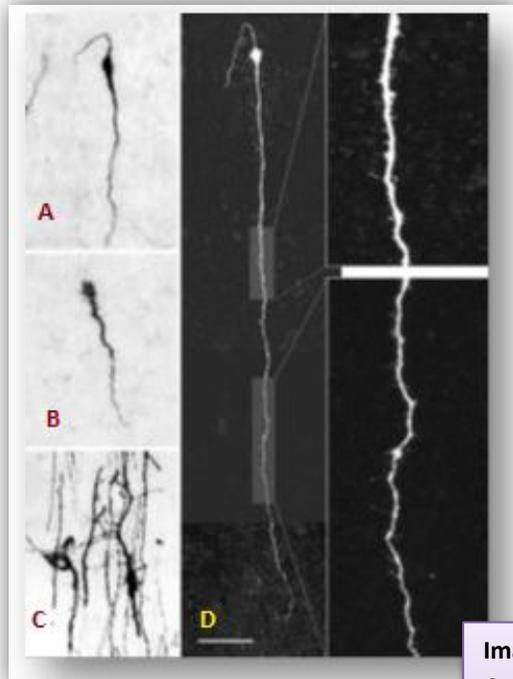


Imagen 8. . Morfología de la neurona GnRH en el ratón y oveja. La característica bipolar de las neuronas GnRHérgicas se muestra en la imagen **A** y **B**, en la imagen **B** se muestra claramente la morfología de una “espina” después de realizar inmunohistoquímica en la neurona GnRH. Las dos células en la imagen **C** deja ver una morfología más compleja y variable del cuerpo celular de la GnRH de la oveja. **D** Es un montaje que muestra el cuerpo de la célula completa y la estructura dendrítica de dicha neurona de ratón adulto con biocitina *in situ*. La longitud de la dendrita principal es de más de 500 nm y los dos recuadros resaltados señalan la alta densidad de espinas a lo largo de la dendrita ⁽⁴⁸⁾.

Otra molécula de GnRH que ha sido identificada en POA-AHA de la rata es la GnRH-III, la cual fue localizada en lamprea, pero en la rata es un potente estimulante de la liberación de FSH ⁽⁴⁹⁾.

En el cerebro de aves se identificó por primera vez un péptido con la capacidad de inhibir la secreción de gonadotropinas, denominada GnRI (por sus siglas en inglés: Gonadotrophins Releasing Inhibitory). La GnRI no sólo actúa directamente en la hipófisis, sino que neuronas GnRH-I y GnRH-II del cerebro de aves y mamíferos expresan el receptor a GnRI; este receptor también se ha identificado en las gónadas, lo que indica que el péptido GnRI es un importante modulador de la función reproductiva que actúa tanto en el hipotálamo y la hipófisis, así como en la gónada ⁽⁷⁾.

Las neuronas que secreta la GnRH-I de mamífero recibe aferencias de neuronas que sintetizan glutamato, GABA (ácido gama amino butírico), GnRH, galanina, β -endorfinas, neurotensina, neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo (VIP), orexina, endotelina, bombesina, dopamina, serotonina, noradrenalina, Factor Liberador de Corticotropina (CRF), vasopresina, oxitocina, péptido natriurético atrial, angiotensina, bradiquinina, colecistoquinina, kisseptina, angitensina, Hormona Estimulante de los Melanocitos (MSH), la neuroglia, entre otros ⁽⁴⁸⁾.

La función secretora de las neuronas que envían aferencias directa o indirectamente a las neuronas que secretan GnRH-I es regulada por los estrógenos, los cuales juegan un papel crítico al establecer el patrón de secreción de la hormona durante la etapa pre-púber ⁽⁴⁷⁾.

A pesar de su importancia, la función precisa de los estrógenos sobre la neurona GnRHérgica misma y sus aferencias neurales no es aún del todo clara. En 1996, Kuiper y col ⁽⁶⁵⁾, clonaron un ácido desoxi-ribonucleico complementario (DNAC) del receptor a estrógenos (RE) en la próstata de rata, al cual denominaron RE subtipo beta ($RE\beta$), para distinguirlo del que previamente se había clonado del útero de la rata, al cual consecuentemente se denominó RE subtipo alfa ($RE\alpha$).

La importancia biológica de los dos subtipos del RE aún no es muy clara. Por medio de la técnica de inmunohistoquímica de doble marcaje e hibridación *in situ*, se observó un alto grado de co-localización de los dos RE en la zona posterior de la estría terminal, el núcleo medial de la amígdala y el núcleo preóptico peri-ventricular e incluso el área preóptica, aunque hay neuronas GnRHérgicas que sólo expresan el RE β y otras que sólo expresan el ARNm del RE α ⁽¹⁰²⁾. Otros investigadores mostraron que solo el 17% \pm 1% de las neuronas GnRH del cerebro de la rata son positivas al RE β ⁽¹¹⁾. Recientemente, mediante la detección del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (por hibridización *in situ*) y la cuantificación de los RE (por la técnica de unión con estrógeno tritiado) en neuronas GnRHérgicas, se mostró que la mayoría de las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el RE β pero no el ARNm para el RE α ⁽⁵⁰⁾. En dirección rostro-caudal del área preóptica medial, el número de células GnRHérgicas que resultan positivas al marcaje con el RE α disminuye progresivamente ⁽¹⁰²⁾.

Aún se desconoce cuál es el papel de la unión del E₂ a los RE α y RE β en las neuronas GnRHérgicas. En especies que ovulan de manera espontánea, la secreción preovulatoria de los estrógenos actúa de manera estimulante (“feedback” positivo) en la secreción de la GnRH y por consiguiente en la secreción de gonadotropinas. Durante el resto del ciclo ovárico, los estrógenos suprimen la secreción de las gonadotropinas (“feedback” negativo). Herbison ⁽⁴⁸⁾ ha propuesto tres formas de acción de los estrógenos sobre la red de neuronas que regulan la actividad de la neurona GnRH:

-  Acción directa sobre la neurona GnRH, la cual ocurriría por medio del RE β y cuyo efecto sería no genómico, por la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta del AMP cíclico (CREB).
-  Transmisión transináptica por medio de neuronas que hacen sinapsis con la neurona GnRH y que expresan el RE α , como son las neuronas GABAérgicas, glutamatérgicas, NPYérgicas, pro-opiomelanocorticotrópicas y noradrenérgicas.
-  Transmisión por medio de la glía y las células endoteliales, ya que estos dos tipos celulares expresan tanto el RE α como el β , de manera que los estrógenos actuarían alterando la relación ultraestructural entre la glía y la neurona GnRH ó por

medio de la secreción de interleucinas como el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β), del factor de crecimiento semejante a la insulina o de óxido nítrico (por medio de las células epiteliales) ⁽⁹⁷⁾.

Los RE α y RE β , pertenecen a la familia de los factores nucleares de transcripción dependientes del ligando, con especificidad para fijar al E₂. Ambos receptores participan en procesos que intervienen en la producción y liberación de GnRH en roedores ⁽⁸⁶⁾.

La unión del receptor con su ligando específico, provoca la disociación de las proteínas inhibidoras termoinducibles (o proteínas de choque térmico), las cuales incapacitan al receptor para unirse al ADN, mientras el receptor está inactivo y se forma el complejo hormona-receptor. La adición de la hormona provoca la transformación del receptor de tal manera que los dominios funcionales quedan expuestos y permiten la unión al ADN. El complejo hormona-receptor se dimeriza, es decir ocurre la conjunción de dos receptores, de esa forma adquieren mayor afinidad ⁽⁹⁷⁾.

Wintermantel y colaboradores ⁽¹¹²⁾, por medio del uso de ratones “knock-out” para el RE α o el RE β , mostraron que el RE α pero no el RE β es necesario para que ocurra el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH, ya que mediante el uso de un ligando selectivo para el RE α mostraron que este receptor no sólo es “necesario”, sino que es “suficiente” para estimular la secreción preovulatoria de LH. El RE α de la porción derecha de POA-AHA regula de manera inhibitoria la secreción de LH y de E₂, ya que la micro-inyección de metil-piperidino-pirazol (MPP: anti-estrógeno del RE α), en la mañana del estro o del proestro, resulta en el aumento de la concentración de ambas hormonas (hasta 2 veces en magnitud) cuando se mide 2, 8, 72 o 78 horas después del bloqueo del receptor ⁽¹¹³⁾. Un efecto opuesto ocurre cuando se bloquean los receptores de la porción izquierda de POA-AHA. Por medio del mismo diseño experimental, la inyección de ciclofenil (antiestrógeno del RE β), se mostró que los RE β de la porción izquierda de POA-AHA estimulan la secreción de LH, ya que la micro-inyección de este fármaco en este lado de POA-AHA resulta en la inhibición de la secreción de LH ⁽⁴¹⁾.

HIPÓFISIS

El efecto de la GnRH sobre los gonadotropos se inicia con la unión a receptores específicos en la membrana celular, la formación del complejo hormona-receptor activa a la proteína G, la que a su vez induce la síntesis de fosfatidil inositol trifosfato (IP₃) y finalmente la movilización intracelular de calcio [Ca²⁺]_i. Como resultado de esta “cascada” de señalización, el gonadotropo sintetiza y libera LH y FSH al torrente circulatorio ^(55, 63).

La FSH y la LH son hormonas gluco-proteicas formadas por dos cadenas polipeptídicas (subunidades α y β), unidas por enlaces de hidrógeno. La cadena α es común a todas las hormonas glucoproteicas de cada especie. La subunidad β es variable en cada especie y hormona, lo que establece la actividad biológica específica de cada hormona ^(88, 100, 108).

OVARIO

El ovario está organizado en tres compartimentos; el intersticial, el luteal y el folicular. Los folículos, que son la unidad anatómica y funcional de dicho órgano, se clasifican estructuralmente en primordiales, primarios, secundarios, terciarios ó antrales y preovulatorios (Imagen 9). El folículo está formado por el ovocito I, la zona pelúcida, una o varias capas de células de la granulosa, una membrana basal que aísla a estos componentes de los demás, una o más capas de células de la teca (que se divide en interna y externa). La teca externa está formada por fibras de colágeno, células del tejido conjuntivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas (Imagen 9 y 10) ⁽²⁵⁾.

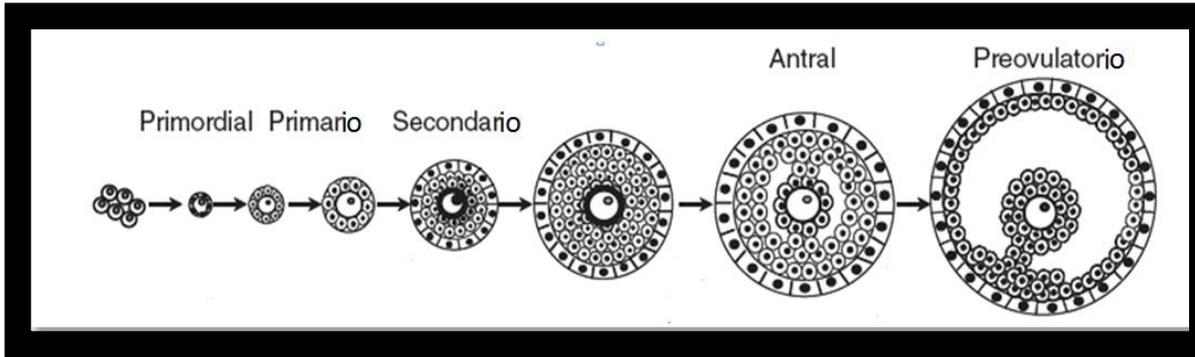


Imagen 9. Clasificación de folículos de ratón. De izquierda a derecha, se muestra el desarrollo post-natal del folículo, comenzando por la etapa de folículo primordial hasta la etapa de folículo antral. Antes de la formación del antro, el crecimiento del folículo es independiente de las gonadotropinas. Después de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca sufren

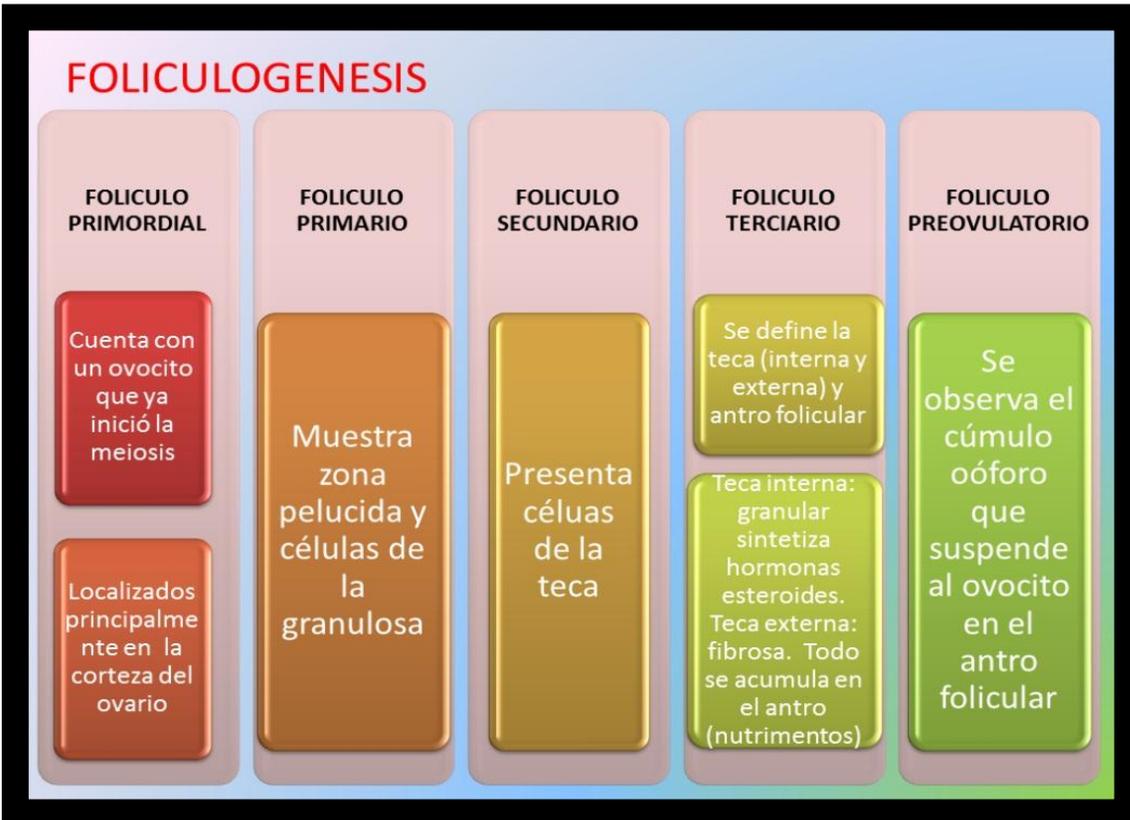


Imagen 10. La foliculogénesis es el proceso de maduración del folículo ovárico en el cual se van modificando su estructura y función; cuando el folículo está en la fase primordial es totipotencial, el ovocito ya inició la meiosis y se localiza en la corteza del ovario, el ovocito del folículo primario ya presenta la zona pelucida y cuenta con células de la granulosa; mientras que el folículo secundario presenta ya células de la teca; algunos autores consideran que el folículo terciario ya presenta células de la teca interna y externa y se observa el antro folicular. Finalmente en el folículo preovulatorio ya muestra el cúmulo

Esteroidogénesis

Las hormonas esteroideas son un grupo de hormonas que derivan del colesterol, cuyo núcleo químico básico ciclopentano-perhidro-fenantreno cuenta con 27 carbonos. El colesterol obtenido desde la circulación sanguínea o a partir del acetato se convierte en pregnenolona y ácido caprónico en la membrana interna de las mitocondrias de las células de la teca interna, por acción del complejo enzimático citocromo P450. Este paso enzimático es estimulado por la LH ^(5, 54, 108).

A partir de la pregnenolona la síntesis de esteroideas puede seguir dos vías:

 **Vía delta 4 ($\Delta 4$)** o de las cetonas (es la principal en el ovario):

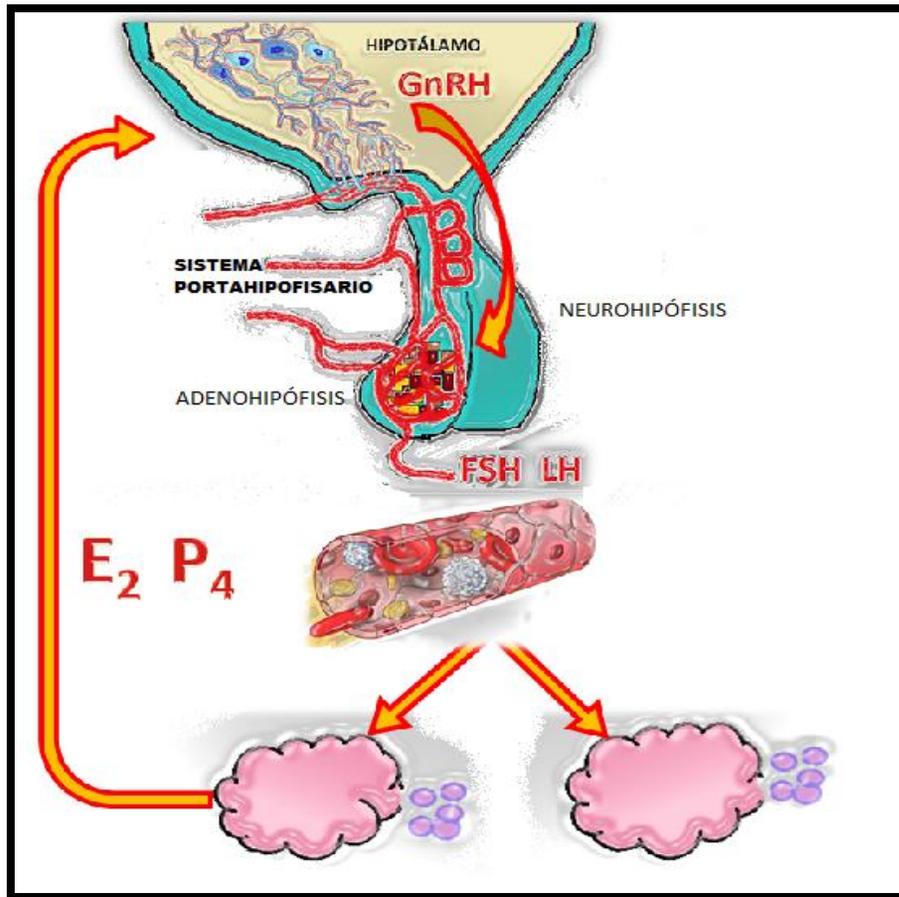
- La pregnenolona se convierte en P₄ mediante dos fases enzimáticas que implican a la 3 β -ol-deshidrogenasa y la $\Delta 4$ -5-isomerasa. Posteriormente, la P₄ se hidroxila dando lugar a la 17-hidroxiprogesterona, la acción de la desmolasa (17, 20 liasa) convierte la 17-hidroxiprogesterona en androstendiona y la acción de la 17 β -ol-deshidrogenasa sobre la androstendiona da lugar a la testosterona.

