



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

**“PAPEL DE LOS RECEPTORES
MUSCARÍNICOS M2 DEL OVARIO
IZQUIERDO EN LA REGULACIÓN DE LA
OVULACIÓN A LO LARGO DEL CICLO
ESTRAL DE LA RATA ADULTA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

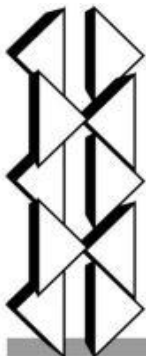
BIÓLOGA

P R E S E N T A :

SANDRA LETICIA HERNÁNDEZ AGUILAR

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN



**FES
ZARAGOZA**

**FINANCIADO POR CONACyT (Convenio 81898) y
DGAPA-PAPIIT (IN-214508)**

México, D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGÍA

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, los ha nombrado como Sinodales del Examen Profesional de la alumna:

HERNÁNDEZ AGUILAR SANDRA LETICIA

Quien presenta como trabajo recepcional: **Papel de los Receptores Muscarínicos M2 del Ovario Izquierdo en la Regulación de la Ovulación a lo largo del Ciclo Estral de la Rata Adulta.**

PRESIDENTE M. C. RAÚL ZAVALA CHAVERO
 VOCAL DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
 SECRETARIO DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
 SUPLENTE M. en IBSH ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ
 SUPLENTE BIÓL. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

[Firma manuscrita]

[Firma manuscrita]

[Firma manuscrita]

[Firma manuscrita]

[Firma manuscrita]

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarles.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 México, D. F., a 18 de abril de 2013.

[Firma manuscrita]
 DR. CARLOS CASTILLOS CRUZ.
 JEFE DE LA CARRERA



c.c.p. Departamento de Control de Escolar
 c.c.p. Interesado

“No basta saber, se debe también aplicar. No es suficiente querer, se debe también hacer”

Goethe (1749-1832) Poeta y dramaturgo alemán.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales por su tiempo y consejos:

M.C. Raúl Zavala Chavero

Dra. Leticia Morales Ledesma

M. en IBSH Angélica Flores Ramírez

Biól. María Cristina Alvarado Domínguez

Dra. María Esther Cruz Beltrán

A la universidad, la facultad y los profesores por todos los recursos que me proporcionaron en la carrera y durante la elaboración de esta tesis.

A todas las personas que creyeron en mí, que me brindaron su apoyo cuando más lo necesité y aunque yo misma creyera que no podría, ellos me ayudaron y me animaron a seguir adelante.

A mis padres porque sé que no ha sido fácil y a pesar de todo siempre han estado ahí para mí, por todo el esfuerzo que hicieron, por el apoyo que me han dado todos estos años, y porque cada uno es muy importante en mi vida. Espero que estén orgullosos de que sea su hija así como yo estoy orgullosa de que sean mis padres. Porque la vida me dio una “gran madre” (Leticia) y no solo uno sino “dos maravillosos padres” (Diógenes y René).

A mi hermano Roberto que adoro con todo mi corazón, que aparte de un hermano lo considero mi amigo, que me anima a seguir luchando y simplemente es el mejor en el mundo.

A mi gran amiga Vale, que ha sido como una hermana para mí y mi paño de lágrimas, gracias por darme refugio en mis tristezas, por reír conmigo y por dejarme ser parte de su vida, gracias por demostrarme que no importa cuánto tiempo pase, los amigos verdaderos siempre estarán ahí.

A Sofía y Alex a quienes quiero muchísimo, con los que compartí momentos que jamás olvidaré que me ayudaron y estuvieron conmigo, que han sido grandes amigos.

A Oscar por todo el apoyo que me brindo, por el tiempo dedicado, las palabras de aliento y la enorme paciencia que tuvo y sigue teniendo.

A los que fui conociendo a lo largo de la carrera, con los que me desvele, reí, me congele, me quemé, me caí, me pegue, me levanté en cada practica de campo y que se convirtieron en grandes compañeros y amigos (Carmen, Luz Maria, Angel, Ignacio, Eli, Carlos...por no mencionarlos a todos)

A mis compañeros de laboratorio: Adriana, Blanca, Esteban, Jessica, Kayro, Laura, Luis, Raúl, Sandra Verónica, Verito, Yadira; los que ya se fueron, los que llegaron, muchas gracias porque de cada uno he aprendido algo.

A Doctora María Esther Cruz Beltrán porque más que una profesora se convirtió en una persona muy especial, a la cual le tengo muchísimo cariño, muchísimo respeto y una enorme admiración. En verdad no hay palabras para agradecerle la paciencia, el tiempo y los consejos. Una excelente profesora y sobre todo un gran ser humano, en verdad muchas gracias.

Contenido	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MARCO TEÓRICO	3
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO	3
EL OVARIO	4
HORMONAS ESTEROIDES	9
OVULACIÓN	11
CICLO ESTRAL	12
FEEDBACK POSITIVO Y NEGATIVO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES	14
ASIMETRÍAS OVÁRICAS	17
INERVAÇÃO OVÁRICA	18
PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINERGICO EN LA REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN	19
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
METODOLOGÍA	24
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	49

RESUMEN

Aunque se ha probado que las células de la granulosa de folículos preovulatorios del ovario de rata y de la mujer expresan receptores muscarínicos (RM) (Mayerhofer y Kunz, 2005), se desconoce si estos participan en el proceso ovulatorio de esos folículos. Por lo que en esta tesis se analizó si los RM subtipo 2 (RM₂) modulan la ovulación.

Para lo cual, ratas hembras cíclicas vírgenes fueron anestesiadas con ketamina/xilazina y micro-inyectadas con una solución de metoctramina (MTC: antagonista selectivo de los RM₂) a una concentración de 20 ng/0.5 µl (solución que fue suministrada durante 30 segundos) en la bursa del ovario izquierdo, a las 13:00 h de cada etapa del ciclo estral. Como grupo de operación simulada se utilizaron animales micro-inyectados con agua destilada. Todos los animales se sacrificaron al estro esperado. A la autopsia se disecaron las trompas uterinas para contar el número de ovocitos liberados, así como los ovarios y el útero para ser pesados. En los grupos experimentales en los que se bloqueó la ovulación, se analizó si la falta de ésta era el resultado de modificaciones en la secreción fásica de la hormona estimulante de las gonadotropinas (GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone, siglas en inglés), de la hormona luteinizante (LH: Luteinizing Hormone, siglas en inglés) o de estradiol, por lo cual, grupos de animales micro-inyectados con MTC fueron inyectados a las 14:00 h del proestro con LHRH-Gly sintética o con gonadotropina coriónica humana (hCG), o a las 14:00 h del diestro-2 con 10 µg de benzoato de estradiol.

En el día del estro, 7/8 animales ovularon después de inyectar la MTC, pero disminuyó el número de ovocitos liberados por el ovario no tratado, el ovario derecho (3.4±0.6 vs. 6.5±0.9, p<0.05) y aumenta su peso comparado con el grupo inyectado con agua (28.2±2.8 mg/100 g p.c. vs. 14.2±0.8 mg/100 g p.c. p<0.05).

En el día del diestro-2 sólo ovuló un animal de los ocho micro-inyectados con MTC. No se modificó ninguno de los otros parámetros estudiados.

En el día del proestro, la MTC disminuyó el número de animales que ovularon del ovario inyectado (2/10 vs. 10/10, p<0.05). También disminuyó el número de ovocitos liberados por cada ovario (ovario izquierdo: 2.2 ± 1.4 vs. 5.5 ± 1.4; ovario derecho: 3.3 ± 0.5 vs. 5.4 ± 0.9, p<0.05), así como el peso (ovario izquierdo: 14.1 ± 1.9 vs. 20.4 ± 2.7; ovario derecho: 14.2 ± 1.0 vs. 22.0 ± 1.9, p<0.05). Por el contrario, el peso del útero aumentó (162 ± 11 vs. 140.1 ± 5.8, p< 0.05).

La inyección de LHRH-Gly sintética y de hCG estimuló la ovulación en los animales tratados con MTC en la fase del diestro-2 o del proestro. En cambio, la inyección de benzoato de estradiol no indujo la ovulación en los animales tratados con MTC en el día del diestro-2.

Con base en los resultados obtenidos concluimos que los efectos de la ACh por medio de los RM₂ sobre la ovulación depende de la fase del ciclo estral: en el diestro-2, la ACh a través de los RM₂ estimula la secreción preovulatoria de la GnRH. En la fase del proestro, la ACh unida a los RM₂ del ovario izquierdo regula la sensibilidad de los folículos de este ovario y el contra-lateral a la LH, lo que manifiesta una comunicación reguladora del ovario izquierdo al derecho, por medio de la activación de estos receptores. Mientras que en el estro, la activación de los RM₂ del ovario izquierdo por la ACh regula de manera estimulante el número de ovocitos liberados por el ovario derecho.

INTRODUCCIÓN

El ovario es el principal órgano reproductor y está recubierto por una fina capa denominada bursa ovárica. La unidad anatómica y funcional del ovario es el folículo. La ovulación es un proceso complejo que culmina con la liberación del ovocito de un folículo preovulatorio (Domínguez y col., 1991; Espey, 1978). Para que la ovulación se lleve a cabo es necesaria una cascada de señalizaciones que involucran el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.

En la rata hembra, este eje regula de manera sincronizada y repetitiva la ovulación y la conducta de “celo”, mediante la secreción de hormonas o la estimulación nerviosa eferente y aferente a las tres estructuras del eje. En la rata, el ciclo estral es de 4 o 5 días dependiendo de la cepa y de las condiciones de luz-oscuridad en que se mantengan a las ratas. El ciclo estral se divide en cuatro fases: estro, diestro-1 diestro-2 y proestro (Kilen y Schwartz, 1988).

Uno de los neurotransmisores que regula la función del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario es la acetilcolina (ACh). En el humano, en primates y en la rata, las células de la granulosa de los folículos preovulatorios secretan ACh y expresan receptores muscarínicos del subtipo uno, tres y cinco (RM₁, RM₃ y RM₅) (Fritz y col., 1999; Mayerhofer y Kunz, 2005). Dado que los receptores muscarínicos tienen un efecto mitogénico en las células de la granulosa, se considera que la ACh es una molécula de señalización autocrina y paracrina importante en el folículo antral (Mayerhofer y Fritz, 2002). A la fecha no se ha descartado, ni se ha mostrado la presencia de RM₂ en el ovario de la rata adulta. Por otra parte, la inyección de sulfato de atropina (antagonista de todos los receptores muscarínicos) bloquea la ovulación de la rata, pero este efecto depende de la hora y el día del ciclo estral (Domínguez y col., 1982).

Aunque en general se considera que los órganos pares son fisiológica y anatómicamente similares, resultados experimentales muestran que difieren en su función y en los mecanismos neuroendocrinos que los regulan. Por ejemplo, en las mujeres, la ovulación se produce en el ovario derecho dos veces más que en el izquierdo (Potashnik y col., 1987). En la rata, el ovario izquierdo libera más ovocitos (Domínguez y col., 1987) y pesa más que el derecho (Gerendai y Halász, 1997).

Con base en esta información, se decidió analizar el efecto del bloqueo de los RM₂ del ovario izquierdo de la rata adulta, a las 13:00 h de cada fase del ciclo estral, mediante la micro-inyección de metoctramina (MTC) en la bursa del ovario. Con el propósito de analizar cuál de las señales endócrinas del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario se modifica por el fármaco, se procedió a remplazar la “señal hipotalámica” (por la administración de LHRH-Gly sintética o GnRH), de la “señal hipofisaria” (mediante la inyección de hCG) y de la “señal ovárica” (por la administración de benzoato de estradiol).

MARCO TEÓRICO

EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

El ciclo estral está regulado por la interacción neuroendocrina entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario, denominado Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.

El Hipotálamo es una estructura que se encuentra debajo del tálamo a ambos lados del tercer ventrículo y algunas de sus neuronas producen la hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH (Carmel y col., 1988; Anderson y col., 1981). En los roedores, la GnRH es un decapeptido secretado por neuronas localizadas en el área preóptica (POA), el área hipotalámica anterior (AHA) y en el núcleo anteroventral periventricular (AVPV). Estas neuronas denominadas GnRHérgicas, establecen contacto con los capilares y venas del sistema porta hipotalámico-hipofisario localizado en la eminencia media, donde es liberada la GnRH y al llegar a sus receptores de membrana en las células de la adenohipófisis, se une (R-GnRH) e induce la secreción de las gonadotropinas de manera pulsátil.

Existen al menos 13 formas de GnRH que han sido aisladas en diferentes vertebrados. Una sola especie puede poseer de dos a tres formas de GnRH, que podrían tener distintas funciones a la de sólo estimular la liberación de las gonadotropinas (Parhar, 2002). En la rata se han detectado tres de ellas, la GnRH-I, aislada originalmente de mamíferos (porcinos y ovinos) y presente en humanos; la GnRH-II encontrada primeramente en aves y luego en mamíferos (Chen y col., 1998) y la GnRH-III identificada en la lamprea (Millar, 2003).

La GnRH-I (pyroGlu-His-Trp-Ser-**Tyr**-Gly-**Leu-Arg**-Pro-Gly-NH₂) es considerada como la principal en mamíferos. La GnRH II (NH₂ • phyroGlu-His-Trp-Ser-**His**-Gly-**Trp-Tyr**-Pro-Gly), es producto de la expresión de un segundo gen, que difiere de la GnRH-I en los aminoácidos 5, 7 y 8, está localizada en el hipotálamo y regula la LH. La GnRH-II se conserva entre las especies, incluidos los humanos (excepto el ratón), se expresa ampliamente en todo el cerebro, actúa como un neuromodulador, coordina el comportamiento reproductivo, puede ser la reguladora de las neuronas GnRH-I (Millar 2003), y modifica la ingesta de alimentos. La GnRH-III regula la secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH) (Herbison, 2006), se ha postulado que sería el factor liberador de FSH en mamíferos ya que la administración de este péptido promueve la liberación diferencial de FSH en ratas *in vivo* e *in vitro* probablemente a través de su propio receptor (Yu y col., 2002).

La hipófisis denominada también glándula pituitaria, es una pequeña glándula, situada en la silla turca (una cavidad ósea de la base del cráneo) y unida al hipotálamo mediante el tallo hipofisario (Guyton, 2007). Está compuesta por dos porciones bien diferenciadas, la adenohipófisis (lóbulo anterior y lóbulo intermedio) y la neurohipófisis (lóbulo posterior) (Hafez, 1996); también está unida al hipotálamo por el tallo hipofisario, en el cual se encuentra el sistema porta hipofisario de vasos sanguíneos (Arimura, 2000).

La hipófisis secreta diferentes hormonas: la Hormona del Crecimiento (GH), la Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH), la Hormona Estimulante del Folículo (FSH), la Hormona Luteinizante (LH), la Prolactina (PRL), la Tirotrópina (TRH), la hormona estimulante de los melanocitos o melanotropina (MSH), la oxitocina y la vasopresina u hormona antidiurética (ADH) (Brown, 1994).

La adenohipófisis es una glándula muy vascularizada que dispone de amplios capilares entre las células glandulares. Pequeñas arterias penetran en la eminencia media y otras regresan a la superficie, donde se unen formando el sistema porta hipotalámico-hipofisario. Estos vasos descienden a lo largo del tallo hipofisario y riegan los senos adenohipofisarios (Guyton, 2007).

La FSH y la LH cumplen un papel relevante en la regulación neuroendocrina del ciclo estral. Estas gonadotropinas son hormonas glicoproteicas conformadas por dos cadenas polipeptídicas: la α y la β . La subunidad α es idéntica en las dos hormonas, le confiere la especificidad de especie, mientras que la subunidad β difiere entre ellas y le da la especificidad biológica. La presencia de las dos subunidades funcionales es necesaria para que la hormona tenga acción biológica y su mecanismo de acción se ejerza a través de la unión de cada hormona a sus receptores ubicados en la membrana celular del órgano blanco (Combamous, 1988).

La FSH es la responsable del proceso de esteroidogénesis ovárica así como del crecimiento y la maduración folicular. La LH interviene en el proceso de esteroidogénesis ovárica, la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y el mantenimiento del mismo (Hafez, 1996).

EL OVARIO

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, está suspendido en un pliegue peritoneal llamado mesovario. La arteria ovárica (o arteria útero-ovárica) recibe el riego sanguíneo que circula por la aorta abdominal y llega al ovario a lo largo del mesovario, rama que entra a través de un hilo, por donde salen las venas (Fawcett, 1995; Yao y Bahr, 1988).

El ovario anatómicamente consiste de tres regiones: la corteza que contiene al llamado epitelio germinal e incluye a los folículos que se encuentran embebidos en el tejido conectivo del estroma ovárico; la médula que consiste en el estroma de tejido conectivo laxo y fibroso y el *hilum* que se encuentra alrededor de la zona de unión del ovario al mesovario.

El ovario está recubierto por la **bursa ovárica**, la cual es una delgada capa de peritoneo que recubre al ovario y se encuentra presente en muchas especies de mamíferos. Está conformada por tres capas: *interna* (capa de epitelio discontinuo, orientado hacia el ovario), *media* (capa de tejido conjuntivo que contiene fibroblastos,

células del músculo liso y vasos sanguíneos) y la *externa* (epitelio que se encuentra en contacto con la cavidad peritoneal) (Martin y col., 1981).

