



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCIÓN.
LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

ESTRUCTURAS NERVIOSAS DORSALES A POA-AHA
QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA
OVULACIÓN.

ACTIVIDAD DE INVESTIGACIÓN POR INFORME DE LIF VII Y VIII

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

ALEJANDRO REYNOSO JÚAREZ

DIRECTORA DE PROYECTO: Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRAN

MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO	5
Hipotálamo	8
Sistema de fibras nerviosas entre el tallo cerebral y el hipotálamo	9
Hipófisis	10
Ovario	11
Área Preóptica (POA)	14
Conexiones del Área Preóptica Medial (MPOA)	15
Conexiones del Área Hipotalámica Anterior (AHA)	16
Vías de conexión del Área Preóptica y del Área Hipotalámica Anterior (POA-AHA)	17
Neuronas que sintetizan la GnRH	19
Asimetrías Hipotalámicas	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO	23
MATERIALES Y MÉTODOS	23
RESULTADOS	31
ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	52

RESUMEN

En la rata, el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) es la zona donde se localizan las neuronas GnRH vinculadas con la ovulación. Esta área del hipotálamo regula de manera asimétrica la ovulación, lo que depende de la fase del ciclo estral. Previamente se mostró que introducir una aguja de micro-inyección en POA-AHA en la fase de estro y diestro-1 bloquea la ovulación en el día del estro esperado. Este efecto inhibitorio es asimétrico en la fase del estro y simétrico en diestro-1. En cambio, en las fases de diestro-2 y proestro este procedimiento no afecta.

Con la finalidad de saber si dicha respuesta ocurre por alterar los mecanismos neuroendocrinos de POA-AHA o por afectar estructuras dorsales en la trayectoria de la aguja, se decidió analizar cuál o cuáles estructuras o vías de conexión dorsales a POA-AHA están vinculadas con la ovulación.

Para lo cual, se utilizaron ratas hembras, adultas, cíclicas, de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h) con libre acceso al alimento y agua. En las fases de estro y diestro-1, grupos de nueve ratas, entre las 8:30 y 9:30 h, fueron anestesiadas, colocadas en un estereotáxico para introducir verticalmente una aguja de acero inoxidable a POA-AHA izquierda o derecha. Los animales fueron sacrificados en la mañana del estro esperado. En otros grupos de animales la aguja se introdujo hasta el límite superior dorsal (tracto cortico-hipotalámico-medial o la estría terminal parte hipotalámica); estos grupos experimentales fueron sacrificados de la misma manera que los grupos anteriores. Otros grupos experimentales fueron sacrificados cuando los animales presentaron un estro vaginal.

Con el propósito de saber cuál de las señales endócrinas fue alterada por estos procedimientos experimentales, grupos de ratas que no ovularon por la introducción de la aguja fueron inyectados a las 14:00 h del proestro esperado con 3.7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso de Hormona liberadora de la hormona leuteinizante LHRH-sintética (señal hipotalámica) o con 25 u.i. de hCG (gonadotropina coriónica humana) (señal hipofisiaria) o con 10 μg Benzoato de estradiol a las 14:00 h del diestro-2 esperado (señal ovárica). Todos estos animales fueron sacrificados en la mañana del estro esperado. En la necropsia se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados y se pesaron los ovarios y el útero. Los resultados del número de animales que ovularon fueron analizados por la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher; los del número de ovocitos liberados por la prueba de Kruzkall-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Mientras que los del peso de los ovarios y del útero (mg/100g), mediante la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se comparen dos grupos,

el análisis se realizó por medio de la prueba de “t” de Student o la de “U” Mann-Withney. En todos los casos sólo se aceptarán como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad sea $\leq 5\%$.

En la fase de estro, la introducción de la aguja en POA-AHA derecha bloqueó la ovulación en el día del estro esperado. El reemplazo de la señal hipotalámica o la hipofisiaria indujo la ovulación en todos los animales, lo que no ocurrió cuando se reemplazó la señal ovárica. En los animales con introducción de la aguja en POA-AHA derecha, la ovulación ocurrió 24 horas después del estro esperado. A pesar de que todos los animales ovularon, disminuyó el número de ovocitos liberados por el ovario derecho.

Cuando la aguja se introdujo hasta el límite dorsal de POA-AHA izquierda (LSI) o derecha (LSD), es decir hasta el tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica, todos los animales ovularon (izquierda: 9/9; derecha: 9/9 vs. intactos: 9/9). El número de ovocitos liberados disminuyó en los animales con LSD. Introducir la aguja hasta el LSI incrementó el peso del útero (223.3 ± 10.6 mg/100g vs. 163.8 ± 3.1 mg/100g, $p < 0.05$), lo que no sucedió al introducir la aguja en LSD (187.3 ± 10.7 mg/100g vs. 163.8 ± 3.1 mg/100g).

En el día del diestro-1, la introducción de la aguja en POA-AHA izquierda o derecha bloqueó la ovulación en la mañana del estro esperado, pero el peso del útero aumentó por ambos tratamientos (POA-AHA izquierda: 255.97 ± 11 mg/100g vs. 163.82 ± 3.13 mg/100g; POA-AHA derecha: 273.21 ± 21 mg/100g vs. 163.82 ± 3.13 mg/100g, $p < 0.05$). La inyección de LHRH a ratas con aguja en POA-AHA izquierda indujo la ovulación en el 66% de los animales, mientras que en POA-AHA derecha solo el 33% lo hicieron. La inyección de hCG en ratas con aguja en POA-AHA izquierda indujo la ovulación en el 76% de los animales tratados, mientras que en POA-AHA derecha todas lo hicieron. En cambio, la inyección de benzoato de estradiol solo indujo la ovulación en un 20%. Cuando los animales fueron sacrificados al estro vaginal, 24 horas después del estro esperado, todos los animales ovularon, pero disminuyó el número de ovocitos liberados. El peso del útero aumentó (POA-AHA izquierda: 212.94 ± 5.01 mg/100g vs. 163.98 ± 4.02 mg/100g; POA-AHA derecha: 201.34 ± 3.9 mg/100g vs. 163.98 ± 4.02 mg/100g, $p < 0.05$).

La respuesta asimétrica entre POA-AHA izquierda y derecha (medida por la ausencia de la ovulación) en el día del estro y simétrica en diestro-1 no es resultado de afectar zonas o seccionar vías nerviosas dorsales a ella, como el tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica, sino de una respuesta fisiológica a la lesión provocada en POA-AHA por introducir la aguja y mantenerla allí durante un minuto.

INTRODUCCIÓN

El área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) juega un papel crucial en la función reproductiva de la rata. En esta zona se localizan las neuronas secretoras de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) que inducen la ovulación. Esta área del hipotálamo regula de manera asimétrica la ovulación, lo que depende de la fase del ciclo estral. Se ha mostrado que introducir una aguja de acero inoxidable en POA-AHA en la fase de estro y diestro-1 bloquea la ovulación en el día del estro esperado. Este efecto inhibitorio es asimétrico en la fase del estro y simétrico en diestro-1. En cambio en las fases de diestro-2 y proestro este procedimiento no afecta la ovulación.

Con la finalidad de saber si este fenómeno ocurre por alterar los mecanismos neuroendocrinos que se llevan a cabo en POA-AHA o por afectar estructuras dorsales en la trayectoria de la aguja, se decidió analizar cuál o cuáles estructuras o vías de conexión dorsales a POA-AHA están vinculadas con la ovulación. Así mismo, con la finalidad de analizar que señal hormonal del eje Hipotálamo- Hipófisis - Ovario afecta por la inserción de la aguja, y que conduce al bloqueo de la ovulación, se decidió remplazar las señales hipotalámica (por la inyección de LHRH sintética), hipofisiaria (por la inyección de la gonadotropina coriónica humana o hCG) y ovárica (por la inyección de benzoato de estradiol).

MARCO TEÓRICO

La reproducción es la función biológica que asegura la supervivencia de las diversas especies. En mamíferos, los sistemas que regulan la función reproductiva son altamente sofisticados y presentan diferentes niveles de organización funcional, englobando desde señales neuroendocrinas y hormonas sistémicas a factores producidos localmente (Manuel Tena- Sempere, 2006).

La deaferentación y estudios de implantación hipotalámica realizadas por Halász (Halász y col. 1962, Halász y Gorski 1967, Halász y Pupp 1967, Halász 1969, Halász 1972, Halász 1978) mostraron la capacidad del hipotálamo medio basal de mantener el control en la secreción de hormonas tróficas, incluso de las zonas o estructuras quirúrgicamente aisladas de otras partes del Sistema Nervioso Central (SNC) (Szentágothai y col. 1962). Como resultado de estas técnicas se observaron alteraciones en el ciclo ovulatorio, ciclo circádico y efectos inhibitorios en la secreción de corticosterona inducidos por estrés (Halász 1969, Krey y col. 1975, Makara y col. 1980b). También se ha

mostrado (Kawakami y Kimura 1978) que la estimulación o destrucción de estructuras extra hipotalámicas (como la amígdala, el área preóptica, el hipocampo, el septum, el tallo cerebral, entre otras regiones) afecta la actividad secretora de la hipófisis anterior (Záborszky 1982).

Las ratas de laboratorio como modelo experimental ha sido uno de las herramientas biológicas más utilizadas en la investigación en Biología de la Reproducción, a partir del cual se obtiene información para comprender los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación. Dicha información y sus resultados puede ser extrapolada a otras especies de mamíferos o utilizarla para comprender la patología de algunas enfermedades en medicina humana y veterinaria (Freeman 2008).

Al alcanzar la madurez sexual, la rata hembra inicia su ciclo reproductivo, conocido como ciclo estral (Heape 1900). El término *estro* describe el periodo del ciclo durante el cual ocurre el deseo sexual por parte de la hembra. En su tiempo, (Heape 1900) describió distintos estadios del ciclo. Él usó el término *anestro* para describir la temporada no reproductiva o período de descenso funcional, cuando los ovarios y los órganos reproductivos accesorios están relativamente inactivos. El término *proestro*, lo estableció para el periodo caracterizado por el lapso en el que la hembra “entra en calor” o deseo sexual. La palabra *estro*, para el periodo en el que la hembra es receptiva al macho, mientras que al corto tiempo que ocurría después del estro, lo denominó *metaestro* (también llamado diestro-1). Finalmente usó el término de *diestro* (también denominado diestro-2) al periodo durante el cual se prepara el tracto reproductivo para recibir al ovulo, si es que ocurría la fecundación (Freeman, 2008).

Según Freeman (2008), el proestro tiene una duración de 12 a 14 horas, el estro de 25 a 27 horas, el diestro-1 dura entre 6 y 8 horas, mientras que el diestro-2 ocurre de 56 a 57 horas. Estas etapas del ciclo estral se pueden distinguir mediante el seguimiento de los tipos de células que se observan al tomar una muestra del epitelio de la vagina, también llamado frotis vaginal.

En la Imagen 1 se pueden observar los tipos celulares que predominan y caracterizan a cada etapa del ciclo estral. El proestro **(A)**, se caracteriza por el predominio de células epiteliales nucleadas, estas células son redondas, con núcleos visibles y aparecen en racimos. En el estro **(B)** las células predominantes son de tipo epitelial escamoso carnificado, que contienen poco citoplasma y son de forma irregular. Durante el diestro-1 **(C)** las células predominantes son los leucocitos pequeños, que poseen un citoplasma granular. En algunas cepas de ratas la secreción de progesterona (P4) se prolonga, lo que conducen a ciclos de 5 días (Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000). En el día del diestro-2 **(D)** todos los tipos de células mencionadas están presentes (Freeman, 2008).

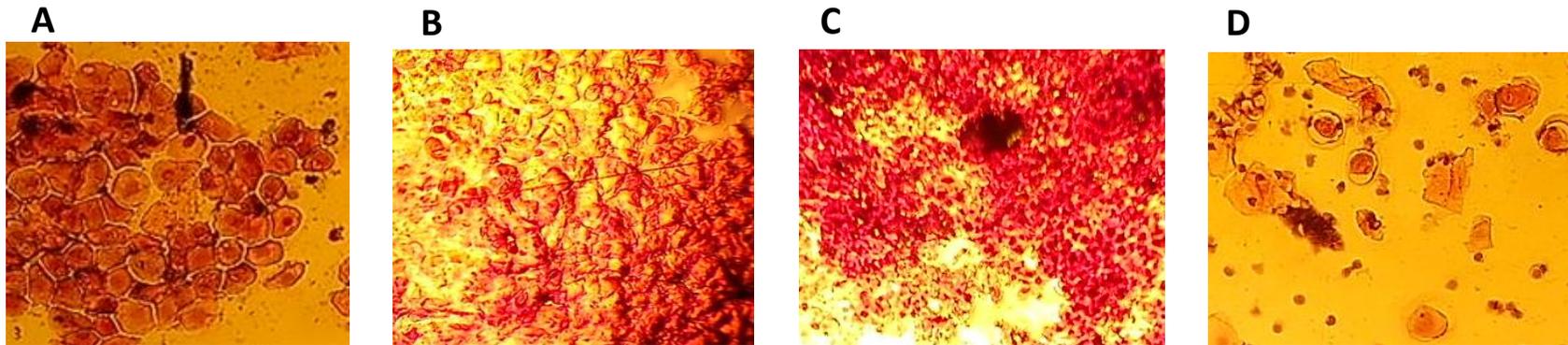


Imagen 1. Fotografías representativas de las diferentes células que se pueden observar en un frotis vaginal y que caracterizan cada fase del ciclo estral de la rata: A: proestro, B: estro, C: diestro-1 y D: diestro-2, tomadas a 10x aumentos, en un microscopio óptico. Tomadas por Alejandro Reynoso Juárez 2013.

La ovulación se produce cuando un óvulo maduro es liberado del ovario y es expulsado a la trompa uterina, quedando disponible para ser fertilizado. El abultamiento que se presenta en los folículos maduros en la superficie de uno de sus extremos, que al microscopio se observa como una zona turgente y muy vascularizada (denominada estigma), es la primera señal de que el proceso de ovulación ha comenzado como resultado de la estimulación de hormonas de origen hipofisario, llamadas gonadotropinas (Freeman, 2008).

A medida que se acerca la ruptura del folículo, las células superficiales germinales del epitelio que cubre el estigma se dividen en pequeños grupos. El ovocito liberado encuentra rápidamente el camino hacia el oviducto, ya que las fibras ciliadas de la trompa uterina lo impulsan al lugar donde se implantará el blastocito en caso de fertilización. El proceso de la ovulación dura 10 horas (Freeman, 2008).

La regulación del ciclo estral depende en especial de las neurohormonas liberadas desde el hipotálamo y de hormonas liberadas por la hipófisis anterior y los ovarios (Hill-Wise-Anderson, 2006). Con la finalidad de comprender de manera integral los procesos que ocurren

durante el ciclo estral, es necesario analizar los eventos que se producen periódicamente en el hipotálamo, la hipófisis anterior y los ovarios (Hill-Wise-Anderson, 2006).

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, por debajo del tálamo y está dividido por el tercer ventrículo en hipotálamo derecho e izquierdo (McGeer y col, 1987). El hipotálamo se divide en cuatro regiones organizadas rostro-caudalmente (Imagen 2A): área preóptica, el hipotálamo anterior, el hipotálamo medio y el hipotálamo posterior. Las áreas de interés en este proyecto de investigación son el área preóptica (POA) (Imagen 2B) y la hipotalámica anterior (AHA) (Imagen 2C), que se encuentran en la parte rostral o anterior del hipotálamo (Norris, 1996; Palkovits, 2000).

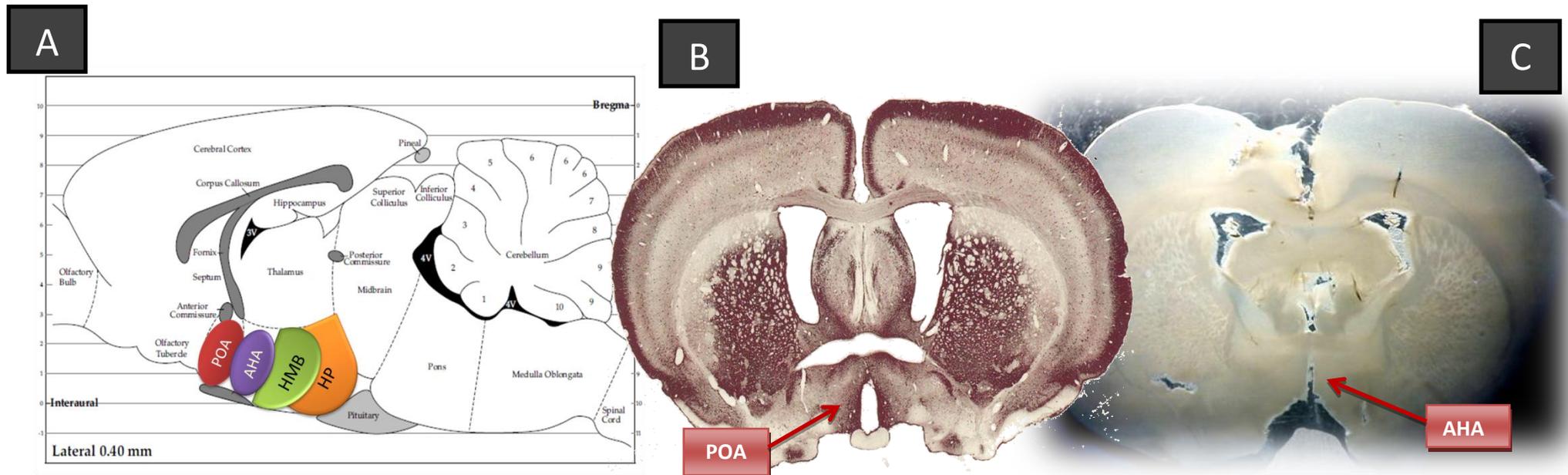


Imagen 2. A: Corte sagital del cerebro de la rata adulta, donde se representa la ubicación del área preóptica (POA) y a hipotálamo anterior (HA), medio basal (HMB) y posterior (HP). **B:** Corte coronal que muestra las porciones izquierda y derecha del POA (**B**) y del área hipotalámica anterior (AHA) (**C**) (Tomadas de König y Klippel, 1963).

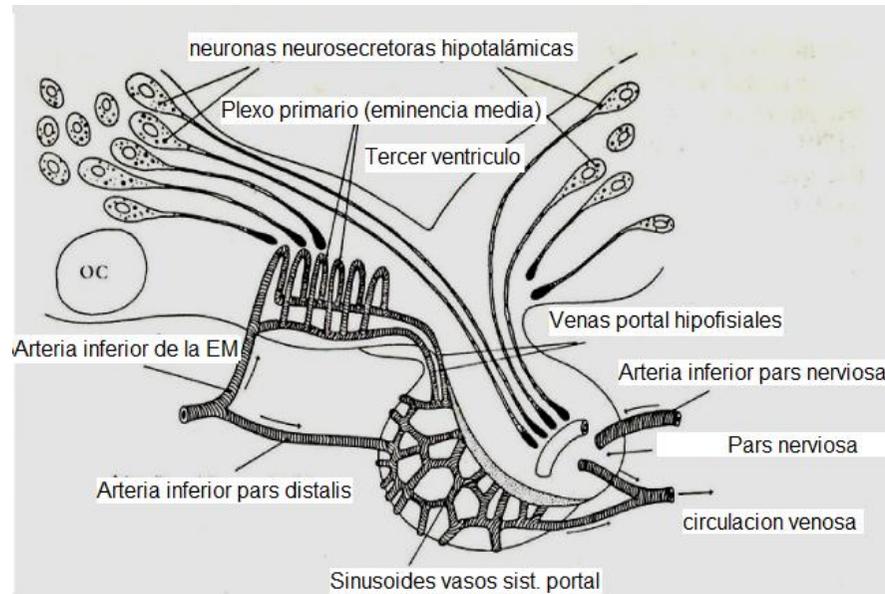


Imagen 3. Ubicación y formación del sistema porta hipotálamo-hipofisiario (Fink, 2000).