La androstendiona y la testosterona atraviesan por difusión pasiva la membrana basal del folículo y se incorporan al citoplasma de las células de la granulosa. En estas células la FSH aumenta la actividad del complejo enzimático de las aromatasas, lo que provoca la aromatización de los andrógenos a estrógenos.

 **Vía delta 5 ($\Delta 5$)** (es la principal en la suprarrenal):

- La pregnenolona por hidroxilación se convierte en 17- α hidroxipregnenolona, ésta desdobla su cadena lateral mediante una desmolasa convirtiéndose en la dehidroepiandrosterona (DHEA) y por la acción de la 3 β -ol-deshidrogenasa y la $\Delta 4$ -5-isomerasa sobre la DHEA da lugar a la androstendiona.

La androstendiona, obtenida por cualquiera de las vías anteriores, se convierte en testosterona por acción de la 17 β -ol-deshidrogenasa. La aromatización del anillo A de la androstendiona da lugar a la estrona y la aromatización de la testosterona da lugar al E₂ ^(54,105).



Como resultado de este proceso, parte del E₂ secretado por células de la granulosa del folículo ovárico se acumula en el antro folicular, pero gran parte se dirige a circulación sanguínea para transportarse unida a una proteína (principalmente albumina) hacia sus principales células blanco ^(4,8); el hipotálamo y la hipófisis, donde el E₂ inhibe o estimula la secreción de la GnRH. De esta forma, se cierra el circuito de regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario (Imagen 11).

Imagen 11. Eje hipotálamo Hipófisis ovario

LA ACETILCOLINA

BIOSÍNTESIS DE LA ACETILCOLINA

La síntesis de acetilcolina implica la unión de colina con acetil-coenzima A (acetil-CoA), reacción catalizada por una enzima específica la colin-acetil-transferasa (o colina acetilasa: CAT).

Dentro de las terminales nerviosas colinérgicas, la CAT se encuentra fijada laxamente a las vesículas sinápticas. La CAT es sintetizada en los cuerpos de las neuronas colinérgicas y migra a las terminales nerviosas por transporte axonal anterógrado.

La acetil-CoA, utilizada en la síntesis de acetilcolina, se produce en las mitocondrias a partir de tres fuentes: citrato, piruvato o acetato. Luego de ser sintetizada, la acetil-CoA difunde al citoplasma para su posterior unión con la colina.

En la síntesis de acetilcolina, la colina es otro elemento importante. La colina se incorpora a las terminales pre-sinápticas por un sistema de co-transporte con sodio, dependiente de ATP. Tal proceso solo se da en las terminales nerviosas y por medio de éste se suministra la mayor parte de la colina necesaria para la síntesis del neurotransmisor. La colina recién captada proviene, en su mayor parte, de la hidrólisis de la acetilcolina liberada, (hidrólisis generada por acción de la acetilcolinesterasa). El paso limitante en la síntesis de acetilcolina es la captación de colina ⁽²⁹⁾.

ALMACENAMIENTO

Las vesículas sinápticas de las terminaciones nerviosas colinérgicas son estructuras claras con un diámetro de 300 - 500 nm. Estas vesículas son las unidades "cuánticas" de almacenamiento del transmisor, parte de la acetilcolina ingresa a las vesículas y otra parte se asocia en la cara externa de las mismas ⁽²⁹⁾.

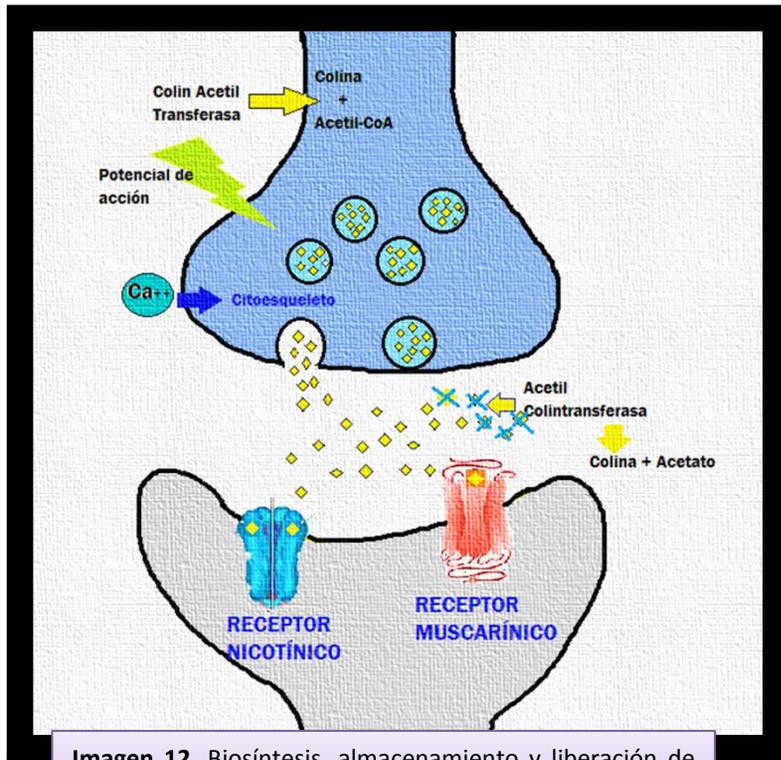


Imagen 12. Biosíntesis, almacenamiento y liberación de la Acetilcolina

LIBERACIÓN

La acetilcolina es liberada como resultado de un estímulo nervioso que induce un potencial de acción, cuyo resultado implica el ingreso de Ca^{++} al citoplasma de la neurona, el cual activa las proteínas contráctiles del citoesqueleto y facilitan que la vesícula se adose a la membrana de la terminal, de tal forma que el contenido de acetilcolina de la vesícula se descargue al espacio sináptico.

La neurotransmisión colinérgica concluye con la inactivación de la acetilcolina, que implica hidrólisis del neurotransmisor, en la que la acetil-colinesterasa (AChE) produce colina y acetato. La colina es reincorporada al citoplasma por un mecanismo de captación de alta afinidad, para ser reutilizada en la síntesis de acetilcolina y ácido acético⁽²⁹⁾.

RECEPTORES COLINÉRGICOS

La acetilcolina se une a dos tipos de receptores: nicotínicos y muscarínicos⁽³⁶⁾.

El nombre de los receptores nicotínicos (RN) se debe a que la nicotina, principio activo de la *Nicotiana tabacum* (alcaloide natural que desencadena acciones farmacológicas estimulantes a nivel de los ganglios autonómicos y en la placa mioneural estriada) carece de afinidad por los RM.

Anatómicamente, los RN se encuentran en regiones como la *placa mioneural* (en la membrana postsináptica de terminales nerviosas motoras provenientes de las motoneuronas alfa), la de *placa terminal* (membrana plasmática de fibras intrafusales del huso neuromuscular, que recibe inervación de las motoneuronas gamma), *ganglios autonómicos* (en el soma y dendritas de las neuronas noradrenérgica y colinérgica), *célula cromafin de la médula adrenal*, *neuronas del SNC* (por ejemplo: en la neurona de Renshaw de la médula espinal que recibe la inervación colateral recurrente de las moto-neuronas alfa y en autoreceptores de las terminaciones dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal), y *ciertas terminaciones nerviosas colinérgicas y noradrenérgicas* (como receptor presináptico facilitador de la liberación del neurotransmisor correspondiente) ⁽³⁶⁾.

RECEPTORES MUSCARÍNICOS

La muscarina es un alcaloide que se obtiene del hongo venenoso *Amanita muscaria*. Este compuesto natural posee la propiedad de desencadenar acciones parasimpatomiméticas por interactuar específicamente con ciertos receptores sobre los cuales también actúa la acetilcolina. Las acciones de la muscarina reciben el nombre de acciones muscarínicas y los receptores correspondientes se denominan muscarínicos ⁽³⁶⁾.

Los cinco tipos de RM han sido identificados por experimentos *in vitro* o con el uso de ratón y ratas “knock-out”, cuantificado por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en varias zonas del cerebro tales como; corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebro medio, médula espinal, cerebelo y cordón espinal ^(56,107). Se han identificado, clonado y secuenciado al menos cinco genes diferentes de los RM, (denominados m1 a m5) ⁽⁵⁶⁾. Los subtipos difieren en su capacidad de acoplamiento a diferentes proteínas G, generando desde ahí distintos procesos celulares.

Anatómicamente, los RM se encuentran en los *efectores autonómicos* con inervación parasimpática (músculo liso, corazón y glándulas), así como en *ciertos tejidos que no poseen inervación colinérgica* (el endotelio vascular carece de inervación parasimpática, pero presenta una alta densidad de RM), los ganglios anatómicos (simpáticos y parasimpáticos), en

la célula cromafin con sus cinco subtipos de receptores y finalmente en SNC, en neuronas localizadas en corteza, núcleo caudado, putamen, entre otras incluyendo el hipotálamo ^(2, 109).

Los diferentes subtipos de RM están constituidos por las correspondientes proteínas que se ubican en las membranas plasmáticas conformados de 7 dominios transmembranales. Estos receptores son parte de una gran familia de receptores, los cuales transducen sus señales celulares a través de proteínas G_i. Los RM₁ al acoplarse a la acetilcolina activan la fosfolipasa C, con la consecuente hidrólisis del fosfatidil inositol difosfato y la producción de los segundos mensajeros IP₃ y diacilglicerol (DAG) ^(3, 33, 38, 105).

NEURONAS COLINÉRGICAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL VINCULADAS AL HIPOTÁLAMO

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 acetilcolina ⁽⁸⁰⁾ apoyados posteriormente con el desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos poli y monoclonales, así como con marcadores radioactivos ^(26, 28). Las neuronas colinérgicas se organizan principalmente como circuitos locales y neuronas de proyección ⁽⁸¹⁾.

En el cerebro de la rata, se han identificado dos vías colinérgicas principales. La vía tegmental dorsal, cuyos somas neuronales colinérgicos se localizan en el núcleo cuneiforme de la formación reticulada mesencefálica, proyectan sus fibras hacia el tectum, el área pretectal, los cuerpos geniculados, el tálamo y el sistema límbico. La vía tegmental ventral cuyas neuronas se localizan en la sustancia negra y el núcleo tegmental ventral del cerebro medio, sus axones viajan a lo largo del haz tegmental ventral y atraviesan el hipotálamo y el subtálamo hasta llegar al tallo cerebral ^(81, 106) (Imagen 13).

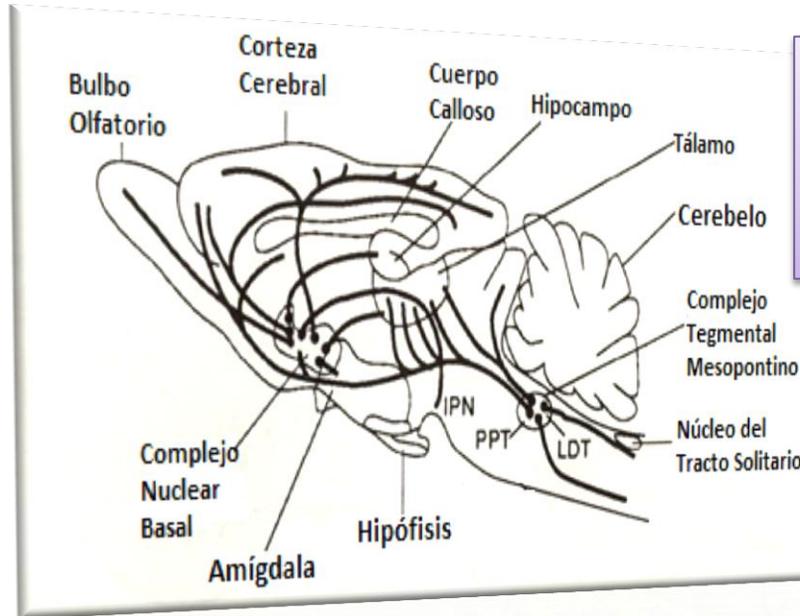


Imagen 13. Vías colinérgicas. Neuronas colinérgicas ocupan dos principales regiones del cerebro: **el complejo nuclear basal**, que envía axones al bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, tálamo y núcleo interpeduncular (IPN), el núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) y el núcleo tegmental laterodorsal (LDT). **La región tegmental mesopontina** que envía axones al tálamo, bulbo olfatorio y corteza cerebral ⁽⁹³⁾.

En el núcleo submamilar del hipotálamo se encuentra un núcleo denso de neuronas colinérgicas. Dispersas en las áreas posterior y lateral del hipotálamo y existen otras neuronas AChE-positivas. El área preóptica lateral es rica en células de este tipo y aquellas que se ubican en la porción dorsal del área preóptica envían fibras hacia la amígdala, por medio de la estría terminal ⁽⁸¹⁾.

PIRENZEPINA

El antagonista pirenzepina (PZP), tiene gran afinidad por el RM₁, el cual se encuentra principalmente en los tejidos nerviosos. La PZP es un fármaco sintético, muy hidrofílico, que atraviesa con dificultad las barreras biológicas. Por vía oral, en el tubo digestivo se absorbe un 20 - 30 %, alcanza su máxima concentración en el plasma aproximadamente a las 2 horas de administrarse, tiene una vida media plasmática de 11 horas, no se liga a las proteínas plasmáticas, no atraviesa la barrera hematoencefálica, se distribuye en el espacio extracelular y se elimina por riñón sin biotransformarse.

La PZP se caracteriza por sus efectos terapéuticos en la enfermedad ulcerosa gastroduodenal. En el hombre, esta inhibe la secreción ácida del estómago, principalmente, por disminuir el volumen secretorio. En la experimentación animal, la PZP

inhibe la secreción ácida gástrica inducida por diferentes secretagogos tales como la histamina, gastrina y acetilcolina. Las dosis efectivas de la PZP administrada por vía oral son 25 a 50 mg, 2 veces por día.

Es importante destacar que la selectividad de la PZP por los RM₁ no supera la de la acetilcolina ⁽⁵¹⁾.

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

Las primeras evidencias de la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas fueron los experimentos realizados por Sawyer, Markee y Everett hace más de 60 años, quienes mostraron que el bloqueo del sistema colinérgico, por la inyección subcutánea de sulfato de atropina interrumpe la ovulación, cuando se administra inmediatamente después del coito, en el caso de la coneja, un animal de ovulación refleja y en la rata, un animal de ovulación espontánea, cuando se inyecta en la mañana del proestro ^(30, 31).

En la rata, la inyección subcutánea de sulfato de atropina (70 mg/100 g de peso) o su aplicación directa al tercer ventrículo (250 µg) entre las 11:00 y 13:00 horas del proestro bloquea la secreción de LH, FSH y prolactina (PRL) horas más tarde. En estos animales, la inyección de GnRH sintético (LHRH) restablece la liberación preovulatoria de LH, por lo que se concluye que sus efectos son sobre el SNC, y que el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos altera la secreción normal de GnRH ^(68, 111).

Por otro lado, en el área preóptica (POA) existen diferencias sexuales en el número de sitios de unión de agonistas muscarínicos, siendo mayor en los machos que en las hembras. En ratas hembras cíclicas se observa que en POA la población de sitios de unión de alta afinidad a agonistas muscarínicos es mucho mayor en el día del proestro que en los demás días del ciclo estral (66 vs. 38%) ⁽¹⁵⁾. La lesión producida por la inyección de 6-hidroxidopamina intracerebral (destrucción masiva de neuronas catecolaminérgicas) produce un decremento de 1/6 del número total de receptores en el hipotálamo, por lo que es posible pensar en la existencia de RM presinápticos ubicados en las terminales catecolaminérgicas del hipotálamo ⁽⁴⁾.

Estudios *in vitro* muestran que en POA de la rata hembra, el número de RM varía durante el ciclo estral. En la mañana del proestro se observa un aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad a agonistas muscarínicos (60%), comparado a lo observado en diestro-2 o en la tarde del proestro (35%). Cuando porciones homogenizadas de POA se exponen a la presencia de E₂ resulta en la conversión de los sitios de unión de alta afinidad a agonistas muscarínicos 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 clomiféno (antiestrógeno) o prevenido por la ocupación previa de los RM por sus propios ligandos antes de la adición de la hormona. Los cambios significativos en los RM de POA coinciden con el llamado (periodo crítico), caracterizado por altas concentraciones de estrógenos y gran número de RE en POA (27).

En el hipotálamo y la adenohipófisis de las ratas, las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos evaluadas por ensayos de competencia con H³-N-metil - 4 piperidil bencilato (antagonista muscarínico tritiado de alta afinidad), muestran que únicamente las hormonas sexuales E₂ y P₄, afectan las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos. Ambas hormonas provocan la disminución en la proporción de sitios de unión de alta afinidad y en la constante de disociación. Esto permite sugerir una vinculación entre el sistema colinérgico muscarínico y los mecanismos por los cuales los esteroides ováricos inducen la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis (90, 105).

Tanto el contenido de acetilcolina de POA-AHA, la actividad de las enzimas de síntesis (CAT) como la degradación (AChE) y el número y la afinidad de los RM presenta cambios durante el ciclo estral (15, 28, 89). 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 por ciento de los casos depende del día del ciclo y la hora en que se administre; es el diestro-1 el día más sensible, ya que se requiere de la dosis menor (22). Durante el periodo crítico (en el día de proestro) la concentración de acetilcolina en POA cae y luego incrementa de modo abrupto (23, 28).

Durante el ciclo estral de la rata hembra, en POA existe un ritmo colinérgico endógeno. En el día del diestro-1 se presentan las concentraciones máximas de acetilcolina y en diestro-2 las mínimas. El número y la afinidad de RM también varían durante el ciclo estral (15). El marcaje con el agonista muscarínico [³H]-N-metil escopolamina muestra que la unión específica y la constante de disociación para dicho fármaco es máxima en el día del estro y disminuyen progresivamente en los

demás días del ciclo estral ⁽¹⁵⁾. Mediante el marcaje con el antagonista colinérgico muscarínico [³H] bencilato de quinuclidina se observan también cambios cíclicos en el marcaje, con un máximo en proestro y un mínimo en los días del diestro ⁽⁸⁹⁾. La discrepancia aparente de estos resultados podría explicarse por el hecho de que los fármacos usados en los experimentos, posiblemente tengan diferente afinidad a los subgrupos de RM en POA-AHA, y abre la puerta a la especulación sobre la importancia de cada uno de estos subgrupos de receptores en la regulación del proceso reproductor. El número y la afinidad de los RM en el hipotálamo son regulados por las hormonas esteroides ováricas. Experimentos *in vitro* con POA muestran que existe una relación directa entre la concentración de E₂ y la proporción de RM de alta y baja afinidad. Durante la mañana del proestro se observa un incremento significativo en la proporción de RM de alta afinidad (60 %), comparado con el día de diestro-2 o la tarde del proestro (35%). Es posible que estos cambios en la afinidad de los RM reflejen variaciones en la actividad colinérgica en POA durante el ciclo estral ⁽²⁸⁾. En la rata hembra cíclica, la actividad máxima de la enzima AChE en el hipotálamo se presenta en los días de estro y diestro-1 y la mínima en proestro ⁽¹⁵⁾.