La cavidad bursal es la que se forma entre el ovario y la bursa, contiene líquido y su volumen es regulado por paquetes de células musculares lisas (Li y col., 2007).

En roedores, la bursa ovárica juega un papel en el paso de los ovocitos hacia el oviducto y permite el paso de sustancias entre la cavidad bursal y los vasos sanguíneos que se encuentran dentro de ella e impide la salida de líquido hacia la cavidad peritoneal (Martin y col., 1981).

El ovario está constituido por tres compartimentos: el folicular, el luteal y el intersticial. A partir del folículo ovárico se originan los dos compartimentos restantes del ovario (Domínguez y col., 1991; Fawcett, 1995).

Compartimento folicular. Como su nombre lo indica lo constituyen los propios folículos en las diferentes etapas de desarrollo y es el responsable de la secreción de hormonas esteroides y péptidos, así como de la maduración de las células sexuales (Figura 1).

Compartimento luteal. Los folículos que ovularon se convierten en el órgano endocrino más efímero: el cuerpo lúteo, que es la fuente principal de progesterona (P4) después de la ovulación y cuya formación es iniciada por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos preovulatorios (Figura 1). Esos cambios ocurren como el resultado del incremento dramático en la concentración sérica de LH, que ocurre en la tarde del proestro, denominado “pico” preovulatorio de LH (Niswender y Nett, 1994).

Compartimento Intersticial. El compartimento intersticial está constituido por células que se encuentran entre los folículos, denominadas células teco-intersticiales. Las células teco-intersticiales de los folículos atrésicos con antro, pasan a formar parte de la glándula intersticial (Figura 1), estas células secretan principalmente andrógenos (Domínguez y col., 1991). Después de la ovulación las células tecales se transforman en células teco-luteínicas del cuerpo lúteo.

El ovario está constituido por los folículos (la unidad anátomo-funcional). El folículo ovárico es la estructura que contiene el ovocito. Tras la estimulación adecuada de las gonadotropinas (FSH y LH), los folículos crecen y se diferencian, resultando en la producción de hormonas que promueven el desarrollo de características sexuales secundarias y que regulan el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

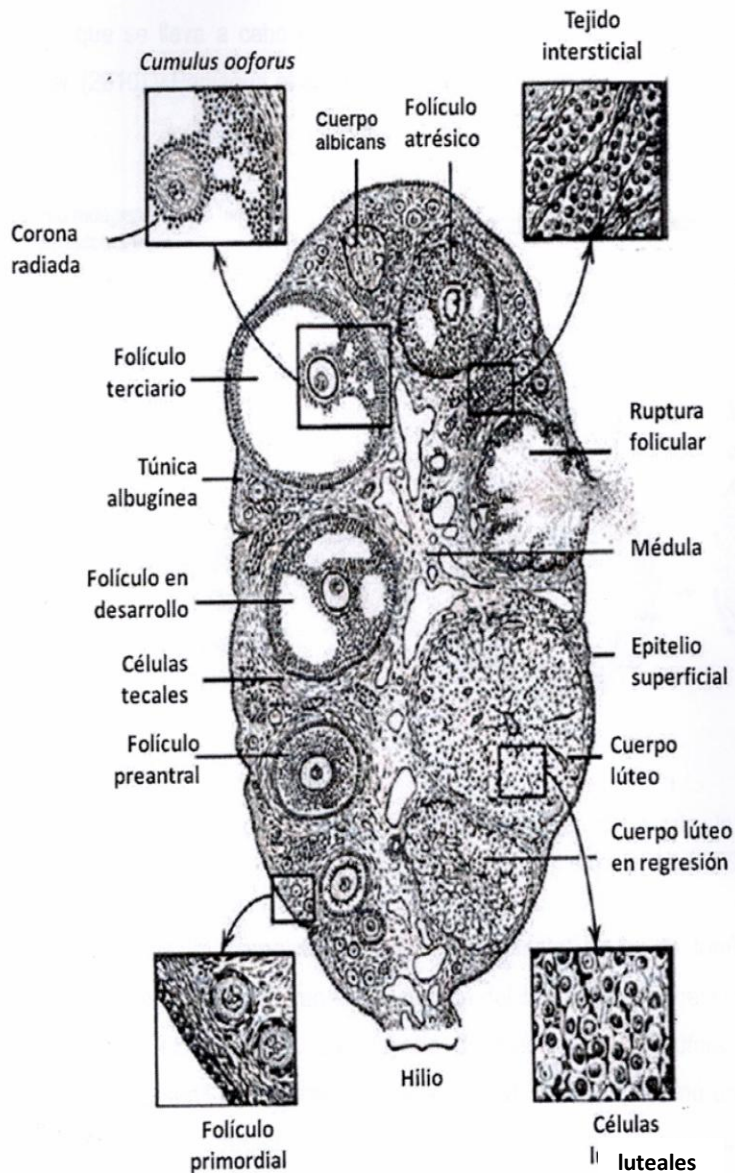


Figura 1. Ovario de mamífero donde se observa el compartimento folicular, lúteo e intersticial (Modificada de Freeman, 1994).

Las células foliculares que rodean al ovocito son las células de la granulosa. El ovocito y las células de la granulosa adyacentes quedan separados por una estrecha hendidura en la que se proyectan microvellosidades y prolongaciones más grandes tanto del ovocito como de las células de la granulosa. En este espacio se acumula una capa glicoproteica que se condensa gradualmente formando la zona pelúcida (Fawcett, 1995).

El desarrollo folicular se inicia con el crecimiento de los folículos ováricos, que puede culminar en la atresia o la ovulación (Van-Voorhis, 1999).

La atresia folicular es el proceso normal por el cual se eliminan del ovario todos aquellos folículos que, habiendo iniciado el proceso de crecimiento y diferenciación, no ovulan. Esta se presenta en cualquier etapa del desarrollo folicular (Domínguez, y col., 1991).

Folículos primordiales: Son los más numerosos y están conformados por un ovocito primario que se origina a partir de las células germinales primordiales (Carlson, 1999). Alrededor de éste se encuentra una capa de células epiteliales planas llamadas pregranulosa (Guyton, 2007). Los folículos presentan una lámina basal que posteriormente se hará más prominente y será la membrana basal; la cual rodea al estrato granuloso y al ovocito, además de separarlos del compartimento tecal y de los vasos sanguíneos (Greenwald y Roy, 1994) (Figura 2).

Folículos primarios: En esta etapa el ovocito aumenta de tamaño (Goldfien y Monroe, 2000). Las células epiteliales adquieren una forma cúbica y son llamadas células de la granulosa. Las células mesenquimales del estroma se agrupan alrededor de la membrana basal y se diferencian en las células de la teca (Bergman y col. 1998; Geneser, 2000) (Figura 2).

Folículos secundarios: Se caracterizan por un estrato granuloso de siete a ocho capas (Domínguez y col., 1991). Las células de la teca se diferencian en dos capas: la interna (células cuboidales que reciben suministro sanguíneo y nervioso) y la externa (conformada de tejido conectivo con fibras de colágeno y fibras musculares lisas) (Domínguez y col., 1991; Yao y Bahr, 1988)(Figura 2).

Folículos terciarios: También llamados preovulatorios se distinguen de los demás por la presencia del *cumulus ooforus* y una corona radiada las cuales se originan a partir de células de la granulosa, estas proporcionan nutrientes y factores que son necesarios para que el ovocito crezca (Domínguez y col., 1991) (Figura 2).

La formación y crecimiento de los folículos primordiales es un evento complejo que parece estar relacionado con señales dentro del ovario, su desarrollo es independiente de las gonadotropinas (LH y FSH) (Domínguez y col., 1991).

En la rata, el crecimiento del folículo dura aproximadamente 19 días, desde que sale de su estado de reposo hasta la ovulación (Domínguez y col., 1991).

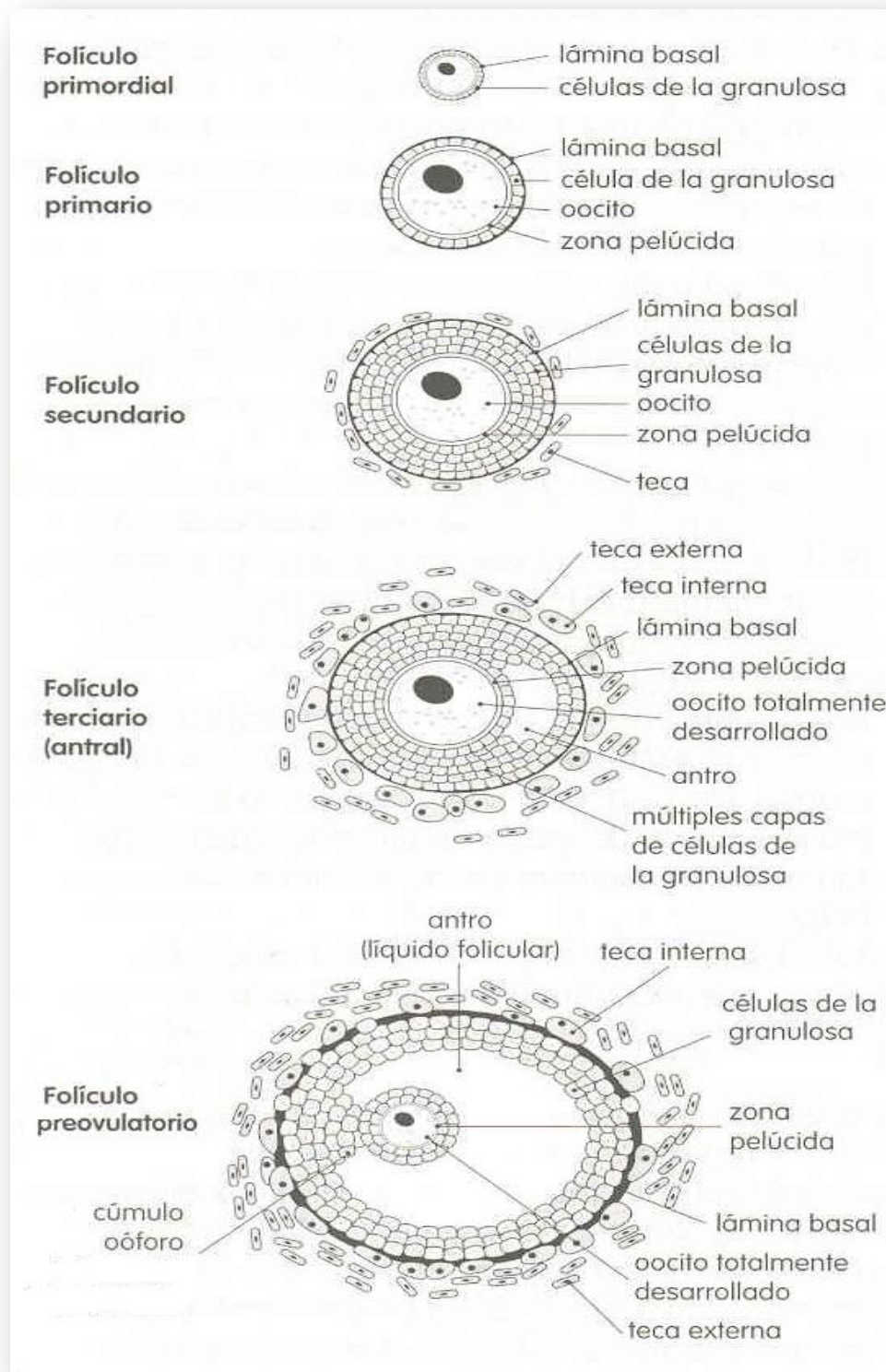


Figura 2. Etapas del desarrollo folicular (Tomada y modificada de Gal y col., 2007).

HORMONAS ESTEROIDES

En la Figura 3, se muestra la vía biosintética de las hormonas esteroideas. Estas hormonas son sintetizadas a partir del colesterol, molécula lipídica de 27 átomos de carbono, que es transportado en el plasma sanguíneo por lipoproteínas de baja densidad (Pedrera, 1993; Van-Voorhis, 1999).

En la mitocondria de las células de la granulosa, el colesterol es convertido a pregnenolona por acción del citocromo P450_{sccc}, complejo enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol (Van-Voorhis, 1999).

La pregnenolona puede ser biotransformada a progesterona por dos vías metabólicas: la $\Delta 4$ o la $\Delta 5$, siendo la $\Delta 4$ la que se utiliza principalmente en el ovario.

Por la vía $\Delta 4$ es convertida en progesterona por medio de la actividad de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HDS), la cual se localiza en el retículo endoplásmico liso de las células de la teca, células de la granulosa y luteales. Por lo general, esta ruta se lleva a cabo en las células del cuerpo lúteo (Gore-Langton y Armstrong, 2006; Van-Voorhis, 1999).

La progesterona es hidroxilada a 17α -hidroxiprogesterona por la enzima 17α -hidroxilasa; sobre la 17α -hidroxiprogesterona actúa la 17-20 desmolasa para separar la cadena lateral entre los carbonos 17 y 20 y formar la androstenediona.

La vía $\Delta 5$ se inicia con la hidroxilación de la pregnenolona por la 17α -hidroxilasa con el fin de convertirla en 17α -hidroxipregnenolona y por acción de la 17-20 desmolasa transformarla en dehidroepiandroterona (DHEA), sobre la cual actuarán las enzimas 3β -HDS y $\Delta 5$ -4 isomerasa, para transformarla a su vez en androstenediona (Pedrera, 1993; Van-Voorhis, 1999).

En la síntesis de los estrógenos participan dos células del folículo: la célula teca-intersticial, la que a partir del colesterol que obtiene del plasma sanguíneo, o del acetato o de la síntesis de *novo*, sintetizan andrógenos. Estos esteroides (androstenediona, testosterona o ambos) atraviesan la membrana basal y son incorporados al citoplasma de las células de la granulosa, donde son aromatizados a estrógenos por la enzima aromatasa, la cual es regulada de manera estimulante por la FSH. Los estrógenos regulan la síntesis de los receptores a FSH y LH en las células de la granulosa y además de difundirse a la circulación general (Domínguez, y col., 1991).

La FSH estimula la síntesis de estrógenos por las células de la granulosa al unirse a su receptor en la membrana celular. El complejo hormona-receptor actúa sobre el sistema de la adenilato ciclasa, lo que provoca el aumento del AMPc y estimula la síntesis de la aromatasa (Domínguez, y col., 1991).

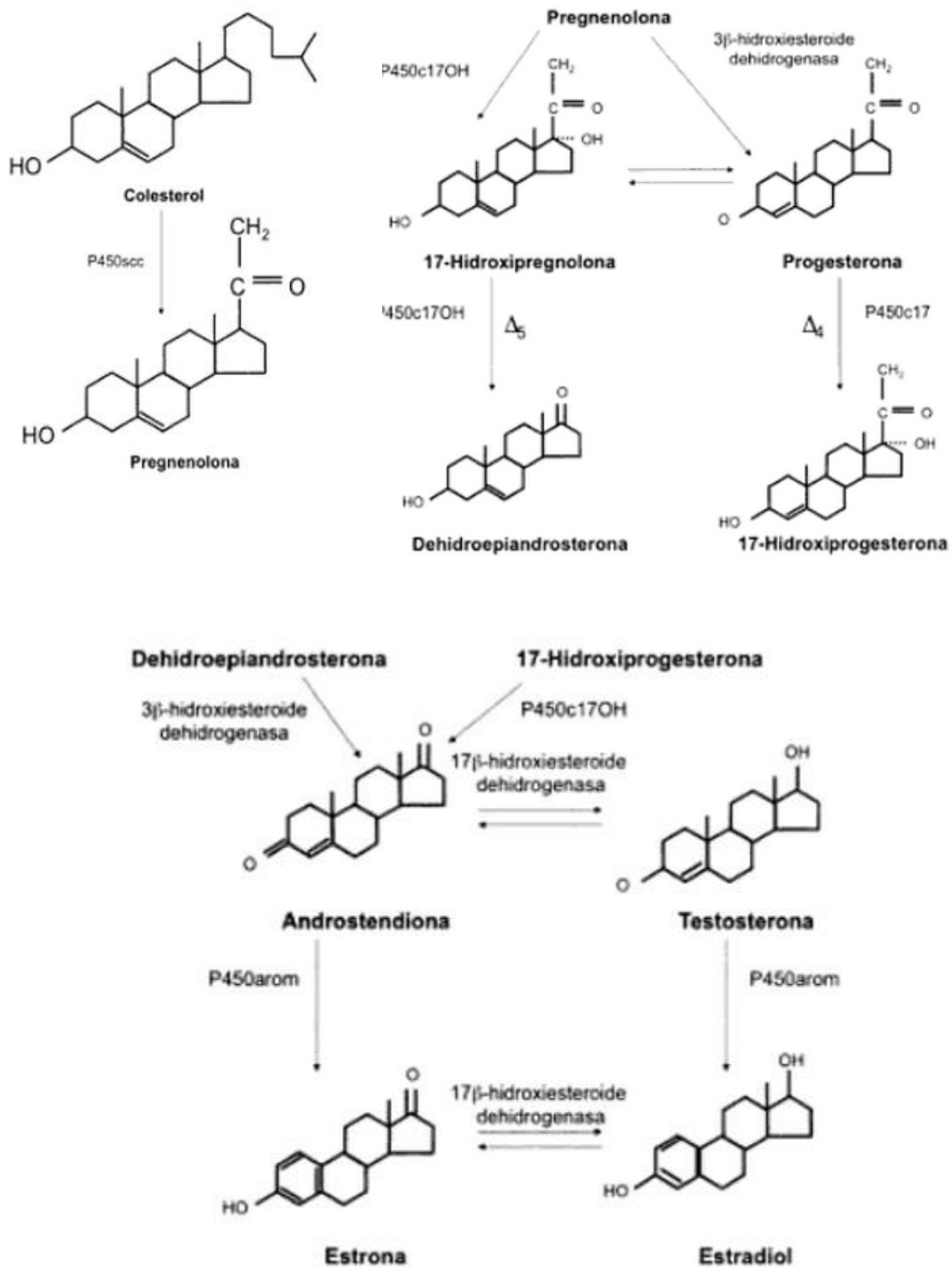


Figura 3. Ruta metabólica Δ_4 y Δ_5 de las hormonas esteroides (Tomado y modificado de Bajo y Coroleu, 2009)

La LH estimula selectivamente el complejo enzimático que separa la cadena colateral del colesterol y las actividades de la 17 α -hidroxilasa y la C17, 20-desmolasa, las que provocan la conversión de colesterol a pregnenolona, paso limitante en la síntesis de progesterona (Erickson, 1982; Erickson, 1983; Eisenberg y col., 1984). La LH también estimula la actividad de la aromatasa en aquellas células de la granulosa que fueron previamente estimuladas por la FSH y el efecto de la LH es amplificado por su liberación pulsátil (Hsueh y col., 1983).