Histológicamente el hipotálamo está constituido por células nerviosas, axones o terminales nerviosas de neuronas extrahipotálamicas, células gliales o de sostén y una rica red vascular. Las neuronas forman grupos celulares bien demarcados conocidos como núcleos, o agrupaciones no muy bien delimitadas conocidas como áreas (Norris, 1996; Palkivits, 2000). Establece una comunicación de tipo neuroendocrina con la hipófisis anterior (Arimura,2000; Brown, 1994; Halász,2000), donde las hormonas hipotálamicas son transportadas a lo largo de axones y liberadas de las terminales nerviosas dentro del plexo primario de los capilares del sistema porta de la eminencia media, desde donde serán llevadas a la hipófisis (Arimura, 2000). Estos capilares sanguíneos se conocen como sistema porta-hipotálamo-hipofisiario, constituido por vasos provenientes de las arterias hipofisarias superiores, que al unirse

forman las venas portales hipofisarias, las que corren por el tallo hipofisiario (donde se ubica la eminencia media), hasta llegar a la parte distal de la adenohipófisis, donde forman un plexo secundario de vasos llamado sinusoides hipofisarios (Imagen 3) (Fink, 2000).

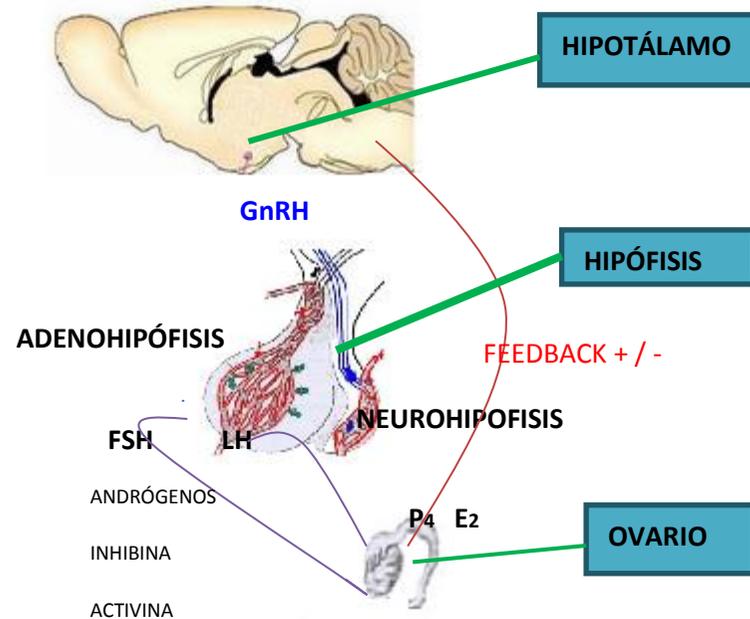
Sistema de fibras nerviosas entre el tallo cerebral y el hipotálamo

Por medio de un microscopio de luz (Szentagothai y col. 1962) fueron capaces de mostrar que la mayoría de las aferencias al hipotálamo medial se originan en el tallo cerebral. Diferentes estructuras del tallo cerebral estimulan o inhiben la secreción de hormonas tróficas. Este efecto implica una compleja actividad interactiva, ya que estas áreas del tallo cerebral no solo están ligadas a vías ascendentes, sino a las concentraciones hormonales sanguíneas de estrógenos, andrógenos, progesterona, corticosterona y aldosterona.

Los nervios periféricos y las rutas de estrés espinales alcanzan al hipotálamo a través del tallo cerebral (Gann y col. 1979, Makara y col. 1980). Se asume que los nervios ascendentes al hipotálamo medio provienen de la glándula adrenal (Szentagothai y col. 1962, Halász 1978).

Imagen 4. Eje Hipotálamo- Hipófisis- Ovario, comunicación neuroendocrina. Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), Hormona Foliculo estimulante (FSH), Hormona Leuteinizante (LH), Progesterona (P4), Estrógeno (E2).

Modificado por: Alejandro Reynoso Juárez, 2013.



La hipófisis se encuentra en la base del cerebro alojada en el hueso esfenoideas y está cubierta por la duramadre (Fink, 2000). Está unida al hipotálamo por el tallo hipofisario, el cual contiene a la eminencia media y a la red de capilares que irrigan a la hipófisis (Imagen 4). Es un órgano complejo dividido en tres partes: lóbulo anterior, intermedio y posterior. El lóbulo anterior y el intermedio forman una glándula endocrina llamada adenohipófisis (Arimura, 2000). La hipófisis secreta diferentes hormonas: la hormona del crecimiento (GH), la somatomedina, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la hormona luteinizante (LH), la foliculo estimulante (FSH), la prolactina (PRL), Hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hormona estimulante de los melanocitos o melanotropina (MSH), oxitocina y vasopresina. (Brown, 1994).

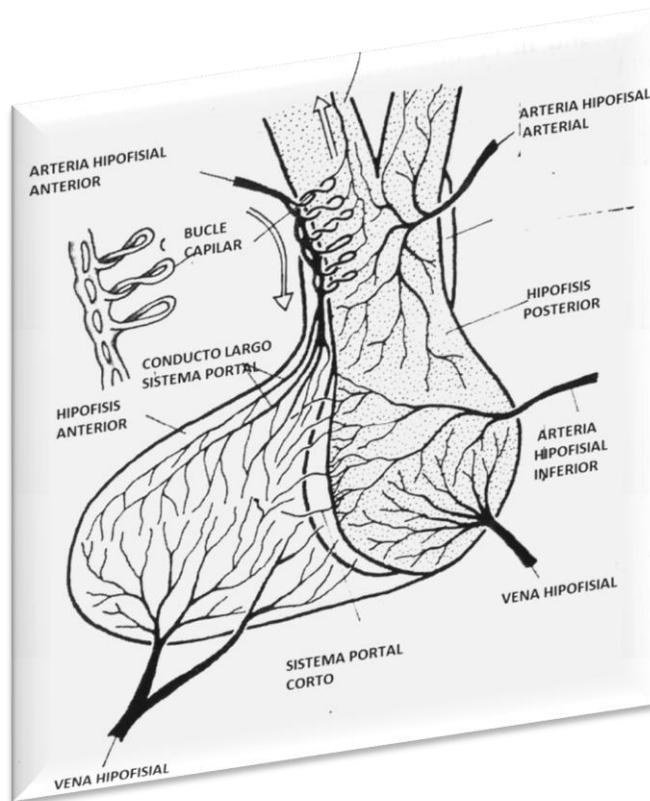


Imagen 5. La hipófisis y el sistema de irrigación (Tomado de Halász, 2000).

estadios de crecimiento, embebidos en el estroma. La parte más externa de la corteza está tapizada por el epitelio germinal escamoso o cuboide que se apoya en la túnica albugínea y una capa de tejido conectivo denso (Fawcett, 1995; Yao y Bahr, 1998).

Las hormonas hipofisarias se liberan a la circulación y estimulan la secreción de hormonas en su órgano blanco. La FSH y LH estimulan las funciones de los ovarios. Su secreción es regulada por la concentración de hormonas esteroides y el patrón de secreción de la GnRH (Arimura, 2000; Brown, 1994).

La LH y FSH son hormonas gonadotrópicas de naturaleza glicoproteica, producidas en el lóbulo anterior de la hipófisis.

El ovario es el principal órgano reproductor. En él se producen los gametos femeninos y se sintetizan hormonas que participan en la regulación de las funciones reproductivas y del metabolismo en general. En los vertebrados, este órgano es pareado y se localiza a ambos lados de la cavidad pélvica; están suspendidos en un pliegue peritoneal llamado mesovario (Fawcett, 1995; Yao y Bahr, 1998).

El ovario se divide en dos zonas: la médula y la corteza. La médula está formada por el estroma, los nervios, abundantes vasos sanguíneos arteriales y venosos, con poco tejido conectivo y la glándula intersticial. En la corteza se localizan los folículos en sus diferentes

El folículo ovárico es la unidad anatómico-funcional del ovario, del cual se originan tres compartimentos: el folicular, el luteal y el intersticial. Sus funciones primordiales son liberar al ovocito capaz de ser fecundado y secretar las hormonas que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor (Yao y Bahr, 1998).

El folículo está formado por el ovocito I, una membrana basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario y de las células tecales; estas últimas conforman la denominada teca interna. Además de las células de la granulosa y las tecales, el folículo está rodeado por un complejo sistema de fibras colágenas, células de tejido conectivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas, todo lo que recibe el nombre de teca externa. Todos estos elementos forman una vaina fibrosa, la que al disgregarse en un punto cercano a la superficie del ovario, forma un orificio por el cual saldrá el ovocito. El ovocito y las células foliculares no reciben riego sanguíneo ni inervación en forma directa (Rajkovic y col, 2006).

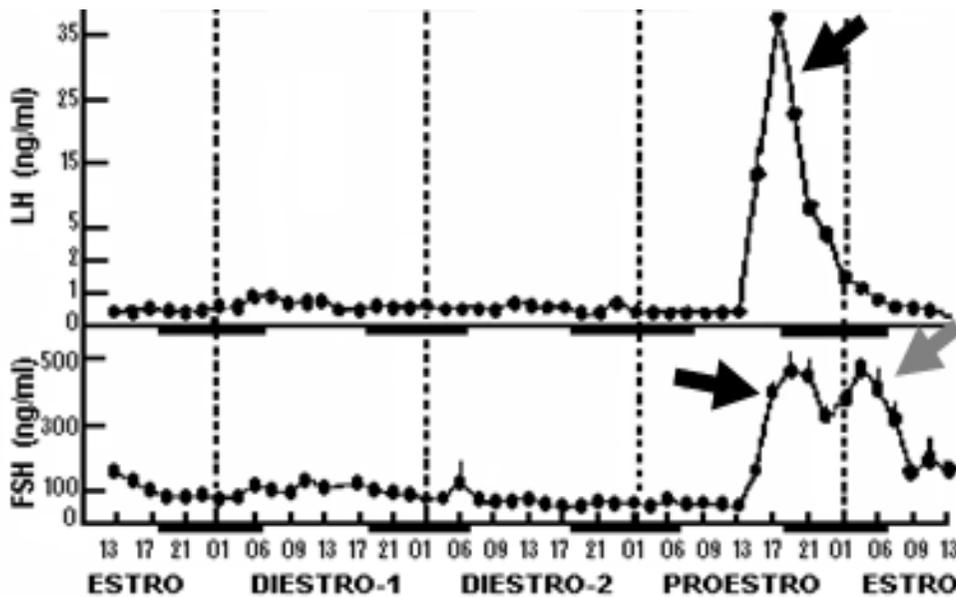


Imagen 7. Concentraciones plasmáticas de LH y FSH a diferentes horas de cada fase del ciclo estral (Tomado de Freeman, 2006).

Las hormonas secretadas por el hipotálamo y la hipófisis anterior son indispensables en el desarrollo del folículo. Además, las hormonas secretadas por el folículo ejercen un efecto de retro-regulación sobre el hipotálamo y la hipófisis anterior (Hill-Wise-Anderson, 2006). En la fase del proestro del ciclo estral de la rata, la secreción de la LH y de la FSH alcanzan su concentración sanguínea máxima entre las 17:00 y 19:00 h (lo que depende de la cepa), aproximadamente ocho a diez horas antes de que ocurra la ovulación; después de lo cual las

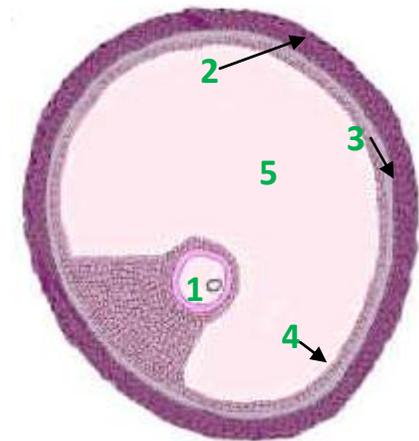


Imagen 6. Folículo preovulatorio. 1: Ovocito con núcleo. 2: Teca externa. 3: Teca interna. 4: Capa de células de la granulosa. 5: antro folicular. Hecha por Alejandro Reynoso, 2013.

concentraciones caen abruptamente a valores mínimos (concentraciones basales), los que persisten durante el resto del ciclo. Estas hormonas se secretan en respuesta a la GnRH secretada por neuronas localizadas en POA-AHA (Hill-Wise-Anderson, 2006).

Estas dos gonadotropinas llegan a los ovarios por el sistema circulatorio. El tejido diana de la LH es la capa de células de la teca interna. En cambio, las células blanco de la FSH son las de la granulosa (Hill-Wise-Anderson, 2006). La acción coordinada de ambas hormonas sobre sus células diana induce la producción de progesterona, andrógenos y 17β-estradiol (Hill-Wise-Anderson, 2006).

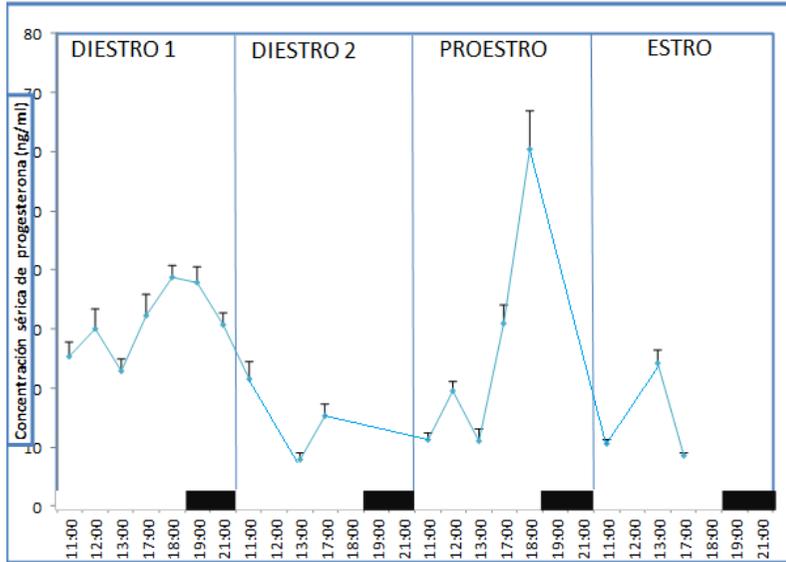


Imagen 9. Concentraciones plasmáticas de progesterona a diferentes horas de cada fase del ciclo estral en la rata adulta (Cepa CIIZ-V) (Hernández, 2012).

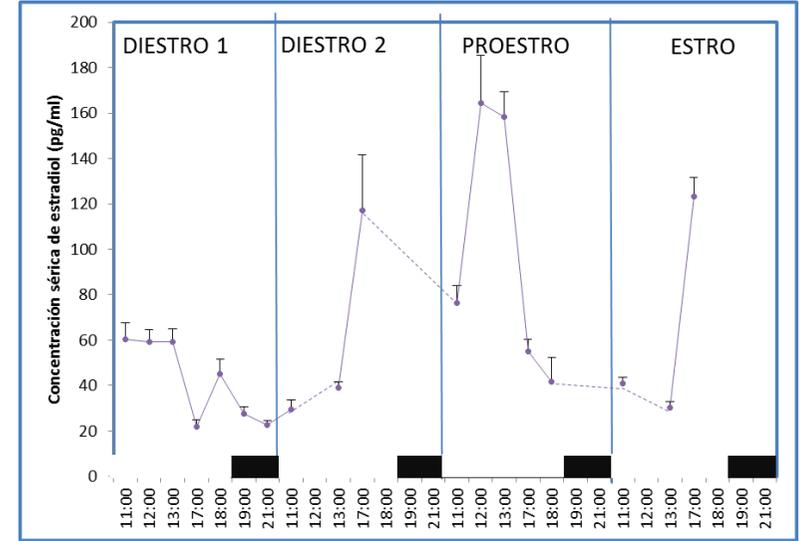


Imagen 8. Concentraciones plasmáticas de estradiol a diferentes horas de cada fase del ciclo estral en la rata adulta (Cepa CIIZ-V) (Hernández, 2012).

Las concentraciones sanguíneas de estradiol aumentan lentamente durante los estadios tempranos del desarrollo folicular (tarde del diestro-2) y en forma muy pronunciada (mañana y medio día del proestro) horas antes de la ovulación (Hill-Wise-Anderson, 2006). Los estrógenos regulan de forma paracrina y autocrina la síntesis de receptores a ambas gonadotropinas en las células del ovario (Hill-Wise-Anderson, 2006).

En la rata, la GnRH es sintetizada por neuronas (GnRHérgicas) que se localizan en la banda diagonal de Broca, en el área septal, el núcleo de la estría terminal y en algunas áreas del diencefalo, que incluyen el núcleo paraventricular, (POA) media y lateral, (AHA) y la zona

retroquiasmática. Algunos grupos de neuronas GnRHérgicas se localizan en el hipotálamo lateral y en la parte dorsal del núcleo supraóptico. (López, 1994). La GnRH viaja por el sistema porta hipotalámico-hipofisario hasta la hipófisis anterior, donde estimula la secreción de la LH y la FSH.

Área preóptica (POA)

El área preóptica es considerada como parte del diencefalo (Crosby y Woodburne, 1966), (Rioch y col, 1940) y (Crosby y Showers, 1969), y como parte del telencefalo por (Nauta y Hymaker, 1969). Cualquiera que sea su origen, está íntimamente relacionada con el hipotálamo. (Papez, 1940) considera al POA como la entrada de la inervación rostral al hipotálamo. El POA participa en la regulación de la temperatura corporal, la sed y el balance de fluidos, en la integración de la respuesta al estrés, regulación cardiovascular, balance hídrico, diferenciación sexual, desarrollo sexual masculino y femenino, la conducta sexual y la secreción de gonadotropinas (Page, 2006).