En ratas ovariectomizadas, la administración sistémica de BE aumenta significativamente el marcaje de los RM por [³H] bencilato de quinuclidina en el hipotálamo medio basal y lo disminuye en el área preóptica media de modo dosis dependiente ⁽²¹⁾. En el hipotálamo y la hipófisis, las progestinas y sus metabolitos inhiben el marcaje de los RM por antagonista colinérgico ⁽⁶⁰⁾.

Por otro lado, el sistema colinérgico a su vez regula la respuesta de las neuronas hipotálamicas a los estrógenos, ya que el tratamiento con betanecol, un agonista colinérgico muscarínico, incrementa en 38% el número de sitios de unión al E₂ en el citosol de neuronas hipotálamicas de ratas hembras ovariectomizadas y el pre-tratamiento con sulfato de atropina bloquea los efectos del betanecol. En machos castrados, el betanecol no tiene efectos sobre la concentración de sitios de unión al E₂ ⁽⁶⁶⁾.

La liberación de GnRH desde la eminencia media en ratas cíclicas es estimulada significativamente por el antagonistas muscarínicos 11{[2-[(diethylamino) metil]-1-piperidinil] -acetil}-5, 11 dihidro-6 H-pirido (2,3-b) (1,4) benzodiazepina-6-uno (AF-DX-116) y metoctramina. Dicha estimulación depende del día del ciclo estral en que se realice el tratamiento. Es posible que los efectos inducidos por la administración de estos fármacos sean mediados por RM del subtipo M₄. El bloqueo de los

efectos de los antagonistas muscarínicos solo fue posible en presencia de prazosin, (un antagonista α -adrenérgico). Una posible explicación para la estimulación de la liberación de GnRH por un antagonista muscarínico es que los efectos sean el resultado de una intercomunicación entre los RM y los receptores 1- α adrenérgicos. Así, los agonistas muscarínicos inhibirían la liberación de GnRH inducida por los agonistas 1- α adrenérgico y los antagonistas muscarínicos, al cancelar este efecto inhibitorio permite que los agentes α_1 - endógenos (noradrenalina) induzcan la liberación de GnRH ⁽⁶²⁾.

En ratas ovariectomizadas, la inyección en el tercer ventrículo de 20 a 100 μ g de sulfato de atropina (2 μ l) redujo significativamente las concentraciones plasmáticas de LH. La inyección intraventricular de 20 μ g de acetilcolina indujo un incremento significativo de la concentración de LH durante los 5 minutos siguientes a la inyección, mientras que la concentración de FSH se elevó 30 minutos después de la inyección. El bloqueo de los receptores dopaminérgicos con pimozide previene los incrementos en las concentraciones plasmáticas de LH y FSH así como la disminución de PRL inducidos por la inyección intraventricular de acetilcolina. La supresión de la liberación de LH inducida por sulfato de atropina fue revertida y ocurrió una elevación en los animales que fueron tratados con el bloqueador de los receptores dopaminérgicos. La inyección de sulfato de atropina no tuvo efectos sobre las altas concentraciones de PRL en los animales tratados con pimozide. Estos resultados apoyan la idea de un papel estimulante de la acetilcolina sobre la liberación de las gonadotropinas e inhibitorio sobre la liberación de PRL, indicando que el control colinérgico podría ser por medio de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares ⁽¹¹⁰⁾.

En neuronas disgregadas de hipotálamos provenientes de ratas en cada fase del ciclo estral, se analizó el papel funcional de los receptores nicotínicos y muscarínicos en la liberación de la GnRH. La activación de los RM₁ incrementa la liberación de GnRH al medio, mientras que la activación de los RM₂ inhibe la liberación de GnRH. Un efecto semejante se ha observado cuando se ponen a incubar las eminencias medias de ratas adultas con antagonistas muscarínicos como el AF-DX 116 o la metoctramina, lo que implica que los RM₂ inhiben la liberación de GnRH, efectos que varían durante el ciclo estral, siendo el día más sensible la fase de estro ⁽⁶²⁾.

ASIMETRÍA Y LATERALIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Uno de los criterios morfológicos que se utilizan para clasificar a los animales es el tipo de simetría. Hasta hace algunos años se consideraba que los animales que son bilaterales son simétricos, es decir, sus cuerpos pueden dividirse por un plano en dos partes iguales (la izquierda y la derecha); de tal forma que ambas partes son imágenes especulares una de la otra. Sin embargo, en algunos de sus órganos internos puede haber asimetría, la cual puede estar vinculada con aspectos anatómicos, morfológicos, ultra estructurales, bioquímicos y funcionales ⁽⁵⁸⁾.

Desde hace más de 120 años se describió la existencia de elementos asimétricos en el cerebro ⁽¹⁰⁾. Aun cuando la predominancia del uso de la mano derecha se ha reconocido mucho tiempo antes, no se había considerado la posibilidad de que la preferencia manual tenga su origen en la organización del cerebro. No fue sino hasta después de la segunda guerra mundial que se mostró que en el hombre, el hemisferio cerebral izquierdo participa preferentemente en la expresión del habla y la habilidad manual (diestro y siniestro), mientras que el hemisferio derecho estaba relacionado con las manifestaciones emocionales, las aptitudes musicales y la atención ⁽⁵⁸⁾.

Cada lado del cerebro humano está especializado para la expresión de algunos estados de ánimo. Así, uno de los hemisferios está más relacionado con las manifestaciones de alegría y júbilo, y el otro con las de depresión ^(39, 40, 95). La evaluación de la respuesta típica al ácido lisérgico (LSD), en pacientes que fueron sometidos a una lobectomía temporal, desaparece después de extirpar el lóbulo temporal derecho y no el izquierdo ⁽¹⁰¹⁾. Esta asimetría funcional va acompañada de diferencias en el tamaño de diversas estructuras cerebrales y, en algunos casos, estas diferencias dependen del sexo. Por ejemplo, en la rata, la corteza cerebral y el hipocampo del lado derecho son más grandes en los machos, en tanto que en las hembras ocurre lo contrario ⁽²⁰⁾.

La asimetría no se restringe a los aspectos macroscópicos, sino que también incluye el tamaño de las neuronas y la distribución de sus dendritas. Por ejemplo, en el hombre, las neuronas de la corteza auditiva primaria del lado izquierdo son más grandes que las del lado derecho; el número de sinapsis dendríticas del lado derecho de la corteza de asociación, de las

fibras simpáticas y parasimpáticas que inervan uno y otro lado del corazón, el intestino y otros órganos de la cavidad abdominal son desiguales ⁽⁴⁵⁾. Estas asimetrías funcionales y anatómicas pueden acompañarse o no, de diferencias en el contenido de neurotransmisores y de algunos aminoácidos esenciales ^(76, 83, 96, 98).

La asimetría fisiológica puede ocurrir aunque no existan disimilitudes anatómicas. Por ejemplo, el canto de las aves paserinas está controlado por el núcleo hiperestriado ventral del hemisferio izquierdo, el que es anatómicamente simétrico. Este hecho sugiere que el patrón de las conexiones neurales es asimétrico, de tal forma que cada lado podría controlar diferente función. De hecho, cada lado de la siringe de estas aves controla en forma diferente la vocalización, ya que la sección del nervio hipogloso izquierdo altera el canto del ave, mientras que la sección del nervio derecho no tiene efectos significativos ⁽²⁾.

En la rata, la ligadura de la arteria cerebral media derecha, provoca hiperactividad en los animales, disminución de la concentración de noradrenalina en toda la corteza y el *locus ceruleus*, así como de dopamina en la sustancia negra; mientras que la ligadura de la misma arteria, pero del lado izquierdo, no tiene efectos ⁽⁹⁴⁾. Como podemos observar, la simetría bilateral externa, puede o no acompañarse de asimetrías funcionales, bioquímicas, ultraestructurales, conductuales o todas a la vez.

ASPECTOS ASIMÉTRICOS DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA

Resultados experimentales de varios autores han demostrado que la regulación neuroendocrina que ejerce el hipotálamo, sobre la función de uno y otro ovario, es asimétrica ^(1, 14, 16, 17, 24, 30, 38, 42, 43, 44, 75, 78, 79, 80, 82). A la fecha, no se cuenta con datos que indiquen que esta asimetría funcional se acompañe de asimetrías anatómicas. Al respecto sabemos que la cantidad de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal es significativamente mayor que en el izquierdo ^(6, 42), la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH y del receptor α y β para estrógenos es diferente entre las porciones izquierda y derecha de POA-AHA ^(80, 86). Es posible que estas asimetrías estén relacionadas con diferencias anatómicas, morfológicas o

bioquímicas, en la participación de los diversos sistemas de neurotransmisión que regulan la síntesis y la liberación de la GnRH, entre cada lado del hipotálamo o de las áreas extra-hipotalámicas que se relacionan funcionalmente con él.

No hay que dejar de considerar que esta asimetría funcional y bioquímica del hipotálamo, sea el resultado de diferencias bioquímicas y anatómicas de las diversas señales neuroendocrinas que regulan la secreción de la GnRH, como pueden ser las que provienen del propio ovario; ya que la extirpación de uno de los ovarios aumenta significativamente el contenido de GnRH en el hipotálamo del mismo lado que se extrajo el ovario. La hemiovariectomía del lado derecho aumenta la asimetría en el contenido de GnRH, mientras que la del lado izquierdo la disminuye ^(42, 44).

La región preóptica responde de manera asimétrica a las hormonas esteroides. El implante de E₂ en el lado derecho de POA o el núcleo ventromedial de ratas hembras recién nacidas provoca masculinización cuando los animales llegan a la edad adulta (estas hembras prefieren sexualmente a otras hembras). En cambio cuando el E₂ se implanta en el lado izquierdo, ocurre defeminización (los animales no tienen ciclos estrales) ⁽⁸¹⁾.

Asimismo, el lado derecho de AHA parece jugar un papel preponderante en el proceso de hipertrofia compensadora del ovario, ya que en la rata hemiovariectomizada, la lesión por radio frecuencia del lado derecho de esta área previene la hipertrofia compensadora del ovario remanente, en tanto que la lesión del lado izquierdo no la modifica ⁽³⁸⁾; la lesión unilateral de esta misma área del hipotálamo con ácido kaínico, bloquea la hipertrofia compensadora sólo si la lesión y la hemiovariectomía se hacen del mismo lado ⁽⁷⁷⁾.

En la rata prepúber el proceso de hipertrofia compensadora del ovario parece estar controlado por el hipotálamo izquierdo, ya que su deaferentación bloquea la hipertrofia compensadora del ovario, en tanto que la deaferentación del hipotálamo derecho no modifica este proceso ⁽⁷⁹⁾.

Cada lado de POA-AHA regula la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario ipsilateral, mientras que el hipotálamo medio (que comprende a los núcleos arcuato y ventro-medial) regula la ovulación de uno u otro ovario de manera estimulante, y de manera asimétrica la hipertrofia compensadora de cada ovario ⁽¹⁷⁾.

No sólo cada lado del hipotálamo regula en forma lateralizada la función de una y otra gónada, sino que ésta responde de manera asimétrica a los mecanismos neuroendocrinos que la regulan. Así, el número de ovocitos liberado por el ovario izquierdo de la rata adulta es mayor que el del derecho ⁽²⁴⁾; cuando se extirpa el ovario derecho el número de animales que ovulan es significativamente menor que cuando se extirpa la gónada izquierda ⁽¹³⁾; en la cerda, el número de receptores a la gonadotropina coriónica humana (hCG), la concentración de P₄, la actividad de la β-N-acetil-D-glucosaminidasa y de la glucosa-fosfato deshidrogenasa son mayores en los cuerpos lúteos del ovario izquierdo que en los del derecho ⁽⁹²⁾; la concentración de testosterona en la vena testicular aumenta al doble en el 58% de los animales hemicastrados del lado izquierdo, mientras que sólo ocurre en el 27% de los que fueron hemicastrados del lado derecho ⁽³⁷⁾.

Por otro lado, la estimulación de los RM con pilocarpina (agonista no selectivo a los RM) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA de la rata, modifica la ovulación espontánea de manera diferente en cada fase del ciclo estral: en el día del estro provocó bloqueo de la ovulación cuando el implante se colocó en el lado izquierdo de POA-AHA (lo contrario a lo sucedido por el implante de sulfato de atropina); en diestro-1 o diestro-2 el implante unilateral de pilocarpina no provocó efectos asimétricos sobre la ovulación. En cambio, en proestro, el implante en el lado derecho de POA-AHA bloqueó la ovulación, lo que no sucedió del lado izquierdo de POA-AHA ⁽⁶⁹⁾.

La función asimétrica que ejerce el sistema colinérgico de POA-AHA, sobre la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, es consecuencia de una actividad asimétrica propia de acetilcolina, ya que:

1. La actividad de la enzima CAT del lado derecho de POA-AHA varía durante el ciclo estral; sus valores máximos se observan en el día del estro y sus mínimos en el día del diestro-2. En cambio, la actividad de la CAT del lado izquierdo no varía. En el día del estro, la actividad de la CAT en POA-AHA derecha fue significativamente mayor que en el lado izquierdo. En el día del diestro-2, esta relación se invierte ⁽⁹⁹⁾.

2. Las concentraciones de acetilcolina en POA-AHA varían durante ciclo estral: la concentración máxima se detectó en el día del diestro-1 y la menor en diestro-2. Solamente en los días del diestro-1 y del proestro, se observaron diferencias asimétricas; es decir, el lado derecho de POA-AHA tiene más acetilcolina que el izquierdo ⁽¹⁵⁾.
3. La cantidad de sitios de unión (B_{max}) para la [³H]N-metil-escopolamina en membranas de tejido de POA-AHA cambia durante el ciclo estral. La mayor cantidad se midió en el día del estro y la menor en el proestro. En los días del diestro-2 y del proestro, la B_{max} del lado derecho fue menor que la del izquierdo, lo que llega a ser indetectables en el proestro ⁽¹⁵⁾. Por medio de la técnica de inmunocitoquímica, se ha observado en cortes histológicos de POA-AHA extraídos a las 09:00, 11:00, 13:00 ó 17:00 horas de cada fase del ciclo estral, que el número de células inmuno-reactivas (ir) a los RM₁ no cambia durante el ciclo estral y es semejante en uno y otro lado de POA-AHA. En cambio, el número de células ir-RM₂ es alto a las 09:00 h del día y va disminuyendo hacia la tarde (17:00 h); este comportamiento siempre ocurre en cada fase del ciclo estral, pero es igual en uno y otro lado de POA-AHA ⁽⁹⁴⁾.

JUSTIFICACIÓN

POA-AHA regula en forma asimétrica la secreción de las gonadotropinas y la ovulación (1, 13, 16, 24, 38, 42, 43, 78, 80, 82, 91, 92). En esta regulación diferencial entre la porción izquierda y derecha del hipotálamo participa el sistema colinérgico, el cual es intrínsecamente asimétrico en su función (expresada como actividad de la enzima de síntesis de la acetilcolina, la cantidad de acetilcolina, el número y afinidad de los receptores muscarínicos) y varía durante el ciclo estral (9, 15, 28, 99).

Se ha mostrado que el bloqueo unilateral de todos los receptores muscarínicos de POA-AHA, 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. Dichos efectos son el resultado de la alteración en la secreción fásica de GnRH, ya que el reemplazo de esta hormona a ratas implantadas con atropina en POA-AHA, ovulan en la mañana del estro esperado (17). La falta de ovulación por el bloqueo del sistema colinérgico resulta de la inhibición de la secreción preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) en la tarde del proestro (110).

Por otra parte, se considera a la atropina como un antagonista muscarínico no selectivo, es decir que se une a los cinco receptores de este tipo (61, 62). En el hipotálamo, los receptores que predominan son los muscarínicos M_1 y M_2 (53, 110, 111).

Mediante el estudio *in vitro* de tejido hipotalámico extraído de fetos de 17 días de gestación y células GT-1 se mostró que la acetilcolina modula la secreción de la GnRH por medio de receptores M_1 y M_2 (64). En la eminencia media de ratas cíclicas se ha mostrado que la desactivación de los receptores muscarínicos M_1 y M_2 incrementa la liberación de GnRH al medio efecto que varía durante el ciclo estral (62).

Con la finalidad de estudiar si el papel de los receptores M_1 en la ovulación cambia durante el ciclo estral y si es semejante entre la porción izquierda y derecha de POA-AHA, en esta tesis se analizaron los efectos del bloqueo de los receptores M_1 , mediante la inyección de pirenzepina, sobre la ovulación de la rata adulta.

HIPÓTESIS

Dado que durante el ciclo estral de la rata, el bloqueo unilateral de los cinco receptores muscarínicos de POA-AHA provoca efectos asimétricos en la ovulación, y que *in vitro*, la desactivación de los receptores M₁ de células de eminencia media de la rata estimulan la liberación de GnRH, entonces el bloqueo unilateral de los receptores M₁ de POA-AHA provocará efectos asimétricos sobre la ovulación de la rata, la cual cambiará con la etapa del ciclo estral.

OBJETIVO

Analizar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos M₁ de la porción izquierda o derecha de POA-AHA, llevado a cabo en cada fase del ciclo estral, sobre la ovulación de la rata adulta.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos M₁ de la porción izquierda de POA-AHA, llevado a cabo en cada fase del ciclo estral, sobre:
 - El número de ovocitos liberados
 - El peso de los ovarios
 - El peso del útero en el día del estro esperado.
2. Cuantificar la respuesta ovulatoria al remplazo de la señal hipotalámica y ovárica, en animales que no ovulan por el bloqueo unilateral de los receptores muscarínicos M₁ durante el ciclo estral.

METODOLOGÍA

Micro-inyección

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 Chow) y al agua. A todos los animales se les realizó el estudio del frotis vaginal por medio de la toma diaria de una muestra de la vagina, a las 10:00 horas y sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron al menos dos ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración. Animales en diferente fase del ciclo estral, seleccionados al



Imagen 14. Rata anestesiada de la cepa (CIIZ-V: Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM).



Imagen 15. Equipo de micro-inyección; estereotáxico y bomba de micro-inyección.

azar, fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Anestesal Smith Kline Norden de México) (25 mg/kg p.c.) i.p. y se colocaron en un aparato estereotáxico entre las 12:30 y 13:30 h en las cuatro fases del ciclo estral. Las coordenadas para llegar a POA-AHA fueron: Antero-posterior=-0.04mm, Medial-lateral=+0.06mm (POA-AHA izquierda) y -0.06mm (POA-AHA derecha) y vertical=-0.86mm a partir del punto Bregma del atlas de cerebro de la rata de Köning y Klippel ⁽⁶¹⁾.