La secreción de estradiol es regulada por la FSH, LH, prolactina y ACTH. Los efectos de estas hormonas son modulados por neurotransmisores secretados por la innervación ovárica intrínseca cercana a la pared folicular. Uno de estos neurotransmisores es la acetilcolina producida por los folículos preovulatorios (Domínguez y col., 1988; Mayerhofer y col., 2003; Fritz y col., 2001).

Además de las hormonas esteroides, el ovario secreta varias hormonas de naturaleza polipeptídica que regulan directa o indirectamente las funciones del folículo y de la hipófisis, una de ellas es la inhibina que se define como un factor polipeptídico de origen gonadal que disminuye selectivamente la tasa de secreción de la FSH (Domínguez, y col., 1991). Otra de las hormonas polipeptídicas es la activina que tiene un efecto dual en la secreción de la FSH; actúa sobre los gonadotropos en la adenohipófisis al estimular la secreción de la FSH, y sobre el propio ovario al estimular la proliferación mitótica de las células de la granulosa. También secreta factores de crecimiento, como el factor de crecimiento tipo insulina I y II: IGF I y II (Van-Voorhis, 1999).

OVULACIÓN

La ovulación se puede definir como el proceso por el cual el ovario libera hacia el exterior uno o varios ovocitos capaces de ser fecundados (Domínguez y col., 1991; Van-Voorhis, 1999), es considerada como el resultado de un proceso inflamatorio localizado, ya que antes de que se produzca la salida del ovocito hay edema en la capa de células de la teca interna, muerte celular y aumento de prostaglandinas en el área. Para que se produzca la ovulación, son necesarios varios cambios en la pared del folículo y en las relaciones entre las células de la granulosa y las tecaes (Domínguez y col., 1991).

Los eventos foliculares inmediatos que siguen a la ruptura y expulsión del ovocito han sido descritos en su mayoría en conejos (Espey, 1978; Lipner, 1973). El folículo ovulatorio sobresale de la superficie del ovario y se observa muy turgente y vascular. En cuestión de minutos después de la estimulación de la LH, en la zona pelúcida se forman estigmas en el ápice de cada folículo preovulatorio. Esta es la primera señal de que el proceso de ovulación ha comenzado. Conforme la ruptura folicular se aproxima, las células epiteliales germinales superficiales que cubren el estigma, se rompen en pequeños grupos (Espey y Richards, 2006).

La extrusión del *cumulus ooforus* y del ovocito toma de 11 a 12 minutos. Primero las células de la granulosa comienzan a ser expulsadas a través del orificio, seguido rápidamente por el ovocito. Una vez que el ovocito es extruido, sale una gran cantidad de líquido folicular. El ovocito rápidamente encuentra el camino hacia el oviducto. En la hora posterior a la ovulación, los ovocitos rodeados del *cumulus ooforus* pueden ser reconocidos en el tercio superior del oviducto. Todos los ovocitos a ovular se liberan en hora y media aproximadamente (Espey y Richards, 2006).

En la rata, los cuerpos lúteos persisten morfológicamente de 12 a 14 días. Para el diestro-2, el nuevo cuerpo lúteo formado ha alcanzado su talla máxima, la cual se mantiene hasta el diestro-1 del siguiente ciclo. Para el diestro-2 del segundo ciclo el cuerpo lúteo sufre un retroceso abrupto. Esta regresión coincide con el cierre de los vasos sanguíneos (Bassett, 1943), la aparición de las áreas de degeneración, la infiltración de leucocitos, el incremento de 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Pupkin y col., 1966) y el incremento de contenido de colesterol (Everett, 1945).

CICLO ESTRAL

El ciclo estral se caracteriza por cambios hormonales y conductuales progresivos, altamente sincronizados y repetitivos, que incluyen una etapa en la que la hembra es receptiva al macho, la cual se denomina etapa de **celo**. El término estral proviene del término en latín “*oistros*” que significa frenesí (Kilen y Schwartz, 1988). Este término fue utilizado por primera vez por Heape quien lo describe como “el periodo especial de deseo sexual de la hembra” y lo distingue del celo en el macho (Heape, 1900).

En la rata, el ciclo estral es de 4 o 5 días dependiendo de la cepa y de las condiciones de luz-oscuridad con que son monitoreados. Para su estudio el ciclo estral se divide en: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro (Kilen y Schwartz, 1988).

Estro: el frotis vaginal presenta células epiteliales cornificadas y sin núcleo (Kilen y Schwartz, 1988). En la madrugada de este día ocurre la ovulación. La concentración de estradiol, progesterona y LH se encuentran en la sangre en concentraciones basales, pero la FSH vuelve a aumentar en la madrugada de este día (Figura 4). Este segundo “pico” de FSH induce el reclutamiento de los folículos que entran al pool de crecimiento (Freeman, 1994; Schwartz, 2000).

Diestro-1: se caracteriza por presentar gran cantidad de leucocitos en el frotis vaginal. El cuerpo lúteo secreta progesterona por varias horas, con lo cual esta hormona alcanza su segundo “pico” al medio día (Freeman, 1994; Schwartz, 2000). Las concentraciones de estradiol, LH y FSH son basales (Figura 4).

Diestro-2: este día se caracteriza por una menor cantidad de leucocitos, además de presentar algunas células epiteliales nucleadas. Desde la tarde de este día comienza a aumentar la concentración de estradiol de manera paulatina (Figura 4) (Kilen y Schwartz, 1988; Schwartz, 2000).

Proestro: El frotis vaginal se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas. La concentración de estradiol alcanza el valor máximo del ciclo hacia el medio día y después de eso disminuye su concentración hasta alcanzar sus concentraciones basales. La disminución progresiva de esta concentración induce el aumento de la concentración sanguínea de LH y FSH. La concentración máxima de ambas hormonas en la sangre se conoce como “secreción preovulatoria”, que ocurre en la tarde de este día (entre las 17:00 y 19:00 horas). La secreción preovulatoria de LH estimula la secreción de progesterona, que alcanza un primer “pico” o máximo en su concentración sérica en la noche de este día (Figura 4) (Freeman, 1994; Schwartz, 2000).

El “pico” de FSH (Figura 4) tiene varias funciones, entre ellas la estimulación del activador de plasminógeno, el cual cataliza la activación de la proteólisis de tejido conectivo folicular y causa la ovulación. Asimismo la función de ese “pico” es asegurar un número adecuado de receptores para la LH.

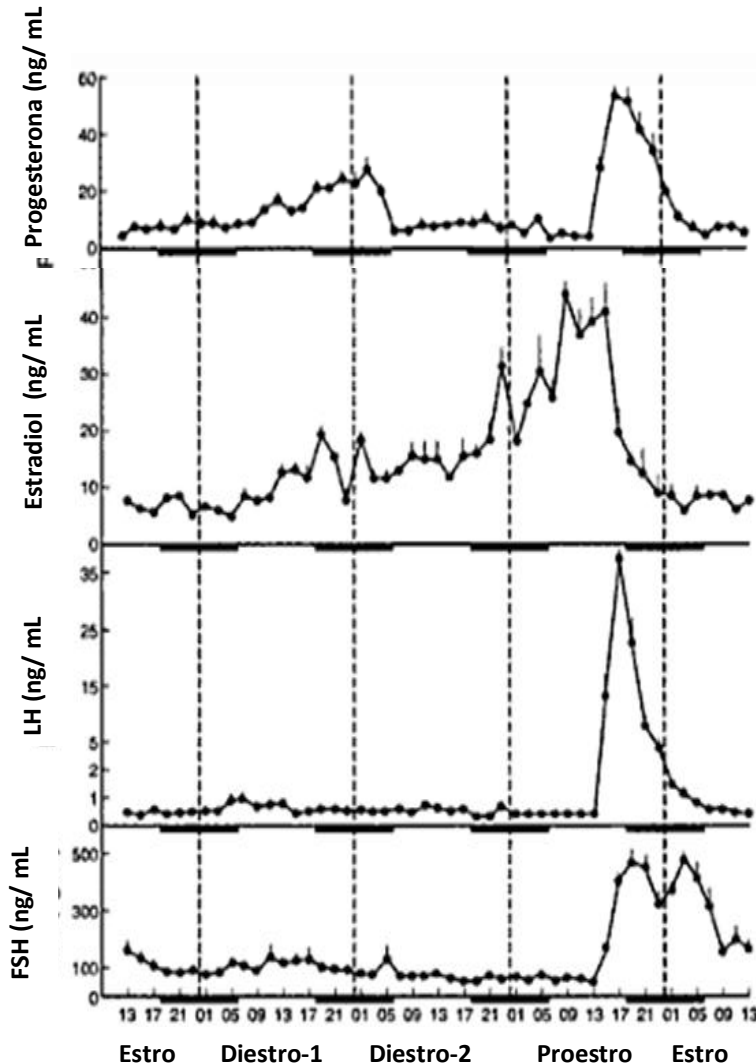


Figura 4. Concentración de progesterona, estradiol, LH y FSH en plasma periférico obtenido en intervalos de dos horas a lo largo de cada día del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la media + e.e.m. de la concentración hormonal de 5 a 6 ratas. En eje horizontal, las barras negras representan los intervalos de oscuridad del fotoperiodo al que son mantenidos los animales y los números debajo representan la hora del día en términos de un reloj de 24 horas (Tomado y modificado de Freeman, 1994).

FEEDBACK POSITIVO Y NEGATIVO DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

Everett y Sawyer (1950) mostraron que la administración de pentobarbital entre las 14:00 y las 15:45 h del proestro, a animales mantenidos en iluminación diaria de 05:00 a 19:00 h, bloquea la ovulación en el día del estro esperado, la cual se retrasa 24 horas. Estos datos dieron lugar a la idea de un "período crítico", en el que el bloqueo de las señales nerviosas cancela la liberación de LH y la ovulación. Así, el medio ambiente, los ciclos de luz-oscuridad actúan regulando los ciclos del ovario a través de arrastrar o desplazar su ritmo circadiano.

En la rata hembra intacta la secreción de LH (en concentraciones basales a finales del estro y a comienzos del proestro) es regulada de manera inhibitoria (retroalimentación negativa del inglés: feedback) por el 17- β estradiol y la progesterona, secretados por los ovarios. Tales efectos inhibitorios sobre la secreción de LH pueden ser más fáciles de mostrar mediante la eliminación de los ovarios (ovariectomía). Entre las 14 a 24 horas después de la ovariectomía ocurre el primer aumento significativo en la concentración de LH en la sangre (Herbison, 2006).

La administración de progesterona a ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos disminuye las concentraciones de LH por debajo de las observadas en animales tratados solamente con estrógenos. Además, la simulación de las concentraciones basales de estradiol y progesterona durante el Diestro-1 impide el aumento de LH en los animales ovariectomizados. De estos datos se puede inferir que las concentraciones de estradiol y progesterona secretadas en estro hasta el diestro-1 son capaces de disminuir la actividad del eje hipotálamo-hipófisis y conduce a la secreción basal de LH durante este tiempo (Herbison, 2006).

Los estrógenos pueden tanto inhibir como estimular la secreción de la GnRH. Así, durante la fase preovulatoria ocurre un efecto transitorio de retroalimentación positiva, que implica la potenciación de la secreción de LH por las elevadas concentraciones de estrógenos. La retroalimentación negativa por estrógenos no se ejerce directamente sobre las neuronas GnRHérgicas sino sobre otros grupos neuronales, que a su vez proyectan sobre el gonadostato (Herbison, 2006).

Se ha sugerido que el efecto de retroalimentación positivo que ejercen los estrógenos es a través de modificaciones en las conexiones sinápticas de las neuronas GnRHérgicas que expresan receptores a estradiol. El estradiol también regula la expresión de receptores a GnRH, pero también modula la síntesis de ácido gamma-amino-butírico (GABA) en células que sintetizan glutamato, las mismas que expresan el receptor a estrogénos alfa (RE- α) (Herbison, 2006).

En la Figura 5 se muestra las diferentes maneras en las que el estradiol puede ejercer su acción sobre la neurona GnRH: ① De manera directa a través de regular la transcripción del ARNm del decapeptido por medio del RE- β . ② De manera indirecta, a través de su efecto en diferentes tipos de células o estructuras del hipotálamo:

Células de la glía que interactúan con el soma o con las terminales (en la eminencia media) de la GnRH, ③ neuronas que tienen o no contactos sinápticos con la neurona GnRH, denominadas interneuronas y ④ a través de las células vasculares endoteliales que actúan de manera paracrina en la terminal de la neurona GnRH. El efecto indirecto del estradiol ocurre al unirse al RE- β y ER- α (Figura 5) (Herbison, 2006).

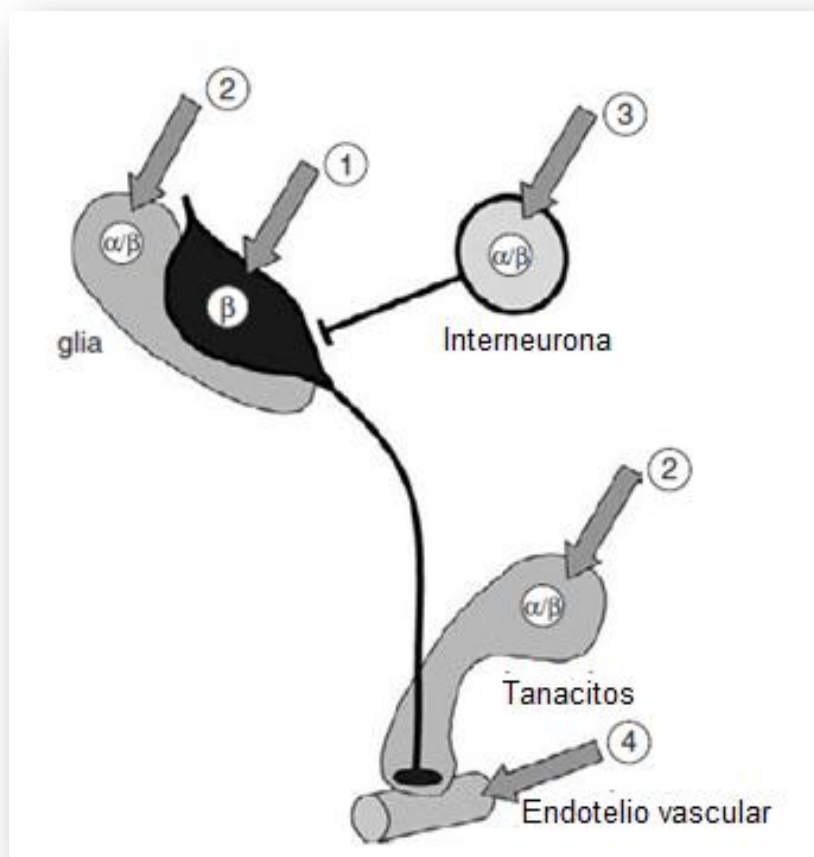


Figura 5. Diagrama que muestra cuatro posibles modos de acción de los estrógenos sobre la hormona GnRH. (Tomado y modificada de Herbison, 2006).

Los estrógenos ejercen su efecto “feedback” estimulante en la secreción de GnRH y LH al actuar en las células del núcleo anteroventral-periventricular (AVPV). Estudios realizados en ratas muestran que los estrógenos inducen su efecto “feedback” positivo sobre la neurona GnRH a través de aferencias primarias que expresan el RE- α , cuyos cuerpos celulares se sitúan en el AVPV (Figura 6). Entre dichas aferencias primarias destacan las derivadas de neuronas que sintetizan kisspeptina (Wolfe y Wu, 2012), GABA, noradrenalina, glutamato, endorfinas, encefalinas, sustancia P, galanina, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y neurotensina. Estudios en ovejas sugieren que las células dentro del hipotálamo medio basal (MBH) tienen el mismo papel. En cambio, el efecto “feedback” negativo ocurre por medio de los tres tipos celulares que interactúan de manera indirecta con la neurona GnRH (Herbison, 2006, Wolfe y Wu, 2012).