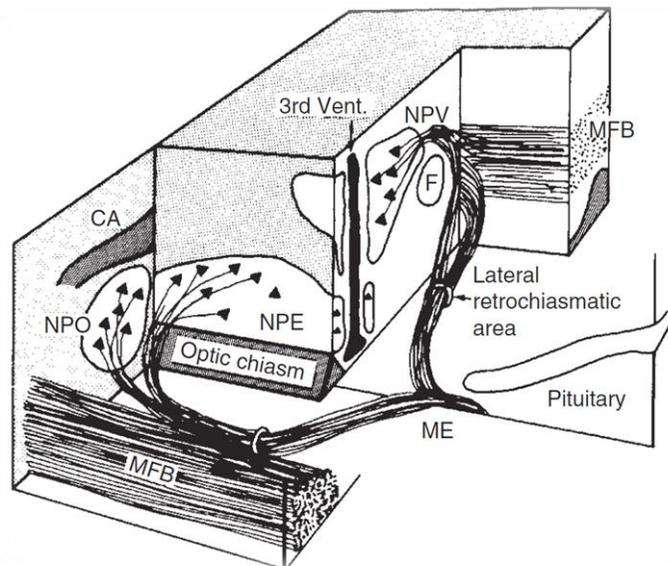


Imagen 10. Descripción esquemática de la zona lateral del área retroquiasmática y de las células que proyectan sus axones hacia la eminencia media. **NPO** (núcleo preóptico medial); **NPE** (núcleo periventricular); **MFB** (haz medial del cerebro anterior); **ME** (eminencia media); **CA** (comisura anterior), **NPV** (núcleo paraventricular), **F** (fórnix) [Tomado de Palkovits, 1982].

El límite anterior del POA está delimitado por la lámina terminal y por la banda diagonal Broca (BDB), en la parte inferior está limitada por el quiasma óptico y el núcleo supraquiasmático, en la región dorsal por la comisura anterior. En la parte posterior del POA se localiza el hipotálamo, exactamente qué la limita es difícil de definir. Los límites ideales son al trazar una línea desde el borde posterior de la comisura anterior al borde posterior del quiasma óptico y al extremo rostral del núcleo paraventricular (Page, 2006).

El POA se continúa dorsalmente con el macizo del núcleo de la estría terminal que entra al POA en su parte más anterior. Continúa con el tubérculo olfatorio y antero-dorsalmente con la región del septo (Nauta, WJH, and Haymaker, W. 1969).

Cito-arquitectónicamente POA se divide en una zona peri-ventricular, medial, lateral y en el núcleo preóptico magnocelular (Swanson, 1979). La zona peri-ventricular (núcleo preóptico peri-ventricular: PVPOA) es una banda delgada de células que yacen debajo del tercer ventrículo y se continúan caudalmente con el núcleo anterior peri-ventricular del hipotálamo. (Swanson, 1979), ha descrito que son células pequeñas, orientadas frecuentemente en paralelo al tercer ventrículo. La zona preóptica medial (área preóptica medial, MPOA) está delimitada en todo su borde dorsal por la comisura anterior y ventralmente por el quiasma óptico. El límite rostral se fusiona con el macizo del núcleo de la estría terminal. Las células son de tamaño medio densamente empaquetadas. El núcleo preóptico magnocelular descansa en la zona lateral, lateral a la BDB; se conforma por neuronas de 20 a 30 μm de diámetro que se agrupan en racimos en los núcleos septal medial, el núcleo preóptico magnocelular, la sustancia inornata y el globo pálido. Estas neuronas son positivas para la acetilcolino-esterasa (AChE) (Page, 2006). La zona lateral (área preóptica lateral, LPOA) se caracteriza por la presencia de neuronas de tamaño medio, dispersas entre las fibras del haz medial del cerebro anterior (MFB). El macizo del núcleo de la estría terminal está separado de LPOA por una zona libre de células. El macizo del núcleo de la estría terminal se proyecta en la zona preóptica entre el área preóptica anterior (AHA), el MPOA y el LPOA (Page, 2006).

En la rata, por inmunohistoquímica se han localizado hormonas peptídicas en las células que conforman los núcleos del POA, del septum medial y del macizo del núcleo de la estría terminal: Somatostatina en PVPOA, hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y metionina-encefalina (met-ENK) en PVPOA y MPOA, hormona liberadora de la tirotrina (TRH) en MPOA, VIP (péptido intestinal vasoactivo) y CRH en el macizo del núcleo de la estría terminal, sustancia P y met-ENK en MPOA y LPOA (Page, 2006). Las células inmuno-reativas (ir-) a GnRH se han encontrado en MPOA pero no están confinadas en sus bordes; también hay en el bulbo olfatorio, en el tubérculo olfatorio en el núcleo de la BDB, en el septum medial, el núcleo preóptico peri-ventricular y el hipotálamo lateral (Page, 2006).

Conexiones del Área Preóptica medial (MPOA)

El MPOA cuenta con múltiples proyecciones ascendentes y descendentes en sentido lateral y dorsal (Nauta 1958; Valverde 1965; Wolf y Sutin 1966; Enoch y Kerr 1967; McClure y Clark 1968; Millhouse 1969; Mizuno y col. 1969). Las múltiples fibras de MPOA se proyectan de manera vertical y horizontal desde la (Banda Diagonal de Broca) BDB, y en forma lateral con el septum, excepto con el septum medio-lateral. Hay una menor cantidad de proyecciones hacia el septo del núcleo triangularis y con el BNST. Dorsalmente el MPOA proyecta fibras al núcleo talámico

paraventricular y paratenial. Lateralmente hacia el núcleo medial amigdaloides y pocas fibras se dirigen al área amigdaloides anterior, pero no a la corteza ni el núcleo basolateral (Ganten y Pfaff, 1981).

Dentro del hipotálamo el MPOA proyecta pocas fibras hacia el área hipotalámica anterior (AHA), la parte ventrolateral del núcleo ventro medial (NVM), y el núcleo hipotalámico dorsal y dorsomedial. Hacia la parte caudal, MPOA proyecta fibras hacia el núcleo arcuato y la eminencia media, continúan lateralmente al núcleo ventral premamilar (VPM). Hay proyecciones hacia el núcleo supramamilar. El núcleo premamilar dorsal recibe una leve cantidad de fibras en comparación a las enviadas al VPM (Ganten y Pfaff, 1981).

Las proyecciones caudales van hacia el núcleo habenular lateral (LHN), el MPOA proyecta fibras a todas direcciones del interior LHN, pero más hacia zonas posteriores; en su mayoría las proyecciones van en la parte medial de LHN. El MPOA posee una proyección difusa al área tegmental ventral de Tsai, y una leve proyección hacia el centro del mesencéfalo, particularmente las partes mediolateral, medial y ventral (Ganten y Pfaff, 1981). También se han observado fibras desde MPOA que descienden al núcleo parabranchial del puente, al locus ceruleus, al núcleo del tracto solitario y al complejo vagal en el bulbo raquídeo (Chiba y Murata, 1960)

Conexiones del Área Hipotalámica Anterior (AHA)

El AHA posee proyecciones dorsales, caudales e intrahipotalámicas (Powell y col. 1963; Nauta y Haymaker 1969; Millhouse 1973b; Swanson y Cowan 1975b; Conrad y Pfaff 1976, Zaborszky 1982). El AHA envía proyecciones dorsales hacia el septum lateral, particularmente en la parte media-lateral. Caudalmente el AHA proyecta axones hacia la mitad medial de LHN y el núcleo amigdaloides medial y cortical (Ganten y Pfaff, 1981).

Las conexiones intrahipotalámicas son hacia la eminencia media, el núcleo arcuato y el hipotálamo contralateral. El AHA proyecta un importante número de terminales hacia el núcleo dorsomedial. El AHA también proyecta hacia el núcleo dorsal y ventral premamilar; un menor número de axones se dirigen hacia el núcleo supramamilar y aún menos hacia los cuerpos mamilares. En el cerebro medio, el AHA proyecta hacia el mesencéfalo, específicamente hacia el área tegmental ventral de Tsai. La proyección más caudales de AHA son hacia el área lateral, alrededor del locus ceruleus (Ganten y Pfaff, 1981).

Las conexiones del área preóptica-tuberal fueron identificadas por medio de técnicas morfológicas (Köves y Réthelyi 1976) y electrofisiológicas (Dyer 1973); a partir de ellas se identificó que un pequeño número de neuronas del núcleo arcuato y del ventromedial reciben aferencias del POA-AHA, que además desde allí se proyectan a la eminencia media (Záborszky, 1982).

Con base en estudios fisiológicos, se mostró que POA parece ser el área principal responsable de la regulación del comportamiento sexual de la hembra y de la ovulación, mientras que en el macho lo es el núcleo ventromedial (Záborszky, 1982).

Vías de comunicación de las Áreas Preóptica e Hipotalámica Anterior (POA-AHA)

Para estudiar las conexiones nerviosas del hipotálamo, se ha procedido a destruir las vías de entrada (“aferentes”) y las proyecciones (“vías eferentes”) de tractos nerviosos de distintos grupos celulares. Las lesiones electrolíticas y mecánicas son métodos clásicos en el estudio de las conexiones nerviosas en el Sistema Nervioso Central (SNC). Un problema común de todas las lesiones experimentales es el daño a vías de paso entre una estructura y otra, que pueden contribuir a la degeneración de una u otra estructura cercana o a distancia (Záborszky, 1982).

La sección quirúrgica de las aferencias de una región se realiza por medio de una navaja o “cuchillo” especial, que se denominó “cuchillo de Halász”. Esta herramienta facilitó el estudio de aferencias al hipotálamo, y mostró que el hipotálamo medio basal recibe aferencias desde el tronco cerebral (Záborszky, 1982).

En todo diseño experimental se exige de un grupo experimental denominado “operación simulada”. Los animales con “operación simulada” se someten a todos los procedimientos metodológicos que recibirá el grupo experimental, excepto el tratamiento que evaluará los efectos de la variable a estudiar. El término “operación simulada” llega a ser confundido con otro término “grupo control o blanco”, pero cabe señalar que la diferencia radica en que una operación simulada es un proceso invasivo y un grupo control, por lo general es solo el punto de partida, sin modificación alguna. Las operaciones simuladas deben llevarse a cabo para eliminar los efectos secundarios causados por lesiones mecánicas o electrolíticas. Sin embargo, una forma más confiable de afrontar el problema del paso de fibras es el enfoque del método de lesiones por dos pasos, que únicamente es hacer dos veces la operación y mediante esto observar el efecto fisiológico y el morfológico. Este método de dos pasos es de gran utilidad para el estudio de las conexiones locales.

Un requisito previo para la aplicación de un método de dos pasos es un tiempo para asegurarse de la supervivencia de los animales utilizados, y que las señales de la degeneración de la primera operación no afecten o intervengan con la segunda. Los cerebros de los animales con un hipotálamo deaferentado con una segunda lesión sirvieron como controles después de un período de 3 semanas de supervivencia, suficiente para la desaparición de las fibras y la degeneración extra-hipotalámica (Záborszky, 1982).

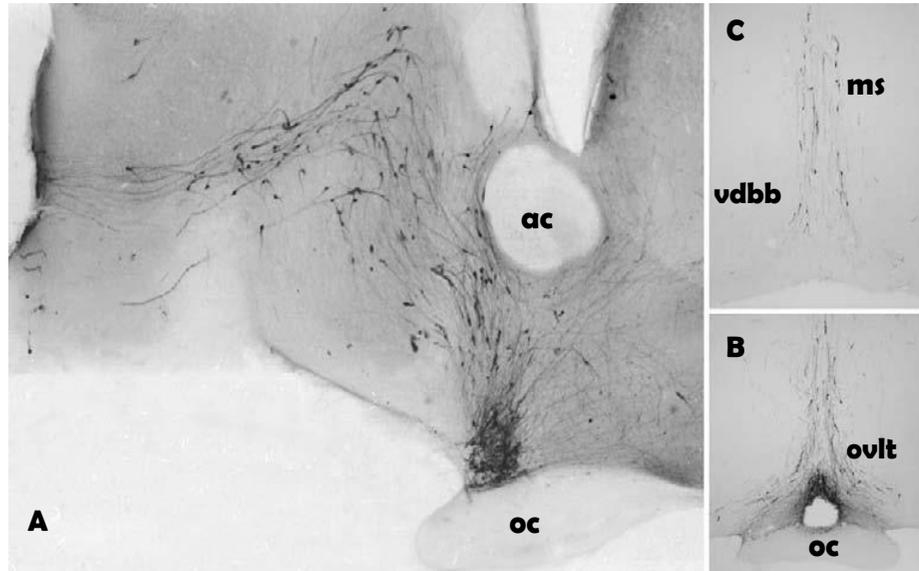


Imagen 11. Distribución de las neuronas GnRHérgicas en el cerebro de ratón. **(A)** Fotografía de un corte sagital del cerebro de ratón adulto inmunoteñido para GnRH que muestra la distribución dispersa de las neuronas desde bulbo olfatorio hasta el hipotálamo. **(B)** Corte coronal de la distribución de las neuronas GnRH en la parte más frontal de POA. Observe la “Y invertida” desde el septum (**ms**) y la rama vertical de la banda diagonal de Broca (**vdbb**), que constituyen el polo rostral y el más caudal en el continuo de las neuronas GnRH a ambos lados del tercer ventrículo, alrededor del órgano vasculoso de la lamina terminal (**ovlt**). **(C)**. Observe la densidad de terminales GnRH en ovlt. comisura anterior (**ac**). quiasma óptico (**oc**). (Tomada de Herbison, 2006)

Con respecto a la secreción de la GnRH, el efecto de la lesión de ciertas estructuras del SNC es el desequilibrio o la desintegración del mecanismo temporal que induce el aumento diario de la GnRH. En la rata la lesión de POAm, no solo resulta en un estro persistente, sino también en un bloqueo de la inducción de la secreción de progesterona (Silverman y Pickard, 1983).

La estimulación o destrucción de diferentes estructuras extra-hipotalámicas como la amígdala, el hipocampo, el septum, el tronco cerebral, afecta la actividad secretora de la adenohipófisis (Záborszky, 1982). Estas regiones participan en el control de la conducta reproductiva y pueden estar modulando la liberación de GnRH; sin embargo, solo las lesiones que impiden el transporte de la GnRH hasta la eminencia media afectan de manera significativa la secreción de gonadotropinas. La GnRH es liberada de manera pulsátil más que continua. Mediante el empleo de un modelo experimental como el primate (McDonnell, 1998) se demostró por primera vez que el patrón pulsátil de liberación de la GnRH era necesario para aumentar la expresión de los genes relacionados con la secreción de gonadotropinas (Yen y col. 2001).

Neuronas que sintetizan la GnRH (GnRHérgicas)

La distribución de las fibras de las neuronas GnRHérgicas se han estudiado tan ampliamente como los cuerpos celulares. Parte del debate sobre el origen de las terminales de la GnRH en la eminencia media se resolvió al realizar experimentos en el cobayo, en donde observaron que tanto el grupo de células en el POA como las del núcleo arqueado terminaron en la vasculatura del sistema portal (Silverman y Pickard, 1983).

Por medio de trazadores retrógrados aplicados en la eminencia media se ha demostrado la presencia de células inmunoreactivas a la GnRH (ir-GnRH) en la región septal, de POA, y la región PVPOA; no todas las neuronas proyectan sus terminales a la eminencia media.

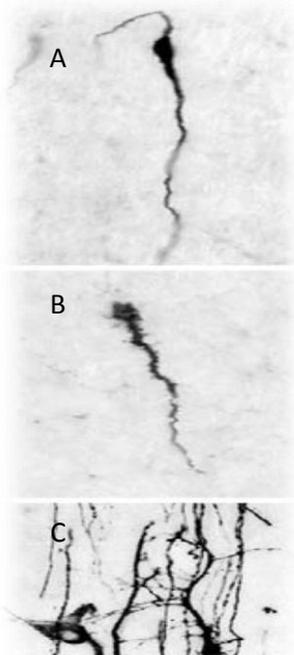


Imagen 12. Morfología de la neurona GnRH de ratón (A y B) y de oveja (C); observe su naturaleza bipolar y el importante número de espinas dendríticas (tomadas de Herbison, 2006).

En la rata y el cobayo, por medio de inmuno-citoquímica, se ha demostrado que la GnRH está presente dentro de gránulos en los axones y terminales nerviosas situadas en la eminencia media. Sin embargo, muy pocas de las células ir-GnRH colindan con los capilares del plexo primario de las terminales del sistema portal. Esto llevó a plantear que uno de los aspectos de la regulación de la liberación de la GnRH podría estar vinculado con cambios en la posición de estas terminales en el espacio peri-vascular. Este cambio en la dinámica de las terminales neurosecretoras y alrededor de los elementos gliales o endoteliales se ha propuesto para otros sistemas neuro-secretorios, incluyendo el del lóbulo neural (Silverman y Pickard, 1983).

En todas las especies estudiadas se ha observado que los cuerpos celulares GnRHérgicos se extienden desde la región pericomisural de la lámina terminal, transcurren y se incorporan a las terminales del órgano vasculoso de la lámina terminal, aunque la concentración de fibras en esta región varía entre las especies (Silverman y Pickard, 1983).

Las neuronas GnRHérgicas hacen sinapsis con terminales GnRH, noradrenérgicas (en el POA de rata), neuropéptido Y (NPY), ácido gama amino butírico (GABA), glutamato, CRH, sustancia P, propiomelanocortina y sus derivados opiáceos (Page, 2006, Herbison, 2006). Los cuerpos de las neuronas GnRHérgicas se disponen en forma de V invertida a lo largo de la región basal del cerebro anterior. El ápice está dirigido hacia la línea media del órgano vasculoso de la lámina terminal y de PVPOA y los extremos divergen al ser divididos por el tercer ventrículo. Ambos sistemas de neuronas

GnRHérgicas se dirigen caudal y ventralmente a la eminencia media. Un sistema periventricular originado en la línea media y otro sistema lateral descienden por el HMB (Page, 2006).

Las neuronas de la GnRH no están agrupadas en racimos y núcleos específicos, si no que se localizan como redes laxas dispersas. La población de neuronas de GnRH es relativamente pequeña, entre 1000 y 3000. Existiendo diferencias considerables entre las especies: en los primates, incluidos los seres humanos, las neuronas de GnRH están principalmente localizadas en el núcleo arqueado del HMB y el POA, mientras que en los roedores se han detectado pocas neuronas de la GnRH en el núcleo arqueado. La red más sobresaliente en el roedor está compuesta por neuronas que forman un continuo laxo conocido como la vía septo-preóptica-infundubular. Los axones de las neuronas GnRH se proyectan hacia muchos sitios en el interior del encéfalo. Una de las proyecciones más características va desde el HMB hasta la eminencia media, que termina en un plexo extenso de botones sinápticos sobre los vasos del sistema portal primario, el cual envía GnRH a su célula blanco. Los axones de las neuronas de GnRH también se proyectan hacia el sistema límbico y los órganos circunventriculares distintos de la eminencia media, como el OVLT, las que regulan la conducta reproductiva (Yen y col. 2001).

Asimetrías Hipotalámicas

Uno de los criterios morfológicos que se utilizan para clasificar a los animales es el tipo de simetría, Casi todos los animales son bilateralmente simétricos, es decir, sus cuerpos pueden dividirse por un plano lateral en dos partes iguales (izquierda y derecha) de tal forma que ambas son imágenes especulares de la otra. La existencia de una función asimétrica ha sido descrita en los distintos órganos endocrinos pares, como la glándula tiroidea, las suprarrenales y las gónadas, incluso está presente en el sistema nervioso central (Gerendai, 1986).