Una vez en POA-AHA a cada animal se le inyectó un μl de solución salina de 0.9% (grupo vehículo), 10 ó 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de pirenzepina (antagonista a RM_1), durante un minuto, en el lado derecho o izquierdo de POA-AHA, por medio de una aguja de #25 (diámetro interior) conectada a un tubo de teflón unido a una jeringa (Hamilton) de 20 μl acoplada a una bomba de micro-diálisis

(CMA/100, BAS: Bioanalytical System). Dicha dosis fue calculada con base a los experimentos realizados previamente tanto *in vitro* ⁽⁶²⁾, como *in vivo* ⁽¹⁶⁾.

Con la finalidad de analizar los mecanismos endócrinos que provocaron la falta de ovulación como resultado del bloqueo de los receptores M_1 de POA-AHA, grupos de ratas que no ovularon se microinyectaron con solución salina o con PZP en la misma etapa y el mismo lado de POA-AHA, y se les administró:

- 3.7 μg de GnRH sintética (LHRH Sigma Aldrich) a las 14:00 h del proestro esperado, ó
- 10 μg de Benzoato de Estradiol (Sigma Aldrich) a las 14:00 h del diestro-2

Dichas dosis inducen la ovulación en diferentes modelos experimentales.



Imagen 16. Inyección subcutánea de LHRH o BE_2 en la rata.

Procedimiento de autopsia

Todos los animales se sacrificaron entre las 10:00 y 11:00 horas del día del estro esperado del ciclo estudiado mediante una exposición a vapores de cloroformo; se pesaron ambos ovarios y útero de cada animal. Se cuantificaron también los ovocitos contenidos en los oviductos de cada ovario con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Como grupo testigo se utilizaron animales intactos sacrificados en el día del estro.

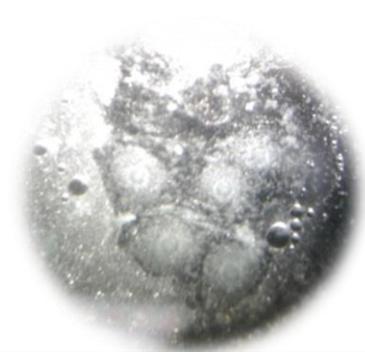


Imagen 17. Ovocitos de rata vistos al estereoscopio al momento de extraer de los oviductos (10x).

Análisis Estadístico

Los resultados del número de animales ovulantes se analizaron por la prueba exacta de Fisher, el del número de ovocitos liberados por la prueba de Kruzkall-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los datos del peso de los ovarios y del útero se analizaron mediante la prueba de análisis de las varianzas (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de “t” de Student ó de “U” Mann-Withney. También se realizó una correlación inversa entre el peso del útero y el porcentaje de úteros balonados hallados con el tratamiento de 100 µg de PZP. En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad es $\leq 5\%$.

RESULTADOS

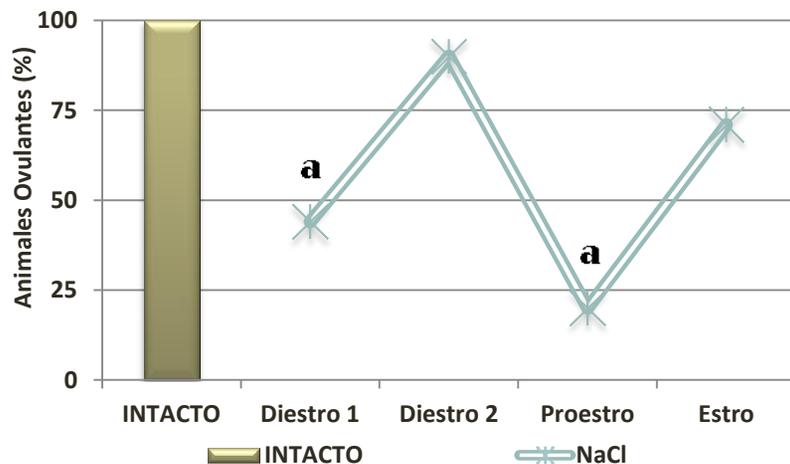
MICRO-INYECCIÓN CON CLORURO DE SODIO (NaCl) O CON 10 O 100 µg de PIRENZEPINA

PORCENTAJE DE ANIMALES OVULANTES

Con respecto a los animales intactos, la micro-inyección de cloruro de sodio en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA provocó efectos semejantes sobre la ovulación: en los días de diestro-1 y proestro, el NaCl indujo el bloqueo de la ovulación (Figura 1).

La micro-inyección de 10 µg de PZP no modificó los efectos de la micro-inyección del NaCl. En cambio, la micro-inyección de 100 µg de PZP en uno y otro lado de POA-AHA alteró la ovulación según el día del ciclo en que se administró: en diestro-1, la micro-inyección de 100 µg de PZP en uno y otro lado de POA-AHA provocó aumento del porcentaje de animales ovulantes (%AO) con respecto a los animales micro-inyectados con NaCl. En proestro, la inyección de 100 µg de PZP aumentó el %AO solo cuando se inyectó en el lado izquierdo de POA-AHA. En el día del estro la micro-inyección de 100 µg de PZP en uno y otro lado de POA-AHA provocó disminución del %AO (Figura 2).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

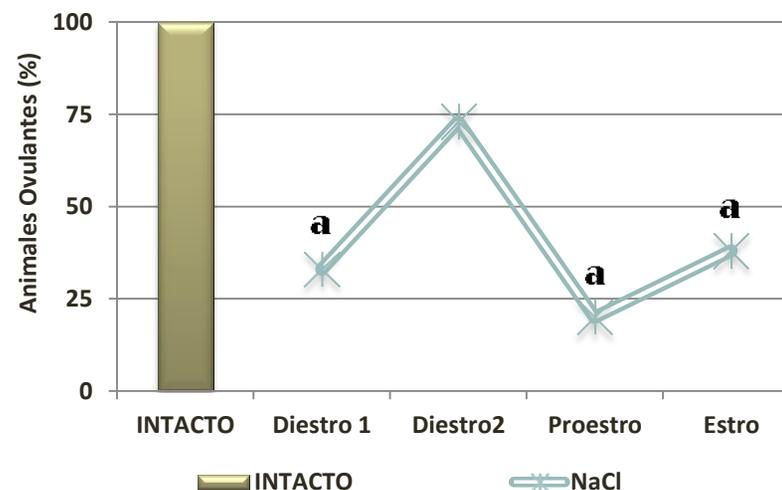
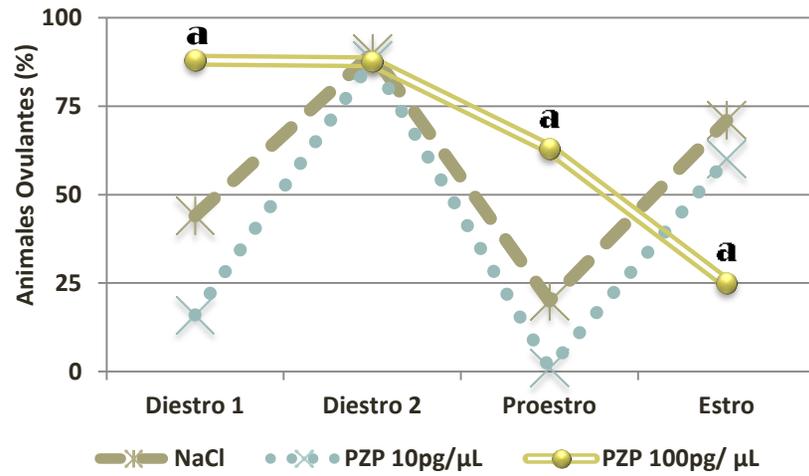


Figura 1. Efectos de la micro-inyección de NaCl en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre el porcentaje de animales que ovularon espontáneamente en el día del estro esperado. **a**: $p < 0.05$ vs. Intacto (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

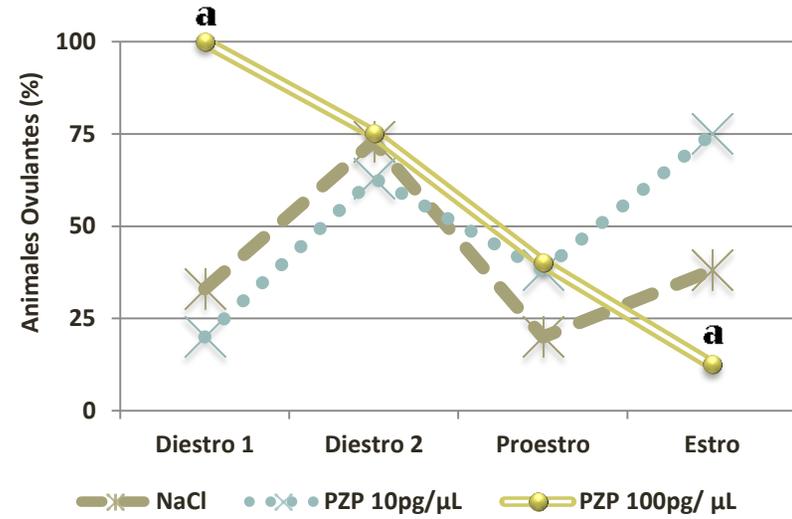


Figura 2. Efectos de la micro-inyección de 10 ó 100 pg de pirenzepina (PZP) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre el porcentaje de animales que ovularon espontáneamente en el día del estro esperado. ^a $p < 0.05$ vs NaCl (Prueba exacta de Fisher).

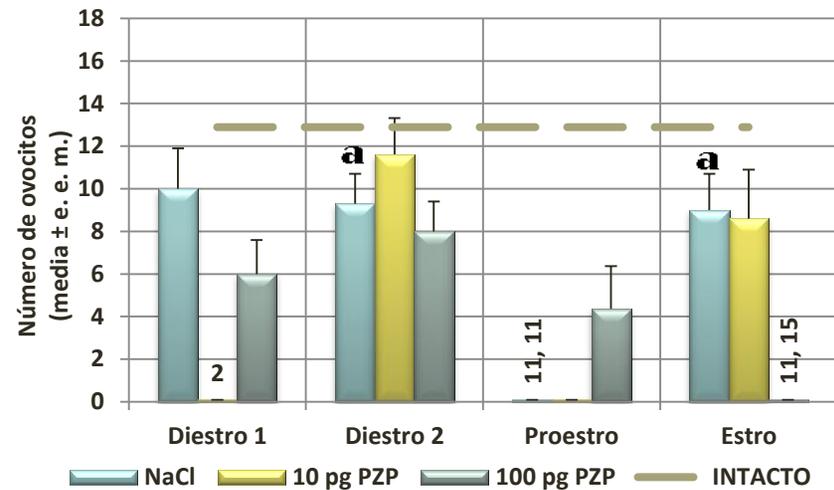
OVOCITOS TOTALES LIBERADOS

La micro-inyección de NaCl provocó la disminución del número de ovocitos liberados, pero este efecto solo fue significativo en diestro-2 y en estro en el lado izquierdo de POA-AHA, así como en proestro del lado derecho. La micro-inyección de 10 pg de PZP del lado derecho modificó los efectos del NaCl en diestro-2 y estro y mientras que la microinyección de 100 pg modifica los efectos de NaCl en los días de diestro-2 y proestro (Figura 3).

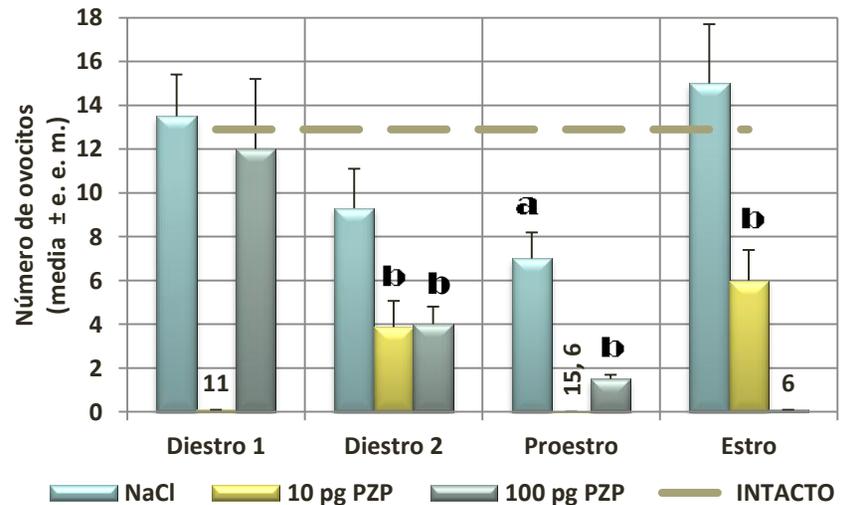
Figura 3. Efectos del bloqueo de los receptores M₁ de POA-AHA izquierda o derecha sobre el número de ovocitos liberados. **a** p<0.05 vs intacto; **b** p<0.05 vs. NaCl. Los valores sobre las barras indica el número de ovocitos liberados por uno o dos animales que ovularon en ese grupo experimental.^{II} (Prueba de Kruskal-Walis seguida de la prueba de Dunn).

^{II} Donde ovulan menos de tres animales en cada grupo no se puede establecer media, error estándar y diferencia significativa.

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

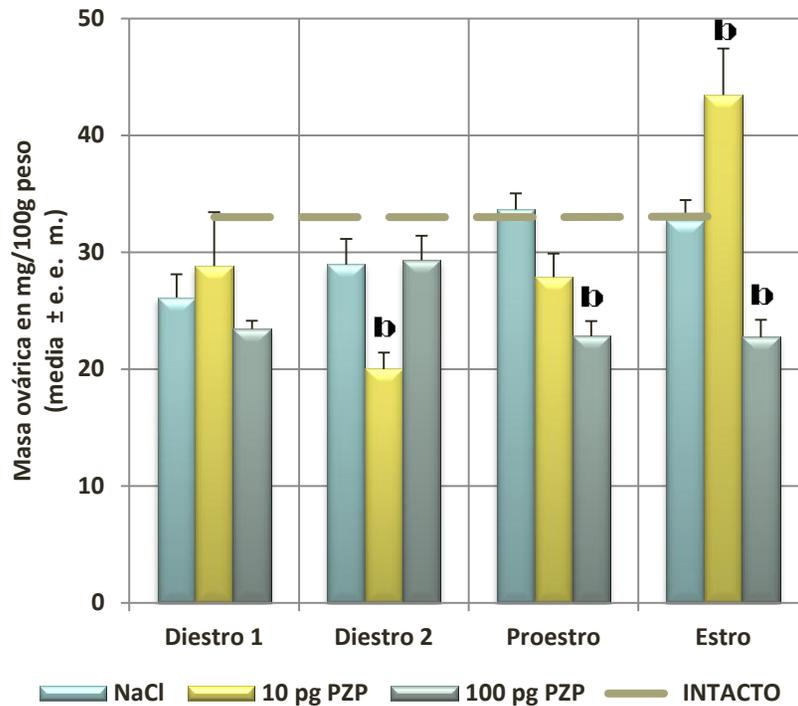


MASA OVÁRICA (Σ del peso del ovario izquierdo y derecho)

Con respecto a los animales intactos, la micro-inyección de NaCl en el lado derecho de POA-AHA provocó disminución de la masa ovárica cuando los animales se inyectaron en diestro-1, diestro-2 o estro.

La micro-inyección de 10 μ g de PZP en POA-AHA izquierda en diestro-2 disminuyó la masa ovárica, mientras que cuando la micro-inyección se realizó en estro, en uno u otro lado de POA-AHA, la masa ovárica aumentó. Los animales tratados con 100 μ g de PZP en el lado izquierdo de POA-AHA, en las fases de proestro o estro, mostraron un menor peso de los ovarios con respecto a los animales tratados con NaCl (Figura 4).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

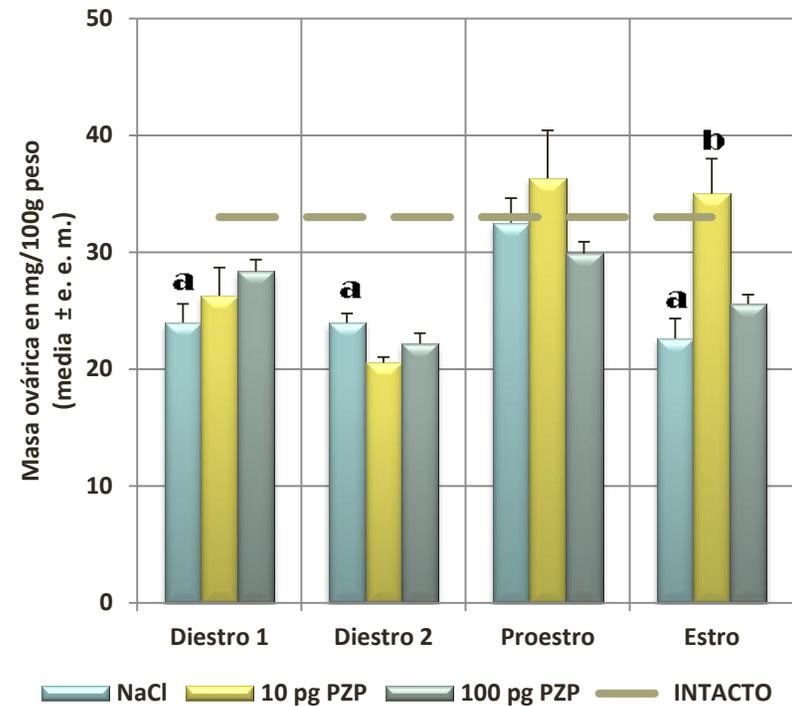
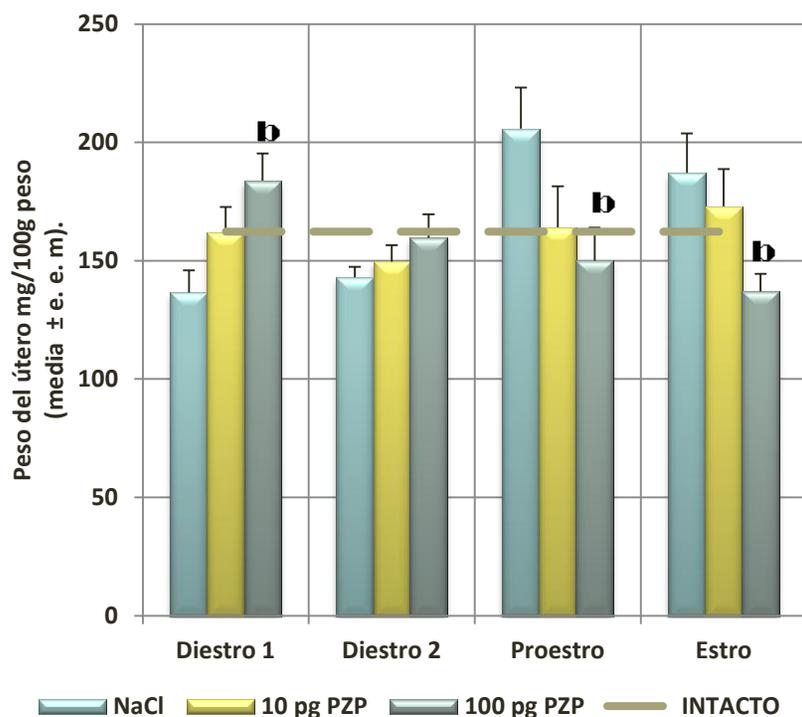