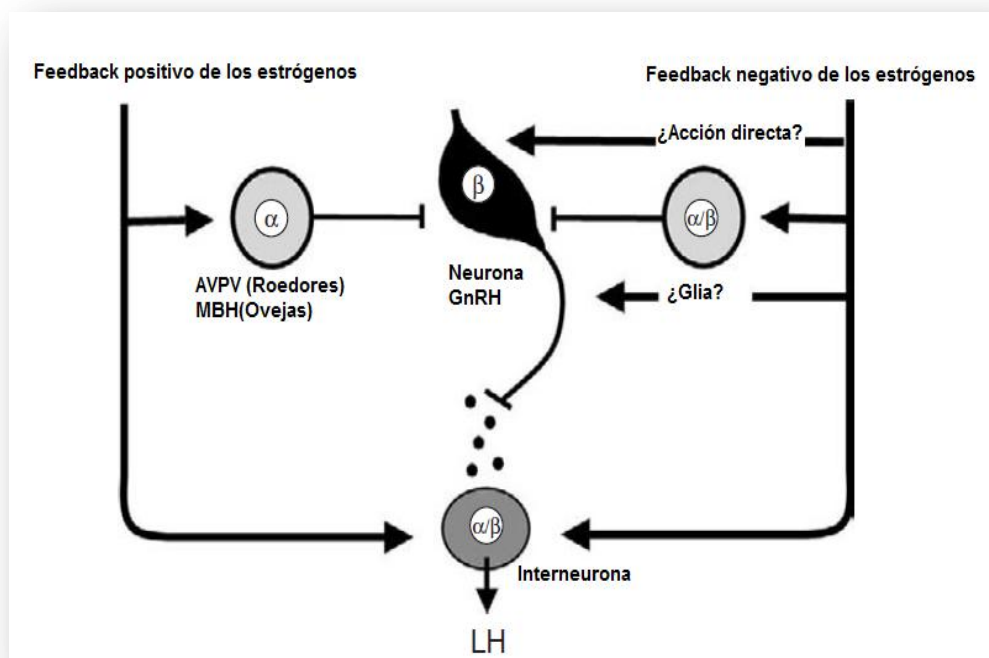


Figura 6. Diagrama que muestra los mecanismos propuestos del feedback positivo y del feedback negativo de los estrógenos (Tomado y modificada de Herbison, 2006).

Wolfe y Wu, (2012) plantean que el sitio de acción del feedback negativo de los estrógenos radica en el núcleo arcuato, por medio del sistema kisspeptidérgico. Por el contrario, la progesterona tiene el efecto opuesto, es decir, inhibir la secreción de la GnRH y la sensibilidad del hipotálamo a la acción de los estrógenos (Herbison, 2006). Estudios en oveja, han mostrado que la progesterona ejerce una fuerte influencia supresiva de la frecuencia de los pulsos de GnRH durante la fase luteal.

Aunque la vía neural precisa por la cual la progesterona suprime la frecuencia de los pulsos de la GnRH aún no es clara, se ha mostrado que los péptidos opioides endógenos tienen un papel dentro del feedback negativo de la progesterona (Goodman y col., 1995).

En ovejas se ha demostrado que la progesterona puede actuar relativamente rápido (menos de 50 minutos) para suprimir la frecuencia de los pulsos de la GnRH y que esto requiere de la presencia de los receptores a progesterona inducidos por estrógenos (Goodman y col., 1995).

La modulación rápida y directa de la neurona GnRH por metabolitos de la progesterona deriva de células gliales que pueden jugar un papel inhibitorio en los pulsos de secreción de la LH durante la fase lútea. Es posible que las altas concentraciones de progesterona en esta fase del ciclo sean metabolizadas a alopregnenolona por células gliales en la proximidad de los cuerpos celulares de GnRH. A su vez, la alopregnenolona activa a las neuronas GABAérgicas (Herbison2006).

El estudio de las concentraciones de LH sérica en roedores y primates indica que la progesterona puede adelantar el momento de inicio de la secreción preovulatoria de la GnRH y LH, así como aumentar considerablemente la amplitud de los pulsos. Ambos efectos requieren de la síntesis de receptores a progesterona inducida por los estrógenos (Herbison, 2006).

Existe una la posibilidad de que los estrógenos puedan inducir la secreción de progesterona de *novo* dentro del cerebro y así generar el pre-aumento de progesterona dentro de la red neural de la GnRH (Herbison, 2006).

ASIMETRÍAS OVÁRICAS

A pesar de que se piensa que, en general, los órganos pareados son fisiológica y patológicamente muy similares, hay evidencia de que éstos no son idénticos en cuanto a su función y a los mecanismos que los regula. Por ejemplo, en las mujeres, la ovulación se produce en el ovario derecho dos veces más que en el izquierdo (Potashnik y col., 1987).

En las aves solo el ovario izquierdo es funcional, la gónada derecha se reduce a una capa de tejido localizado por debajo de la vena cava inferior, pero si se extirpa el ovario izquierdo provoca la activación de la gónada derecha, la cual, hasta ese momento, tiene el aspecto de un testículo y secreta testosterona (Domínguez y col., 2003).

En mamíferos poli ovulantes, también han sido observadas diferencias en la capacidad ovulatoria del ovario izquierdo y el ovario derecho. En murciélagos, las asimetrías funcionales, anatómicas o ambas, de los órganos femeninos reproductivos son mucho más frecuentes y marcadas que las observadas en

cualquier otro orden animal, la ovulación ocurre predominantemente en la gónada derecha, el ovario contralateral tiene la capacidad de funcionar, solo si se extirpa el ovario dominante (Domínguez y col., 2003; Gerendai y Halász, 1997). La dominancia diestral (derecha) es más frecuente, pero casos de dominancia siniestral (izquierda) han sido descritos (Wimsatt, 1979).

En la cerda se han observado diferencias bioquímicas entre los cuerpos lúteos del ovario izquierdo y los del derecho (Rao y Edgerton, 1984).

En yeguas, el ovario derecho ovula significativamente más en dos meses, mientras que el izquierdo lo hace en los otros dos meses (Domínguez y col., 2003).

En el humano, la sangre venosa del ovario derecho llega a la vena cava inferior, mientras que la vena ovárica del lado izquierdo entra en la vena renal izquierda. Asimismo, el ovario derecho se desarrolla más temprano que el izquierdo (Gerendai y Halász, 1997).

En la rata, se ha observado que durante el día del estro, el ovario izquierdo libera un promedio de seis ovocitos, mientras que el derecho solo cuatro (Domínguez y col., 2003) y pesa más que el derecho (Gerendai y Halász, 1997). También se ha mostrado que los ovarios derecho e izquierdo tienen capacidades diferentes para mantener la ovulación en ratas ovariectomizadas (Chávez y col., 1987).

En el animal con ovariectomía unilateral, la proporción de animales que ovulan en el día del estro es el doble cuando el ovario derecho se encuentra *in situ* que cuando está el izquierdo (Cruz y col., 2001).

Los resultados experimentales sugieren que una de las gónadas tiene predominancia funcional en mamíferos y aves (Bleier y Ehteshami, 1981; Domínguez y col., 1988). Estas asimetrías funcionales de los ovarios se han explicado por diferencias en la inervación del ovario, la que participa en la modulación de los efectos de las gonadotropinas en los folículos ováricos (Burden, 1985; Ojeda y Aguado, 1985; Domínguez y col., 1988). Por estudios histológicos se ha mostrado que el ovario derecho es más rico en inervación simpática que el izquierdo (Klein y Burden, 1988).

INERVAÇÃO OVÁRICA

El ovario de la rata recibe inervación de tipo simpático, parasimpático, peptidérgico y sensorial (Burden, 1985; Dissen y OJeda., 1999).

La inervación simpática llega al ovario por dos vías nerviosas: la primera a través del nervio del plexo ovárico (PO), el cual corre a lo largo de la arteria ovárica e inerva al ovario y al oviducto; y la segunda por medio del nervio ovárico superior (NOS), el cual inerva al ovario, al oviducto y al útero.

Las fibras que se originan en el PO inervan principalmente la vasculatura ovárica y las que se originan en el NOS inervan principalmente el compartimento secretor de la glándula (la teca y células intersticiales de los folículos en desarrollo) y vasos sanguíneos (Burden, 1985; Dissen Ojeda., 1999). El NOS transporta noradrenalina (NA), neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP). El PO lleva fibras sensoriales, formada por neuronas que contienen sustancia P (SP), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y somatostatina (Calka y col., 1988).

La inervación parasimpática llega a los ovarios por medio del nervio vago (NV) (Burden y col, 1983). Las fibras del NV transportan SP, VIP, somatostatina, NPY, acetilcolina (ACh) y CGRP (Gilbert y col., 1980; Calka y col., 1988).

En la rata los somas de la inervación ovárica se encuentran en el ganglio celiaco (GC), el ganglio mesentérico y los nervios espláncnicos lumbares. (Baljet y Drukker, 1979; Isomura y col., 1985).

Las fibras nerviosas alcanzan los vasos sanguíneos, la glándula intersticial y las tecas. Las células de la granulosa de los folículos ováricos no están en contacto con las fibras nerviosas que llegan al ovario, ya que no cruzan la membrana basal que separa las células de la teca de las de la granulosa (Mayerhofer y col., 1997).

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN

La acetilcolina que existe en las terminales de neuronas colinérgicas es sintetizada en el citoplasma de la neurona a partir de la colina y de la acetilcoenzima A (acetil-CoA) mediante la acción de la enzima colino-acetil-transferasa (CAT). El origen de la acetil-CoA es diverso, puede derivarse del metabolismo de la glucosa, del citrato y del acetato. La síntesis de acetil-CoA tiene lugar en las mitocondrias, catalizada por el complejo piruvato-deshidrogenasa. Una vez sintetizada, la acetilcolina es almacenada fundamentalmente en el terminal colinérgica presináptica; en su interior, existen tres formas de depósito: a): de forma libre, disuelta en el citoplasma; b): en el interior de vesículas sinápticas, en ocasiones asociada a otro neurotransmisor y c): asociada débilmente a membranas y susceptible, por lo tanto, de desprenderse con facilidad. La acetilcolina recién sintetizada pasa a ocupar alguno o algunos de estos tres compartimientos (González, 1997).

Los receptores colinérgicos se dividen en dos categorías: nicotínicos y muscarínicos. Los receptores nicotínicos forman parte de un canal iónico y controlan su abertura, mientras que los muscarínicos están asociados a diversos tipos de proteínas G, mediante las cuales activan sistemas efectores de diversa naturaleza.

Los receptores muscarínicos de la acetilcolina son miembros de una familia de proteínas relacionadas estructuralmente (Bonner, 1989) acoplados a proteínas G (Gilman, 1987) que traducen la señal extracelular de acetilcolina en una respuesta intracelular (Nathanson, 1987).

En la actualidad se han clonado cinco receptores muscarínicos distintos y se han designado como m1, m2, m3, m4 y m5 (utilizando la nomenclatura de Bonner, 1989) (Kubo y col., 1986; Bonner, 1988; Peralta y col., 1987). Sin embargo, se ha considerado que el número de genes que codifican los receptores muscarínicos pueden ser más de cinco (Bonner, 1987; Bonner, 1989).

La primera evidencia de la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas fue el experimento realizado por Sawyer, Markee y Everett (1949) hace más de 60 años, quienes mostraron que el bloqueo del sistema colinérgico, por la inyección subcutánea de atropina (antagonista muscarínico), interrumpe la ovulación, cuando se administra inmediatamente después del coito en el caso de la coneja (un animal de ovulación refleja), y, en la rata (un animal de ovulación espontánea) cuando se inyecta en la mañana del proestro.

La acetilcolina (ACh) participa en la regulación de los eventos reproductivos, incluida la conducta sexual masculina y femenina (Kow y Pfaff, 1988) y la secreción de gonadotropinas (Benedetti y col., 1969; Everett, 1964).

En la rata, la inyección subcutánea de sulfato de atropina (70 mg/100 g) o su aplicación directa al tercer ventrículo cerebral (250 µg) entre las 11:00 y 13:00 h del proestro bloquea la secreción de LH, FSH y PRL horas más tarde. En estos animales, la inyección de LHRH sintética restableció la liberación preovulatoria de LH, por lo que se concluyó que sus efectos ocurren en el sistema nervioso central y que el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos alteraba la secreción normal de la GnRH (Livne y col., 1993).

Estudios *in vitro* muestran que en el área preóptica de la rata hembra el número de receptores muscarínicos varía durante el ciclo estral. En el día del proestro se observa un aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos (60%), comparado a lo observado en diestro-2 o en la tarde del proestro (35%). Cuando porciones homogéneas de POA se exponen a la presencia de 17β -estradiol, resulta en la conversión de los sitios de unión de alta afinidad a sitios de baja afinidad a agonistas muscarínicos como la pilocarpina o el carbacol. Este efecto de la hormona se observa únicamente en muestras de POA obtenidas en la mañana del proestro y puede ser bloqueado por clomifeno (antiestrógeno) o prevenido por la ocupación previa de los receptores muscarínicos por sus propios ligandos antes de la adición de esta hormona.

Los cambios significativos en los receptores muscarínicos de POA coinciden con el llamado “periodo crítico”, caracterizado por altas concentraciones de estrógenos y gran número de receptores estrogénicos en POA (Egozi y col., 1986).

Domínguez y colaboradores (1982) mostraron que la sensibilidad del sistema colinérgico al sulfato de atropina varía durante el ciclo estral y que la dosis necesaria para bloquear la ovulación en el 100 % de los casos depende del día del ciclo y la hora en que se administre, siendo el diestro-1 el día más sensible, ya que para lograr dicho efecto se requiere la dosis menor que fue de 100 mg/kg peso.

Es bien sabido que los neurotransmisores, principalmente catecolaminas y neuropéptidos, tiene funciones específicas en la regulación de las funciones ováricas, incluyendo la regulación de la esteroidogénesis, la inducción de genes y el desarrollo e inicio del crecimiento folicular. Estos neurotransmisores son derivados de la innervación ovárica o de fuentes intraováricas (Mayerhofer y col., 1997, Lara y col., 2001, Mayerhofer, 1991).

Los nervios ováricos a través de la formación de sinapsis liberan neurotransmisores, que viajan con los vasos sanguíneos entre las células endocrinas intersticiales, la capa de células de la teca de los folículos y, posiblemente, del cuerpo lúteo (Mayerhofer, 2002).

La ACh es producida por células de la granulosa de folículos preovulatorios (Mayerhofer y Kunz, 2005). Estudios con RT-PCR han mostrado la presencia de receptores muscarínicos de tipo M₁, M₃ y M₅ en ovarios de humano y primates (Fritz, y col., 2001). Esta técnica junto con inmunohistoquímica ha mostrado que el RM₃ está presente en los ovocitos, mientras que los genes para el RM₁ y RM₅ son expresados en las células de la granulosa (Batra y col., 1993, Fritz, y col., 2001), lo que sugiere que la ACh producida por estas células foliculares, así como las luteinizadas pueden actuar en formas autócrina y parácrinas dentro del ovario sobre los ovocitos, las células de la granulosa, las luteales o todas a la vez (Mayerhofer y col., 2003). En cultivos de células de la granulosa, los tres tipos de receptores movilizan fosfoinositol e incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular (Fritz y col., 1999).

En la rata adulta, las células de la granulosa de folículos antrales son inmunoreactivas a la CAT (ir-CAT), así como para el transportador vesicular de ACh (Fritz y col., 1999). Estos resultados muestran que en este tipo de folículos son las células de la granulosa la fuente de ACh.

Por medio del RM₁, la ACh estimula la proliferación de las células de la granulosa y en células de la granulosa luteinizadas, estos receptores estimulan la formación de nexos (Fritz y col., 2002).

A la fecha, se considera que la ACh es una molécula de señalización muy importante en el folículo con antro, es decir en aquellos folículos que ya sintetizan receptores a FSH y LH. En cultivos de células de la granulosa de rata que expresa el receptor a FSH (línea celular GFSHR-17), la producción de ACh aumenta en el medio celular cuando son cultivadas por 24 h con FSH, por lo que los autores sugieren que la FSH estimula la síntesis de ACh por las células de la granulosa (Mayerhofer y col., 2006).

Con base en este conjunto de evidencias, se plantea una vía de señalización intra-ovárica entre el complejo ACh-receptor muscarínico, que es utilizada por las gonadotropinas en las células de la granulosa (Richards y col., 2002). En el día del proestro (13:00 h), la micro-inyección de pirenzepina (antagonista RM₁) en el ovario izquierdo bloquea la ovulación esperada al día siguiente, lo que no ocurre al inyectar el fármaco en el ovario derecho (Cruz y col., 2012).

El ovario se comunica con el sistema nervioso central a través de una vía multisináptica ya identificada por Gerendai y colaboradores (1998), en la cual el nervio vago es uno de los haces principales.

JUSTIFICACIÓN

Las células de la granulosa de los folículos preovulatorios secretan ACh, expresan receptores muscarínicos M_1 y M_5 (Mayerhofer y Kunz, 2005) y ejercen efectos mitogénicos, autócrinos y paracrinos (Mayerhofer, y col., 2003). Sin embargo, se desconoce si la ACh está involucrada en la ovulación. Aunque no se ha descrito la existencia de los receptores muscarínicos M_2 (RM_2), en esta tesis se decidió analizar si el bloqueo de RM_2 altera la ovulación y si su participación cambia durante el ciclo estral. Por otra parte, aunque existe una asimetría funcional entre el ovario izquierdo y el derecho, en este estudio solo se analizaron los efectos del bloqueo de los RM_2 del ovario izquierdo y la respuesta ambos ovarios a dicha manipulación experimental.

