



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA



“PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DEL RECEPTOR
MUSCARÍNICO TIPO 2 EN EL OVARIO DE LA RATA,
DURANTE EL CICLO ESTRAL Y SU PARTICIPACIÓN EN LA
REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN”

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O

P R E S E N T A

MIGUEL MARTÍN HERNÁNDEZ ESCOBAR

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ISABEL ARRIETA CRUZ

ASESORA INTERNA:
DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

MÉXICO, D.F. 2015

TESIS FINANCIADA POR DGAPA-PAPIIT: CONVENIO: IN-220014-3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **HERNÁNDEZ ESCOBAR MIGUEL MARTÍN**, con número de cuenta **306121083**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **02 de diciembre de 2015** a las **09:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. LETICIA MORALES LEDESMA
VOCAL Dra. ISABEL ARRIETA CRUZ*
SECRETARIO Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
SUPLENTE M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ
SUPLENTE Dr. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ

Leticia Morales Ledesma
Isabel Arrieta Cruz
María Esther Cruz Beltrán
Angélica Flores Ramírez
Edgar Ledesma Martínez

El título de la tesis que presenta es: **Patrón de distribución del Receptor Muscarínico Tipo 2 en el ovario de la rata, durante el ciclo estral y su participación en la regulación de la ovulación.**

Opción de titulación: Tesis

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D. F., a 05 de noviembre de 2015

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR
DIRECCIÓN

RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

vó. BQ.
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL
JEFE DE CARRERA

DEDICATORIAS

Esta tesis es el reflejo de un cúmulo de procesos, en los cuales siempre ha estado presente mi familia, amigos como aquellas manos que me han brindado sabiduría y experiencia.

“Trabajo y perseverancia” son palabras y ejemplos inculcados por mis padres Beatriz y Francisco, que motivan el movimiento de mis pasos, es difícil tratar de reflejar en palabras los sentimientos, ya que mi alma y cuerpo danzan para reflejar lo que siento como bien lo ha dicho mi hermana Linda. Y a veces un gracias no es suficiente para retribuirles los esfuerzos dados, mas sin embargo un agradecimiento infinito, va por ustedes mis logros.

Mi familia: padres, hermana, abuelos, abuelas, tíos, tías, primos, primas, sobrinos, sobrinas un regalo de la vida que irradian alegría, historias y consejos que abren la mente y despiertan los sentidos a ustedes gracias.

A mis amigos que me han acompañado en un sinfín de viajes y aventuras, pero siempre más que el resultado de ellas, es el placer de conocerlos a todos ustedes porque cada cabeza es un mundo y yo he viajado por el universo y al final tan solo somos polvo de estrellas.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Francisco y Beatriz, a mi hermana Linda, los amo y lo saben.

A mis primos Alex, Nestor, Beto, Claudia, Moyote, Victor, Ecnar, Vianey, Bety, Fofó, Araceli, Grillo, Ivan, Fernando, Jovana, Liz, Carla, Temito los quiero y lo saben.

A mis tíos, Chucho, Lucy, Laura, Toño, Rosa, Andres, Vicky, Temo, Victor, Lupe, Alvaro, Lucio, Piloncillo, Carmela los quiero y lo saben.

A mis amigos, Linda, Raul, April, Luis, Eicnar, Alin, Alina, Arleen Cid, Cynthia, Monic, Diana, Gabriela, Maestra Judith, Coach Caballo, Lince, Guzman, mis amigos del centro de acopio UNAM, mis amigos de biblioteca UNAM, mis amigos de vigilancia UNAM, Amigos del cerfis UNAM, amigos del Bioterio, A mis amigos maestros UNAM, Abigail, Abraham, Adrian, Alberto, Fricke, Ale, Alex, Alexei, Alfonso, Alondra, Amy T Alvarez, Ana, Gaby, Anahí, Andrea, Angel, Armando, Betsy, Andres, Blanca, Min, Black, Carmina, Carol, Mata, Fernando, Cuautlense, Josymar, Diego´s, Monse, Naye los quiero, aprecio y a donde valla los considero amigos y los que me faltaron, lo saben.

A mis directores de Tesis, Isabel Arrieta Cruz y María Esther Cruz Beltrán les agradezco por darme la oportunidad, como aquellos momentos y consejos, regaños y reconocimientos que viví a lo largo de este proyecto que con sus altibajos siempre estuvieron presentes. Gracias.

A mis sinodales por su paciencia y compromiso

Dra. Leticia Morales Ledesma.

Dra Isabel Arrieta Cruz

Dra. María Esther Cruz Beltrán

M. Angelica Flores Ramírez

Dr. Edgar Ledesma Martínez

“Un libro, como un viaje, se comienza con inquietud y se termina con melancolía” (José María Albino Vasconcelos Calderón 1982-1959)