Figura 4. Efectos del bloqueo de los receptores M_1 de POA-AHA izquierda o derecha sobre la masa ovárica. **a** $p < 0.05$ vs. Intacto; **b** $p < 0.05$ vs NaCl (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

PESO DEL ÚTERO

Con respecto a los animales micro-inyectados con NaCl, 100 pg de PZP inyectado en POA-AHA izquierda en la fase de diestro-1, incrementó el peso del útero, mientras que cuando se administró en proestro ó estro, lo disminuyó (Figura 5).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

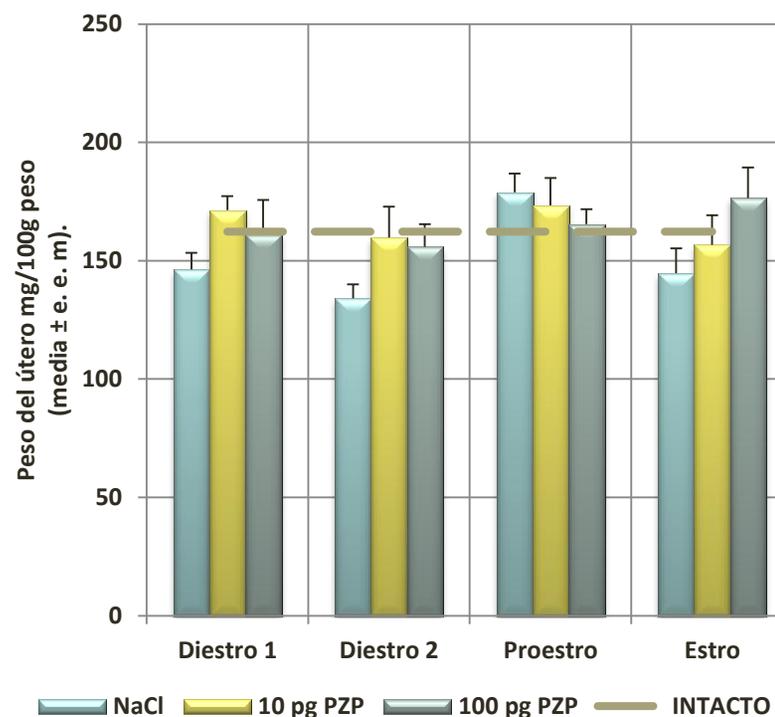
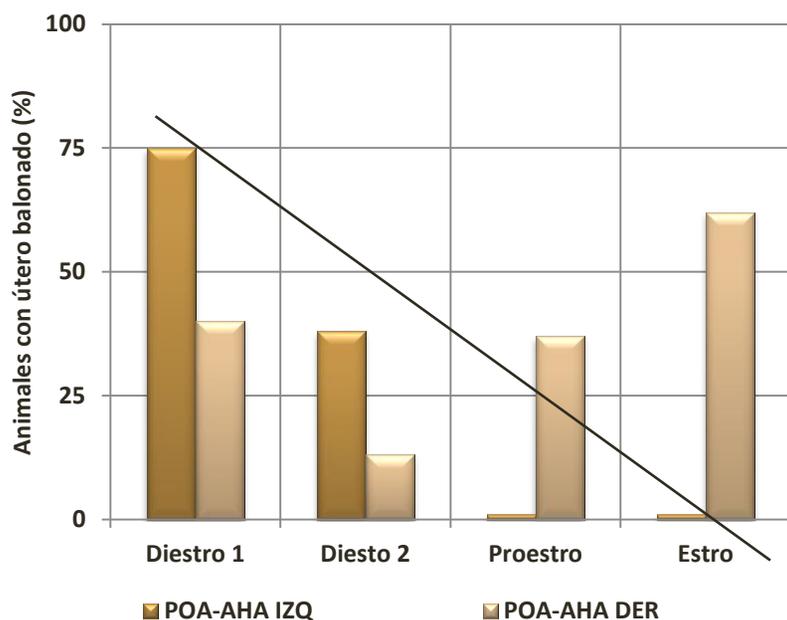


Figura 5. Efectos del bloqueo de los receptores M_1 de POA-AHA izquierda o derecha sobre el peso del útero. ^b $p < 0.05$ vs NaCl (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

PRESENCIA DE ÚTEROS BALONADOS EN ANIMALES MICRO-INYECTADOS CON 100 μ g DE PIRENZEPINA EN RATAS SACRIFICADAS AL ESTRO ESPERADO

El bloqueo de los RM_1 en el lado izquierdo de POA-AHA, por la micro-inyección de 100 μ g de PZP, modificó de manera gradual el peso del útero, así como la presencia de líquido en el interior del mismo (útero balonado) en el día del estro esperado (Figura 6). Además se observó correlación inversa entre el peso y el porcentaje de animales con útero balonado ($r=0.958$, $r^2=0.9119$, $p<0.0419$). La inyección de la misma dosis de PZP en el lado derecho de POA-AHA no se observó esta correlación ($r=0.9402$, $r^2=0.8841$, $p<0.0598$, prueba de correlación con distribución Gaussiana). La micro-inyección de NaCl o de 10 μ g de PZP no resultó en un efecto semejante.

A



B

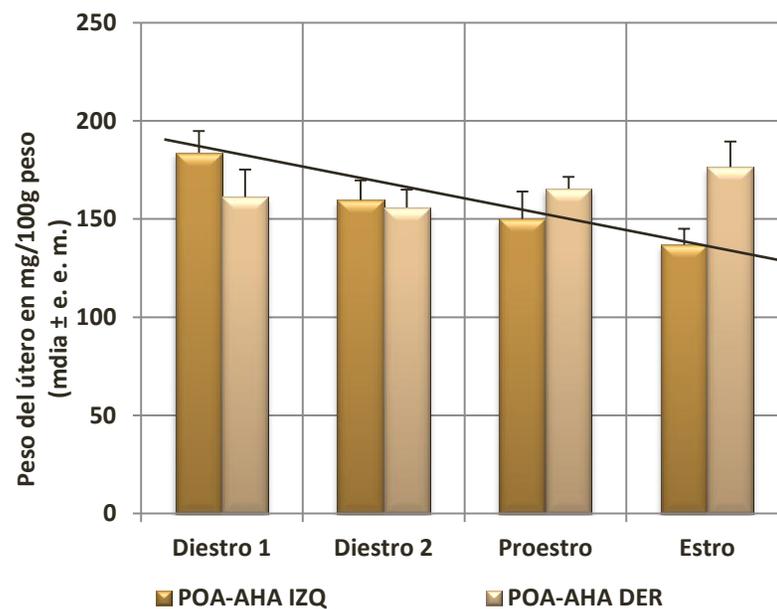


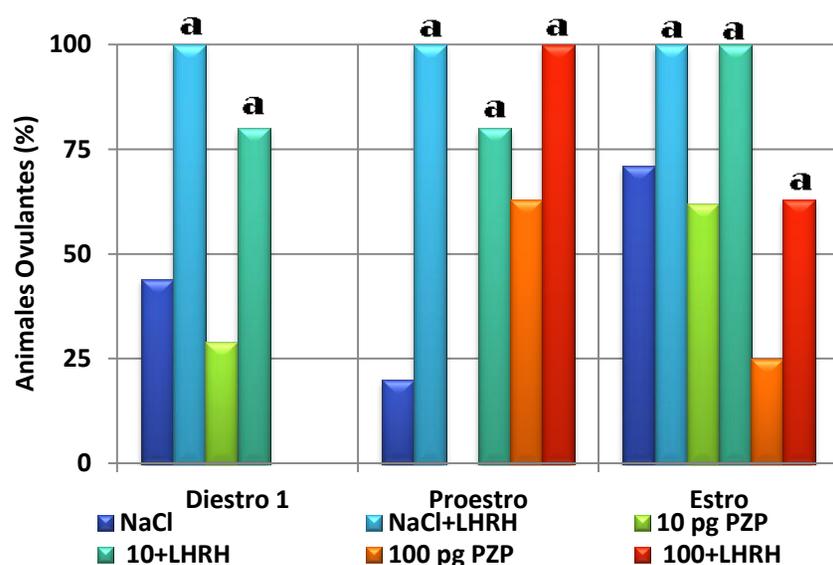
Figura 6. Porcentaje animales con úteros balonado (A) y peso del útero (B) en ratas con micro-inyección de 100 μ g de PZP en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA durante el ciclo estral de la rata, la línea representa la tendencia lineal entre POA-AHA izquierda.

REEMPLAZO DE LA HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE

PORCENTAJE DE ANIMALES OVULANTES

La administración de LHRH resultó en el aumento del %AO en todos los grupos micro-inyectados con NaCl o con PZP, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA (Figura 7).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

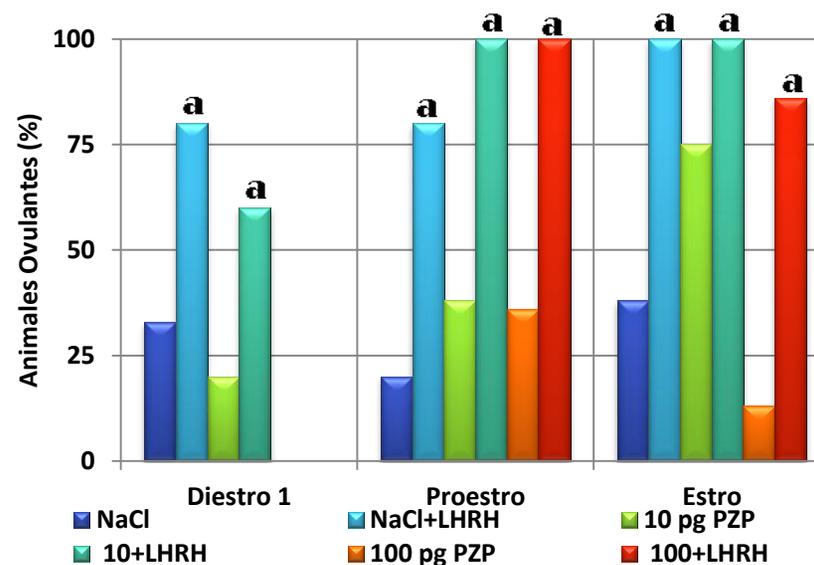
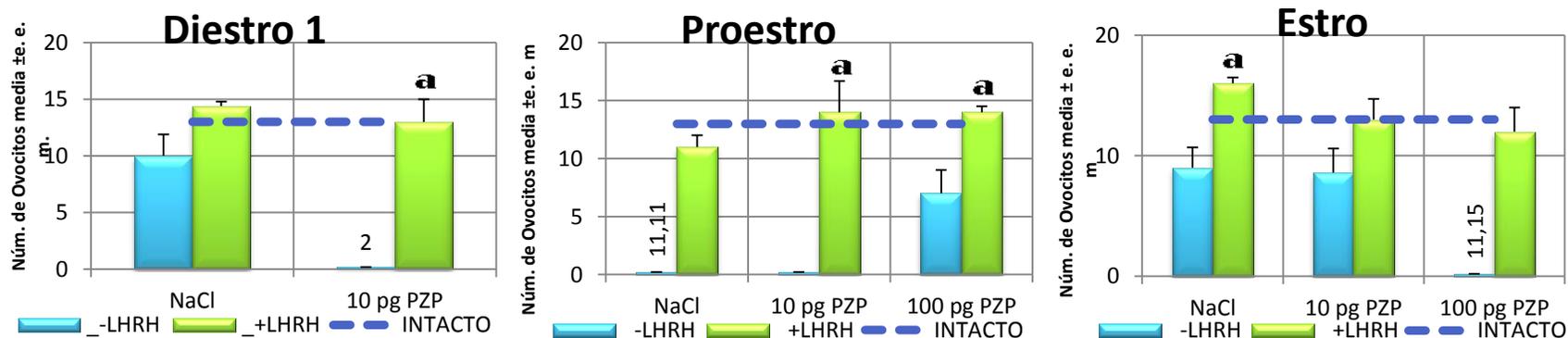


Figura 7. Porcentaje de animales que ovularon en respuesta de la inyección de LHRH, a las 14:00 h del proestro esperado, después de ser micro-inyectados con NaCl o PZP en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. ^a $p < 0.05$ vs. mismo grupo sin reemplazo de LHRH (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).

OVOCITOS TOTALES LIBERADOS

La inyección de 3.7 µg de LHRH en ratas micro-inyectadas con NaCl o PZP (10 ó 100 µg), en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, provocó la liberación de un número de ovocitos semejante al de los animales intactos (Figura 8).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHO

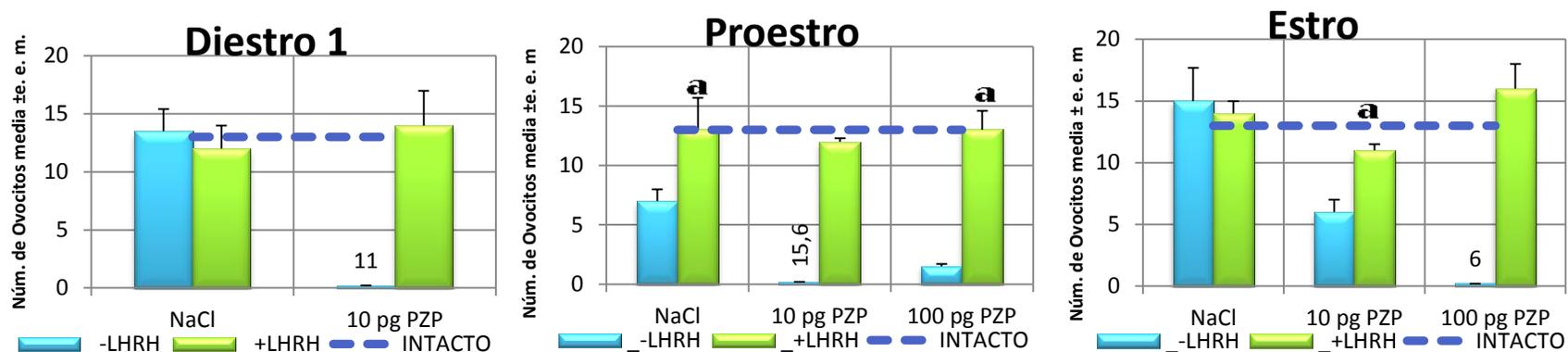


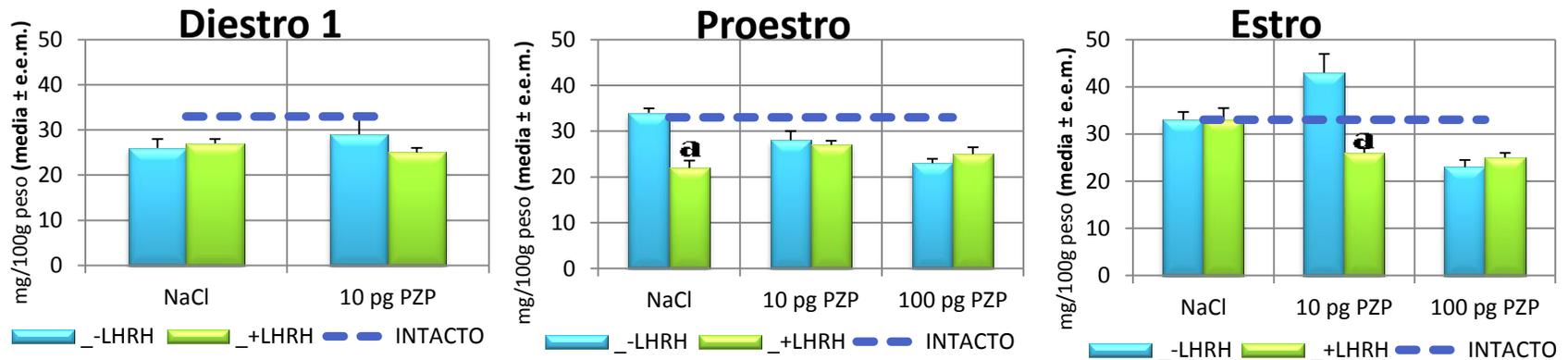
Figura 8. Número de ovocitos liberados como respuesta a la administración de 3.7 µg de LHRH en ratas micro-inyectadas con NaCl o PZP (10 ó 100 µg) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. **a** p<0.05 vs mismo grupo sin reemplazo de LHRH. Los valores sobre las barras indica el número de ovocitos liberados por uno o dos animales que ovularon en ese grupo experimental. (Prueba de Kruskal-Walis seguida de la prueba de Dunn).²

² Donde ovulan menos de tres animales en cada grupo no se puede establecer media, error estándar y diferencia significativa.