HIPÓTESIS

En los ovarios de la rata, las células de la granulosa de los folículos preovulatorios secretan ACh y expresan receptores muscarínicos tipo M_1 , M_3 y M_5 . Aunque no se ha descrito los RM_2 , si estos están presentes y juegan un papel en el ovario, entonces el bloqueo de ellos en el ovario izquierdo modificará la ovulación. Si estos receptores cambian durante el ciclo estral, entonces el bloqueo de estos receptores sobre la ovulación variará en cada fase del ciclo estral.

OBJETIVO GENERAL

Analizar durante el ciclo estral, el efecto del bloqueo de los RM_2 del ovario izquierdo, sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estudiar los efectos del bloqueo de los RM_2 a las 13:00 h del Estro, Diestro-1, Diestro-2 o Proestro, sobre el porcentaje de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados, la masa ovárica y el peso del útero en la mañana del estro esperado.

Evaluar la respuesta ovulatoria al reemplazo de la señal hipotalámica, hipofisaria y ovárica en los grupos experimentales cuyo tratamiento con metoctramina haya modificado el porcentaje de animales ovulantes.

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratas hembras adultas (90-120 días de edad) de la cepa CIIZ-V, mantenidas en cubículos con iluminación controlada (14 horas luz/10 horas oscuridad, luces de 05:00 a 19:00 h) y con libre acceso a agua y alimento.

Se les monitoreó el ciclo estral por medio de la toma de frotis vaginal diario; sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron dos ciclos estrales consecutivos de 4 días.

Experimento 1. Efectos de la anestesia inducida a las 13:00 h del diestro-1, sobre la ovulación

Dado que la anestesia con Ketamina-Xilazina bloquea la ovulación cuando se administra a las 13:00 h del Diestro-1 (Min-Poblete y col., 2011), y no la afecta en las fases de diestro-2, proestro o estro, se procedió a anestesiar animales (n= 8) con un coctel de ketamina-xilazina (25 mg y 0.1 mg, respectivamente) por vía peritoneal. En la mañana del estro esperado los animales fueron sacrificados, con la finalidad de contar el número de ovocitos liberados.

En otros grupos de ratas anestesiadas con ketamina-xilazina que no ovularon por la anestesia, que correspondieron a los animales anestesiados en diestro-1, se procedió a restablecer la señal hipotalámica con 3.7 µg/ kg peso de LHRH-Gly sintética (Sigma Aldrich, México) a las 14:00 h del proestro esperado del ciclo tratado; la señal hipofisaria con 25 UI hCG (Gonadotropina Coriónica humana) a las 14:00 h del proestro esperado del ciclo tratado y la señal ovárica con 10 µg de BE (benzoato de estradiol) a las 14:00 h del diestro-2 esperado del ciclo tratado.

Todos los animales se sacrificaron en una cámara letal con cloroformo en la mañana del estro esperado. Los ovarios y el útero fueron disecados y pesados en una balanza analítica. En los oviductos del ovario izquierdo (ovario inyectado) y el derecho (ovario no tratado) se verificó la presencia de ovocitos, los cuales fueron contados bajo un microscopio estereoscópico.

Experimento 2. Micro-inyección con agua destilada o metoctramina en la bursa del ovario izquierdo

Se procedió a inyectar grupos de animales en estro, diestro-2 y proestro (n= 8) con un coctel de ketamina-xilazina (25 mg y 0.1 mg, respectivamente) por vía peritoneal. Una vez anestesiados, se realizó una incisión dorso lateral de 2 cm aproximadamente, a través de la cual se expuso el ovario y se les introdujo en la bursa del ovario izquierdo la aguja de una jeringa de insulina (30 Gx13 mm) de acero inoxidable, conectada a un tubo de teflón, el cual a su vez estuvo acoplado a una jeringa Hamilton colocada en una micro-bomba (CMA400, Byochemical System). De esta forma, el ovario izquierdo fue inyectado con 0.5 µL de agua esterilizada (agua

inyectable, libre de pirógenos, PiSa) o metoctramina (MTC, 20 ng/0.5 µL), los cuales fueron administrados en 30 segundos. Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del estro esperado.

Como grupo de comparación se utilizaron ratas cíclicas, sin tratamiento, sacrificadas en la mañana del estro vaginal. Todos los animales se sacrificaron en una cámara con cloroformo en la mañana del estro esperado.

Experimento 3. Efecto del reemplazo de las señales hipotalámica, hipofisaria y ovárica en animales que no ovularon por la micro-inyección de metoctramina en la bursa del ovario izquierdo

Grupos de ratas (manipulados experimentalmente de igual manera que en el experimento 2) que no ovularon por la micro-inyección de agua o de metoctramina en la bursa del ovario izquierdo, se dividieron al azar para ser inyectados en la siguiente forma:

- 3.7 µg/kg peso de LHRH-Gly sintética (Zigma Aldrich, México) a las 14:00 h del proestro esperado del ciclo tratado,
- 25 UI hCG(Gonadotropina Coriónica humana) a las 14:00 h del proestro esperado del ciclo tratado o
- 10 µg de BE (benzoato de estradiol) a las 14:00 h del diestro-2 esperado del ciclo tratado.

Todos los animales se sacrificaron en una cámara letal con cloroformo en la mañana del estro esperado.

Análisis Estadístico

Los resultados del número de animales que ovularon con respecto al total de animales tratados, se analizó por la prueba de la probabilidad exacta de Fisher. El número de ovocitos liberados por cada ovario y los totales (los liberados por los dos ovarios) por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los datos del peso de los ovarios y del útero fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey.

En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis de datos paramétricos se realizó por medio de la prueba de “t” de Student (peso de ovarios y útero), mientras que los no paramétricos (número de ovocitos liberados) por la prueba de “U” de Mann-Whitney. En todas las pruebas estadísticas se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue ≤ 0.05 .

RESULTADOS

1.- Efectos de la anestesia inducida a las 13:00 h del diestro-1, sobre la ovulación

Porcentaje de animales ovulantes

Dado que la anestesia en diestro-1 provocó el bloqueó la ovulación, se procedió a estudiar cual de las “señales” endócrinas fue modificada por el anestésico. El reemplazo de la “señal hipotalámica” indujo la ovulación en un animal (1/8 vs. 0/8). La administración de hCG (“señal hipofisaria”) provocó la ovulación en todos los animales tratados (8/8 vs. 0/8, $p < 0.001$), mientras que la inyección de benzoato de estradiol (“señal ovárica”) indujo la ovulación en el 50% de los animales (4/8 vs. 0/8, no significativa).

Peso de ovarios y útero

El reemplazo de la “señal hipotalámica” e “hipofisaria” en animales anestesiados en diestro-1 resultó en el aumento del peso de los ovarios, pero no del peso del útero (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo, del ovario derecho y del útero en la mañana del estro esperado de animales inyectados con Ketamina-Xilazina a las 13:00 h de cada fase del ciclo estral y con posterior reemplazo hormonal de LHRH o hCG a las 14:00 h del Proestro, o BE a las 14:00 del Diestro-2.

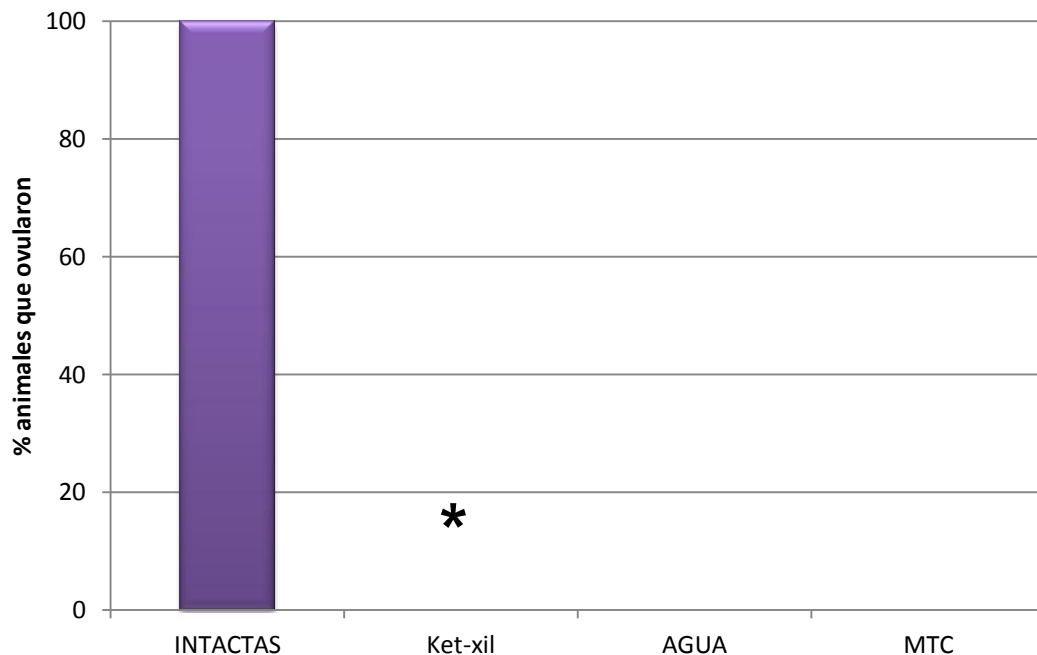
GRUPO EXPERIMENTAL		PESO (mg/100 g peso corporal)		
DÍA DEL CICLO	TRATAMIENTO	OI (TRATADO)	OD (NO TRATADO)	ÚTERO
INTACTAS		13.4 \pm 1.3	17.2 \pm 1.9	181.7 \pm 10.3
DIESTRO-1	<i>Ket-xilazina</i>	15.3 \pm 2.0	14.033 \pm 1.9	202.11 \pm 16.4
	<i>ket-xil+LHRH</i>	22.6 \pm 1.2*	19.5 \pm 1.4*	179.7 \pm 16.1
	<i>ket-xil+hCG</i>	20.2 \pm 3.1*	21.1 \pm 1.6*	179.5 \pm 20.6
	<i>ket-xil+BE</i>	14.0 \pm 1.3	16.6 \pm 1.8	181.7 \pm 10.3

* $p < 0.05$ vs. Ket-xilazina (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

1.2.- Efectos de la micro-inyección de agua o de metoctramina (MTC) en el ovario izquierdo, realizada en diestro-1

Porcentaje de animales ovulantes

La micro-inyección de agua ó MTC en el ovario izquierdo a las 13:00 h del diestro-1 no modificó el porcentaje de animales ovulantes con respecto al grupo inyectado con la ketamina-xilazina (Gráfica 2).

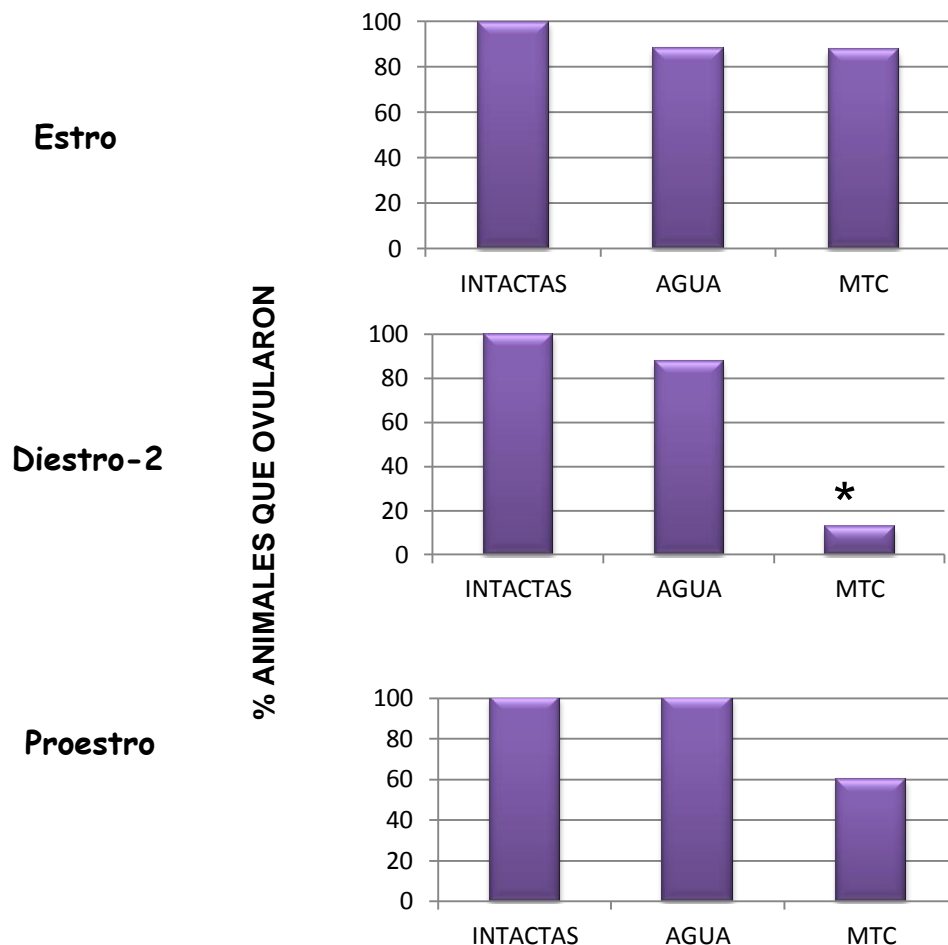


Gráfica 2. Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado después de la inyección subcutánea de Ketamina-Xilazina o la micro-inyección de agua o de metoctramina (MTC) en el ovario izquierdo a las 13:00 h del diestro-1 * $p < 0.05$ vs. intacto (Prueba de la probabilidad Exacta de Fisher).

1- Efectos de la micro-inyección de agua o metoctramina (MTC) en la bursa del ovario izquierdo a las 13:00 h del estro, diestro-2 o del proestro

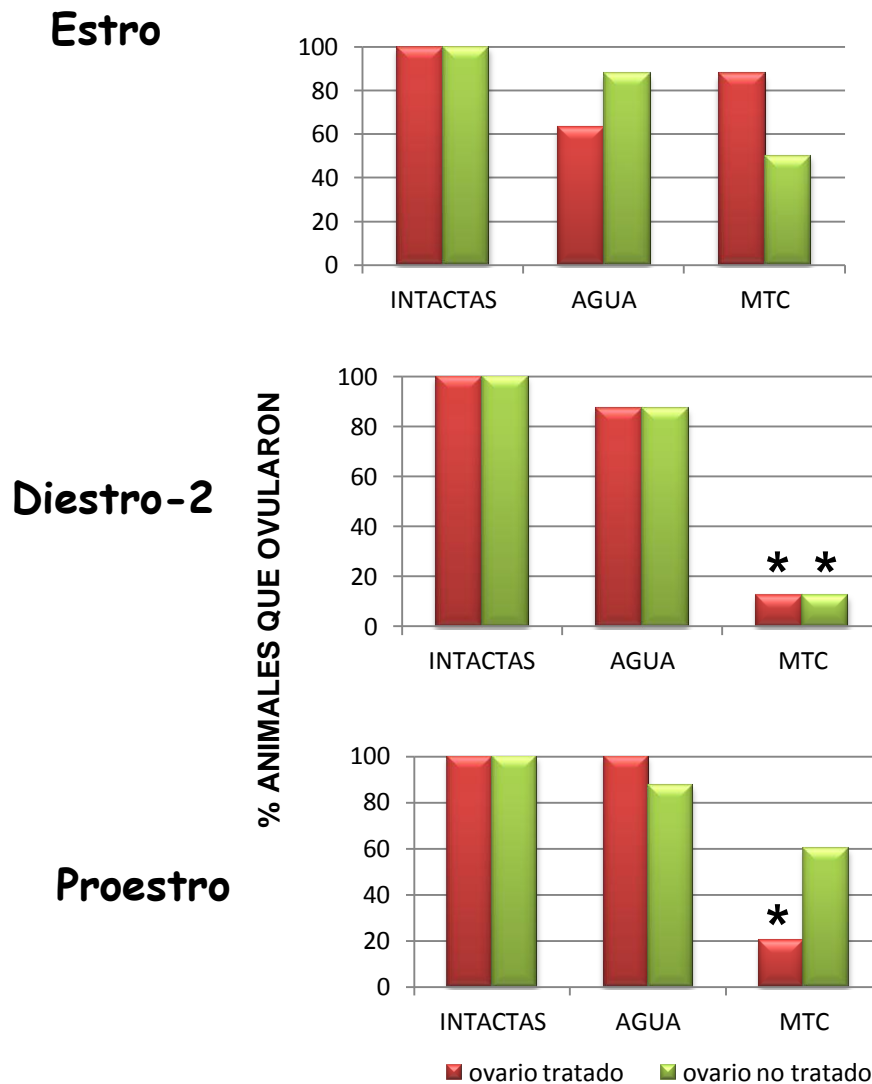
Porcentaje de animales ovulantes.

Con respecto a los animales intactos, la micro-inyección de agua no modificó el porcentaje de animales que ovularon en el estro esperado. En la fase de estro y proestro, la micro-inyección de MTC en el ovario izquierdo no modificó el porcentaje de animales ovulantes total con respecto a los grupos de animales inyectados con agua. En la fase del diestro-2 la micro-inyección de MTC en el ovario izquierdo provocó disminución el porcentaje de animales ovulantes (Gráfica 3).