El hipotálamo, específicamente el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) regula de manera asimétrica la secreción de gonadotropinas y la ovulación (Gerendai y col., 1978; Bakalkin y col., 1984; Inase y Machida, 1992; Nance y Moger, 1982; Fukuda y col., 1984; Nance y col., 1984; Moran y col., 1994; Cruz y col., 1989; Sánchez y col., 1994; Arteaga- López y col., 2003). Esta función asimétrica no ha sido comprobada por un sustento anatómico. Sin embargo, se sabe que la cantidad de GnRH en el HMB derecho es el doble que en el izquierdo (Gerendai y col., 1978); la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH en POA-AHA derecha es mayor que en la izquierda a las 13:00 h del diestro-2 (Arteaga-López y col, 2003); la expresión del ARNm del receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$) es mayor en POA-AHA derecha que en la izquierda a las 17:00 h del estro (Arteaga-López y col, 2003); la cantidad de neuronas inmunoreactivas a GnRH (ir-GnRH) en el cerebro del ratón es mayor en el hipotálamo derecho que en el izquierdo (Inase y Machida, 1992); la concentración de acetilcolina a las

13:00 h del diestro-1 y proestro es mayor en POA-AHA derecha que en la izquierda (Cruz y col, 1997). La cantidad de neuronas ir-RE α en la mañana del diestro-1 es mayor en POA-AHA derecha que izquierda (Mendoza-Garcés y col, 2007).

El hipotálamo anterior responde de manera asimétrica a las hormonas esteroides. El implante de estradiol en POA o en el núcleo ventromedial derecho de ratas hembras de cinco días de vida, provoca masculinización cuando los animales llegan a la edad adulta (estas hembras prefieren sexualmente a otras hembras). En cambio, cuando el estradiol se implanta en el lado izquierdo, ocurre desfeminización, los animales no tienen ciclos estrales (Norden y Yahr, 1982). El lado derecho de AHA parece jugar un papel preponderante en el proceso de hipertrofia compensadora del ovario que el lado izquierdo, ya que en la rata ovariectomizada unilateralmente, la lesión del lado derecho previene la hipertrofia compensadora del ovario remanente, en tanto que la lesión del lado izquierdo no la modifica (Fukuda y col. 1984). La lesión unilateral de esta misma área del hipotálamo con ácido kaínico bloquea la hipertrofia compensadora del ovario, solo si la lesión y la ovariectomía unilateral se hacen del mismo lado. (Nance y col. 1982 y 1984). La lesión electrolítica del 90% del hipotálamo anterior derecho o izquierdo en la mañana del diestro-1 bloquea la ovulación, aún después de 42 días posteriores a la destrucción de una de las porciones (Cruz y col. 1989).

Mediante la inserción dorsal de una aguja (29G) de acero inoxidable dirigida hacia la zona media de POA-AHA, se observó que la ovulación puede ser alterada, pero esto depende del día del ciclo y de la porción lateral de POA-AHA en que se lleve a cabo el procedimiento experimental (Cruz y col., 2009; Domínguez y col., 2011).

Con este diseño experimental se mostró que en la fase del estro, la inserción de la aguja en POA-AHA derecha provocó el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales, mientras que la inserción en POA-AHA izquierdo no indujo modificaciones, ya que el 80% de los animales ovularon. El número de ovocitos, liberados por el ovario izquierdo disminuyó en los animales con inserción de la aguja en POA-AHA izquierda, pero el peso de este ovario es semejante al grupo control. En cambio, en las ratas con inserción de la aguja en POA-AHA derecha, se observó aumento significativo del peso de los ovarios. Estos resultados se acompañaron del aumento del peso del útero (Cruz y col., 2009).

En la fase de diestro-1, la inserción de la aguja en POA-AHA izquierda o derecha resulta en el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales, así como el aumento del peso de los ovarios y del útero. En las fases de diestro-2 y proestro, la inserción de la aguja en POA-AHA de uno u otro lado no afecta la ovulación (Cruz y col., 2009).

Los efectos de la falta de ovulación por la inserción unilateral de la aguja en POA-AHA en las fases de estro y diestro-1 se acompañan de un retraso de 24 horas en la secreción preovulatoria de la LH y de la FSH (Domínguez y col., 2011). Estos resultados llevan a sugerir que por medio de estructuras o vías de conexión dorsales a POA-AHA transcurren señales que modulan de manera estimulante los mecanismos hipotalámicos que culminan con la ovulación. Además que estas señales neuroendocrinas pueden ser asimétricas o no, pero esto depende de la fase del ciclo y específicamente durante el estro y el diestro-1.

JUSTIFICACIÓN:

Los estudios llevados a cabo en el SNC para conocer las vías de conexión entre una zona y otra, utilizan grupos experimentales denominados como operaciones simuladas (“sham operations”), en las cuales el electrodo, el cuchillo de Halász, la aguja de inyección, etc. Previamente, se mostró que una operación simulada, la cual consistía en introducir una aguja hasta POA-AHA y mantenerla allí durante un minuto podía bloquear o no la ovulación, efecto que depende de la porción izquierda o derecha de POA-AHA en la que se introduce la aguja y de la fase del ciclo en el que se lleva a cabo la operación simulada. Dado que introducir la aguja afecta estructuras y vías de conexión que se localizan en la parte dorsal a POA-AHA, se puede considerar que la ovulación es regulada por la transmisión de información de esas estructuras y vías dorsales. Por lo que en este estudio se decidió analizar cuál o cuáles de las estructuras localizadas en la parte dorsal de POA-AHA regulan la ovulación, y si son las responsables de la asimetría observada en estro y la simetría en diestro-1. El experimento fue diseñado bajo el razonamiento que aquellas estructuras dorsales a POA-AHA que no participan en los mecanismos de regulación de la ovulación, no la alterarán. Por lo que se detendría el análisis en la coordenada vertical en la que los animales ovularan.

Con la finalidad de analizar si estas estructuras localizadas en la parte dorsal a POA-AHA regulan la secreción de GnRH, de LH o de estradiol, en ratas con bloqueo de la ovulación por la introducción de la aguja, se administrará cada una de estas hormonas y se analizará si se induce la ovulación.

HIPÓTESIS.

Si las estructuras nerviosas y las vías de conexión dorsales a POA-AHA participan en los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación, entonces introducir la aguja y mantenerla durante un minuto en diferentes coordenadas ascendentes o verticales a POA-AHA bloqueará la ovulación.

OBJETIVO:

- Estudiar cual o cuales estructuras dorsales a POA-AHA están vinculadas con los mecanismos que regulan la ovulación.
- Estudiar los efectos del reemplazo de la señal hipotalámica, hipofisaria u ovárica en animales con bloqueo de la ovulación, resultado de la lesión de estructuras dorsales a POA-AHA, provocadas por la inserción de una aguja.

MATERIALES Y MÉTODO

EXPERIMENTO 1. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DORSALES A POA-AHA QUE PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN.

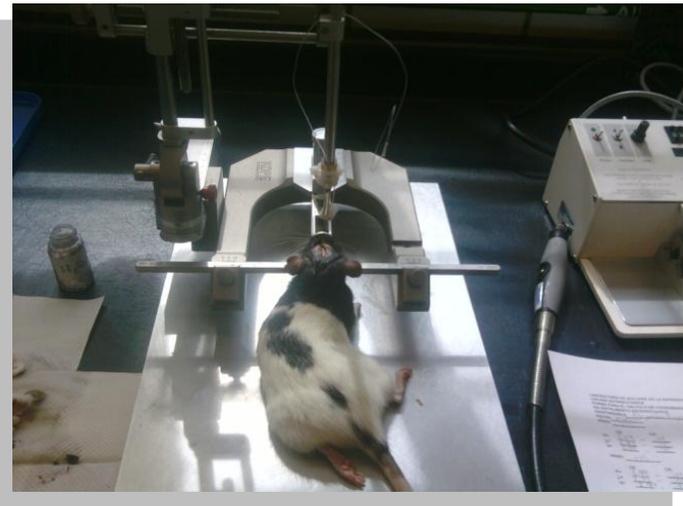


Imagen 13. En esta imagen se muestra una rata colocada en el estereotáxico, que permite ubicar e insertar la aguja en POA-AHA.

A todos los animales se les realizó el estudio del ciclo estral por medio de la toma diaria de frotis del epitelio de la vagina. Una vez que los animales presentaron por lo menos dos ciclos estrales de cuatro días, se seleccionaron ratas en la fase de estro o de diestro-1. A las 8:30 h del día los animales fueron anestesiados por medio de la inyección intraperitoneal de 25mg/kg p.c de pentobarbital sódico (Anestesal, Smith Kline Norden de México). Posteriormente se colocaron en un aparato estereotáxico (Imagen 13) se insertó una aguja 29G (0.5 mm O.D. x 16 mm; marca BD Plastipak, Tuberculina), de acero inoxidable en POA-AHA izquierda o derecha. Ya en la zona de estudio, y la aguja se mantuvo en esa posición durante un minuto.

Las coordenadas que se utilizaron fueron tomadas del atlas del cerebro de la rata de Köning y Klippel. (1963), a partir de Bregma son: Antero-Posterior: ± 0.06 mm, Lateral-Medial: 0.06 mm, Vertical: 0.86 mm (Imágenes 14). En otros grupos de ratas, la coordenada vertical fue modificada bajo el razonamiento que aquellas estructuras dorsales a POA-AHA que no participaran en los mecanismos de regulación de la ovulación, no la alterarían, por lo que se detendría el análisis en la coordenada vertical en la que los animales ovularan (Imágenes 15 y 16).

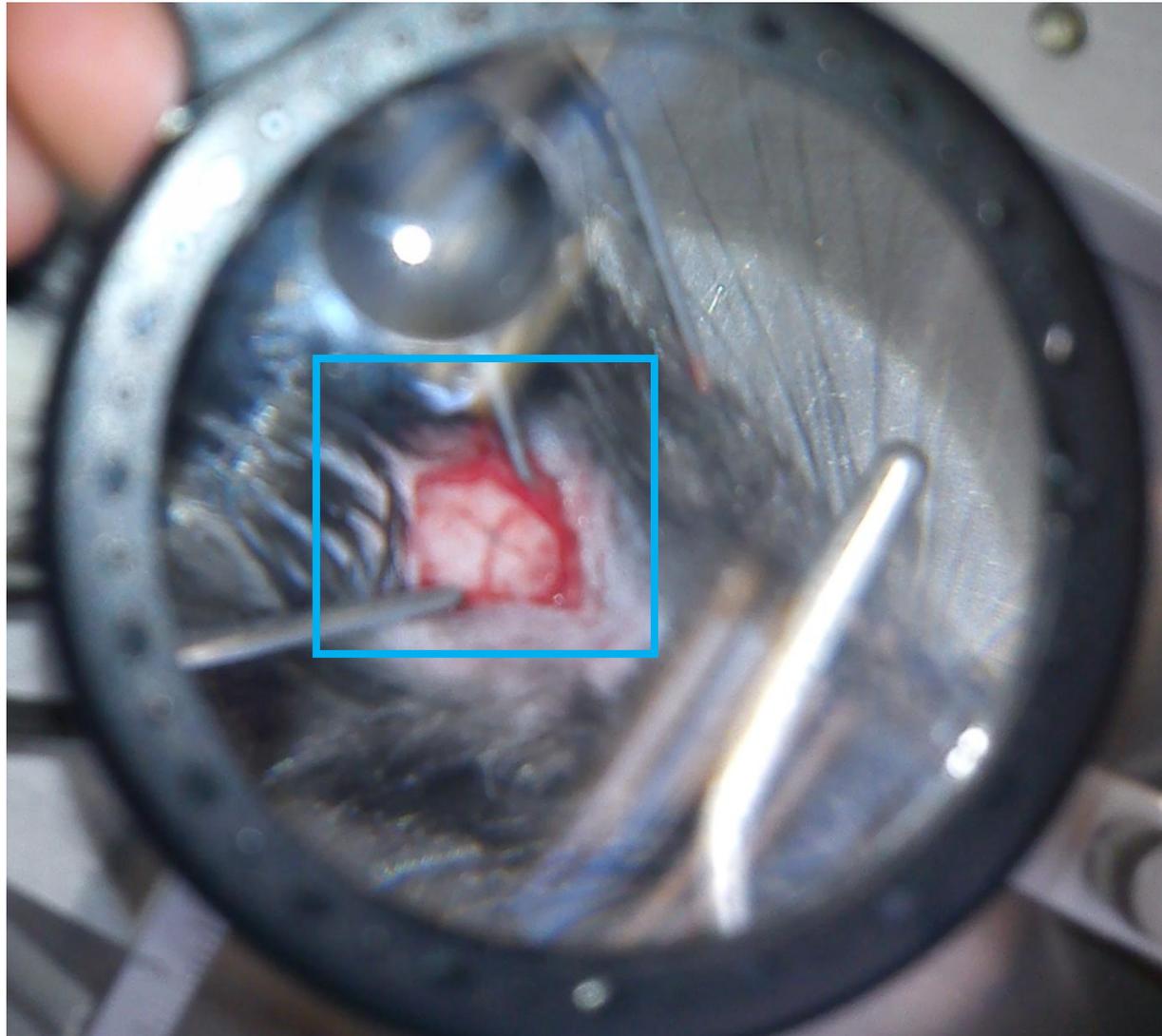


Imagen 14. Fotografía que muestra a Bregma en el cráneo de la rata de la cepa CIIZ-V la cual se toma como referencia en la introducción de la aguja en POA-AHA.

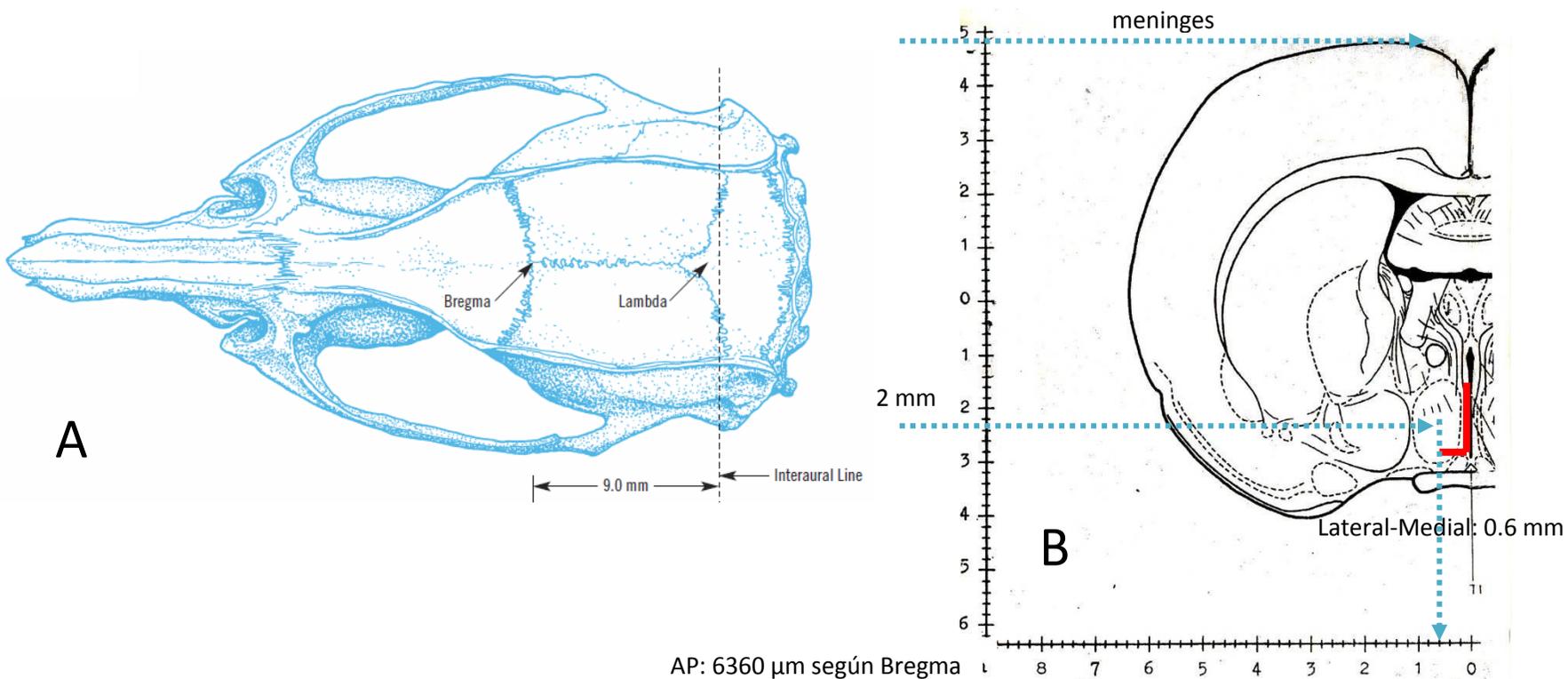


Imagen 15. Imagen. **A:** vista dorsal del cráneo de una rata de 290g de la cepa Wistar, donde se identifica la posición de los puntos Bregma y Lambda, para la inserción de la aguja en POA-AHA se tomó como referencia a Bregma considerándolo el punto cero o punto de referencia antero-posterior (AP) señalado en cada corte coronal del atlas del Cerebro de la Rata (König y Klippel, 1963). **B:** corte coronal que ilustra las estructuras que se encuentran en el cerebro de la rata a 6360 μ (posición de POA-AHA) y la distancia en mm desde el punto cero al área.

La imagen 16 muestra la trayectoria vertical que puede seguir la aguja en la zona de estudio, que comprende de la coordenada AP: 6790 a 6280 μm (510 μm de longitud). Las zonas que son afectadas por la trayectoria de la aguja se muestran en la imagen 17.

A veinticuatro horas de la cirugía, se continuó con el estudio del frotis vaginal. Los animales fueron sacrificados a las 09:00 h del estro esperado. Como grupo testigo se utilizaron animales intactos sacrificados en el día del estro, a la misma hora que los animales experimentales.