MASA OVÁRICA

En el día del proestro, la masa ovárica disminuyó en los animales que fueron micro-inyectados del lado izquierdo de POA-AHA con NaCl y que recibieron LHRH. Un efecto semejante se observó cuando se inyectó 10 µg de PZP en el lado derecho de POA-AHA en proestro, y en uno y otro lado en el día del estro, después de la administración de LHRH (Figura 9).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

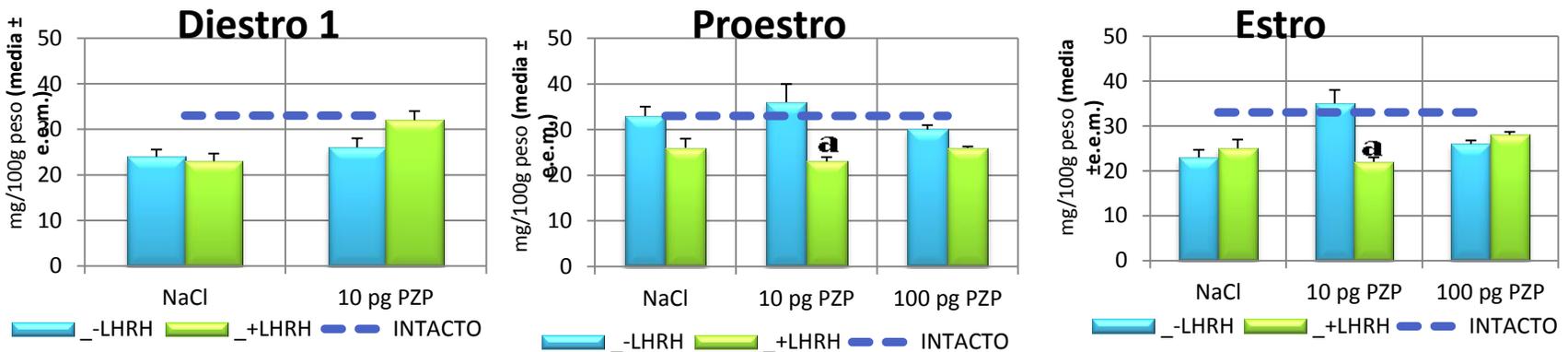
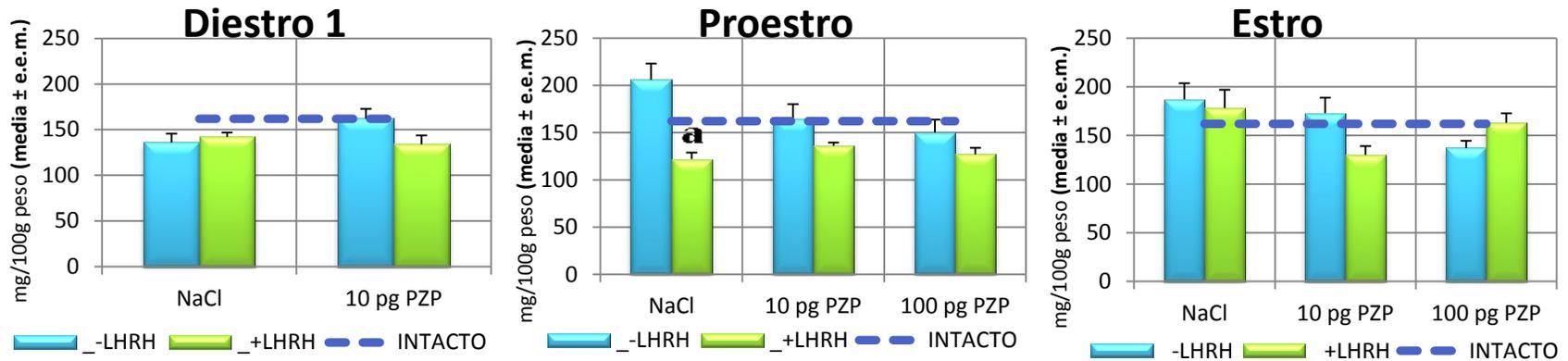


Figura 9. Peso de los ovarios como respuesta a la administración de 3.7 µg de LHRH en ratas micro-inyectadas con NaCl o PZP (10 ó 100 µg) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. ^a p<0.05 vs mismo grupo sin reemplazo de LHRH (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

PESO DEL ÚTERO

La única diferencia con respecto al peso del útero ocurrió al administrar LHRH a los animales micro-inyectados con NaCl en el lado izquierdo de POA-AHA al medio día del proestro (Figura 10).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

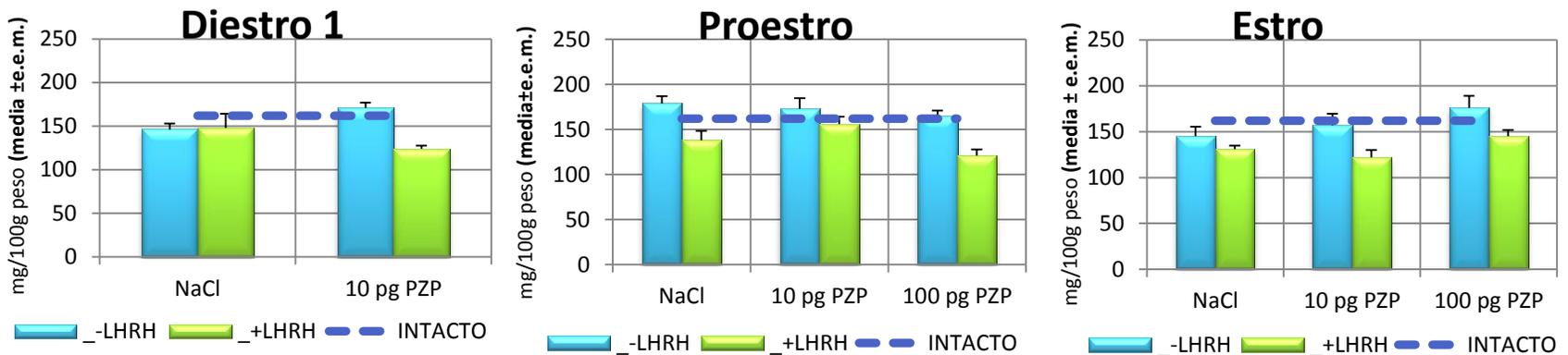


Figura 10. Peso de útero en respuesta a la administración de 3.7 μ g de LHRH en ratas micro-inyectadas con NaCl o PZP (10 ó 100 μ g) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. **a** $p < 0.05$ vs mismo grupo sin reemplazo de LHRH (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

ADMINISTRACIÓN DE BENZATO DE ESTRADIOL

PORCENTAJE DE ANIMALES OVULANTES

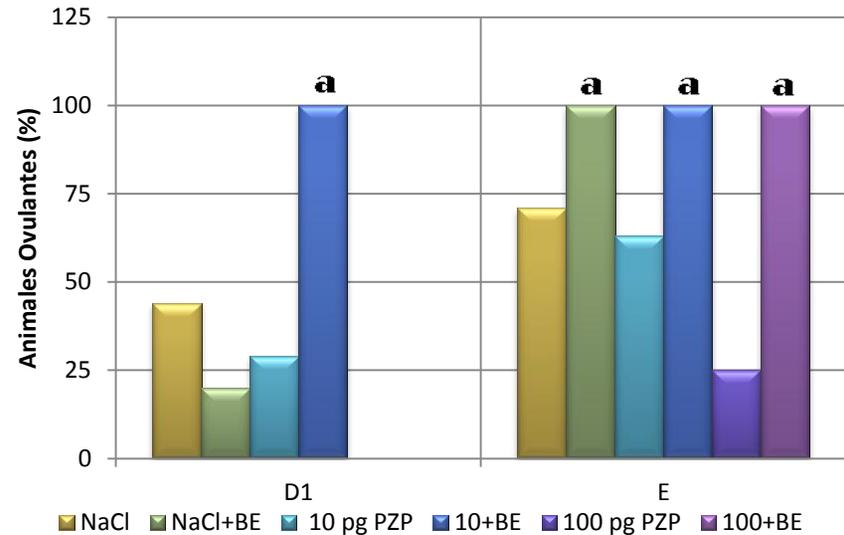
Los efectos del reemplazo de la señal ovárica con benzoato de estradiol (BE) en los animales micro-inyectados con NaCl o con PZP dependieron del día del ciclo en el que se trató al animal:

En diestro-1 la inyección de BE no indujo la ovulación en los animales micro-inyectados con NaCl en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. Los animales con bloqueo de los receptores M₁ en uno y otro lado de POA-AHA ovularon después de la inyección de BE.

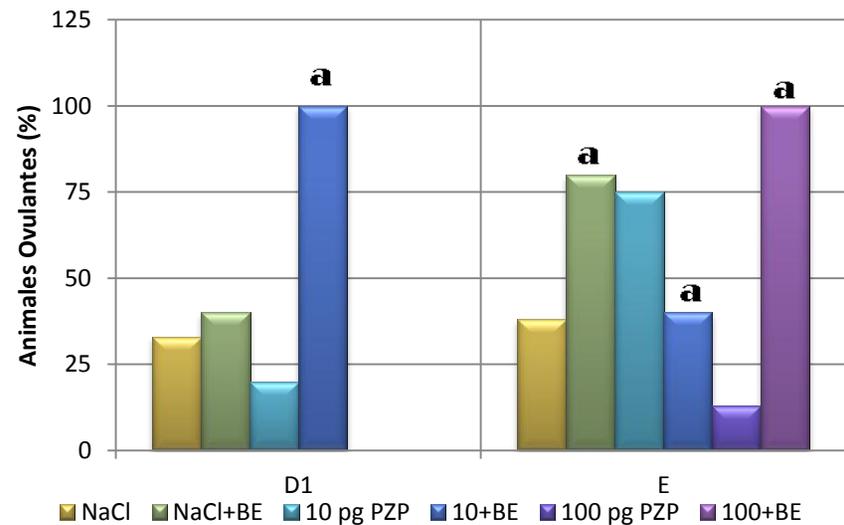
En el estro la inyección de BE indujo la ovulación en los animales micro-inyectados con NaCl en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. En los animales micro-inyectados con 10 µg de PZP, el reemplazo de BE indujo la ovulación en aquellos inyectados en el lado izquierdo de POA-AHA. Por el contrario, los tratados en el lado derecho, el BE disminuyó el porcentaje de animales ovulantes. Todas las ratas micro-inyectadas con 100 µg de PZP ovularon con el reemplazo de BE (Figura 11).

Figura 11. Porcentaje de animales que ovularon como respuesta a la administración de 10 µg de BE en ratas micro-inyectadas con NaCl o PZP (10 ó 100 µg) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. **a** p<0.05 vs. el mismo grupo sin reemplazo de BE (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).

POA-AHA IZQUIERDA



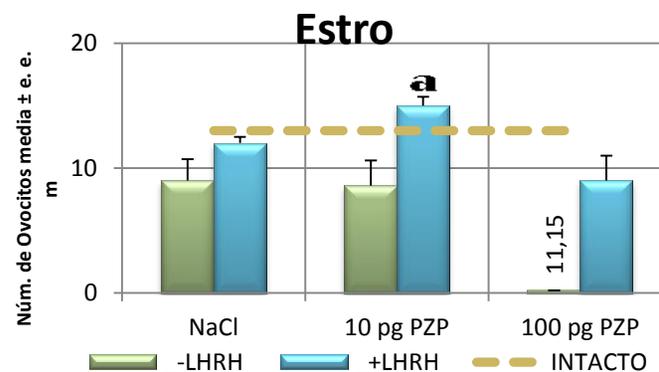
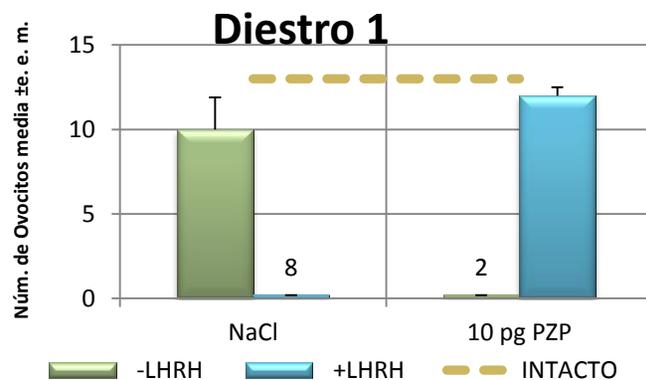
POA-AHA DERECHA



OVOCITOS TOTALES LIBERADOS

La micro-inyección de NaCl en uno u otro lado de POA-AHA en la fase de D1, no modificó el número de ovocitos liberados, en aquellos animales que logran ovular. Este mismo efecto se observó en ratas micro-inyectadas en el día del estro con 10 µg de PZP en el lado derecho de POA-AHA y 10 µg de BE. En cambio, cuando este tratamiento se realizó en el día del estro en el lado izquierdo, el BE incrementó significativamente el número de ovocitos liberados con respecto al grupo sin BE. (Figura 12)

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

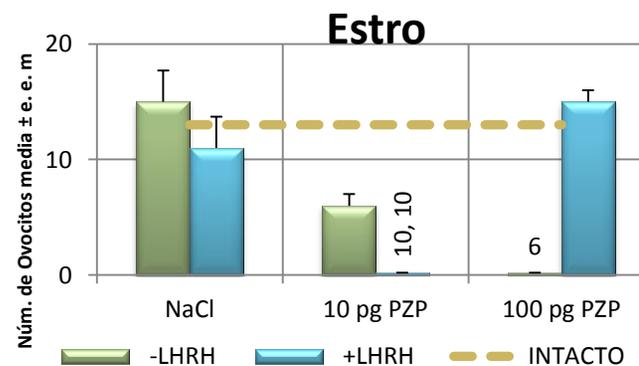
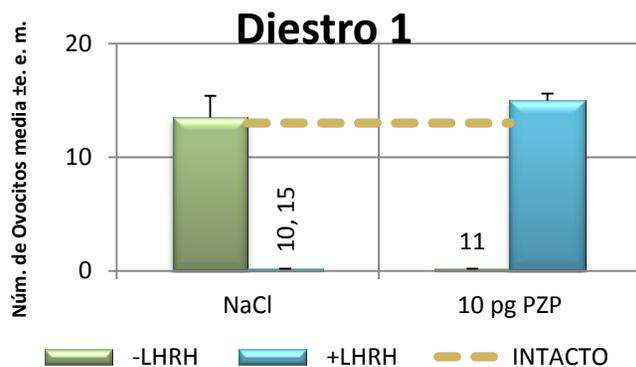


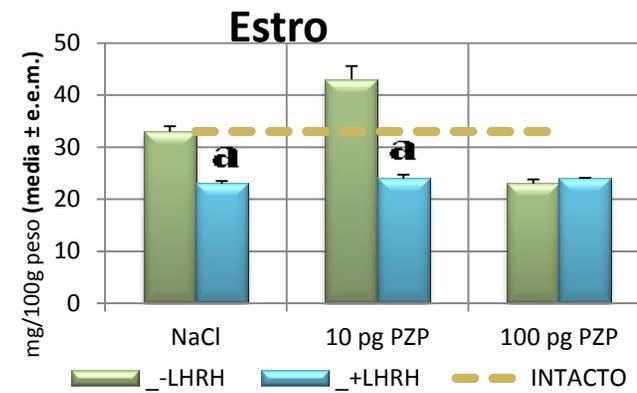
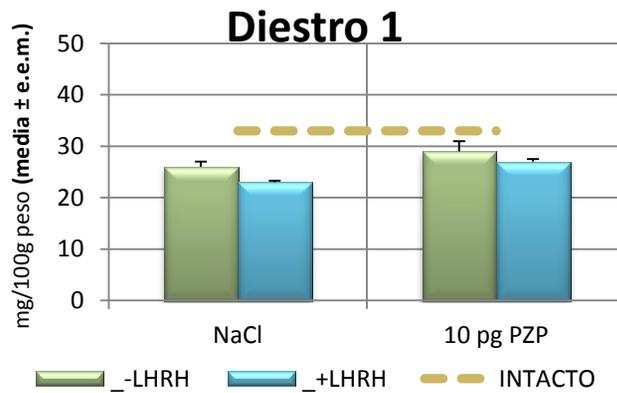
Figura 12. Número de ovocitos liberados en respuesta a la administración de 10 µg de BE en ratas micro-inyectadas con NaCl o PZP (10 ó 100 µg) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. Los valores sobre las barras indica el número de ovocitos liberados por uno o dos animales que ovularon en ese grupo experimental.^{VI} **a** $p < 0.05$ vs. mismo grupo sin reemplazo de BE (Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn).

^{VI} Donde ovulan menos de tres animales en cada grupo no se puede establecer media, error estándar y diferencia significativa.

MASA OVÁRICA

En el día del estro, el reemplazo de BE en los grupos de ratas micro-inyectadas en el lado izquierdo de POA-AHA con NaCl provocó disminución de la masa ovárica. El mismo efecto se observó en los animales inyectados con 10 µg de PZP en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, después de la administración del BE (Figura 13).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

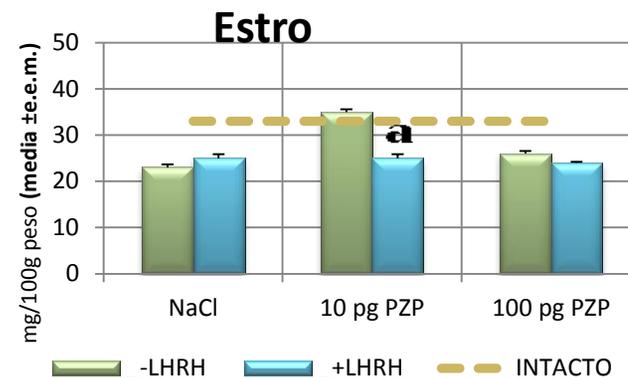
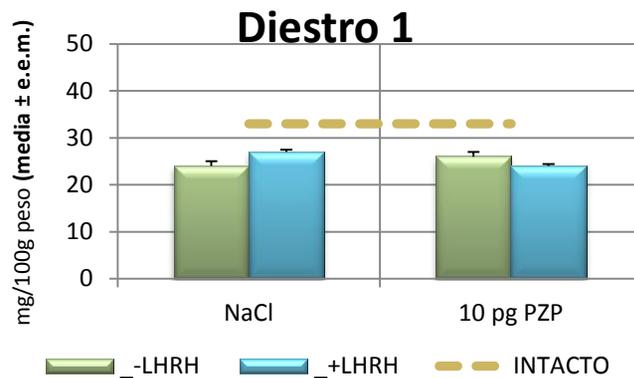
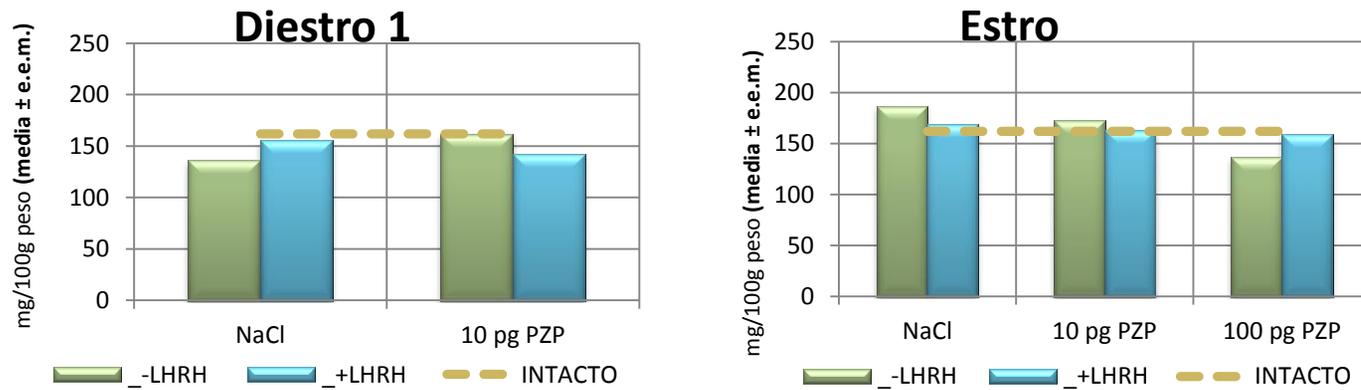


Figura 13. Peso de los ovarios en respuesta a la administración de 10 µg de BE en ratas micro-inyectadas con NaCl o PZP (10 ó 100 µg) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA. **a** $p < 0.05$ vs. mismo grupo sin reemplazo de BE (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

PESO DEL ÚTERO

El reemplazo de BE en los grupos de ratas micro-inyectadas con NaCl o PZP en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, no modificó el peso del útero con respecto a los animales sin reemplazo de la hormona (Figura 14).