Gráfica 3. Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado después de la micro-inyección de agua o de metoctramina (MTC) en el ovario izquierdo a las 13:00 h del estro, diestro-2 o proestro. * $p < 0.05$ vs. agua (Prueba de laprobabilidad exacta de Fisher).

La Gráfica 4 muestra los efectos del agua o de la MTC en el ovario tratado (ovario izquierdo) y la respuesta del no tratado (ovario derecho). En el día del **estro** la micro-inyección de agua no provocó cambios en el número de animales que ovularon del ovario tratado o del no tratado, comparado con el grupo de animales intactos. En **diestro-2**, la micro-inyección de MTC redujo el número de ratas que ovularon por ambos ovarios, comparado con el grupo micro-inyectado con agua. En **proestro**, la micro-inyección de MTC provocó disminución del porcentaje de animales ovulantes por el ovario tratado comparado con el grupo micro-inyectado con agua.



Gráfica 4. Porcentaje de animales que ovularon del ovario izquierdo (tratado) y del ovario derecho (no tratado) en el día del estro esperado después de la micro-inyección de agua o de metocetramina (MTC) en el ovario izquierdo a las 13:00 h del estro, diestro-2 y proestro.

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

Número de ovocitos liberados

En el día del estro la micro-inyección de MTC provocó disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario no tratado comparado con el grupo intacto. Con la micro-inyección de agua en el día del diestro-2 no hubo modificaciones mientras que, con la micro-inyección de MTC solo un animal ovuló. En el día del proestro la micro-inyección de MTC provocó disminución el número de ovocitos liberados en ambos ovarios, con respecto al grupo micro-inyectado con agua (Tabla 2).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, el ovario derecho y el número de ovocitos totales liberados en la mañana del estro esperado de animales intactos, micro-inyectados con Agua o MTC a las 13:00 h del estro, diestro-2 y proestro.

GRUPO EXPERIMENTAL		NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS		
DÍA DEL CICLO	TRATAMIENTO	OVARIO IZQUIERDO (TRATADO)	OVARIO DERECHO (NO TRATADO)	OVOCITOS TOTALES
INTACTAS		5.25 \pm 0.7	6.5 \pm 0.9	11.7 \pm 0.8
ESTRO	AGUA DESTILADA	3.7 \pm 1.2	6 \pm 1.2	9.25 \pm 1.8
	MTC	6.1 \pm 1.1	3.4 \pm 0.6*	8.4 \pm 1.6*
D2	AGUA DESTILADA	5.3 \pm 0.5	4.6 \pm 1.0	8.6 \pm 1.6
	MTC	(7)	(9)	(13)
PROESTRO	AGUA DESTILADA	5.5 \pm 1.4	5.4 \pm 0.9	11 \pm 1.9
	MTC	2.2 \pm 1.4*	3.3 \pm 0.5*	4.1 \pm 1.5*

* $p < 0.05$ vs. agua (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn).

() Número de ovocitos liberados por 1 animal

Peso de ovarios y útero

La Tabla 3 muestra los efectos de la micro-inyección de agua o de MTC sobre el peso de los ovarios y del útero. En el estro, la micro-inyección de agua no modificó el peso de los ovarios pero disminuyó el del útero. En cambio, la MTC resultó en el aumento del peso del ovario no tratado comparado con el grupo micro-inyectado con agua. En proestro, la micro-inyección de agua incrementó el peso de los ovarios, pero disminuyó el del útero comparado con el grupo de animales intactas. En cambio, la MTC provocó disminución del peso de los ovarios y aumentó el del útero con respecto al grupo con agua.

Tabla 3. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo (tratado), del ovario derecho (no tratado) y del útero en la mañana del estro esperado de animales intactos, o micro-inyectados con agua destilada o metoctramina (MTC) en el ovario izquierdo, a las 13:00 h de del estro, diestro-2 y proestro.

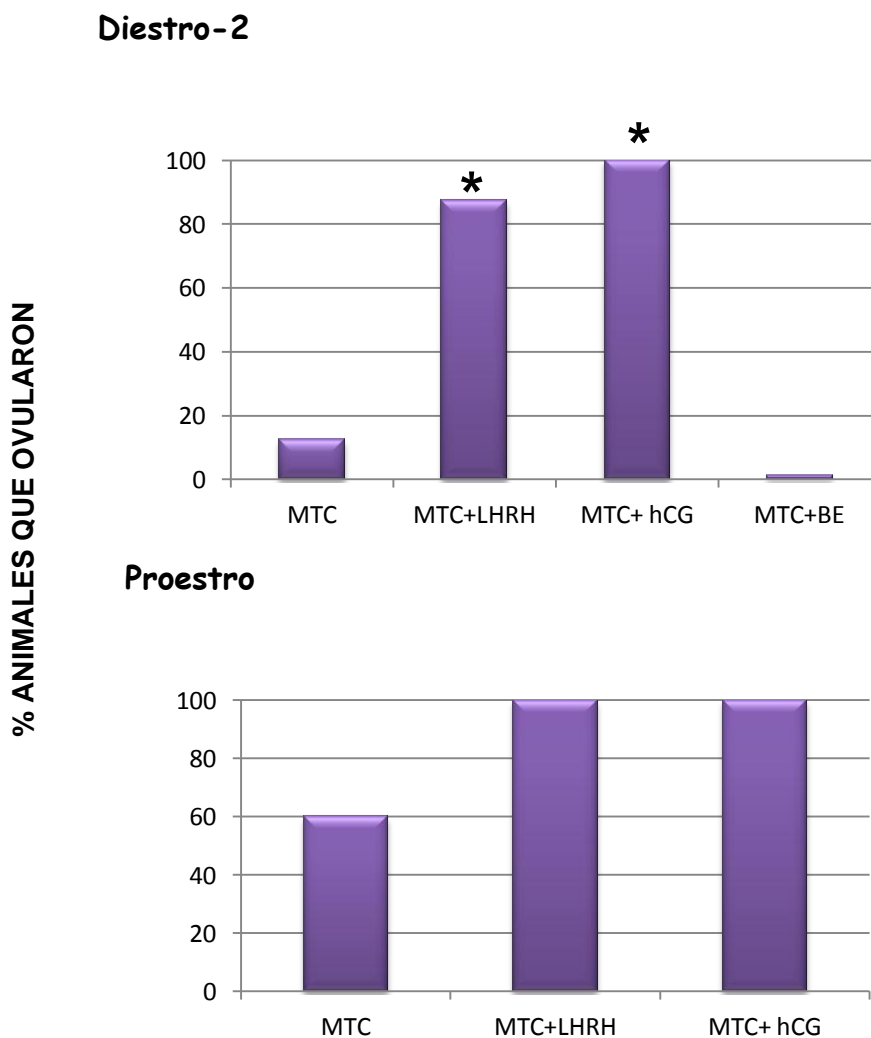
GRUPO EXPERIMENTAL		PESO (mg/100 g peso corporal)		
DÍA DEL CICLO	TRATAMIENTO	OVARIO IZQUIERDO (TRATADO)	OVARIO DERECHO (NO TRATADO)	ÚTERO
INTACTAS		13.4 \pm 1.3	17.2 \pm 1.9	181.7 \pm 10.3
ESTRO	AGUA DESTILADA	13.6 \pm 0.6	14.2 \pm 0.8	138.1 \pm 3.9 *
	MTC	15.5 \pm 2.3	28.2 \pm 2.8 **	146.5 \pm 7.4
D2	AGUA DESTILADA	13.7 \pm 0.3	16.4 \pm 1.4	162.5 \pm 8.7
	MTC	12.1 \pm 0.9	17.1 \pm 2.7	180.6 \pm 10.3
PROESTRO	AGUA DESTILADA	20.4 \pm 2.7 *	22.0 \pm 1.9 *	140.1 \pm 5.8 *
	MTC	14.1 \pm 1.9 **	14.2 \pm 1.0 **	162.0 \pm 11.7 **

* $p < 0.05$ vs. intacta; ** $p < 0.05$ vs. Agua destilada (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

Experimento 2. Efecto del reemplazo de las señales hipotalámica, hipofisaria u ovárica en animales que no ovularon por la micro-inyección de agua o metocramina en la bursa del ovario izquierdo

Porcentaje de animales ovulantes

Con respecto a los animales micro-inyectados con MTC a las 13:00 h del diestro-2 o del proestro, el reemplazo de la señal hipotalámica (LHRH-Gly sintética) o la señal hipofisaria (hCG) indujo la ovulación. Por el contrario, el reemplazo de la señal ovárica no indujo la ovulación (Gráfica 5)



Gráfica 5. Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado después de la micro-inyección de metocramina (MTC) en el ovario izquierdo a las 13:00 h de Diestro-2 o Proestro, por la inyección de LHRH, hCG o BE * $p < 0.05$ vs. MTC (Prueba de la Probabilidad exacta de Fisher).

Número de ovocitos liberados

En el caso del grupo de animales micro-inyectados con MTC a las 13:00 h del proestro, observamos que el reemplazo de la señal hipotalámica aumentó el peso de ambos ovarios, mientras que el reemplazo de la señal hipofisaria lo disminuyó (Tabla 4).

El reemplazo de la señal hipotalámica o hipofisaria en animales con bloqueo de los receptores M₂ en **diestro-2** no afectó el número de ovocitos liberados con respecto a los animales micro-inyectados con agua. En cambio, en **proestro**, el reemplazo de la señal hipotalámica o hipofisaria provocó aumento del número de ovocitos liberados comparado con el grupo micro-inyectado con MTC (Tabla 4).

Tabla 4. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos del ovario izquierdo, del ovario derecho y el número de ovocitos totales liberados en la mañana del estro esperado de animales intactos, micro-inyectados con Agua o MTC a las 13:00 h del día del diestro-2 o del proestro y con reemplazo de la señal hipotalámica (LHRH), hipofisaria (hCG) a las 14:00 h del Proestro, o de la señal ovárica (BE) a las 14:00 del Diestro-2.

GRUPO EXPERIMENTAL		NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS		
DÍA DEL CICLO	TRATAMIENTO	OI (TRATADO)	OD (NO TRATADO)	OVOCITOS TOTALES
DIESTRO-2	AGUA DESTILADA	5.3 \pm 0.5	4.6 \pm 1.0	8.6 \pm 1.6
	MTC	7	9	16
	MTC+LHRH	4.6 \pm 0.6	3.9 \pm 0.6	7.4 \pm 1.4
	MTC+hCG	4.8 \pm 0.8	4.9 \pm 0.9	9.8 \pm 1.2
	MTC+BE	(0,2)	(3,4)	(3, 6)
PROESTRO	AGUA DESTILADA	5.5 \pm 1.4	5.4 \pm 0.9	11 \pm 1.9
	MTC	2.2 \pm 1.4	3.3 \pm 0.5	4.1 \pm 1.5
	MTC+LHRH	5.6 \pm 0.8*	5.3 \pm 0.8*	11.2 \pm 1.5*
	MTC+hCG	5.4 \pm 1.1*	5.0 \pm 0.9*	10.4 \pm 1.7*

* p<0.05 vs. MTC (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn)

() Número de ovocitos liberados por 2 animales

Peso de ovarios y útero

Cuando se realizó el reemplazo de la “señal hipotalámica” y de la “señal hipofisaria” a animales micro-inyectados con MTC a las 13:00 h en el diestro-2, provocó la disminución del peso del útero. El reemplazo de la “señal ovárica” aumentó el peso del ovario tratado y disminuyó el del ovario no tratado comparado con el grupo micro-inyectado con MTC sin reemplazo hormonal (Tabla 5).

En el caso del grupo de animales micro-inyectados con MTC a las 13:00 h del proestro, observamos que el reemplazo de la señal hipotalámica aumentó el peso de ambos ovarios con respecto al grupo tratado con MTC, pero cuando se compara con el grupo tratado con agua, el peso del ovario izquierdo aumenta (26.3 ± 3.1 vs. 20.4 ± 2.7 , $p < 0.05$) y no se modifica el derecho (23.8 ± 1.6 vs. 22.0 ± 1.9 , ns). El reemplazo de la señal hipofisaria también aumenta el peso de los ovarios con respecto a los tratados con MTC (Tabla 5).

Tabla 5. Media \pm e.e.m. del peso del ovario izquierdo, del ovario derecho y del útero en la mañana del estro esperado de animales intactos, o micro-inyectados con agua destilada o con metoctramina (MTC) en el *ovario izquierdo*, a las 13:00 h del diestro-2 o proestro y con reemplazo de la señal hipotalámica (LHRH), hipofisaria (hCG) a las 14:00 h del Proestro, o de la señal ovárica (BE) a las 14:00 del Diestro-2.

GRUPO EXPERIMENTAL		PESO (mg/100g peso corporal)		
DÍA DEL CICLO	TRATAMIENTO	OI (TRATADO)	OD (NO TRATADO)	ÚTERO
DIESTRO-2	MTC	12.1 \pm 1.0	17.1 \pm 2.7	180.6 \pm 10.3
	MTC+LHRH	16.3 \pm 1.4	12.1 \pm 1.0	146.7 \pm 8.2*
	MTC+hCG	14.1 \pm 1.9	15.2 \pm 0.7	155.2 \pm 5.9*
	MTC+BE	23.3 \pm 4.8*	13.8 \pm 1.4*	188.9 \pm 7.5
PROESTRO	MTC	14.1 \pm 1.9	14.2 \pm 1.0	162.0 \pm 11.7
	MTC+LHRH	26.3 \pm 3.1*	23.8 \pm 1.6*	142.3 \pm 19.9
	MTC+hCG	18.7 \pm 1.6*	18.6 \pm 2.2*	149.1 \pm 12.7

* $p < 0.05$ vs. MTC (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con base en los resultados obtenidos sugerimos que el ovario izquierdo contiene RM₂, los que al ser activados por su ligando (ACh) regulan la secreción fásica de la “señal hipotalámica” del día del proestro, así como la liberación del ovocito; funciones que depende del día del ciclo estral.

En el día del **diestro-2** el bloqueo de los RM₂ regula de manera inhibitoria la secreción preovulatoria de la GnRH, ya que la administración de LHRH-gly indujo la ovulación (Esquema 1). Estos resultados fortalecen el planteamiento de la existencia de una vía de comunicación entre el ovario izquierdo y el hipotálamo. Tóth y colaboradores (2007) y Gerendai y colaboradores (2009), mostraron la posible ruta de comunicación entre los ovarios y el sistema nervioso central, que involucra a neuronas del ganglio nodoso, del bulbo ventro-lateral, del núcleo gigante-celular y para-gigante-celular, del núcleo del tracto solitario, del complejo vagal, de las células del grupo A1 y A5, del rafé caudal, del núcleo para-ventricular hipotalámico y del hipotálamo lateral.

En esta fase del ciclo, la ACh por medio de los RM₂ no parecen modificar el desarrollo de los folículos, ya que no se alteró el peso de los ovarios. Esta propuesta es respaldada porque al administrar hCG a los animales tratados con la MTC en el ovario izquierdo, todos los animales ovularon, y tanto el número de ovocitos liberados como el peso de los ovarios fueron semejantes al de un animal intacto (Esquema 1).

Dado que no se restableció la ovulación por la inyección de BE, sugerimos que el bloqueo de la ovulación, resultado de la falta de la señal hipotalámica en el día del proestro, no es por ausencia de la señal ovárica, sino por alteraciones en la expresión de receptores a estrógenos en el hipotálamo. La inyección subcutánea de sulfato de atropina a las 09:00 h del diestro-2 disminuye la expresión del ARNm del receptor a estrógenos α y β en POA-AHA derecha, a las 4 y 26 horas después del tratamiento (Velazco, 2013) (Esquema 1).

Con base en los resultados obtenidos sugerimos que en el día del **proestro** la ACh unida a los RM₂ del ovario izquierdo regula la sensibilidad de los folículos de este ovario a la LH, ya que cuatro horas después de bloquear los RM₂ con la MTC, en condiciones normales, en esta cepa de ratas la secreción preovulatoria de LH ocurre a las 17:00 h del proestro (Domínguez-González y col., 1998) (Esquema 2).

Aún cuando el ovario derecho no fue manipulado, el 40% de los animales no ovularon de éste ovario, y en los que lo hicieron (60%), éste ovario liberó menos ovocitos y disminuyó su peso. Estos resultados nos llevan a sugerir que la comunicación funcional entre un ovario y otro ocurriría por medio de los RM₂ (Esquema 2).

Mayerhofer y Fritz (2002), y Fritz y colaboradores (1999) sugieren que la ACh actúa como un factor trófico/mitogénico en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios y de los cuerpos lúteos. Con base en este planteamiento y nuestros resultados sugerimos que la ACh a través del RM₂ regula el proceso de crecimiento y diferenciación de los folículos en la tarde del proestro, ya que el tratamiento con MTC en el ovario izquierdo, el número de ovocitos liberados y del peso de los ovarios disminuyeron.

Dado que el 60% de las ratas tratadas con la MTC ovularon, no podemos pensar que el bloqueo de los RM₂ provocara la alteración en la secreción de la GnRH y la LH, por lo que sugerimos que la ACh por medio de estos receptores estaría regulando la sensibilidad de los folículos a la LH y a la FSH, ya que el remplazo de una y otra señal endócrina provocó el aumento del número de ovocitos liberados y del peso de los ovarios a valores semejantes a los animales tratados con agua.