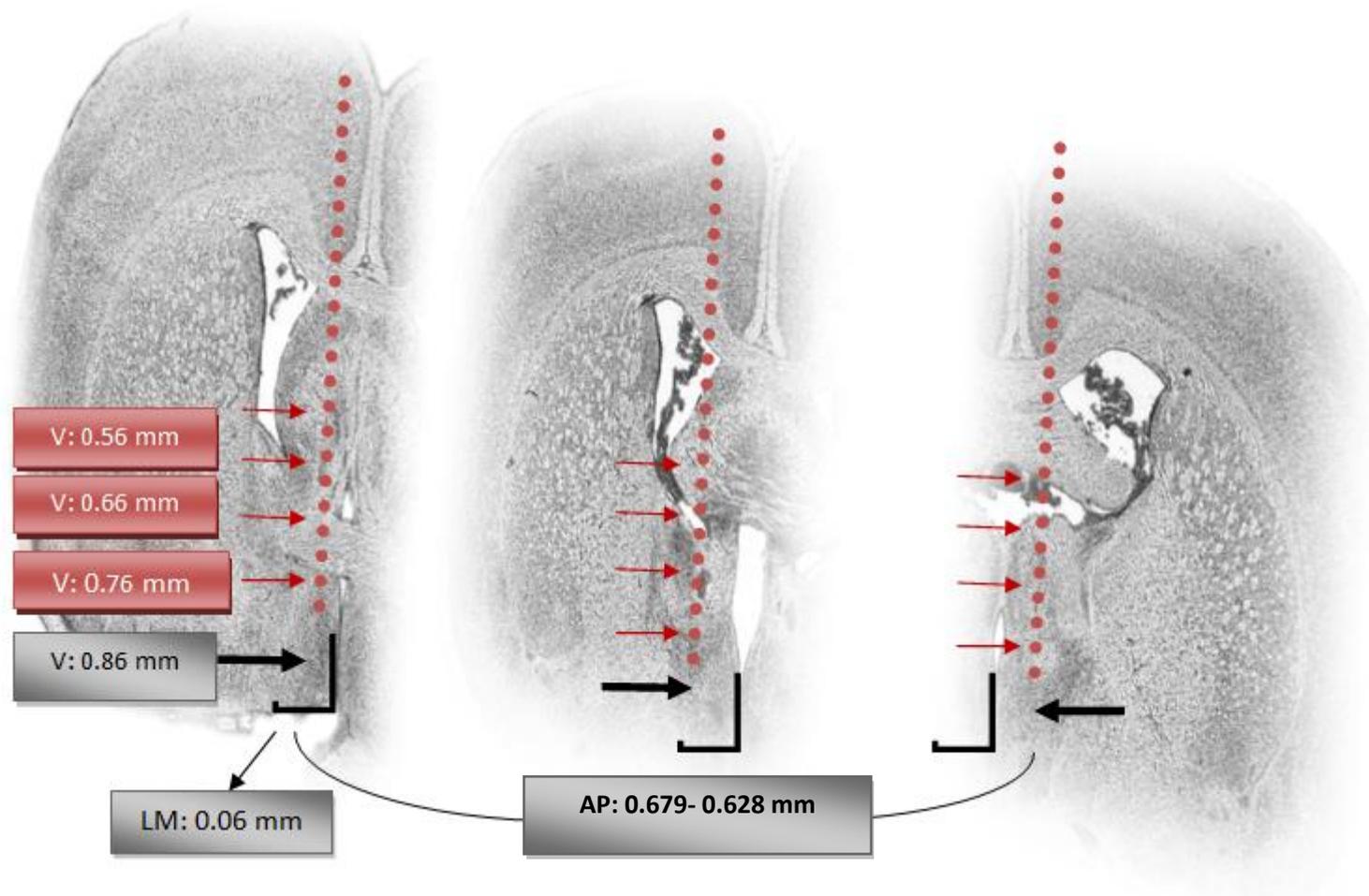


Imagen 16. Coordenadas seleccionadas y diseñadas para utilizar en los diferentes grupos experimentales a valorar su vinculación con la ovulación.

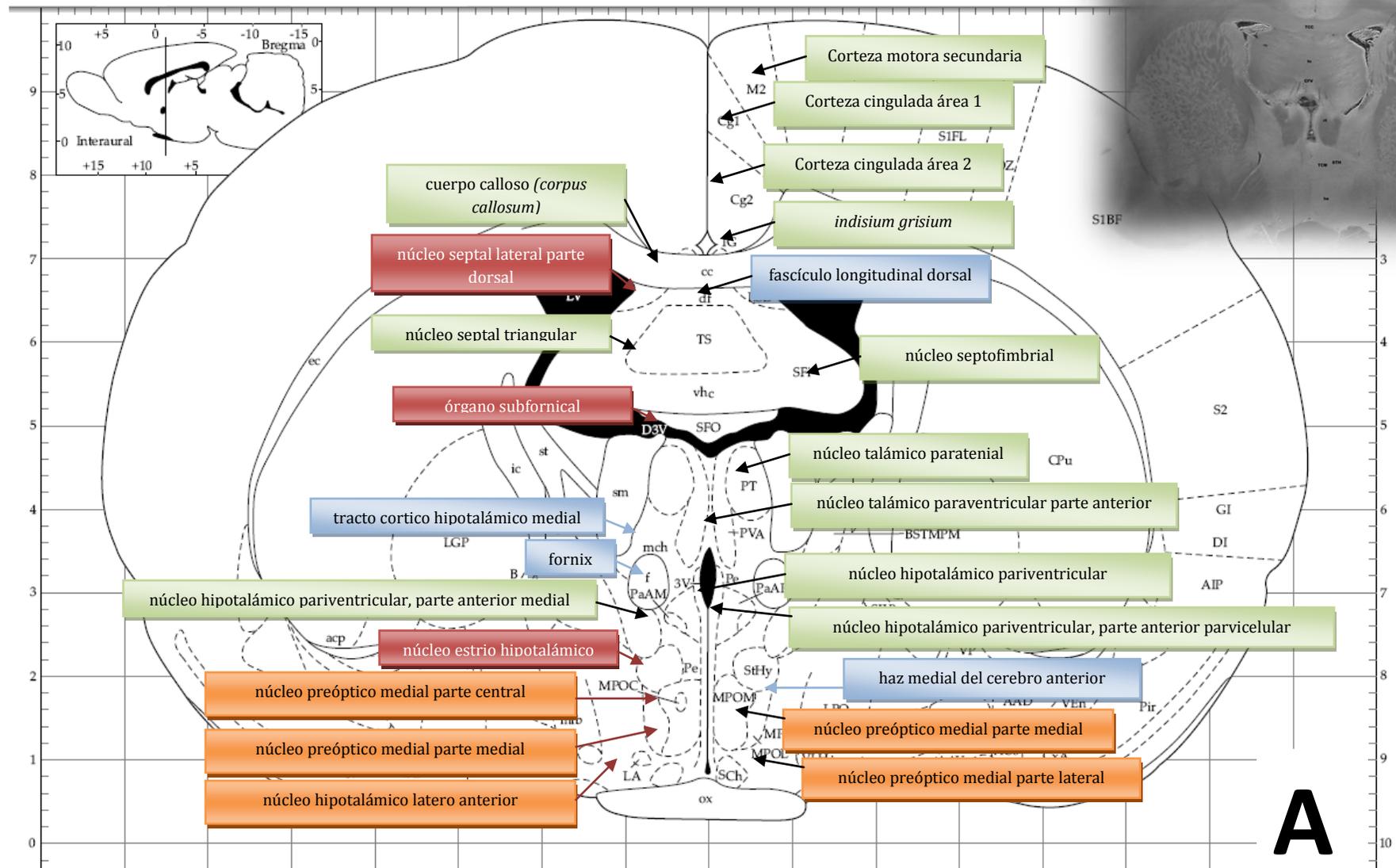


Imagen 17. **A:** Esquema de un Corte coronal del cerebro de la rata donde se señalan las estructuras que se encuentran por encima de POA-AHA, en sentido vertical, y que son seccionadas al bajar la aguja (Tomada de König y Klippel, 1963).

B: Fotografía de un corte coronal del cerebro de las rata visto en un estereoscopio (Fotografías tomadas a 1.5 x 0.80 aumentos).

EXPERIMENTO 2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL REEMPLAZO DE LA SEÑAL HIPOTALÁMICA, HIPOFISARIA U OVÁRICA EN ANIMALES CON BLOQUEO DE LA OVULACIÓN, RESULTADO DE LA LESIÓN DE ESTRUCTURAS DORSALES A POA-AHA, PROVOCADAS POR LA INSERCIÓN DE UNA AGUJA DE ACERO INOXIDABLE.

Una vez identificadas las estructuras nerviosas involucradas en la regulación de la ovulación y con el propósito de conocer cuál de las señales hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario fueron alteradas por la inserción de una aguja de acero inoxidable, otros grupos de animales fueron divididos al azar para tratarlos de la siguiente manera:

- *Reemplazo de la señal hipotalámica:* A las 14:00 h del proestro esperado, a cada rata se les administrará 3.7 µg/Kg peso de LHRH (Sigma Chemical Company St. Louis MO).
- *Reemplazo de la señal hipofisaria:* A las 14:00 h del proestro esperado, a cada rata se les administrará 25 u.i. de hCG (Sigma Chemical Company St. Louis MO).
- *Reemplazo de la señal ovárica:* A las 14:00 h del diestro-2 esperado, a cada rata se les administrará 10 µg Benzoato de estradiol (Sigma Chemical Company St. Louis MO).

Todos los animales fueron sacrificados como en el experimento 1.

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación, se disecaron los ovarios y el útero. Las trompas uterinas se separaron del ovario, y bajo el estereoscopio se punzo y se extrajeron los ovocitos y se contaron en cada ovario. Los ovarios y el útero fueron pesados en una balanza analítica, el valor obtenido se expreso por cada 100 g de peso del animal.



Imagen 18. En esta imagen se observa el oviducto que contiene los ovocitos cuando se lleva a cabo la ovulación.



Imagen 19. Cerebro de rata conservado en paraformaldehído al 4%.

Los cerebros se extrajeron del cráneo, se colocaron en una solución de formaldehído al 4% durante al menos ocho días, y fueron cortados en forma seriada a 20 μm en un vibratomo, para ubicar el trayecto y la zona donde quedó la punta de la aguja. Todos aquellos animales en los que la aguja no quedó en la zona de estudio fueron descartados del análisis estadístico, pero fueron utilizados como el control negativo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del número de animales que ovularon con respecto a los que no lo hicieron se analizaron por medio de la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher. Los resultados del número de ovocitos liberados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Mientras que los datos del peso de los ovarios y del útero se analizaron mediante la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se comparen dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de “t” de Student o la de “U” Mann-Whitney. En todos los casos sólo se aceptarán como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad sea $\leq 5\%$.

RESULTADOS

En la imagen 1 se muestran dos fotografías representativas en la que se observa la zona donde quedó ubicada la aguja cuando se introdujo en POA-AHA izquierda y derecha.

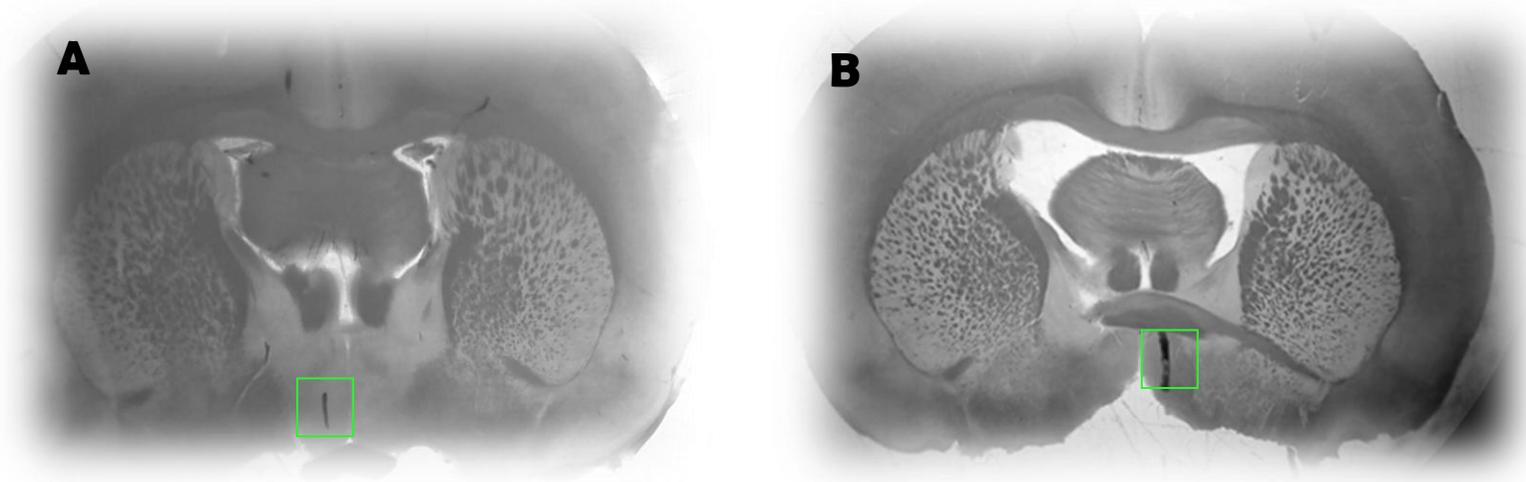
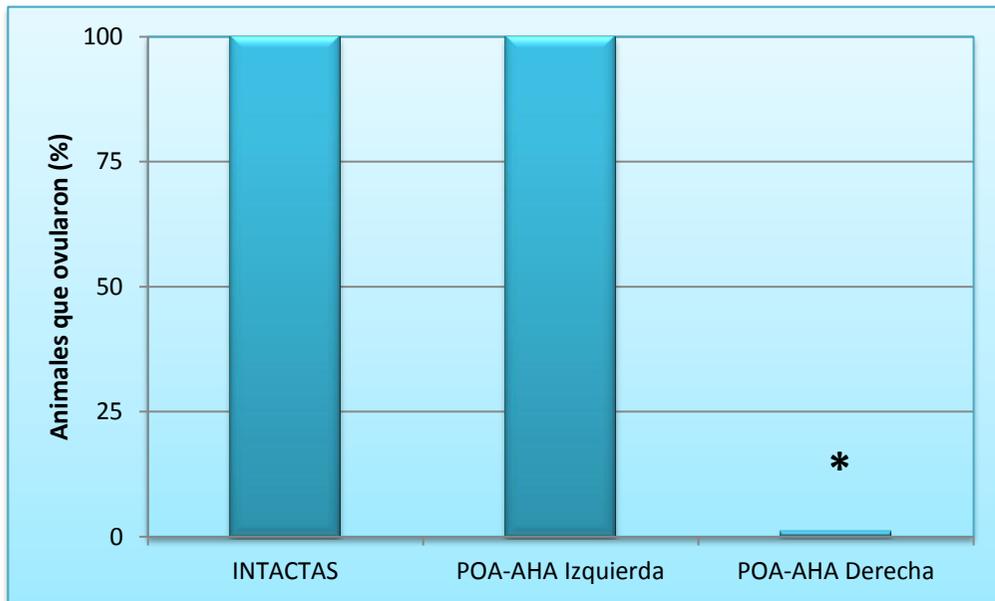


Imagen 1. Fotografías de los cortes coronales del cerebro donde se muestra la ubicación de la aguja de acero inoxidable 25G (0.50 mm x 13mm) en POA-AHA izquierda (A) o derecha (B). Fotografías tomadas a 1.5 x 0.80 aumentos.

EFFECTOS DE LA INTRODUCCIÓN DE LA AGUJA EN POA-AHA IZQUIERDA O DERECHA A LAS 09:00 H DEL ESTRO.



*Figura 1. Efecto de la introducción de la agua en POA-AHA izquierda o derecha a las 09:00 horas del estro, en el porcentaje de animales que ovularon en la mañana del estro esperado. * $p < 0.05$ vs. ratas intactas (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).*

La introducción de la aguja en POA-AHA izquierda no modificó el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado. En cambio, cuando se realizó en POA-AHA derecha ningún animal ovuló (Figura 1).

El peso de los ovarios (izquierdo o derecho), de la masa ovárica (Σ peso del ovario izquierdo + peso del ovario derecho) (Tabla 1) y del útero (POA-AHA izquierda: 186.2 ± 16.9 mg/Kg peso corporal; POA-AHA derecha: 157 ± 7.3 vs. 163 ± 9.4 mg/Kg peso) no fue modificado por la introducción de la aguja en POA-AHA izquierda o derecha.

Tabla 1. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo, derecho y de la masa ovárica de ratas a las que se les introdujo la aguja en POA-AHA izquierda o derecha a las 09:00 horas del estro y sacrificadas al estro esperado.

	PESO DEL OVARIO IZQUIERDO (mg/100 g de peso corporal)	PESO DEL OVARIO DERECHO (mg/100 g de peso corporal)	MASA OVÁRICA (mg/100 g de peso corporal)
INTACTAS	20.7 \pm 1.2	19.9 \pm 1.0	40.6 \pm 2.1
POA-AHA IZQUIERDA	22.5 \pm 2.0	19.6 \pm 1.2	42.1 \pm 2.3
POA-AHA DERECHA	20.6 \pm 1.3	19.9 \pm 1.3	40.5 \pm 2.5

Cuando otro grupo de animales con introducción de la aguja en POA-AHA derecha en el día del estro, fue sacrificado al estro vaginal, todos ellos ovularon (9/9 vs. 9/9). La presencia de estro vaginal ocurrió en todos los animales, 24 h después del estro esperado, pero el número de ovocitos liberados por el ovario derecho disminuyó (Figura 2).

En este grupo de animales el peso del ovario izquierdo disminuyó con respecto al intacto, lo que se reflejó en la masa ovárica (Tabla 2). El peso del útero no fue modificado con respecto al grupo de animales intactos (174.6 \pm 6.2 mg/kg peso vs. 163.8 \pm 3.1 mg/kg peso, ns).

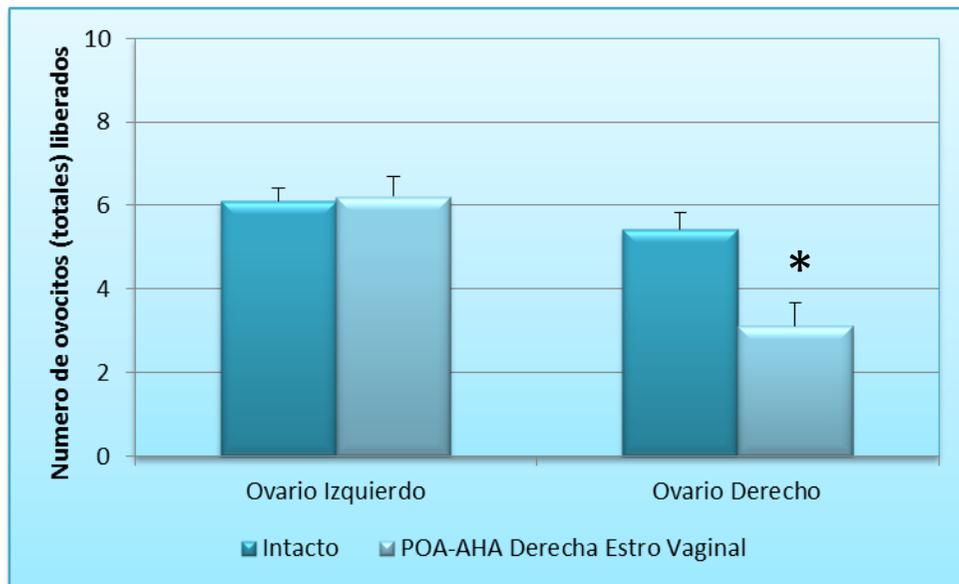


Figura 2. Efecto de la introducción de la aguja en POA-AHA derecha a las 9:00 horas del estro sobre el número total de ovocitos liberados en la mañana del estro vaginal. * $p < 0.05$ vs. ratas intactas (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de "U" de Mann-Withney).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo, derecho y de la masa ovárica de ratas a las que se les introdujo la aguja en POA-AHA derecha a las 09:00 horas del estro y sacrificadas al estro vaginal * $p \leq 0.05$ Análisis ANDEVA

	PESO DEL OVARIO IZQUIERDO (mg/100 g de peso corporal)	PESO DEL OVARIO DERECHO (mg/100 g de peso corporal)	MASA OVÁRICA (mg/100 g de peso corporal)
INTACTAS	20.7 \pm 1.2	19.9 \pm 1.0	40.6 \pm 2.1
POA-AHA DERECHA	15.0 \pm 1.2 *	18.0 \pm 1.4	33.0 \pm 2.4 *

EFFECTOS DEL REEMPLAZO DE LA SEÑAL HIPOTALÁMICA, HIPOFISARIA Y OVÁRICA EN RATAS CON INTRODUCCIÓN DE LA AGUJA A LAS 09:00 h DEL ESTRO.