POA-AHA IZQUIERDA



POA-AHA DERECHA

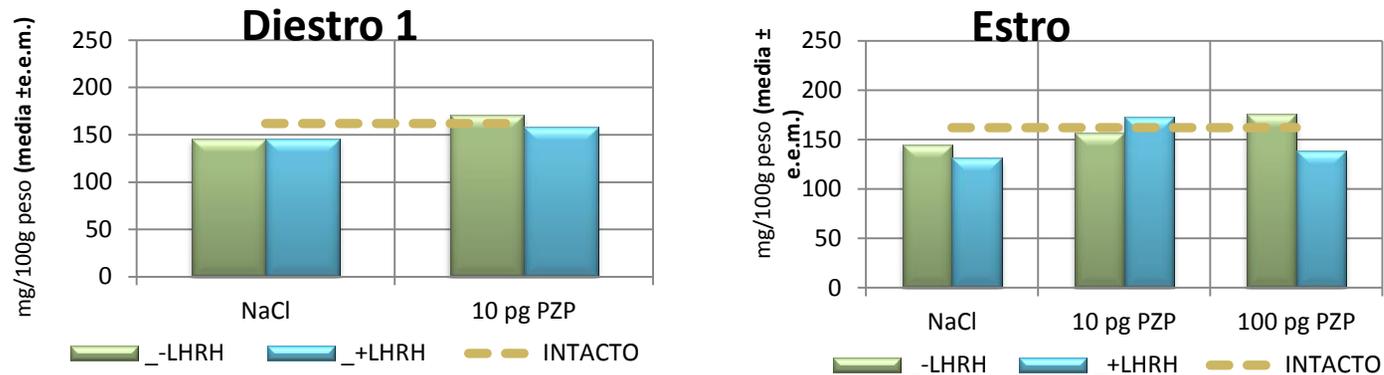


Figura 14. Peso del útero en respuesta a la administración de 10 µg de BE en ratas micro-inyectadas con NaCl o PZP (10 ó 100 µg) en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En POA-AHA, la acetilcolina unida a los RM₁ regula los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación. La función reguladora de la ovulación por los RM₁ se modifica durante el ciclo estral: dependiendo de la dosis de PZP es inhibitoria en diestro-1 y cambia a ser estimulante en las fases de proestro y estro. Además, la función reguladora del complejo acetilcolina-RM₁ en la secreción de la GnRH y la ovulación no es asimétrica.

POSIBLES RESPUESTAS A LOS EFECTOS DE LA MICRO-INEYECCIÓN UNILATERAL DE NaCl EN POA-AHA DURANTE EL CICLO ESTRAL.

Los efectos de la micro-inyección de solución salina en POA-AHA sobre la ovulación dependieron de la fase del ciclo estral en la que fue inyectada: En las fases de proestro y diestro-1, la inyección de solución salina provocó el bloqueo de la ovulación como resultado de la alteración en la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, hecho que dependió de la sensibilidad de cada animal utilizado, ya que la inyección de LHRH sintético indujo la ovulación en todos los animales. El líquido cefalorraquídeo que rodea a las neuronas es sintetizado por células del plexo coroideo. Este líquido está en continuidad con el líquido intersticial que baña las neuronas, pero está separado del plasma que recorre los vasos por la barrera hematoencefálica. En el humano, el volumen de líquido cefalorraquídeo es entre 125-150 ml, el aumento de esta cantidad produce hidrocefalia; su osmolaridad es mayor que la del plasma, de tal forma que las concentraciones de Na⁺, Cl⁻ y Mg⁺⁺ son mayores, mientras que las de K⁺, bicarbonato, fosfato, glucosa y proteínas son menores, así como el pH. Se ha establecido (doctrina de Monroe-Kellie) que ningún elemento del contenido del cráneo (encéfalo, sangre o líquido cefalorraquídeo) puede aumentar como no sea a expensas de los demás ⁽⁵²⁾. Con base en esta información se sugiere que la inyección de un μL de solución salina modifica, al menos durante el tiempo en que se micro-inyecta, la osmolaridad del líquido que rodea a las neuronas de POA-AHA lo que puede resultar en cambios en la excitabilidad de las neuronas, y en consecuencia de la actividad secretora de la neurona GnRH,

de la neuronas que la rodean, de la glía o de todas a la vez. Además, los cambios en la concentración extracelular de Na⁺, Cl⁻ y agua en los días de diestro 1 y proestro, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA resultan en el bloqueo de la ovulación. El cambio osmolar del líquido intersticial en ambos lados de POA-AHA ocurren en las fases de diestro 1, proestro y estro, mientras en el diestro-2, el NaCl no provoca alteraciones.

La inyección de solución salina afecta a la baja el número de ovocitos liberados durante el ciclo estral (aunque sólo significativos en diestro 2 y estro) en el lado izquierdo de POA-AHA y en el día del proestro del lado derecho de POA-AHA, ya que los animales liberan un menor número de ellos. Estos resultados permite sugerir que desde POA-AHA izquierda existe una conexión nerviosa que llega directamente a ovario, que regularía la respuesta de los folículos a las gonadotropinas circulantes. Dado que este efecto no es igual cuando se micro-inyecta la salina en el lado derecho de POA-AHA, se puede sugerir que dicha conexión afecta de manera diferente, lo que resulta en un mecanismo asimétrico entre la zona de estudio y los ovarios. Esta idea estaría apoyada por lo sugerido por De la Iglesia y colaboradores ⁽¹⁹⁾, al señalar que la estimulación asimétrica que ejerce el núcleo supraquiasmático (NSQ) 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, el nervio vago ó el plexo ovárico. 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 ⁽⁷⁷⁾. 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 del Factor 9 de Diferenciación del Crecimiento (GDF9) y Proteína 15 Morfogenética del Hueso (MBP15) ⁽⁹⁰⁾.

Con base en estos resultados, se sugiere que la solución salina micro-inyectada del lado derecho regula mecanismos ováricos que conllevan a cambios en su masa y no en el número de ovocitos liberados. Es decir, que se compromete el crecimiento, diferenciación y salud de los folículos más que la ovulación, ya que el peso de uno u otro ovario disminuye únicamente en los animales micro-inyectados del lado derecho de POA-AHA. Otra explicación sería la existencia de

alteraciones en los mecanismos de regulación de los factores de crecimiento o en el número de receptores a las gonadotropinas en los folículos en sus etapas iniciales de crecimiento, lo que resultaría en modificaciones en el desarrollo y diferenciación de los folículos ⁽⁹⁰⁾. Además, que dicha participación asimétrica de cada lado de POA-AHA en las funciones de los ovarios cambia durante el ciclo estral.

La inyección de benzoato de estradiol al medio día del diestro-2, en los animales micro-inyectados con salina en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA en diestro-1, no indujo la ovulación, lo que indica que en esta fase del ciclo (diestro-1), la salina modifica la expresión de los RE en POA-AHA. Este efecto también cambia con la fase del ciclo estral, ya que la inyección subcutánea de benzoato de estradiol en ratas micro-inyectadas con salina en la fase del estro, sí resulta en la ovulación de todos los animales inyectados en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA.

En resumen; la solución salina altera en POA-AHA la ovulación y sus efectos dependen del día del ciclo estral del que se inyecte.

POSIBLES RESPUESTAS A LOS EFECTOS DE LA MICRO-INYECCIÓN UNILATERAL DE PIRENZEPINA EN POA-AHA DURANTE EL CICLO ESTRAL.

La micro-inyección de 10 µg de PZP no altera los efectos provocados por la solución salina, por lo que permite sugerir que la solución salina altera en parte mecanismos neuroendócrinos en los que está involucrada la unión de la acetilcolina con los RM₁.

La función reguladora de la acetilcolina por medio de los RM₁ es la misma en la porción izquierda y derecha de POA-AHA, lo que me lleva a considerar que estos receptores no son los responsables de los efectos asimétricos ejercidos por los implantes unilaterales de atropina en POA-AHA en las fases de estro y diestro-2. Cruz y colaboradores ⁽¹⁵⁾ mostraron por inmunocitoquímica en cortes histológicos de POA-AHA de ratas intactas sacrificadas a tres horas diferentes de cada fase del ciclo estral, que el número de células inmuno-reactivas al RM₁ es constante y semejante en ambos lados de POA-AHA. Sin

embargo, la función reguladora de los RM_1 en la ovulación cambia durante el ciclo estral: es inhibitoria en diestro-1 y cambia a ser estimulante en las fases de proestro y estro al administrar 100 μ g de PZP. La explicación a este hecho es que conforme transcurre el ciclo cambia el número de receptores, su afinidad o ambos. Cruz y colaboradores ⁽¹⁵⁾ mostraron que la fase del ciclo en la que hay más acetilcolina en POA-AHA es a las 13:00 horas del diestro-1; y son las fases de estro y diestro-1 en las que el número y la afinidad de todos los receptores muscarínicos es mayor respecto a las otras fases del ciclo. Por lo que finalmente se puede decir que los efectos del bloqueo de los RM_1 dependen de la dosis de la PZP y que la inyección de 10 μ g de PZP no altera los efectos provocados por la solución salina.

La acetilcolina unida a los RM_1 de POA-AHA regulan de manera diferente durante el ciclo estral la secreción de la GnRH, ya que el porcentaje de animales ovulantes aumentó cuando se micro-inyectó con 100 μ g de PZP en la fase de diestro-1, mientras que los tratados en estro no lo hicieron. Estos resultados indican que la acetilcolina unida a los RM_1 en diestro-1 estimula la secreción preovulatoria de la GnRH, mientras que en estro la inhibe. Esta hipótesis es sostenida por el hecho de que al inyectar la LHRH sintética a las 14:00 horas del proestro esperado, todos los animales inyectados con 100 μ g de PZP que no habían ovulado, lo hacen.

En la fase del proestro la activación de los receptores M_1 del lado izquierdo de POA-AHA jugaría un papel inhibitorio en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación, mientras que del lado derecho no participarían, ya que sólo del lado izquierdo la PZP (100 μ g) aumentó el porcentaje de animales ovulantes con respecto al grupo inyectado con NaCl.

En la fase de diestro-2, ninguno de los tres tratamientos modificó el porcentaje de animales que ovularon en el estro esperado. La idea que con anterioridad planteé de que la salina altera en parte mecanismos neuroendócrinos en los que está involucrada la unión de la acetilcolina con los RM_1 se apoya en el hecho de que a las 13:00 horas del diestro-2, la cantidad de acetilcolina en POA-AHA es tan pequeña que no se detectó por cromatografía líquida de alta presión ⁽¹¹¹⁾. Dado este hecho, planteo que en la fase del diestro-2 la acetilcolina por medio de los RM_1 no participa en los mecanismos que regulan la ovulación espontánea de la rata.

En diestro-1, la acetilcolina unida a los RM₁ en ambos lados de POA-AHA regula de manera inhibitoria la secreción de estradiol, ya que el reemplazo de la señal ovárica en ratas que recibieron 10 µg de PZP en uno u otro lado de POA-AHA resultó en el incremento del número de animales que ovularon. Este hecho implica que en POA-AHA, la acetilcolina unida a los RM₁ inhiben la secreción tónica de GnRH, que una vía de señalización nerviosa inhibe la respuesta del ovario a las gonadotropinas o ambos ⁽³⁵⁾. El efecto inhibitor de la respuesta del ovario a las gonadotropinas (específicamente el folículo) resultaría en modificaciones en la secreción preovulatoria de estradiol, lo que llevaría a modificaciones en la forma de secreción preovulatoria de GnRH ^(64, 67, 71).

En la fase del estro, los resultados de la inyección de 10 µg de PZP seguida de la administración de BE₂, me permite sugerir que se modifica de manera asimétrica las características de unión de los RE entre el lado izquierdo o derecho de POA-AHA, o que el BE₂ inyectado modifique de manera asimétrica en cada lado de POA-AHA el número, la afinidad o ambos de los RM₁. En estudios *in vitro* se ha mostrado que la unión específica del agonista colinérgico [³H]quinuclidil benzilato (QNB) aumenta, en homogenados obtenidos del área preóptica de ratas ovariectomizadas, cuando son inyectadas con 2 ó 10 µg de E₂, lo que indica que el estrógeno incrementa el número de sitios de unión a la acetilcolina ⁽⁸⁴⁾. Con base en estos resultados, sugiero que la activación de los RM₁ del lado izquierdo de POA-AHA, modulada por el estradiol, regula de manera estimulante la secreción de GnRH, gonadotropinas y la ovulación. Mientras que la activación de los RM₁ del lado derecho de POA-AHA, modulada por el estradiol, regularía de manera inhibitoria la “cascada” de eventos endócrinos entre POA-AHA, la hipófisis y los ovarios. Dado que estos resultados concuerdan con los obtenidos por medio de los implantes de atropina en POA-AHA colocados en la fase del estro ⁽¹⁵⁾ sugiero que son los RM₁ los responsables de que en el día del estro, la acetilcolina ejerza un papel asimétrico en la secreción de GnRH, gonadotropinas y la ovulación.

Con base en los resultados del peso del útero, sugiero que la acetilcolina unida a los RM₁ de POA-AHA estaría regulando de manera asimétrica y dosis dependiente la secreción de estradiol, ya que el peso del útero se modificó gradualmente en función de la dosis de PZP (aún cuando sólo con 100 µg fue significativamente diferente) micro-inyectada en el lado izquierdo de POA-

AHA, en cualquier día del ciclo. Este efecto es a la alta en las fases del diestro, pero es a la baja en proestro y estro. Estos resultados indican que en condiciones normales, la acetilcolina unida a los RM₁ de la porción izquierda de POA-AHA estaría regulando de manera inhibitoria la secreción de estradiol. La inyección subcutánea de atropina en las fases de diestro-1 o proestro provoca disminución de la concentración sérica de estradiol dos horas después de la administración del fármaco ⁽⁷¹⁾, esta discrepancia en los resultados radicaría en el tipo de fármaco utilizado, la dosis y la vía de administración. Sin embargo, confirma un efecto modulador de la acetilcolina sobre la secreción de estradiol.

Cuando se relacionan los resultados del peso del útero con el porcentaje de animales con útero balonado, se observa una correlación negativa entre ambos resultados, pero sólo en los grupos de animales micro-inyectados en POA-AHA izquierda, lo que me permite sugerir que la acetilcolina unida a los RM₁ de POA-AHA también estaría regulando de manera asimétrica la secreción de progesterona, actuando como un neuromodulador estimulante de la secreción de progesterona. El papel estimulante de los RM₁ del lado izquierdo de POA-AHA en la secreción de progesterona sería de origen adrenal. La inyección subcutánea de sulfato de atropina resulta en el aumento de la concentración de progesterona, la cual es de origen adrenal, excepto en la fase del proestro, ya que esta proviene de los ovarios ^(34, 35).

CONCLUSIONES

- La micro-inyección de NaCl en POA-AHA en la fase de diestro 1 y proestro no puede ser utilizado como una solución inerte que no modifica los mecanismos neuroendocrinos que culminan en la ovulación.
- La acetilcolina unida a RM_1 de POA-AHA no regula de manera asimétrica la ovulación.
- En la ovulación, el papel de la acetilcolina unida a los RM_1 de POA-AHA cambia durante el ciclo estral de la rata: al principio del ciclo, en diestro-1, inhibe la secreción preovulatoria de la GnRH; mientras que en las fases de proestro y estro la estimula.
- En la fase del diestro-2, la acetilcolina asociada a los RM_1 no participa en los mecanismos neuroendocrinos hipotalámicos que culminan con la ovulación.

REFERENCIAS

1. ADVIS JP, AHMED CE, OJEDA SR. (1989). Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal peptide (VIP) levels in the developing rat ovary. *Brain Res Bull*, 22: 605-610.
2. ARNOLD AP, BOTTJER SW. (1985). Cerebral lateralization in birds. En: *Cerebral Lateralization in Nonhuman Species*. Editor Glick, S.D., Academic Press, Inc. Orlando, Florida, 11-39.
3. ASHKENAZY A, PERALTA EG. (1994). Muscarinic acetylcholine receptors. En: Peroutka SJ. *Handbook of receptors and channels. G protein-coupled receptors*. (Ed.) Boca Raton, FL: CRC Press, 1-27.
4. AVISSAR S, EGOZI Y, SOKOLOVSKY M. (1981). Studies in muscarinic receptors in mouse and rat hypothalamus: A comparison of sex and cyclical differences. *Neuroendocrinology*, 32(5): 295-302.
5. BAIRD DT, HORTON R, LONGCOPE C, TAIT J. (1968). Steroid prehormones. *Perspect Biol Med*, 3: 384.
6. BAKALKIN GY, TSIBEZOV VV, SJUTKIN EA, VESELOVA SP, NOVIKOW ID, KRIVOSHEEV OG. (1984). Lateralization of LH-RH in the rat hypothalamus. *Brain Res Bull*, 296: 361-364.
7. BENTLEY GE, UBUKA T, MCGUIRE NL, CALISI R, PERFITO N, KRIEGSFELD LJ, WINGFIELD JC, TSUTSUI K. (2009). Gonadotrophin-inhibitory hormone: a multifunctional neuropeptide. *J. Neuroendocrinology*, 21: 276-281.
8. BERT W, O' MALLEY Y, CHARLES A, STROTT. (1999). *Endocrine Regulation of the Reproductive System cap. 4 hormonas esteroides*. En: Samuel S.C. Yen, Robert B. Jaffe, Robert L. Barbieri. *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management 4th Ed*. Philadelphia, 119-143.
9. BOSMA MM, BERNHEIM L, LEIBOWITZ MD, PFAFFINGER PJ, HILLE B. (1990). Modulation of M current in frog sympathetic ganglion cells. In *G Protein and Signal Transduction* (N. M. Nathanson and T. K. Harden, Eds.). The Rockefeller University Press, New York: 43-59.
10. BROCA P. (1861). Remarques sur le siège de la faculté du langage articulé, survies d'une observation d'aphémie. *Bull. Soc. Anat*, 6: 398-407.
11. BUTLER JA, SJOBERG M, COEN CW. 1999. Evidence for estrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *J. Neuroendocrinology*, 11: 331-335.
12. CHAVEZ R, CARRIZOSA L, DOMÍNGUEZ R. (1991). Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Med. Sci. Res.*, 19: 41-42.
13. CHAVEZ R, CRUZ ME, DOMINGUEZ R. (1987). Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi- and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrinology*, 113: 397-401.
14. COOK B. (1987). Endocrine asymmetry (Commentary). *J. Endocrinology*, 113: 331-332.
15. CRUZ ME, ARTEAGA PR, DE LA HUERTA M, SÁNCHEZ M, DOMÍNGUEZ R. (1997). Differences in acetylcholine content, binding and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Med Sci Res*, 25: 823-825.
16. CRUZ ME, JARAMILLO LP, DOMINGUEZ R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J. Endocrinology*, 123: 437-439.
17. CRUZ ME, MORAN JL, JARAMILLO LP, DOMINGUEZ R. (1990). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Res Bull*, 24: 739-742.
18. CRUZ ME, MORAN JL, JARAMILLO LP, DOMINGUEZ R. (1990). Differential effects of a unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rat. *J. Endocrinol*, 124: 37-41.