Es posible que el bloqueo de los RM₂ del ovario izquierdo modifiquen la sincronización entre la secreción de la GnRH (en forma y tiempo) y la diferenciación y el crecimiento de los folículos, por lo que al remplazar la GnRH y la LH en las ratas tratadas con MTC aumente el número de ovocitos liberados y el peso de los ovarios. Es decir, que la ACh por medio del RM₂ regula la velocidad de crecimiento de los folículos preovulatorios, ya que la ACh es sintetizada por las células de la granulosa de folículos preovulatorios (Mayerhofer y Fritz, 2002).

No tenemos una explicación al aumento del peso de los ovarios por la inyección de agua en el ovario izquierdo, sin embargo suponemos que este efecto no es por la cantidad de agua inyectada (0.5 µL), sino por un daño al epitelio de la bursa, a un cambio en la presión osmótica de su cavidad y en la concentración de fluidos, a una alteración a las fibras nerviosas que recibe (que serían específicas en este día del ciclo estral) o todas a la vez. Martin y colaboradores (1981) señalan que la función de la bursa ovárica es regular la presión osmótica y la concentración de fluidos de su cavidad. El daño provocado al tejido de la bursa podría desencadenar la reacción clásica a una lesión, y de esta forma secretarse factores de crecimiento o citocinas que alteren la dinámica del compartimento folicular, del luteal o del intersticial, por ejemplo, el factor de diferenciación del crecimiento 9 (GDF-9) es un

miembro de la super-familia de los factores de crecimiento β (TGF β), el cual estimula el crecimiento de folículos primordiales (Wu y col., 2004).

Este efecto provocado por el vehículo es invertido por la MTC, es decir disminución del peso de los ovarios y aumento del peso del útero, lo que sugiere que uno de estos eventos estaría vinculado con el RM₂.

En el día del **estro**, el bloqueo de los RM₂ no modifican las funciones del ovario izquierdo (el inyectado), pero sí las del contralateral, lo que sugiere que la comunicación inter-ovárica sería del ovario izquierdo hacia el derecho, por medio de los RM₂ (Esquema 3).

Dado que en los animales tratados con la MTC, el número de ovocitos liberados por el ovario derecho disminuyó, pero aumentó su peso, sugerimos que en condiciones normales el ovario izquierdo envía una señal estimulante del crecimiento de los folículos, que es activada al unirse la ACh con los RM₂.

A la fecha no tenemos una respuesta al aumento del peso del útero en los animales tratados con la MTC en proestro o en estro.

En la fase del **diestro-1** la anestesia bloqueó la ovulación, como fue mostrado previamente por Min-Poblete y colaboradores (2011). Dado que la inyección de LHRH sintética a las 14:00 h del proestro esperado no restableció la ovulación en los animales anestesiados, sugerimos que este anestésico no altera la secreción preovulatoria de la GnRH. La ketamina es captada rápidamente por el cerebro (Reich y Silvay, 1989; Hirota y Lambert, 1996), y en él actúa como un antagonista no competitivo de los receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA) (Branson, 2003), lo que inhibe la función del glutamato en la célula blanco. El glutamato es uno de los neuro-moduladores que estimulan la secreción de la GnRH (Herbison, 2006), pero se desconoce si estos receptores cambian durante el ciclo estral de la rata. Sin embargo, en esta fase específica del ciclo (diestro-1), la cantidad o la afinidad de los receptores NMDA sean las mínimas, por lo que en esta fase del ciclo estos receptores no parecerían alterar la secreción fásica del decapéptido.

Con base en los resultados obtenidos sugerimos que la mezcla de ketamina-xilazina actúa en la hipófisis, bloqueando la liberación preovulatoria de la LH, ya que su remplazo indujo la ovulación en todos los animales tratados.

Una respuesta fisiológica del 50% ante un tratamiento experimental, está vinculada a la sensibilidad del individuo. Un ejemplo de lo anterior, es la inducción de la ovulación en el 50% de las ratas anestesiadas e inyectadas con benzoato de estradiol.

Es posible que la falta de una señal nerviosa (como glutamato, serotonina, dopamina o noradrenalina) (González y Pereira, 2002; Branson, 2003) alteren la síntesis de receptores a estrógenos, por lo que la dosis inyectada de benzoato de estradiol no indujo la ovulación de todos los animales.

El aumento del peso de los ovarios en los animales anestesiados con remplazo de la señal hipotalámica, nos llevan a deducir que este efecto es resultado de la permanencia de los folículos preovulatorios que podrían haber ovulado, en un efecto estimulante del crecimiento de los folículos o ambos. Para el caso de los animales anestesiados y remplazo de la señal hipofisiaria, el aumento del peso de los ovarios se explicaría por un mayor número de folículos en crecimiento, como resultado de una adecuada secreción de FSH, ya que se ha mostrado que el desarrollo folicular es regulado por la presencia de la FSH y sus receptores (McGee y col., 1997).

CONCLUSIONES

El bloqueo de los RM₂ del ovario izquierdo altera la ovulación (porcentaje de animales ovulantes y número de ovocitos liberados), el peso de los ovarios y del útero de manera diferente en cada fase del ciclo estral.

☞ En el estro, el bloqueo de los RM₂ no modificó el porcentaje de animales ovulantes, pero el número de ovocitos liberados por el ovario derecho disminuyó.

☞ En el diestro-2, el bloqueo de los RM₂ inhibió la ovulación, sin modificar el peso de los ovarios y del útero.

☞ En el proestro, el bloqueo de los RM₂ interrumpió la ovulación en el ovario izquierdo, aumentó el peso de ambos ovarios y disminuyó el peso del útero.

Respecto al reemplazo de la señal hipotalámica, la señal hipofisaria y la señal ovárica planteamos que:

☞ En el estro, la activación de los RM₂ del ovario izquierdo por la ACh regula de manera estimulante el número de ovocitos liberados por el ovario derecho.

☞ En el diestro-2, la ACh a través de los RM₂ estimula la secreción preovulatoria de la GnRH.

☞ En la fase del proestro, la ACh unida a los RM₂ del ovario izquierdo regula la sensibilidad de los folículos de este ovario y el contra-lateral a la LH, lo que manifiesta una comunicación reguladora del ovario izquierdo al derecho, por medio de la activación de estos receptores.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ **Anderson CR**, Kesner JS, Convey EM. (1981). Evidence that estradiol induces the preovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LH-RH and then increasing LH-RH release. *Endocrinol*; 108:1386.
- ❖ **Arimura A**. (2000). Hypothalamic hormones. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*, Editores: Conn PO, Freeman ME. Human Press Inc. Cap. 3. p. 41-58.
- ❖ **Bajo JM**, Coroleu B. (2009). *Fundamentos de Reproducción*. Editorial Médica Panamericana. p. 17.
- ❖ **Baljet B**, Drukker J. (1979). The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Act Anat*, 104:243–267.
- ❖ **Bassett DL**. (1943). The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am J Anat*, 73: 251-291.
- ❖ **Batra S**, Popper LD, Losif CS. (1993). Characterization of muscarinic cholinergic receptors in human ovaries, ovarian tumours and tumour cell lines. *Eur J Cancer*; 29: 1302-1306.
- ❖ **Benedetti WL**, Lozdziejsky R, Sala MA, Monti JM, Grino E. (1969). Blockade of ovulation after atropine implants in the lateral hypothalamus of the rat. *Experientia*; 25:1158-1159.
- ❖ **Bergman RA**, Afifi AK, Heider PM. (1998). *Sistema Reproductor Femenino*. En: *Histología*, Editorial McGraw-hill Interamericana. México. Cap. 16. p.307-320.
- ❖ **Berthoud HR**, Powley TL. (1996). Interaction between parasympathetic and sympathetic nerves in prevertebral ganglia: morphological evidence for vagal efferent innervation of ganglion cells in the rat. *Micros Res Tech*; 35:80–86.
- ❖ **Bleier WJ**, Ehteshami M. (1981). Ovulation following unilateral ovariectomy in the California leaf-nosed bat (*Macrotus californicus*). *J Reprod Fertil*; 63:181–183.
- ❖ **Bonner TI**, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Sci* 237: 527-532.
- ❖ **Bonner TI**. (1989). New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*; 10:11-15.

- ❖ **Branson K.** (2003). Anestésicos inyectables. En Farmacología y Terapéutica veterinaria. Editor Adams HR. Segunda edición (Octava inglesa) Zaragoza (España). Acribia. p. 225-281.
- ❖ **Brown RE.** (1994). The pituitary gland and its hormones. En: Introduction to neuroendocrinology. Cambridge, University Press. p. 30-39.
- ❖ **Burden HW.** (1978). Ovarian innervation. En: The vertebrate ovary. Competitive biology and evolution. Editor: Jones RE. New York: Plenum Press. p. 615-638.
- ❖ **Burden HW.** (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: Catecholamines as Hormone Regulators. Editores: Ben-Jonathan N, Bahr JR, Weine RI. New York Raven Press. p. 261-278.
- ❖ **Burden HW, Leonard M, Smith CO, Lawrence JE.** (1983). The sensory innervations of the ovary: A horseradish peroxidase study in the rat. *Anat Rec*; 207(4): 623-627.
- ❖ **Calka J, Mc Donald JK, Ojeda SR.** (1988). The innervation of immature rat ovary by calcitonin gene related peptide. *Biol of Rep*; 39: 1215-1223.
- ❖ **Carlson BM.** (1999). Embriología humana y Biología del Desarrollo. Cuarta edición. Editorial Elsevier, Amsterdam. Cap. 1, 16 p. 3-13, 416-428.
- ❖ **Carmel PW, Araki S, Ferin M.** (1988). Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: Evidence for pulsatile release of gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Endocrinol*; 99:243-248.
- ❖ **Chávez R, Cruz ME, Domínguez R.** (1987). Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi-and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J Endocrinol*; 113: 197-401.
- ❖ **Chen A, Yahalom D, Ben-Aroya N, Kaganovsky E, Okon E, Koch Y.** (1998). A second isoform of gonadotropin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS. Letters*; 453:199-203.
- ❖ **Combamous Y.** (1988). Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod nutr Develop* 28,211-228. En: Biotecnología de la reproducción Ediciones Del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Primera edición. p. 38-41.
- ❖ **Cruz M E, Villegas G, Domínguez-González A, Chavira R, Domínguez R.** (2001). Ovulation delay induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior-hypothalamic area of the rat. *Brain Res Bull*; 54:339-344.

- ❖ **Cruz ME**, Alvarado BE, Hernández GC, Santiago MI, Zárate A, Chavira R, Flores A, Domínguez R. (2012). Spontaneous ovulation in both ovaries depends on the stimulation of m1 muscarinic receptors of the left ovary. New Orleans. USA, Octubre 13-17, Poster Sesion 90.01. Poster RR8 SfN, 2012.
- ❖ **Dissen GA**, Ojeda SR. (1999). Ovarian innervation. En: Encyclopedia of reproduction. Editores: Knobil E, Neill J. USA: Academic Press;3: 583-589.
- ❖ **Domínguez R**, Cruz ME, Chávez R. (1991). Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Programa Universitario de Investigación en Salud. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. p. 163-181.
- ❖ **Domínguez R**, Gaitán CM, Méndez SA, Ulloa-Aguirre A. (1987). Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *J Endocrinol*; 113:37-44.
- ❖ **Domínguez R**, Morales L, Cruz ME. (2003). Ovarian asymmetry. *Rev Biomed Sci*; 5:95-104.
- ❖ **Domínguez R**, Riboni L, Zipitría D, Revilla R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *J Endocrinol*; 95:175–180.
- ❖ **Domínguez R**, Cruz ME, Chávez T. (1988). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: Growth factors and the ovary. Editor A. Hirshfield. Plenum Press. Nueva York. p. 321-325.
- ❖ **Domínguez-González A**, Damian-Matsumura P, Timossi C, Cruz ME, Domínguez R. (1998). Characterization of monoamine neural activity in the preoptic anterior hypothalamic area and medial basal hypothalamus in rats during the day of proestrus and its relation to gonadotrophin and sexual steroid hormone plasma levels. *Med Sci Res*; 26: 275-278.
- ❖ **Egozi Y**, Kloog Y, Sokolovsky M. (1986). Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrous cycle. *Brain Res*; 383:389-405.
- ❖ **Eisenberg E**, Kita H, Kobagash Y, Santulli R, Wallace E. (1984). Gonatropin-releasing hormone. Effects on the vitro perfused rabbit ovary. *Biol Reprod*; 30:1216-1221.
- ❖ **Erickson GF**. (1982). Follicular maturation and atresia. In Flamigni C. Givens JR. The gonadotropins: Basic Science and Clinical Aspects in Females. New York. Academic Press. p. 177-182.

- ❖ **Erickson GF.** (1983). The endocrine control of follicle androgen biosynthesis. *J. Steroid Biochem*; 19: 113-117.
- ❖ **Espey LL,** Richards JS. (2006). Ovulation. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: Knobil E, Neill JD. Quinta edición. New York. Raven Press. p. 425–500.
- ❖ **Espey LL.** (1978). Ovulation In *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*. Editor: Jones RE. Plenum Press, New York. p. 503-532.
- ❖ **Everett JW** (1964). Central neural control of reproductive functions of adenohypophysis. *Phys Rev*; 44; 373-431.
- ❖ **Everett JW.** (1945). The microscopically demonstrable lipids of cyclic corpora lutea in the rat. *Am. J. Anat*; 77, 293-323.
- ❖ **Everett, JW,** Sawyer, CH. (1950). A 24-hour periodicity in the LH-release apparatus of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinol*; 47: 198-218.
- ❖ **Fawcett DW.** (1995). *Tratado de histología*. Duodécima edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid. p. 885-893.
- ❖ **Freeman ME.** (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: Knobil E, Neill JD. Raven Press, Ltd., New York, 2:613–658.
- ❖ **Fritz S,** Föhr KJ, Boddien S, Berg U, Brucker C, Mayerhofer A. (1999) Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*; 84: 1744-1750.
- ❖ **Fritz S,** Kunz L, Dimitrijevic N, Grunert R, Heiss C, Mayerhofer (2002). Muscarinic receptors in human luteinized granulosa cells: activation blocks gap junctions and induces the transcription factor early growth response factor-1. *J Clin Endocrinol Metab*; 87: 1362-1367.
- ❖ **Fritz S,** Wessler R, Breitling W, Rossmann SR, Ojeda GA, Dissen A, Amsterdam A, Myerhofer A. (2001). Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence from non neuronal acetylcholine synthesis. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 349-353.
- ❖ **Gal B,** López M, Martín AI, Prieto J. (2007). *Bases de la Fisiología*. Ed. Tebar. Madrid, p. 489.

- ❖ **Geneser F.** (2000). Órganos de la Reproducción. En: Histología sobre Bases Biomoleculares. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 22 p. 613-638.
- ❖ **Gerendai I, Halász B.** (1997). Neuronendocrine asymmetry. *Neuroendocrinol*; 18: 354-381.
- ❖ **Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Halász B** (2009). Recent findings on the organization of central nervous system structures involved in the innervation of endocrine glands and other organs: observations obtained by the transneuronal viral double-labeling technique. *Endocrine*; 36: 179-188.
- ❖ **Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B.** (1998). Neurononal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinol*; 68: 244-256.
- ❖ **Gilbert RF, Emson PC, Fahrenkrug J, Lee CM, Penman E, Wass J.** Axonal transport of neuropeptides in the cervical vagus nerve of the rat. *J Neurochem*; 34(1):108–113.
- ❖ **Gilman AG.** (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*; 56: 615–649.
- ❖ **Goldfien A, Monroe SE.** (2000). Ovarios. Endocrinología básica y Clínica. Editorial El Manual Moderno. p. 497-554.
- ❖ **González A, Camello PJ, Pariente JA, Salido GM.** (1997). Free cytosolic calcium levels modify intracellular pH in rat pancreatic acini. *Biochem Biophys Res. Commun*; 230: 652–656.
- ❖ **González CA, Pereira EJ.** (2002). SNC. Anestésicos generales inyectables. En Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Editores: Botana LM, Landoni F, Martín-Jiménez T. Editorial MacGraw Hill. Interamericana. Madrid, España. p. 195-207
- ❖ **Goodman RL, Parfitt DB, Evans NP, Dahl GE y Karsh FJ.** (1995). Endogenous opioid peptides control the amplitude and shape of gonadotropin-releasing hormone amplitude in the ewe. *Neuroendocrinol*; 52: 382-388.
- ❖ **Gore-Langton RE, Armstrong DT.** (2006). Follicular Steroidogenesis and its control. En: The physiology of Reproduction. Editores: Knobil E, Neill JD. Segunda edición. Editorial Raven Press, New York. Vol. 2. Cap 12 p. 629-724.