La inyección de LHRH sintética (señal hipotalámica) a ratas con introducción de la aguja a las 09:00 h del estro indujo la ovulación en todos los animales tratados; este mismo efecto se observó cuando se inyectó hCG (señal hipofisaria). En cambio, la inyección de benzoato de estradiol (señal ovárica) no indujo la ovulación (Figura 3).



*Figura 3. Porcentaje de animales que ovularon como resultado de la inyección de LHRH, hCG y BE a ratas con introducción de una aguja en POA-AHA derecha a las 9:00 h del estro. * $p < 0.05$ vs. ratas intactas (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).*

EFFECTOS DE LA INTRODUCCIÓN DE LA AGUJA EN EL TRACTO CORTICO-HIPOTALÁMICO MEDIAL Y LA ESTRÍA TERMINAL PARTE HIPOTALÁMICA, A LAS 09:00 H DEL ESTRO.

Cuando la aguja se introdujo hasta el límite dorsal de POA-AHA izquierda (LSI) ó derecha (LSD) (Imagen No. 2), es decir hasta el tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica (coordinada vertical 0.76mm a descender desde el punto de Bregma), todos los animales ovularon (izquierda: 9/9; derecha: 9/9 vs. intactos: 9/9). El número de ovocitos liberados disminuyó en los animales con LSD (Figura 4). Ninguno de los tratamientos modificó el peso de los ovarios ni la masa ovárica (Tabla 3). Introducir la aguja hasta el LSI incrementó el peso del útero (223.3 ± 10.6 vs. 163.8 ± 3.1 , mg/Kg peso $p < 0.05$), lo que no sucedió al introducir la aguja en LSD (187.3 ± 10.7 vs. 163.8 ± 3.1 mg/kg peso, ns).

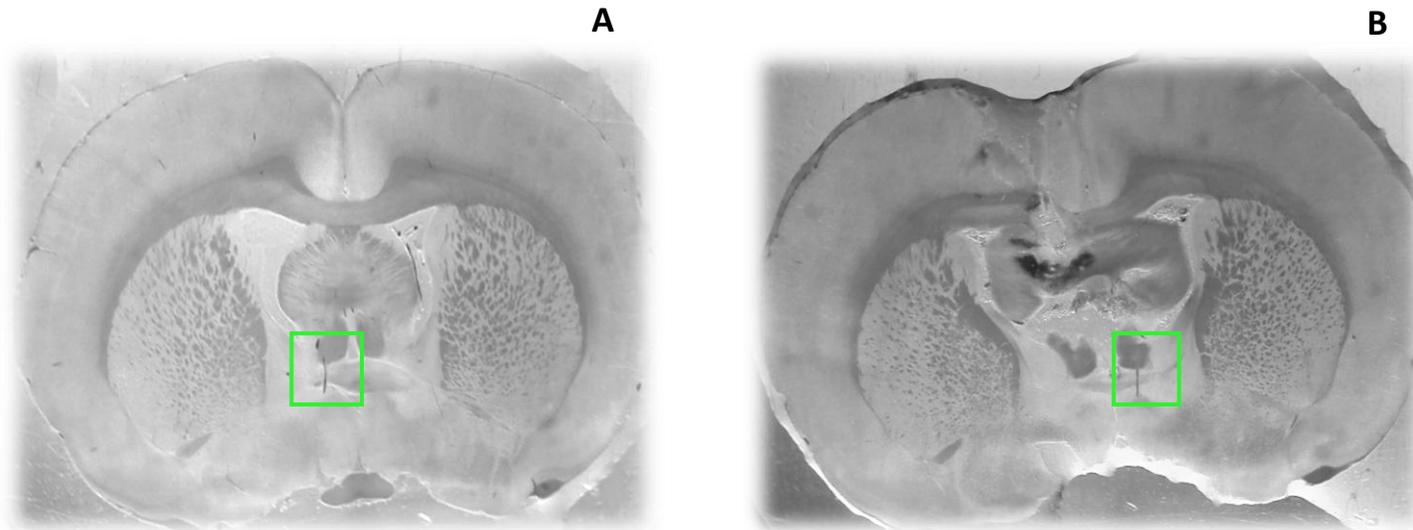


Imagen 2. Fotografía que muestra el área donde se ubicó la aguja (A) en el límite superior de POA-AHA derecha o izquierda (B). Tomada a 1.5 x .80 aumentos.

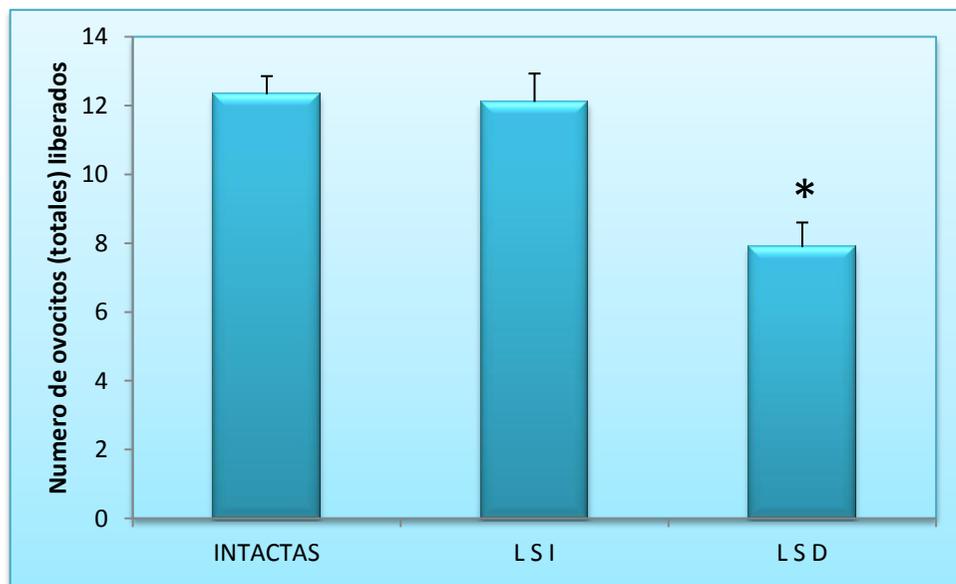


Figura 4. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados en animales con inserción de la aguja en el límite dorsal de POA-AHA lado izquierda (LSI) o derecha (LSD) (tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica) en el estro, sacrificados en el día del estro esperado.
 * $p < 0.05$ vs. ratas intactas (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de "U" de Mann-Withney).

Tabla 3. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo, derecho y de la masa ovárica de ratas a las que se les introdujo la aguja en el límite superior de POA-AHA izquierda o derecha (tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica) a las 09:00 horas del estro y sacrificados al estro esperado. * $p \leq 0.05$ Análisis ANDEVA

	PESO DE OVARIO IZQUIERDO (mg/100 g de peso corporal)	PESO DEL OVARIO DERECHO (mg/100 g de peso corporal)	MASA OVARICA (mg/100 g de peso corporal)
INTACTAS	20.7 \pm 1.2	19.9 \pm 1.0	40.6 \pm 2.1
LSI	21.6 \pm 2.0	19.7 \pm 0.7	41.3 \pm 2.0
LSD	20.2 \pm 1.0	18.5 \pm 0.6	38.7 \pm 1.0

EFFECTO DE LA INTRODUCCIÓN DE LA AGUJA EN POA-AHA IZQUIERDA O DERECHA A LAS 09:00 H DEL DIESTRO-1.

En la imagen 3 se muestran dos fotografías de cortes coronales representativos en el que se ubica el sitio de la aguja en POA-AHA izquierda o derecha en ratas que fueron integradas en el estudio. En el día del diestro-1, la introducción de la aguja en POA-AHA bloqueó la ovulación en la mañana del estro esperado (Figura 5).

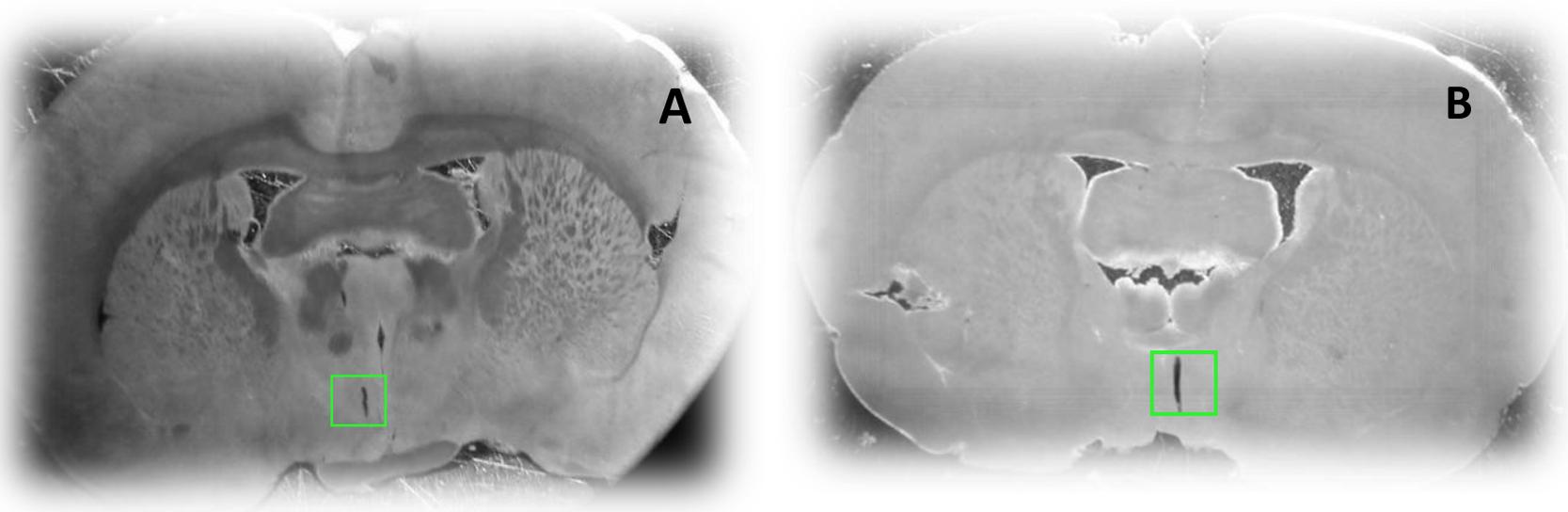


Imagen 3. Fotografías de los cortes coronales de cerebro de ratas donde se muestra la zona donde quedo ubicada la aguja en POA-AHA izquierda (A) o derecha (B). Fotografías tomadas a 1.5 x 0.80 aumentos.

El peso de los ovarios y la masa ovárica no se modificaron en los animales con introducción de la aguja en POA-AHA izquierda o derecha en el diestro-1 (Tabla 4).

El peso del útero aumentó en los animales a los que se le introdujo la aguja en POA-AHA izquierda o derecha en Diestro-1 por ambos tratamientos (POA-AHA izquierda: 255.97 ± 11 vs. 163.82 ± 3.13 mg/kg peso; POA-AHA derecha: 273.21 ± 21 vs. 163.82 ± 3.13 mg/kg peso, $p < 0.05$).

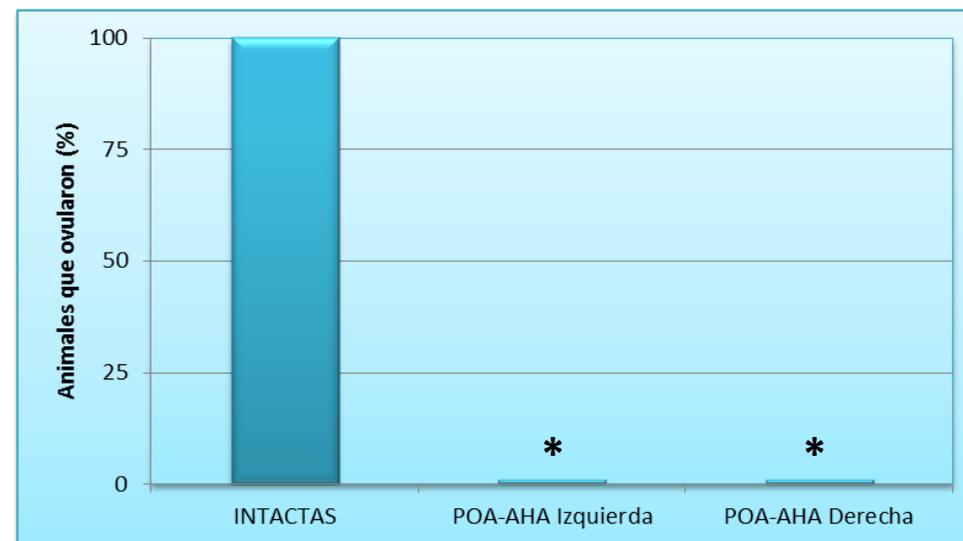


Figura 5. Efecto de la introducción de la aguja en POA-AHA izquierda o derecha a las 9:00 del diestro-1, sobre el porcentaje de animales que ovularon en la mañana del estro esperado.

* $p < 0.05$ vs. ratas intactas (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).

Tabla 4. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo, derecho y de la masa ovárica de ratas a las que se les introdujo la agua en POA-AHA izquierda o derecha a las 09:00 horas del diestro-1 sacrificadas al estro esperado.

	PESO DEL OVARIO IZQUIERDO (mg/100 g de peso corporal)	PESO DEL OVARIO DERECHO (mg/100 g de peso corporal)	MASA OVARICA (mg/100 g de peso corporal)
INTACTAS	20.7 ± 1.2	19.9 ± 1.0	40.6 ± 2.1
POA-AHA IZQUIERDA	25.8 ± 1.6	18.3 ± 1.1	44.1 ± 2.3
POA-AHA DERECHA	20.3 ± 0.6	16.3 ± 1.1	36.6 ± 1.2

Cuando los animales fueron sacrificados al estro vaginal, 24 horas después del estro esperado, todos los animales ovularon, pero el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y el derecho disminuyó (Figura 5 y 6). El peso de los ovarios y la masa ovárica no se modificó (Tabla 5), pero el peso del útero aumentó (POA-AHA izquierda: 212.94 ± 5.01 vs. 163.98 ± 4.02 mg/kg peso; POA-AHA derecha: 201.34 ± 3.9 vs. 163.98 ± 4.02 mg/kg peso, $p < 0.05$).

Tabla 5. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo, derecho y de la masa ovárica de ratas a las que se les introdujo la agua en POA-AHA izquierda o derecha a las 09:00 horas del diestro-1 sacrificadas al estro vaginal.

	PESO DEL OVARIO IZQUIERDO (mg/100 g de peso corporal)	PESO DEL OVARIO DERECHO (mg/100 g de peso corporal)	MASA OVARICA (mg/100 g de peso corporal)
INTACTAS	20.0 ± 1.4	19.5 ± 1.1	39.6 ± 2.4
POA-AHA IZQUIERDA	20.6 ± 0.5	20.5 ± 0.7	41.1 ± 1.2
POA-AHA DERECHA	19.3 ± 0.7	19.1 ± 0.5	38.3 ± 0.7

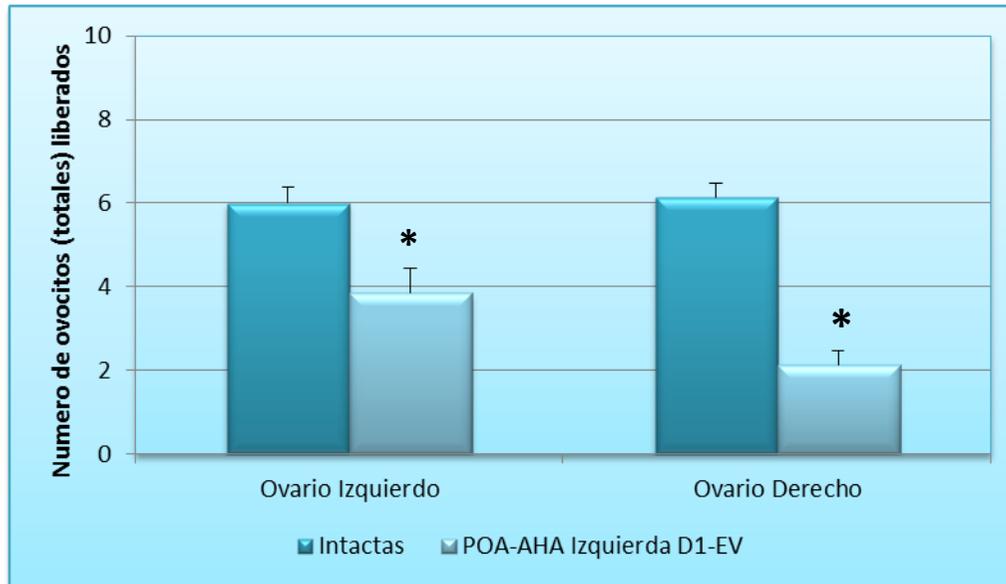


Figura 6. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados en animales con inserción de la aguja en **POA-AHA izquierda** a las 09:00 h del diestro-1, sacrificados en el día del estro vaginal.

* $p < 0.05$ vs. intactas (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de "U" de Mann-Withney).

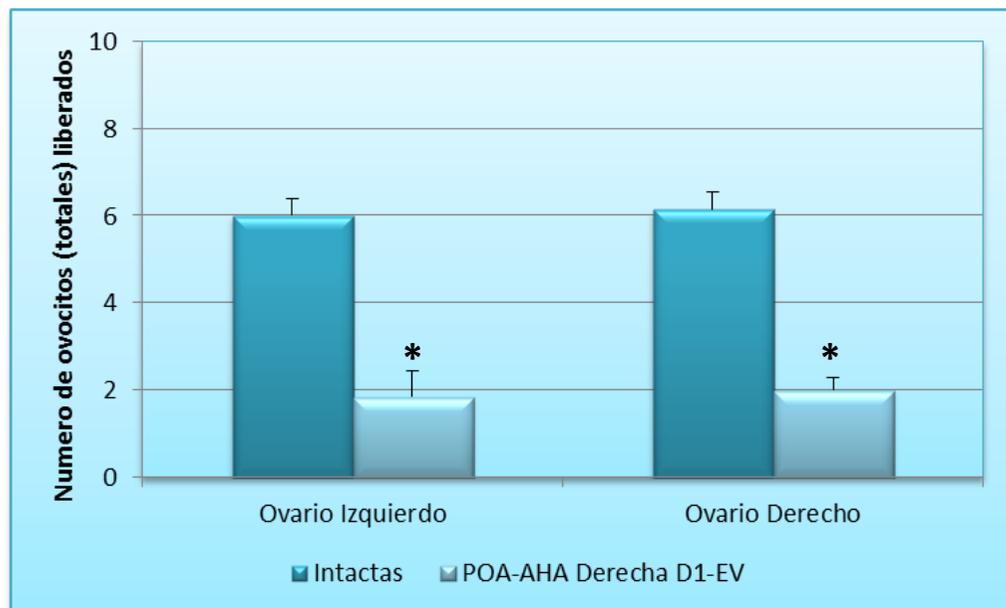


Figura 7. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados en animales con inserción de la aguja en **POA-AHA derecha** a las 09:00 h del diestro-1, sacrificados en el día del estro vaginal.