19. 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.
20. DIAMOND MC. (1985). Rat forebrain morphology: Right-Left; Male-Female; Young-Old; Enrich-Impoverished. En: *Cerebral Lateralization in Nonhuman Species*. Editor Glick, S.D., Academic Press, Inc. Orlando, Florida, 73-87.
21. DOHANICH GP, WITCHER JA, WEAVER DR, CLEMENS LG. (1982). Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Research*, 241(2): 347-350.
22. DOMÍNGUEZ R, RIOBONI L, ZIPITRIA D, REVILLA R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat? *J. Endocrinol*, 95: 175-180.
23. DOMÍNGUEZ R, CRUZ ME. (1989). Different effects of unilateral lesions of the hypothalamus on the spontaneous ovulation in intact and hemiovariectomized adult rat. XVI Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Zacatecas, Méx, 399-422.
24. DOMÍNGUEZ R, CRUZ ME, CHAVEZ R. (1988). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: *Growth factors and the ovary*. Editor A. Hirshfield. Plenum Press, Nueva York. Cap., 39: 321-325.
25. DOMINGUEZ R, CHAVEZ R, CRUZ M. E. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del foliculo ovárico. En: *Tópicos selectos de Biología de la Reproducción*. Editor R. Domínguez. UNAM-PURRUA, México, 161-192.
26. ECKENSTEIN F, THOENEN H. (1982). Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons *EMBOJ*, 1: 363-368.
27. EGOZI Y, KLOOG Y. (1985). Muscarinic receptors in the preoptic area are sensitive to 17 beta-estradiol during the critical period. *Neuroendocrinology*, 40 (5): 385-92.
28. EGOZI Y, KLOOG Y, SOKOLOVSKY M. (1986). Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrus cycle. *Brain Research*; 383: 310-313.
29. EUGENIO E. MULLER GUISEPPE NISTICÓ (1989). *Brain Messenger and the pituitary*. Edition. Academic Press, Inc. Santiago. New York.
30. EVERETT JW, SAWYER CH, MARKEE JE. (1949). A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cycle rat. *Endocrinology*, 44: 234-250.
31. EVERETT JW. (1949). "Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features or the estrous cycle in rat." *Endocrinology*, 4-3: 389-405.
32. FELDER CC. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J*, 9: 619-25.
33. FLORES A, RODRÍGUEZ JO, PALAFOX MT, MELÉNDEZ G, BARCO A, CHAVIRA R, CRUZ ME, DOMÍNGUEZ R. (2006). The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. Participation of the cholinergic system. *Reproductive Biology & Endocrinology* 4: 11.
34. FLORES A, MELÉNDEZ G, PALAFOX MT, RODRÍGUEZ JO, BARCO AI, CHAVIRA R, DOMÍNGUEZ R, CRUZ ME. (2005). The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine*, 2; 145-151.
35. FLORES A, VELASCO J, GALLEGOS AI, MENDOZA FD, EVERARDO PM, CRUZ ME, DOMÍNGUEZ R. (2011). Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol*, 9: 34.
36. FLÓREZ J, PAZOS A. (1997). Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En: Flórez J, Armijo J, Mediavilla A (Eds). *Farmacología humana*. Barcelona: Masson, 433.

37. FRANKEL AI, CHAPMAN JC, COOK B. (1989). Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *J. Endocrinol*, 122: 485-488.
38. FUKUDA, YAMANOUCI K, NAKANO Y, FUKUDA M, ARAI Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neurosci. Lett*, 51: 365-370.
39. GAINOTTI G. (1972). Emotional behavior and hemispheric side of the lesion. *Cortex*, Vol. 8(1): 41-55.
40. GALIN D. (1974). Implications for psychiatry of left and right cerebral specialization. *Arch. Gen Psychiatry*, 31: 572-583.
41. GERENDAI I, ROTSZTEJN W, MARCHETTI B, CORDÓN 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.
42. GERENDAI I, ROTSZTEJN W, MARCHETTI B, SCAPAGNINI V. (1979). LH-RH content changes in the medio-basal hypothalamus after unilateral ovariectomy. En: *Neuroendocrinology: Biological and Clinical Aspects. Proceeding of Sorono Symposia, Vol 19*, editors A. Polleri y R. MacLeod. New York. Academic Press, 97-102.
43. GERENDAI I. (1980). Unilateral complete isolation of the medial basal hypothalamus interferes with the compensatory ovarian growth following unilateral ovariectomy. *Neuroendocrinology. Lett*, 2: 39.
44. GERENDAI I. (1986). Laterality in the Neuroendocrine Systems. En: *Duality and unity of the brain. Unified functioning and specialization of the hemispheres*. Editor Ottoson, D., Proceedings of an International Symposium held at The Wenner Gren Center, Stockholm, 17-28.
45. GESCHWIND N, GALABURDA M. (1985). Cerebral Lateralization. Biological mechanism. Associations and pathology: I. In hypothalamus interferes with the compensatory ovarian growth following unilateral ovariectomy. *Neuroendocrinology. Lett*, 2: 39.
46. HEAPE W. (1900) "The sexual season of mammals and the relation of the pro-estrus to menstruation". *Q. J. Micr. Sci*, 44; 1-70.
47. HERBISON AE. (1998). Multimodal influence of estrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev*, 19: 302-330.
48. HERBISON AE. (2006). Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition*. edited by Jimmy D. Neill, Chapter 28, Elsevier, 1415-1482.
49. HINEY JK, SOWER SA, YU WH, MCCANN SM, DEES WL. (2002). Gonadotrophin-releasing hormone neurons in the preoptic-hypothalamic region of the rat contain lamprey gonadotropin-releasing hormone III, mammalian luteinizing hormone-releasing hormone, or both peptides. *PNAS*, 99, 2386-2391.
50. HRABOVSKY E, SHUGHRUE PJ, MERCHENTHALER I, HAJSZÁN T, CARPENTER CD, LIPOSITS Z, PETERSEN SL. (2000). Detection of receptor-b messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurones of the rat brain. *Endocrinol*, 141 (9): 3506-3509.
51. <http://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/03/apunte-farmacologia-de-sistema-colinergico.pdf> 23 agosto de 2011.
52. <http://www.ferato.com/wiki/index.php/> 19 Octubre de 2011.
53. HUNZICKER-DUNN M, MAYO K. (2006). Gonadotropin Signaling in the Ovary. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition*. Chapter 14, edited by Jimmy D. Neill, Elsevier, 547-592.
54. JARA ALBARRÁN A. (2001). *Endocrinología Clínica*. Editorial Médica Panamericana. Primera edición. Madrid, 920: 25-189.
55. JENNES L, EYIGOR O, JANOVICK JA, CONN PM. (1997). Brain gonadotrophin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Progress in hormone Research*, 52: 475-491.
56. JIAN WEI, ELIZABETH A. WALTON, ANTONIO MILICI, JERRY J BUCCAFUSCO. (1994). "m1-m5 Muscarinic Receptor Distribution in Rat CNS by RT-PCR and HPLC". *USA. International society for Neurochemistry*, 815-821.
57. JONES SW. (1987). Chicken II luteinizing hormone-releasing hormone inhibits the M-current of bullfrog sympathetic neurons. *Neurosci. Lett*, 80, 180-184.

58. JORGE TÉLLEZ VARGAS. (2003). HORMONAS SEXUALES Y CEREBRO. De GAVIRIA S., LUNA I., CORREA E. "Climaterio": (eds.) CES, Editorial Marín Vieco, Medellín.
59. KAUFFMAN AS, RISSMAN EF. (2004). The evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II modifies food intake. *Endocrinology*, 145, 686–691.
60. KLANGKALYA B, CHAN A. (1988). Inhibition of hypothalamic and pituitary muscarinic receptor binding by progesterone. *Neuroendocrinology*, 47 (4): 294-302.
61. KÖNING JFR, KLIPPEL RA. (1963). The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 162.
62. KOREN D, EGOZI Y, SOKOLOVSKY M. (1992). Muscarinic involvement in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat. *Molecular Cell Endocrinology*, 90(1): 87-93.
63. KRAUS S, NAOR Z, SEGER, R. (2001). An intracellular signaling pathway mediates by de Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) receptor. *Arch Medical Res*, 32: 499-509.
64. KRSMANOVIC LZ, MORES N, NAVARRO CE, SAEED SA, ARORA KK, CATT KJ. (1998). Muscarinic regulation of intracellular signaling and neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 139: 4037-4043.
65. KUIPER GGJM, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JÅ. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 5925-5930.
66. LAUBER AH, WHALEN RE. (1988). Muscarinic cholinergic modulation of hypothalamic estrogen binding sites. *Brain Research*, 443(1-2): 21-26.
67. 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: 4047-4043.
68. LIBERTUM C, McCANN SM. (1973). Blockade of the release of gonadotropins and prolactin by subcutaneous or intraventricular injection of atropine in male and female rats. *Endocrinology*, 92:1714-1724.
69. 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.) *Arch Med Res, Otoño*; 28 (3):343-8.
70. MARC. E. FREMAN. 2006 Neuroendocrin Control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, third edition, Jimmy D. Neill. Ed. Elsevier, Capítulo 43: 2328-2388.
71. MARÍA E. CRUZ, ANGÉLICA FLORES, MARÍA T PALAFOX, GRISELDA MELÉNDEZ, JORGE O RODRÍGUEZ, ROBERTO CHAVIRA, ROBERTO DOMÍNGUEZ. (2006). The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reprod Biol Endocrinol*, 4: 43.
72. McGEER PL, SIR JOHN CAREW ECCLES, EDITH G, McGEER. (1987). Molecular neurobiology of the mammalian brain 2nd. Edn. New York. Penum press, 150.
73. MILLAR R, LOWE S, CONKLIN D, PAWSON A, MAUDSLEY S, TROSKIE B, OTT T, MILLAR M, LINCOLN G., SELLAR R, FAURHOLM B, SCOBIE G, KUESTNER R, TERASAWA E, KATZ A. (2001). A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9636–9641.
74. MILLAR ROBERT P, PAWSON ADAM J, MORGANA KEVIN, RISSMAN EMILIE F, LUA ZHI-LIANG. (2008). Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol*, 29: 17–35.
75. MIZUNUMA, H, DE PALATIS LR, McCANN SM. (1983). Effect of unilateral orchidectomy on plasma FSH concentration: Evidence for direct neural connection between testis and CNS. *Neuroendocrinology*, 37: 291-296.

76. MORA F, PEINADO JM, MYERS RD. (1984). Symmetrical distribution of amino acid and neurotransmitters in the right and left cerebral cortex of the rat. *Neurochem, Res* 9: 1109-1115.
77. 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.
78. NANCE DM, BHARGAVA M, MYATT GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Res Bull*, 13: 651-655.
79. NANCE DM, MORGER WH. (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemi-castration. *Brain Res Bull*, 8: 299-302.
80. NANCE DM, WHITE JP, MOGER WH. (1983). Neural regulation of the ovary: Evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control. *Brain Res Bull*, 10: 353-355.
81. NISTICÓ G, MÜLLER EE. (1989). Neurotransmitters, neuromodulators and neuromediators. En: *Brain messengers and the pituitary*, 2da. Edition, Academic Press, New York, 15-228.
82. NORDEEN EJ, YAHR P. (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science*, 218: 391-393.
83. OKE A, LEWIS R, ADAMS RN. (1978). Hemispheric asymmetry of norepinephrine distribution in rat thalamus. *Brain Research*, 188: 269-272.
84. OLSEN KL, EDWARDS E, SCHECHTER N, WHALEN. (1988). Muscarinic receptors in preoptic area and hypothalamus: effects of cyclicity, sex and estrogen treatment. *Brain Research*, 223-229.
85. PALKOVITS M. (2000). Micro- and Macroscopic structure, and vasculare of hypothalamus. En: *Neuroendocrinology, en Physiology and Medicine*.
86. PAOLA RA, DOMÍNGUEZ R, CERBÓN MA. (2003). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrina*, 21: 51-260.
87. PAXINOS, GEORGE, WATSON, CHARLES. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th edition. USA, 2007,
88. PIERCE JG, PARSONS TF. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*, 50:465-495.
89. RAINBOW TC, DEJROFF V, LUINE V, MCEWEN B. (1980). Estradiol-17b increases the number of muscarinic receptors in hypothalamic nuclei. *Brain Research*, 198: 239-243.
90. RAJKOVIC A CHOI Y. (2006). Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*, 63: 579-590.
91. RANTA T, KNECHT M, DARBON J, BAUKAL AJ, CAT TKJ. (1984). Induction of granulose cell differentiation by forskolin: stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate production, progesterone synthesis, and luteinizing hormone receptor expression. *Endocrinology*, 114, 845-853.
92. RAO ChV, EDGERTON LA. (1984). Dissimilarity of corpora lutea within some ovaries or those from right and left ovaries of the pigs during the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert*, 70: 61-66.
93. RICHARD E. BROWN. (2001). *An introduction to neuroendocrinology*. 72 edit ISBN, Australia.
94. ROBERTO DOMÍNGUEZ, LUCIANO MENDOZA-GARCÉS, ANGÉLICA FLORES, MARÍA E CRUZ. 2007. During the estrous cycle of the rat exists a circadian rhythm in the number of neurons expressing the M2 cholinergic receptor in the preoptic-anterior hypothalamic area (POA-AHA). 37th Neuroscience Meeting of Society for Neuroscience. San Diego, CA.
95. ROBINSON RG. (1979). Differential behavioral and biochemical effects of right and left hemispheric cerebral infraction in the rat. *Science*, 205: 07-710.
96. ROBINSON TE, BECKER JB, CAMP DM, MANSOUR A. (1985). Variations in the pattern of behavioral and brain asymmetries due to sex differences. En: *Cerebral Lateralization in Nonhumans Species*. Editor Glick, S.D., Academic Press, Inc. Orlando Florida, 185-231.

97. ROLLEROVA E, URBANCIKOVA M. (2000). Intracellular estrogen receptors, their characterization and function. *Endocrine Regulations*, 34:203-218.
98. ROSEN GD, FINKESTEIN S, STOLL AL, YUTZEY DA, DENENBERG VH. (1984). Neurochemical asymmetries in the albino rat's cortex, striatum and nucleus accumbens. *Life Sciences*, 34: 1143-1148.
99. SÁNCHEZ MA, LÓPEZ GM, CRUZ ME, TAPIA R, ROBERTO D. (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Neuroreport*, 5: 433-434.
100. SASSON R, DANTES A, TAJIMA K, AMSTERDAM A. (2003). Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action. *FASEB J*, 17; 1256-1266.
101. SERAFETINIDES EA. (1965). The significance of the temporal lobes and of hemispheric dominance in the production of LSD-25 symptomatology in man. *Neuropsychologia*, 3: 69-79.
102. SHUGHRUE PJ, SCRIMO PJ, MERCHENTHALER I. (1998). Evidence for the colocalization of estrogen receptor-b mRNA and estrogen receptor-a immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. *Endocrinol*, 139: 5267- 5270.
103. SILVERMAN J, LIVNE I, WITKIN JW (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH), neural systems: immunocytochemistry and in situ hybridation. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: Knobil, JD Neil, 2da. Edición, vol. 1, cap 28, Raven Press, New York, 1683-1692.
104. SOKOLOVSKY M, EGOZI Y, AVISSAR S. (1981). Molecular regulation of receptors: interaction of beta-estradiol and progesterone with the muscarinic system. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 78(9): 5554-55548.
105. SPEROFF L, GLASS RH, KASE NG. (2006). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 7ª Edición. Baltimore, Williams and Wilkins.
106. STRUCKMANN N, SCHWERING S, WIEGAND S, GSCHNELL A, YAMADA M, KUMMER W, WESS J, HABERBERGER RV (2003). Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways: studies on receptor-deficient mice. *Mol. Pharmacol*, 64: 1444-1451.
107. TEMPLE JL, MILLAR RP, RISSMAN EF. (2003). An evolutionarily conserved form of gonadotropin-releasing hormone coordinates energy and reproductive behavior. *Endocrinology*, 144, 13–19.
108. THEMEN APN, HUHTANIEMI IT. (2000). Mutation of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitarygonadal function. *Endocrine Rev*, 21:551-583.
109. TOMOMI OKI, YUKIKO TAKAGUI, SAYURI INAGAKI, MAKOTO M. TAKETO, TOSHIYA MANABE, MINURO MATSUI, SHIZUO YAMADA. (2005). Quantitative analysis of binding parameters of [3H] N-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Molecular Brain Research*, 133 6-11.
110. VIJAYÁN E, McCANN SM. (1980). Effect of blockade of dopaminergic receptors on acetylcholine (ACh)-induced alterations of plasma gonadotropin and prolactin (prl) in conscious ovariectomized rats. *Brain Research Bulletin*, 5(1): 23-29.
111. VILLEGAS G, CRUZ ME, DOMINGUEZ-GONZÁLEZ, CHAVIRA R. (1997). El bloqueo de los receptores muscarínicos inhibe la secreción preovulatoria de LH pero no la de FSH. *Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C. XL Congreso Nacional. Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo y de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.*
112. WINTERMANTEL TM, CAMPBELL RE, PORTEOUS R, BOCK D, GRÖNE HJ, TODMAN MG, KORACH KS, GREINER E, PÉREZ CA, SCHÜTZ G, HERBISON AE. (2006). Definition of Estrogen Receptor Pathway Critical for Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and Fertility. *Neuron*, 52; 271–280.
113. YADIRA L. LÓPEZ, MARIA ESTHER CRUZ, DEISY RODRÍGUEZ, JOSÉ L. GALINDO, MARTHA VÁZQUEZ, CÁRDENAS MARIO, ANGÉLICA FLORES, ROBERTO DOMINGUEZ. Efectos diferenciales del bloqueo unilateral del receptor a estrógenos alpha (REa) o beta (REb) de POA-AHA en la mañana del proestro, sobre la secreción preovulatoria de FSH, LH y estradiol. XXXV Reunión Anual de la AIBIR, Xalapa, Ver, del 22 al 25 de junio del 2010.

114. YAHALOM D, CHEN A, BEN-AROYA N, RAHIMIPOUR S, KAGANOVSKY E, OKON E, FRIDKIN M, KOCH Y. (1999). The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS, Lett.* 463, 289–294.