- ❖ **Greenwald GS**, Roy Sk (1994). Follicular development and its control. En: the physiology of reproduction. Editores: Knobil E, Neill JD. Segunda edición.1: 613-658.
- ❖ **Guyton AC**. (2007). Tratado de Fisiología Médica. Onceava edición McGraw-Hill Interamericana.p.931-941.
- ❖ **Hafez ESE**. (1996). Reproducción e inseminación artificial en animales. Editorial Interamericana. Sexta edición.p.542.
- ❖ **Heape W**. (1900). The “sexual season” of mammals and the relation of the “pro-oestrus” to menstruation. *Q J Micr Sci*; 44:1-70.
- ❖ **Herbison AE**. (2006). Physiology of the gonadotropin-Releasing Hormone Neural Network. Cap 28. Editores: Knobil E, Neill JD. Physiology of Reproduction. 1:1415-1456.
- ❖ **Hirota K**, Lambert DG. (1996).Ketamine: Its mechanism of action and unusual clinical uses. *British journal of academy*; 77: 441-444.
- ❖ **Hsueh AJW**, Jones PBC, Adashi EY, Wang C, Zhuang LZ, Welsh TH. (1983). Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rat. *J. Reprod. Fertil*; 69:325–342.
- ❖ **Isomura, G**, Iwata, S, Chiba, M, Shimizu, N. (1985). Constitution of the greater splanchnic nerve in the rat. *Anat. Anz*; 159; 159–171.
- ❖ **Kilen SM**, Schwartz NB. (1988). Estrous cycle. Encyclopedia of reproduction. Editores: Knobil E, Neill JD. Academic Press U.S.A. 2: 127-136.
- ❖ **Klein CM**, Burden HW. (1988). Anatomical localization of afferent and ostganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett*; 29: 217-222.
- ❖ **Kow LM**, Pfaff DW. (1988). Transmitter and peptide actions on hypothalamic neurons in vitro: implications for lordosis. *Brain Res Bull*; 20(6): 857-61.
- ❖ **Kubo T**, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K. (1986). Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*. Oct 2. 323 (6087): 411–416.
- ❖ **Kunz L**, Thalhammer A, Berg FD, Berg U, Duffy DM, Stouffer RL, Dissen GA, Ojeda SR, Mayerhofer A. (2002) . Ca²⁺-activated, large conductance K⁺ channel in the ovary: identification, characterization, and functional involvement in steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*; 87: 5566-5574.

- ❖ **Lara HE**, Porcile A, Espinoza J, Romero C, Luza SM. (2001). Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine*; 15: 187–192.
- ❖ **Lawrence IE Jr**, Burden HW. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec*; 196:51–59.
- ❖ **Li M**, Zhou T, Gao Y, Zhang N, Li J. (2007). Ultrastructure and estrogen Regulation of the Lymphatic Stomata of Ovarian Bursa in mice. *Anat Record*; 196:51-59.
- ❖ **Lipner, H.** (1973). Mechanism of mammalian ovulation. En: Handbook of Physiology, Endocrinol. Editor: Greep R. American Physiological Society, Whashington, DC. p.409-437.
- ❖ **Livne I**, Gibson MJ, Silverman AJ. (1993). Biochemical differentiation and intercellular interactions of migratory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the mouse. *Development Biology*; 159 (2):643-656.
- ❖ **Martin GG**, Sack M, Talbot P. (1981). Structure of bursae ovaricae surrounding the ovaries of golden hamster. *Anat Record*; 201 (3): 485-498.
- ❖ **Mayerhofer A**, Dimitrijevic N, Kunz L . (2003). The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Sci*; 72:2039-2045.
- ❖ **Mayerhofer A**, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional FSH receptors in newly formed follicles. *Endocrinol*; 138: 3320-3329.
- ❖ **Mayerhofer A**, Fritz S. (2002). Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microsc Res Tech*; 59:503-508.
- ❖ **Mayerhofer A**, Kunz L, Krieger A, Proskocil B, Spindel E, Amsterdam A, Dissen G, Wessler I. (2006). FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol*; 4: 37.
- ❖ **Mayerhofer A**, Kunz L. (2005). A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Ann Anat*;187:521-528.
- ❖ **Mayerhofer A**, Lahr G, Gratzl M. (1991). Expression of the neural cell adhesion molecule in endocrine cells of the ovary. *Endocrinol*; 129:792–800.

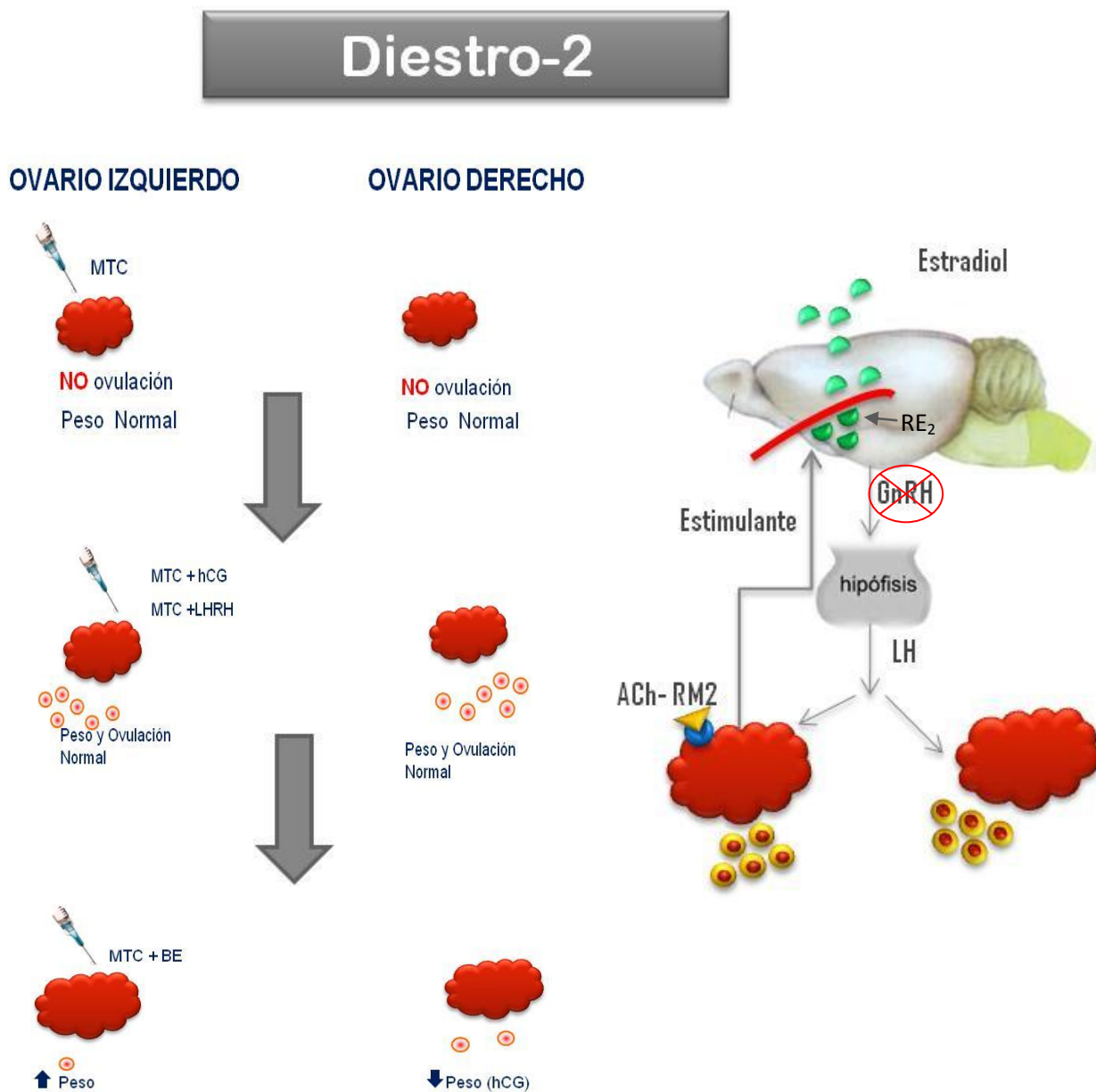
- ❖ **McGee EA**, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiriri A, Hsueh AJW. (1997). FSH enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod*; 57: 990-998.
- ❖ **Millar RP**. (2003). GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends in Endocrinol and Metabolism*; 14: 35–43.
- ❖ **Min-Poblete IE**, Pérez, MJ, López AS, San Agustín, EM, Flores A, Domínguez R, Cruz ME. (2011). Los efectos del pentobarbital o la Xilazina-Ketamina sobre la ovulación dependen de la hora y de la etapa del ciclo. LIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 10-14 sep. León Guanajuato.
- ❖ **Morales L**, Chávez R, Domínguez R. (1993). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med Sci Res*; 21:15-17.
- ❖ **Nathanson NM**. (1987). Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu. Rev. Neurosci*; 10: 195-236.
- ❖ **Niswender GD**, Nett, TM. (1994). The corpus luteum and its control. En: Knobil, E., Neill, J. (eds.). *The Physiology of Reproduction*; p. 499-525.
- ❖ **Ojeda S**, Aguado L.(1985). Adrenergic control of the prepubertal ovary: involvement of local innervation and circulating catecholamines. New York: Serono Symposia Publications from Raven Press.
- ❖ **Parhar IS**. (2002). Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes. Gonadotropin-releasing hormone: Molecules and Receptors. *Prog. Brain Res*;141:3-17.
- ❖ **Pedernera EA**. (1993). Cooperación Celular en la Biosíntesis de Hormonas Esteroides. En: Cominucación Neuroendócrina, Bases Celulares y Moleculares. Editorial Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Mexico. p. 33-46.
- ❖ **Peralta EG**, Ashkenazi A, Winslow JW, Ramachandran J, Capon DJ.(1987). Differential regulation of P1 hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature (Lond.)*. 344: 434-437.
- ❖ **Potashnik G**, Insler V, Meizner I. (1987). Frequency, sequence, and side of ovulation in women menstruating normally. *British Med J*; 294: 219.
- ❖ **Pupkin M**, Bratt H, Weisz J, Lloyd CW, Balogh K jr (1966). Dehydrogenase in the rat ovary. I. A histochemical study of 5-3 β and 20 α -hydroxysteroid dehydrogenases and enzymes of carbohydrate oxidation during the estrous cycle. *Endocrinol*; 79, 316-327.

- ❖ **Rao CV**, Edgerton LA (1984). Dissimilarity of corpora lutea within the same ovaries or those from right and left ovaries of pigs during the oestrous cycle. *J Reprod Fertil*; 70:61-6.
- ❖ **Reich DL**, Silvay G. (1989). Ketamine: and update on the first twenty-five years of clinical experience. *Canadian Journal of Anesthesia*;38:186-197.
- ❖ **Richards JS**, Russell DL, Ochsner S, Espey LL. (2002). Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol*; 64:69-92.
- ❖ **Sawyer CH**, Everett JW, Markee JE. (1949). A neural factor in the mechanism by which estrogen induces the release of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinol*; 44(3):218–33.
- ❖ **Schwartz NB**. (2000). Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. *Neuroendocrinology in Physiology and medicine*. Editores: Conn PM, Freeman ME. EEUU Raven Press. p. 135-145.
- ❖ **Tóth IE**, Wiesel O, Boldogkoi Z, Bálint K, Tapaszti Z,. (2007) Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microsc Res Tech*; 70: 710-718.
- ❖ **Van-Voorhis BJ**. (1999). Follicular Development. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Editores: Knobil E, Neill JD. Academic Press, San Diego. 2: 389-195.
- ❖ **Velazco MA**. (2013). Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en el día del Diestro-2 sobre la ovulación espontanea de la rata adulta. Tesis para obtener el título de Bióloga. México. FES Zaragoza. UNAM.
- ❖ **Wimsatt WA**. (1979). Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in chiroptera. *J Reprod Fertil*; 56;345-357
- ❖ **Wolfe A**, Wu S. (2012). Estrogen Receptor- β in the Gonadotropin. Releasing Hormone Neuron. *Semin. Reprod. Med*; 30: 20-31.
- ❖ **Wu X**, Chen L, Brown CA, Yan C, Matzuk MM. (2004). Interrelationship of growth differentiation factor 9 and inhibin in early folliculogenesis and ovarian tumorigenesis in mice. *Mol. Endocrinol*. 18;1509–1519.
- ❖ **Yao HH**, Barh JM. (1988). Ovary, overview. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Editores: Knobil E, Neill JD. Academic Press U.S.A. 3:590-595.
- ❖ **Yu WH**, S Karanth, Mastronarde CA, Sealton S, Dean C, Dees WL, McCann SM. (2002). Lamprey GnRH-III acts on its putative receptor via nitric oxide to release folliclestimulating hormone specific. *Exp Biol Med*; 227(9):786-93.

ANEXOS

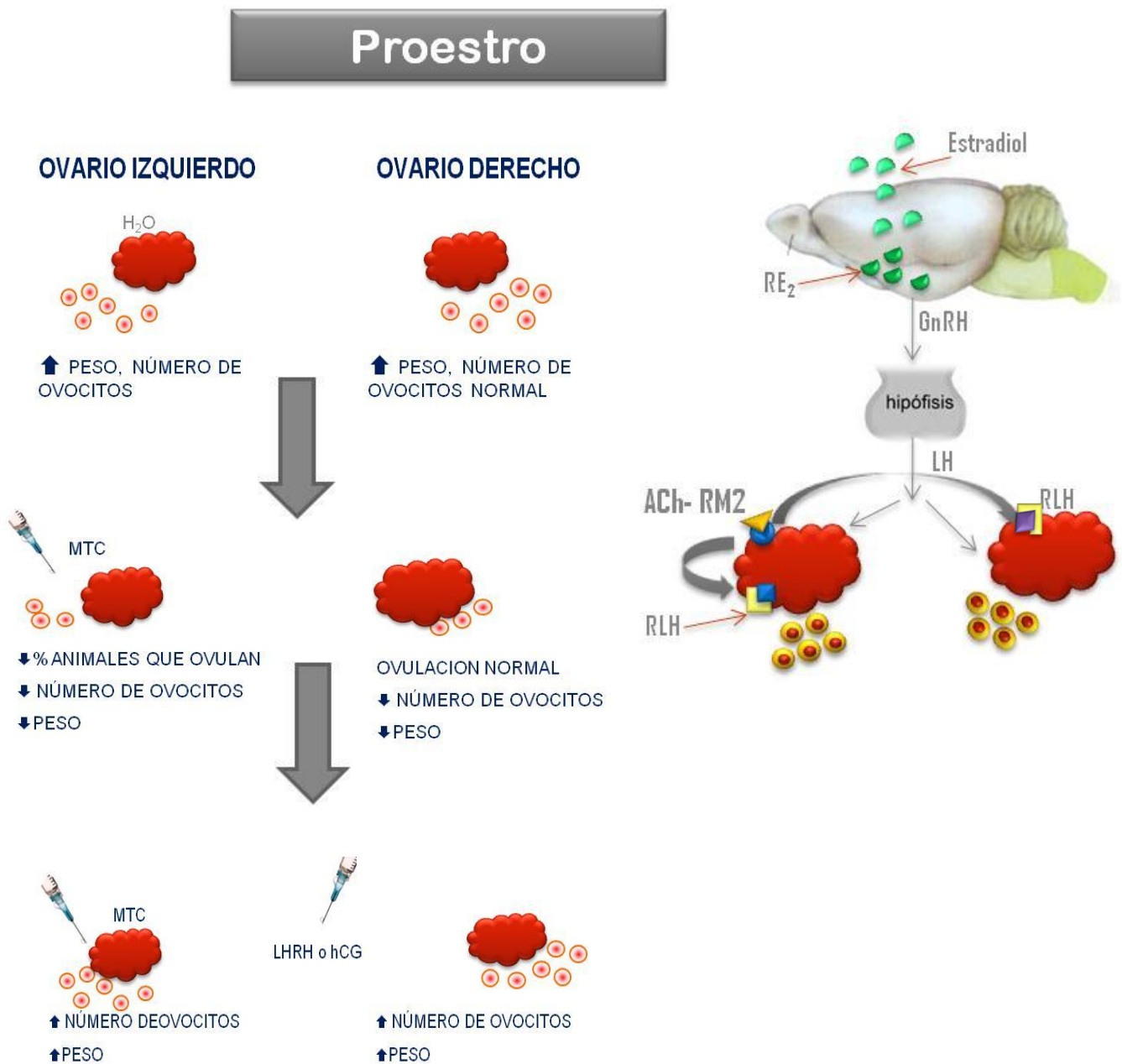
Esquema 1. En los diseños del extremo izquierdo, se muestran los resultados obtenidos al inyectar la metoctramina (MTC) en el ovario izquierdo, a las 13:00 h del diestro-2, y los efectos del remplazo de LHRH, hCG o BE sobre la ovulación y el peso de los ovarios.

En el extremo derecho se muestra el modelo funcional que se sugiere para explicar el papel funcional de la acetilcolina unida a los RM_2 (ACh- RM_2) del ovario izquierdo sobre la el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.



Esquema 2. En los diseños del extremo izquierdo, se muestran los resultados obtenidos al inyectar la metocitramina (MTC) en el ovario izquierdo, a las 13:00 h del proestro, y los efectos del remplazo de LHRH o hCG sobre la ovulación y el peso de los ovarios.

En el extremo derecho se muestra el modelo funcional que se sugiere para explicar el papel funcional de la acetilcolina unida a los RM_2 (ACh- RM_2) del ovario izquierdo sobre la el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.



Esquema 3. A) se muestran los resultados obtenidos al inyectar la metoctramina (MTC) en el ovario izquierdo, a las 13:00 h del Estro sobre la ovulación y el peso de los ovarios.

B) Muestra el modelo funcional que se sugiere para explicar el papel funcional de la acetilcolina unida a los RM_2 (ACh- RM_2) del ovario izquierdo sobre la el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