* $p < 0.05$ vs. intactas (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de "U" de Mann-Withney).

EFFECTOS DEL REEMPLAZO DE LA SEÑAL HIPOTALÁMICA, HIPOFISARIA Y OVÁRICA EN RATAS CON INTRODUCCIÓN DE LA AGUJA A LAS 09:00 h DEL DIESTRO-1.

La inyección de LHRH (señal hipotalámica) a ratas con aguja en POA-AHA izquierda indujo la ovulación en el 66% de los animales tratados, mientras que en POA-AHA derecha solo el 33% lo hicieron. La inyección de hCG (señal hipofisaria) en ratas con aguja en POA-AHA izquierda indujo la ovulación en el 76% de los animales tratados, mientras que en POA-AHA derecha todas lo hicieron. En cambio, la inyección de benzoato de estradiol (señal ovárica) solo indujo la ovulación en un 20% (Figura 8).

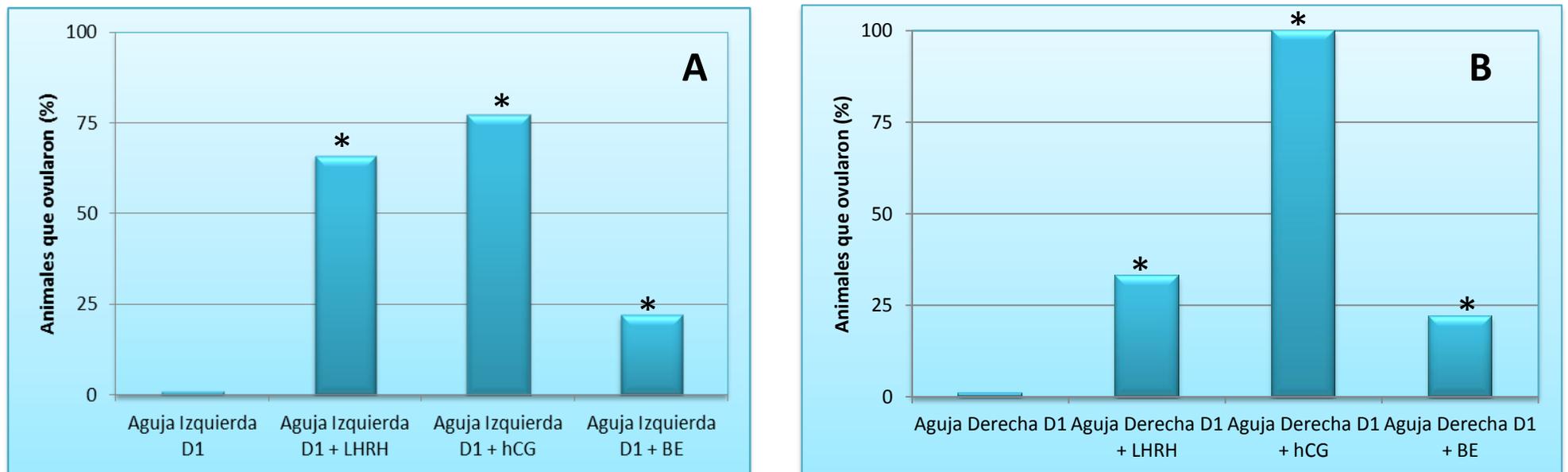


Figura 8. Porcentaje de animales que ovularon como resultado de la administración de LHRH, hCG o BE después de la inserción de una aguja en POA-AHA izquierda (A) o derecha (B), a las 09:00 h del diestro-1. * $p < 0.05$ vs. ratas intactas (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).



EFFECTOS DE LA INTRODUCCIÓN DE LA AGUJA EN EL LÍMITE DORSAL DE POA-AHA (TRACTO CORTICO-HIPOTALÁMICO MEDIAL Y LA ESTRÍA TERMINAL PARTE HIPOTALÁMICA) A LAS 09:00 H DEL DIESTRO-1.

En la imagen 4 se muestran dos fotografías de cortes coronales representativos en el que se ubica el sitio de la aguja en el límite superior de POA-AHA izquierda o derecha, es decir en tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica. En esta fase del ciclo, la introducción de la aguja no bloqueó la ovulación en la mañana del estro esperado (Figura 9).

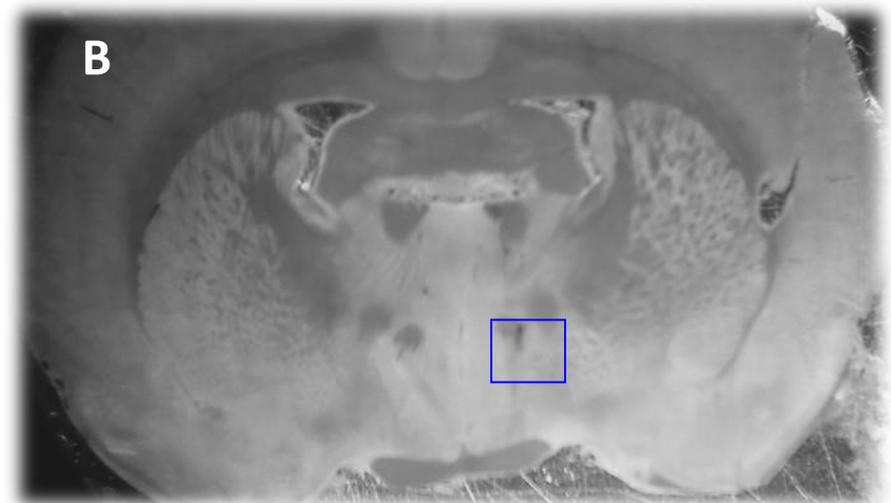
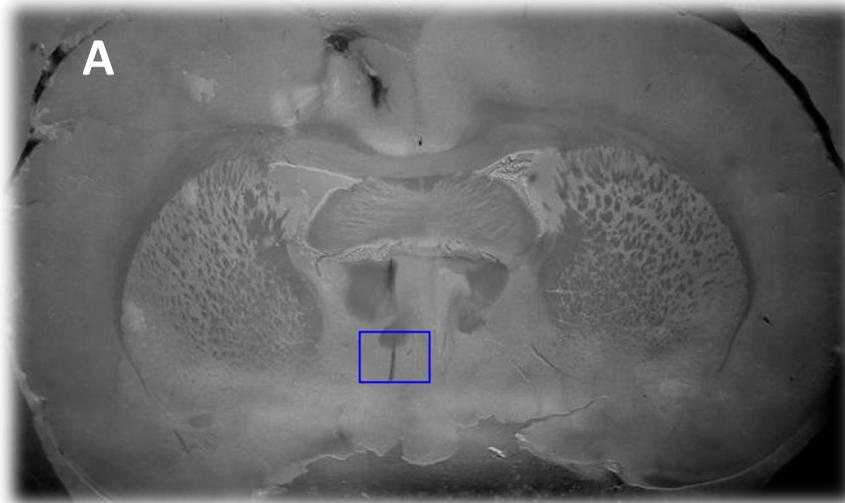


Imagen 4. Fotografías de los cortes coronales de ratas donde se muestra la zona donde quedo ubicada la aguja de acero inoxidable 29G (0.5 mm x 16mm) en el límite superior de POA-AHA izquierda (A) o derecha (B). Fotografías tomadas a 1.5 x 0.80 aumentos.

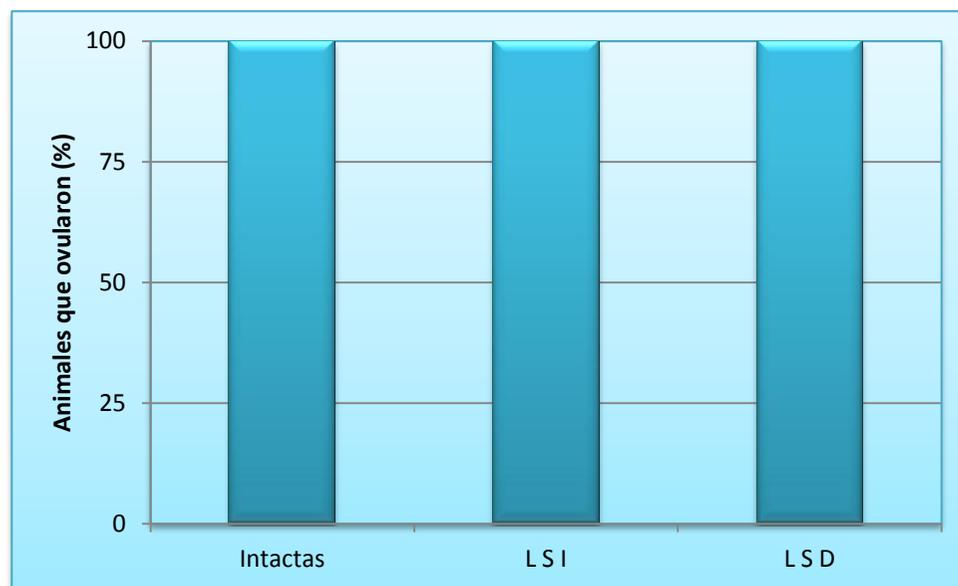


Figura 9. Efecto de la introducción de la aguja en el límite superior de POA-AHA izquierda (LSI) o derecha (LSD) (tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica), sobre el porcentaje de animales que ovularon en la mañana del estro esperado.

El peso de los ovarios y la masa ovarica (peso del ovario izquierdo + peso del ovario derecho) no se modificaron (Tabla 6), el número de ovocitos liberados no se modificó con respecto al intacto, pero introducir la aguja en el límite superior dorsal de POA-AHA izquierda incrementó el peso del útero (223.25 ± 10.25 vs. 163.82 ± 3.13 mg/kg peso, $p < 0.05$), efecto que no ocurrió al introducir la aguja en el límite superior dorsal de POA-AHA derecha (187.32 ± 10.2 vs. 163.82 ± 3.13 mg/kg peso).

Tabla 6. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo, derecho y de la masa ovárica de ratas a las que se les introdujo una aguja hasta el límite superior de POA-AHA izquierda o derecha (tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica) a las 09:00 horas del diestro-1, sacrificadas al estro esperado.

	PESO DEL OVARIO IZQUIERDO (mg/100 g de peso corporal)	PESO DEL OVARIO DERECHO (mg/100 g de peso corporal)	MASA OVARICA (mg/100 g de peso corporal)
INTACTAS	20.7 \pm 1.2	19.4 \pm 1.0	40.6 \pm 2.1
LSI	19.6 \pm 0.6	19.2 \pm 0.9	38.8 \pm 0.9
LSD	15.7 \pm 1.7	16.3 \pm 1.2	35.2 \pm 1.8

Finalmente, en la Imagen 5 se muestra de derecha a izquierda (sentido antero-posterior) tres cortes representativos de POA-AHA (A) y otro de estructuras cerebrales e hipotalámicas posteriores a la zona de estudio (B). Los triángulos en rojo indican la ubicación errónea de la aguja en ratas que fueron descartadas del estudio. En estos animales la ovulación ocurrió en el día del estro esperado, y no se observaron diferencias significativas ni en el número de ovocitos totales liberados (11.22 \pm 0.27 vs. 12.33 \pm 0.52 mg/kg peso), ni en el peso de los ovarios (OI: 18.9 \pm 1.33mg/Kg peso vs. 20.71 \pm 1.22 mg/Kg peso; OD: 19.54 \pm 0.64 mg/Kg peso vs. 19.91 \pm 0.96 mg/Kg peso, ns) y del útero (166.68 \pm 6.45 mg/Kg peso vs. 163.82 \pm 3.13 mg/Kg peso, ns).

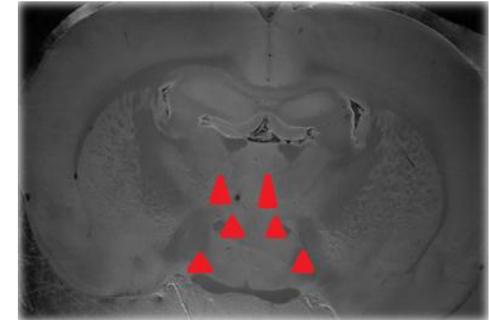
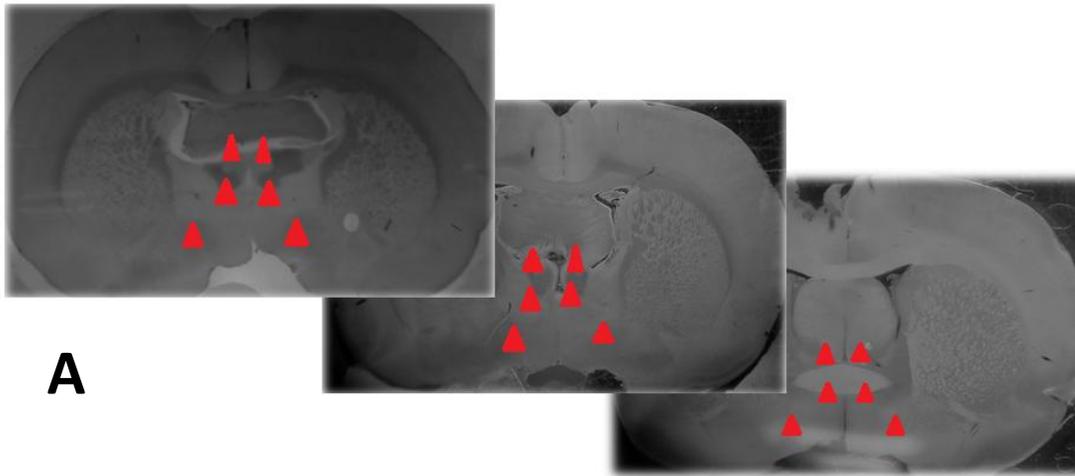


Imagen 5. Fotografías de cortes coronales del cerebro donde se muestran la ubicación de la aguja en zonas externas al área de estudio. De derecha a izquierda (A) cortes antero-posteriores y (B) un corte posterior al área de estudio. Los triángulos rojos indican las zonas del cerebro donde se ubicó la aguja.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

La respuesta asimétrica entre POA-AHA izquierda y derecha (medida por la ausencia de la ovulación) en el día del estro y simétrica en diestro-1 no es resultado de afectar zonas o seccionar el tracto cortico-hipotalámico medial estría terminal parte intermedia, sino de una respuesta fisiológica a la lesión provocada en POA-AHA por introducir la aguja y mantenerla allí durante un minuto.

En la fase del *estro*, la ovulación espontánea de la rata depende de la integración morfológica y funcional de POA-AHA derecha, ya que cuando a los animales se les introdujo la aguja en POA-AHA derecha ninguno de ellos ovuló en el día del estro esperado. En cambio, cuando a los animales se les introdujo la aguja en POA-AHA izquierda (estando integra la porción derecha) todos ovulan en tiempo y un número normal de ovocitos. Esta respuesta asimétrica de POA-AHA depende de diferencias morfológicas y bioquímicas que conducen a reconocer dos estructuras que fisiológicamente son diferentes. En el cerebro del ratón, la cantidad de neuronas ir-GnRH es mayor en el hipotálamo derecho que en el izquierdo (Inase y Machida, 1992). La cantidad de GnRH en el HMB derecho es el doble que en el izquierdo (Gerendai y col., 1978). A las 13:00 h del diestro-2, la expresión del ARNm para la GnRH es mayor en POA-AHA derecha que en la porción izquierda (Arteaga-López y col, 2003). A las 17:00 h del estro, la expresión del ARNm del $RE\alpha$ es mayor en POA-AHA derecha que en la izquierda (Arteaga-López y col, 2003). La concentración de acetilcolina a las 13:00 h del diestro-1 y del proestro es mayor en POA-AHA derecha que en izquierda (Cruz y col, 1997).

Además de estas diferencias morfológicas y bioquímicas, el hipotálamo anterior responde de manera asimétrica a las hormonas esteroides. En ratas hembras de cinco días de vida, el implante de estradiol en POA o en el núcleo ventromedial derecho, provoca masculinización cuando las hembras llegan a la edad adulta (estas hembras prefieren sexualmente a otras hembras). En cambio, cuando el estradiol se implanta en las estructuras izquierda, ocurre defeminización, los animales no tienen ciclos estrales (Norden y Yahr, 1982).

Cuando el hipotálamo anterior es expuesto a situaciones extremas, las funciones del ovario son afectadas de manera asimétrica. En la rata ovariectomizada unilateralmente, la lesión de AHA derecha previene la hipertrofia compensadora del ovario remanente, en tanto que la lesión en la porción izquierda no la modifica (Fukuda y col. 1984). La lesión unilateral de esta misma área del hipotálamo con ácido kainico, bloquea la hipertrofia compensadora solo si la lesión y la ovariectomía unilateral se hacen del mismo lado (Nance y col. 1982 y 1984).

Con base en esta información y la obtenida en la presente tesis llegamos a la conclusión que en el día del estro es indispensable que POA-AHA derecha se mantenga íntegra para que la rata ovule en el día del estro esperado.

Mantener la aguja durante un minuto dentro de POA-AHA derecha genera cambios bioquímicos y quizá cito-arquitectónicos que en esa hora y día del ciclo estral son fundamentales para que la secreción de GnRH ocurra en el tiempo y la forma que garantiza la ovulación de la rata. El acero inoxidable de la aguja introducida en POA-AHA es una aleación de acero con un mínimo de 10 % de cromo, molibdeno o el níquel (Steel Glossary). Una de las posibles explicaciones a la falta de ovulación por la inserción de la aguja implica que al poseer el cromo una gran afinidad por el oxígeno genere alteraciones en el metabolismo celular de la red neuronal GnRHérgica. Además, no debemos olvidar que la inserción de la aguja involucra ruptura de capilares que desencadenan la secreción de sustancias vasoactivas (histamina, serotonina) que regulan la secreción de GnRH (Herbison, 2006) y de células sanguíneas como macrófagos, leucocitos y glóbulos rojos que generan irritación o estrés en la zona afectada. Entre las sustancias que se liberan están la citocinas (interleucina-1 β , factor de necrosis tumoral [TNF], interferón gama, etc) que pueden actuar directamente sobre la neurona GnRH ó a través de la liberación de intermediarios como prostaglandinas, óxido nítrico, neuropéptidos o neurotransmisores que regulan la secreción de la GnRH (Wu y Wolfe, 2012). Si consideramos que estas reacciones pueden desencadenarse en la porción izquierda y en la derecha de POA-AHA, ¿por qué entonces en POA-AHA derecha se bloquea la ovulación y en la izquierda no? Lo que nos lleva a concluir que una y otra POA-AHA son zonas heterogéneas que funcionan y responden de manera diferente.

El hecho que la ovulación se retrase 24 horas en los animales con aguja en POA-AHA derecha implica que el marcapaso de la secreción de GnRH fue enlentecido o detenido por el mismo tiempo. Se ha sugerido que terminales eferentes específicas del núcleo supra-quiasmático lleven la señal de salida que regula la secreción de LH, mediante una vía directa, predominantemente ipsilateral que proyecta a las neuronas GnRH de POA (de la Iglesia y col., 1995, van der Beek y col., 1997). La suma de todos estos posibles cambios ocurridos en los animales con aguja en POA-AHA derecha condujo al bloqueo de la secreción preovulatoria de GnRH en el día del proestro esperado. Esta idea es apoyada por el hecho que al inyectar la LHRH sintética (reemplazo de la señal hipotalámica) o de hCG (reemplazo de la señal hipofisaria) a las 14:00 h del proestro esperado, los animales ovularon y liberaron una cuota normal de ovocitos.

El retraso en la ovulación en los animales con aguja en POA-AHA derecha se acompañó de la disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario derecho y del peso del ovario izquierdo. Si consideramos que el peso del ovario cambia durante el ciclo estral (Domínguez-González y col, 1998), y de que una de las razones es el crecimiento progresivo de los folículos, sugerimos que no sólo se afectó

la secreción fásica de la GnRH, sino también la secreción tónica. Esta alteración provocó modificaciones en la concentración de FSH y LH que resultó en el enlentecimiento del crecimiento de los folículos (Rajkovic y col, 2006). Lo que sí es un hecho es que cada ovario respondió de manera diferente a los cambios en la secreción de gonadotropinas.

Aparentemente la secreción de estradiol no fue alterada, ya que la administración de benzoato de estradiol a las 14:00 h del diestro-2 esperado en las ratas con aguja en POA-AHA derecha no indujo la ovulación, lo que significa que estradiol había en sangre en concentraciones suficientes para estimular la secreción de GnRH, LH y la ovulación.

Dado que en el día del estro la inserción de la aguja por encima de POA-AHA izquierda o derecha, es decir, en el tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica, no se modificó la ovulación espontánea en el día del estro esperado, nos permite sugerir que las estructuras cerebrales o las vías neurales que transcurren dorsalmente al área de estudio no participan en los mecanismos que regulan la secreción de GnRH, LH y la ovulación. Sin embargo, el hecho que disminuyera el número de ovocitos en los animales con introducción de la aguja en el límite dorsal de POA-AHA derecha sugiere que la sección de esas vías eferentes participa en la respuesta de los folículos a las gonadotropinas, es decir que regulan el crecimiento folicular. Es posible que la vía de conexión propuesta por (Tóth y col 2007) entre el ovario y el sistema nervioso central esté involucrada en esta respuesta.

Con base en los resultados obtenidos sugerimos que las estructuras y vías dorsales a POA-AHA como el tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica están involucradas en regulación de la respuesta del útero a las hormonas esteroides. El útero ha sido considerado como un indicador de la secreción de estradiol; luego entonces es posible que las estructuras y vías dorsales al límite superior de POA-AHA izquierda regulen la secreción de hormonas esteroides y no las localizadas del lado derecho. Sin embargo, para comprobar esta idea sería necesario cuantificar progesterona y estradiol en las horas subsecuentes a la introducción de la aguja.

En la fase del **diestro-1** es necesario que ambas POA-AHA se mantengan íntegras para que el animal ovule en el día del estro esperado, ya que la inserción de la aguja en una u otra comprometió la ovulación. La respuesta de las células del complejo GnRHérgico, es decir de terminales nerviosas, glía y neuronas secretoras de diferentes moléculas transmisoras y de GnRH, es semejante a la de los animales tratados en POA-AHA derecha en diestro-1. La única y muy importante diferencia es que en diestro-1, el peso del útero aumentó en la mañana del estro esperado. Este evento era de esperarse cuando consideramos que el endometrio es el principal órgano blanco de las hormonas esteroides (Queenan, 2007), y dado que en estos grupos experimentales la ovulación se retrasó 24 horas, luego entonces, la mañana del estro esperado

correspondió al proestro esperado. Hay que recordar que en la mañana del proestro, el peso del útero aumenta como resultado del efecto mitogénico y angiogénico de los estrógenos sobre el epitelio del útero (Queeman, 2007), así como de la presencia de líquido en la luz del tubo uterino (Freeman, 2006).

Resultados muy parecidos a los observados al introducir la aguja en estro en POA-AHA derecha se observaron en los animales tratados en POA-AHA izquierda o en POA-AHA derecha en el diestro-1, por lo que sugerimos que los mecanismos neurales que se llevan a cabo en estro y diestro-1 se mantienen en estas dos fases del ciclo. La única diferencia es que en estro la ovulación depende de la función neuroendocrina de POA-AHA derecha, mientras que en diestro-1 se requiere del concierto funcional de ambas. Este hecho es respaldado al observar que el reemplazo de las diferentes señales endócrinas, en los grupos con aguja en POA-AHA izquierda o derecha, no indujeron en todos los animales la ovulación.

El aumento del peso del útero en los animales a los que se les introdujo la aguja en el límite superior a POA-AHA izquierda, es decir en el tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica podría estar relacionado con un efecto inhibitorio de la secreción de progesterona que resultó en la falta de pérdida del líquido de la luz del útero. Una explicación a este resultado asimétrico entre la sección y daño de estas estructuras dorsales a POA-AHA izquierda con respecto a la derecha estaría relacionada con modificaciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, lo que implicaría una conexión en corto entre POA-AHA y el núcleo paraventricular (en el cual se ubican neuronas que secretan el TRH) por medio del tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica (Brown, 1994).

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal es regulado de manera asimétrica por el hipocampo (Madsen y col, 2012, Knoops y col, 2010), lo que implica que al introducir la aguja hasta el límite superior de POA-AHA izquierda se seccionaron vías que conectan esta zona frontal del cerebro con el hipocampo. En el humano, se una correlación inversa entre el volumen del hipocampo y la concentración de cortisol (Mondelli y col, 2010) y de ACTH (Knoops y col, 2010). En cerdos, altas concentraciones de cortisol se asociaron con disminución en el volumen y el número de neuronas en giro dentado izquierdo, pero no en el derecho (van der Beek y col, 2004).

Es posible que el tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica lado izquierdo regulen de manera estimulante al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, mediante su conexión con el hipocampo y el giro dentado, lo que provocó aumento en la secreción de ACTH, cortisol y progesterona.

CONCLUSIONES

- ➔ La respuesta ovulatoria asimétrica entre POA-AHA izquierda y derecha en el día del **estro** y simétrica en **diestro-1** no es resultado de afectar zonas o seccionar vías nerviosas dorsales a ella como el tracto cortico-hipotalámico medial y la estría terminal parte hipotalámica, sino de una respuesta fisiológica a la lesión provocada en POA-AHA por introducir la aguja y mantenerla allí durante un minuto.
- ➔ La lesión provocada por la aguja en POA-AHA bloquea la secreción fásica de GnRH y LH.
- ➔ En el día del **estro** es indispensable que POA-AHA derecha se mantenga íntegra para que la rata ovule en el día del estro esperado. En cambio, en **diestro-1** es necesario que ambas POA-AHA se mantengan íntegras.
- ➔ En el día del **estro** introducir la aguja hasta el límite superior de POA-AHA derecha reduce el número de ovocitos liberados. Mientras que introducir la aguja hasta el límite superior de POA-AHA izquierda incrementa el peso del útero.
- ➔ En **diestro-1** introducir la aguja en ó hasta el límite superior de POA-AHA izquierda aumenta el peso del útero.
- ➔ En el día del **estro** introducir la aguja en POA-AHA derecha ó en ambas en el día del **diestro-1** retrasa por 24 horas los mecanismos que regulan la secreción de GnRH.

REFERENCIAS

- Arce MV**, Catalina P, Mallo F. (2006). "Actualizaciones en endocrinología de la reproducción" En: Endocrinología. Capítulo 18 (Manuel Tena-Sempere) Santiago de Compostela: Universidade, Servizo de Publicaciones e Intercambio Científico; Vigo, pp: 137-143.
- Arimura A.** (2000). Hipotalamic Hormones. En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Editores P. Michel Conn y Marc E. Freeman. Part 1, Cap 3. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. pp: 41-58.
- Brown RE.** (1994). The pituitary gland and its hormones En: Introduction to neuroendocrinology. Cambridge University Press, USA pp: 30-39.
- Crosby EC**, y Woodburne, R. T. (1966). The comparative anatomy of the preoptic area and the hypothalamus. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis 20, pp: 52-169.
- Crosby EC**, y Showers, M.J.C. (1969). Comparative anatomy of the preoptic and hypothalamic areas. In the Hypothalamus (W. Haymaker, E. Anderson, and W.J.H. Nauta, Eds.), Charles C Thomas, Springfield,IL; pp:61.
- Cruz ME**, Rodríguez D, Olvera E, Flores A, Galindo JL, Vázquez M, Domínguez R. (2009). Asymmetric effects of unilateral section of dorsal POA-AHA on spontaneous ovulation. Program No. 81.18/CC11. 39th Meeting of Society for Neuroscience. Chicago Illinois, pp: 17-21.
- de la Iglesia HO**, 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. J Neurosci 23: pp: 7412-4.
- Domínguez-González A**, Cruz ME, Domínguez R. (1998). Effects of hemiovariectomy and unilateral mechanical stimulation of the rat ovarian pedicle on ovulation rate and monoamine neural activity in the preoptic-anterior hypothalamic area. Med Sci Res 26: pp: 545-547.
- Domínguez R**, Cabrera E, Cárdenas M, Flores A, Cruz ME. (2011). Differential effects of the section of dorsal connections to the anterior hypothalamus on FSH and LH surge secretion. 8th WORLD CONGRESS OF IBRO. CONVENTION CENTER. FIRENZE. ITALY.

Dyer RG. (1973) An electrophysiological dissection of the hypothalamic regions which regulate the pre-ovulatory secretion of luteinizing hormone in the rat. *J Physiol (lond)* 234: pp: 421-442.

Fink G. (2000). Neuroendocrine regulation of pituitary function. En: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Totowa N.J.: Humana Press Inc; 2000. pp: 107-133.

Freeman ME. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition*. Editores Jimmy D. Neill, Elsevier, 3ed. Cap 43, pp: 2327-2388.

Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: Unilateral hypothalamic lesion and compensatory ovarian hypertrophy. *Neurosci Lett*; 51: pp: 367-370.

Gann DS, Ward DG, Carlson DE (1979). Neural pathways controlling release of corticotropin (ACTH). En: Jones MJ, Guilham B, Dallman MF, Chattopadhyay S (eds) *Interaction within the brain-pituitary-adrenocortical system*. Academic Press, London New York San Francisco , pp: 75-86.

Halász B. (1969). The endocrine effects of isolation of the hypothalamus from the rest of the brain. En: Ganong WF, Martini L (eds) *Frontiers in neuroendocrinology*. Oxford Univ. Press, London, pp: 307-342.

Halász B. (1972). Hypothalamic mechanisms controlling pituitary function. *Prog Brain Res* 38: pp: 97-118.

Halász B. (1978). Control of anterior pituitary function. In: Brambilla F, Bridges PK, Endroczi E, Heuser G (eds) *Perspectives in endocrine psychobiology*. Akadémiai Kiado, Budapest, pp: 41-100.

Halász B, Gorski RA (1967). Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus. *Endocrinology* 80: pp: 608-622.

Halász B, Pupp L. (1967). Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotrophic area. *Endocrinology* 77: pp: 553-562.

Halász B, Pupp L, Uhlarik S. (1962). Hypophysiotrophic area in the hypothalamus. *J Endocrinol* 25: pp: 147-154.

Halász B. (2000). The hypothalamus as an endocrine organ: The Science of Neuroendocrinology. Editores P. Michel Conn y Marc E. Freeman. Part 1, Cap 1. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. pp: 12

Heape W. (1900). The “Sexual Season” of mammals and the relation of the “pro-oestrus” to menstruation. *Quart. J. Micr. Sci.* 44, pp: 1–70.

Hill, Wyse, Anderson. (2006). *Fisiología Animal* Ed. Panamericana, España. pp: 234-257.

Kawakami M, Kimura F, (1978). The limbic forebrain structures and reproduction. In: Brambilla F, Bridges PK, Endrőczi E, Heuser G (eds) *Perspectives in endocrine psychobiology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp: 101-156.

Kilen SD, Schwartz B. (1998). Estrous cycle. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill JD. Academic Press. U.S.A. pp: 127-136.

Knoops AJ, Gerritsen L, van der Graaf Y, Mali WP, Geerlings MI. (2010). Basal hypothalamic pituitary adrenal axis activity and hippocampal volumes: the SMART-Medea study. *Biol Psychiatry*. 67: pp: 1191-1198.

König JFR, Klippel RA. (1967). The rat brain. A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem. Williams & Wilkins Co. U.S.A. pp: 162.

Krey LC, Butler WR, Knobil E (1975). Surgical disconnection of the medial basal hypothalamus and pituitary function in the Rhesus monkey. *Endocrinology* 96: pp: 1073-1087.

López E. (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.* 28: 343-348.

Madsen KS, Jernigan TL, Iversen P, Frokjaer VG, Knudsen GM, Siebner HR, Baaré WFC. (2012). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis tonus is associated with hippocampal microstructural asymmetry. *NeuroImage* 63: pp: 95-103.

Makara GB, Palkovits M, Szentágothai J (1980a). The endocrine hypothalamus and the hormonal response to stress. In: Selye H (ed) *Selye’s guide to stress research*, Vol. I. Van Nostrand Reinhold, New York, pp: 280-337.

Makara GB, Stark E, Palkovits M (1980b) Re-evaluation of the pituitary-adrenal response to ether in rats with various cuts around the medial basal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 30: pp: 38-44.

McDonnell D. (1998). Antiestrogens. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Ernest Knobil E y Jimmy D Neill. Vol.1. Academic Press. Alabama U.S.A. pp: 231-233.

McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG. (1987). *Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain*, 2^a Ed, Book Reviews New York, pp: 186.

Mendoza-Garcés L, Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Arrieta-Cruz I, Flores A, Cruz ME. (2007). Changes in the number of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells on POA-AHA during the estrous cycle of the rat. 40th Annual Meeting of Society Study of Reproduction, San Antonio, Texas. 21-25 julio, Abst 128, pp 106

Mondelli V, Pariante CM, Navari S, Aas M, D'Albenzio A, Di Forti, M, Handley R, Hepgul N, Marques TR, Taylor H, Papadopoulos AS, Aitchison KJ, Murray RM, Dazzan P. (2010). Higher cortisol levels are associated with smaller left hippocampal volume in first-episode psychosis. *Schizophr. Res.* 119: pp: 75–78.

Nance DM, Bhargava M & Myatt GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymetry in endocrine control of the ovary. *Bain Res. Bull.* 13: pp: 651-655.

Nauta WJH, Kuypers HGJM (1958). Some ascending pathways in the brain stem reticular formation. In: Jasper HH, Proctor LD, Knighton RS, Noshay WC, Castello RT (eds) *Reticular formation of the brain*. Little, Brown, Boston, pp: 3-30.

Nauta WJH, Haymaker, W. (1969). Hypothalamic nuclei and fiber connections. In *The Hypothalamus* (W. Haymaker, E. Anderson, and W.J.H. Nauta, eds.), Charles C Thomas, Springfield,IL, pp: 136.

Norris OD. (1996). An Overview of chemical regulation: *Vertebrate Endocrinology*, 4a Ed, ELSEVIER, Cap. 1. pp: 1-29.

Page BR. (2006). *Anatomy of the Hypothalamo-Hypophysial Complex.*, Cap 27, Knobil and Neill's *Physiology of reproduction* 3ed, Elsevier pp: 1309-1357.

Palkovits M, Freeman ME, (2000). Micro and Macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Editores P. Michel Conn y Marc E. Freeman. Part 1, Cap 2. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. pp: 23-40.

Papez JW. (1940). The embryologic development of the hypothalamic area in mammals. Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. 20, pp: 31-51.

Parker A, Thibodeau GA. (2006). Fisiología y Anatomía, Decima Ed. Editorial Mc-Graw Hill, Impreso en México, pp: 440-445.

Queeman JT Jr. (2007) The menstrual cycle. En: Reproductive Endocrinology and Infertility. Vivian Lewis (ed). Capítulo 1, LANDES Bioscience, Austin, Texas, U.S.A. pp: 3-9.

Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. (2006) Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: Knobil And Neill's Physiology of Reproduction. Tercera edición, Elsevier Inc. Academic Press. St. Louis, M, USA. Cap 10, pp: 383-424.

Richard WH, Gordon A. Wise, Anderson. (2006). Fisiología Animal, Ed Medica Panamericana, España.

Rioch D., Wislocki, G., y O'Leary, J. (1940). A precis of preoptic, hypothalamic and hypophyseal terminology with atlas. Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. 20, pp: 3-30.

Sempere M. (2006). Endocrinología. Universidad de Santiago de Compostela, pp: 417

Silverman J, Pickard G. (1983). The Hypothalamus. Editorial ELSEVIER, Vol. 43, Department of Anatomy, Colombia University College of Physicians, New York, pp: 67-72.

Silverman AJ, Jhamandas, J., y Renaud, L.P. (1987). Localization of luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH) neurons that project to the median eminence. J.Neurosci, 7, pp: 2312-2319.

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

Steel Glossary. American Iron and Steel Institute [AISI]).

Swanson L, y Cowan, W.M. (1979). The connections of septal region in the rat. *J. Comp. Neurol.* 186, pp: 621-656.

Szentágothai J, Flerkó B, Mess B, Halász B. (1962). Hypothalamic control of the anterior pituitary, Akadémiai Kiadó, Budapest.

Tóth IE, Wiesel O, Boldogkoi Z, Bálint K, Tapaszi Z, Gerendai I (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. Neuromorphological and neuroendocrine research laboratory, Hungarian Academy of sciences, Department of Human Morphology and Developmental Biology, Semmelweis University, Budapest, Hungary.

Van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, Van den Hurk R, Buijs RM. (1997). Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Comp Neurol.* 384: pp: 569-79.

van der Beek EM, Wiegant VM, Schouten WG, van Eerdenburg FJ, Loijens LW, van der Plas C, Benning MA, de Vries H, de Kloet ER, Lucassen PJ. (2004). Neuronal number, volume, and apoptosis of the left dentate gyrus of chronically stressed pigs correlate negatively with basal saliva cortisol levels. *Hippocampus* 14: pp: 688–700.

Wolfe A, Wu S. (2012). Estrogen receptor- β in the gonadotropin-releasing hormone neuron. *Semin Reprod Med.* 30: pp: 23-31

Wu S, Wolfe A. (2012). Signaling of Cytokines is important in regulation of GnRH neurons. *Mol Neurobiol* 45: pp: 119-125.

Yao HH, Bahr JM, (1998). Ovary overview. *Enciclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill, San Diego, USA Academic press pp: 590-597.

Yen, Jaffe, Barbieri. (2001). *Endocrinología de la reproducción.* Editorial PANAMERICANA, 4 ed, Buenos Aires, pp: 46-48 y 99-103

Záborszky L. (1982). Afferent Connections of the Medial Basal Hypothalamus. En: *Advances in Anatomy Embriology and Cell Biology.* Vol 69. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp:107.