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. CICLO ESTRAL.....	9
3. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO	13
4. EL OVARIO	15
4.2 COMPARTIMENTO LUTEAL.....	18
4.3 COMPARTIMENTO INTERSTICIAL	18
4.4 DESARROLLO FOLICULAR.....	18
4.5 OVULACIÓN	21
4.6 PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES EN EL PROCESO DE LA OVULACIÓN	22
4.7 ASIMETRÍAS OVÁRICAS.....	23
4.8 INERVACIÓN EXTRÍNSECA DEL OVARIO	25
5. ACETILCOLINA.....	26
6. RECEPTORES MUSCARÍNICOS.....	28
6.1 RECEPTOR MUSCARÍNICO TIPO-2.....	28
7. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA OVULACIÓN.....	29
8. JUSTIFICACIÓN.....	31
9. HIPÓTESIS	32
10. OBJETIVO GENERAL	33
11. OBJETIVOS PARTICULARES	33
12. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
12.1 ANIMALES EXPERIMENTALES	34
12.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	34
12.3 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	36
12.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
13. RESULTADOS.....	39
14. DISCUSIÓN	51
15. CONCLUSIONES	53
16. BIBLIOGRAFÍA.....	54

ABREVIATURAS

3 β -HSD	3-beta hidroxisteroide deshidrogenasa
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
AMP _c	Adenosina monofosfato cíclico
CAT	Colina acetiltransferasa
CL	Cuerpo Lúteo
DAG	Diacilglicerol
DHEA	Dehidroepiandrosterona
E ₂	17 β -estradiol
FSH	Hormona folículo estimulante
FSH-RH	Hormona liberadora de la hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
IP	Fosfato inositol
IR	Inmunoreactividad
LH	Hormona luteinizante
MTC	Metocramina
P ₄	Progesterona
RE	Receptor a estrógenos
mAChR	Receptor muscarínico
SNC	Sistema nervioso central
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
Veh	Vehículo

RESUMEN

Las células de la granulosa de folículos preovulatorios de humano y mono expresan el ARNm de receptores muscarínicos tipo 1 (m_1 AChR) y 5 (m_5 AChR). También se ha observado que la micro-inyección de metoctramina (MTC un antagonista específico para m_2 AChR) en el ovario izquierdo a las 13:00h del diestro-2 bloquea la ovulación, lo que sugiere su participación en este proceso. Sin embargo aún se desconoce si el m_2 AChR se encuentra presente en los ovarios de la rata adulta. Este estudio tiene como propósito principal caracterizar el patrón de distribución del m_2 AChR en ambos ovarios durante el ciclo estral y su posible participación en la regulación de la ovulación. Para contestar esta pregunta, se utilizaron los ovarios de ratas hembras adultas cíclicas de la cepa CIIZ-V (n=4), sacrificadas en cada día del ciclo estral. Otro grupo de ratas, a las 13:00 h del diestro-2 (n=4), fueron micro-inyectadas con 0.5 μ L vehículo (Veh) o de MTC (4.5×10^{-5} mmol/L) en la bursa del ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) y se sacrificaron en el estro esperado. Los ovarios fueron procesados e incluidos en parafina para la detección de la proteína del m_2 AChR a través de la técnica de inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos mostraron la presencia del m_2 AChR en las distintas estructuras celulares de los folículos y cuerpos lúteos del OI y OD en las diferentes etapas del ciclo estral. Interesantemente, no se encuentran diferencias significativas en la inmunolocalización del m_2 AChR después de la administración del tratamiento con MTC o Veh. Estos datos contribuyen a demostrar la presencia de la proteína m_2 AChR en el ovario de la rata adulta. Tesis financiada por DGAPA-PAPIIT (Convenio: IN-220014).

1. INTRODUCCIÓN

En los vertebrados, la unidad anatómica y funcional del ovario es el folículo, el cual se encuentra organizado en tres compartimentos que son: el folicular, el luteal y el intersticial. Las funciones primordiales de los ovarios son la liberación del ovocito capaz de ser fecundado y la secreción de hormonas esteroideas sexuales. La ovulación es considerada como el resultado de un proceso inflamatorio local, que resulta en la liberación del ovocito (Domínguez et al., 1991). Para que se produzca la ovulación, es necesaria una serie de señales en cascada que involucra al hipotálamo, la hipófisis y el propio ovario, su integración constituye el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.

El sistema colinérgico es uno de los sistemas de neurotransmisión que participa en la regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. El neurotransmisor liberado por este sistema es la acetilcolina (ACh). En el ovario, este neurotransmisor es sintetizado por las células de la granulosa en los ovarios de humano, primates y de la rata, a través de la enzima colina-acetiltransferasa (CAT), la cual cataliza la reacción de la colina y el acetato, para formar la ACh.

La acción de la ACh está mediada por sus receptores muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChRs). Existen cinco tipos de receptores muscarínicos (m_1 AChR a m_5 AChR). De estos, los m_1 AChR y m_5 AChR se encuentran en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios de humano, mientras que el tipo tres (m_3 AChR) se expresa en el ovocito (Fritz et al., 1999; Mayerhofer y Kunz, 2005). La presencia de la CAT también se ha detectado en células luteícas, células de la granulosa de folículos antrales en ovario de rata, las que en cultivo celular incrementan la síntesis de progesterona, al adicionar ACh y la hormona luteinizante (LH) (M. Omar Al-zi'abi et al., 2009).

Hasta el momento se desconoce si el m_2 AChR está presente en el ovario de la rata. Resultados previos demostraron que la inyección subcutánea de metoctramina (MTC; un antagonista de m_2 AChR) a las 13:00 h del proestro induce la disminución en la ovulación, lo que no se observa en los otros días del ciclo estral (Hernández 2012). Resulta de interés que únicamente la

inyección de MTC en la bursa del ovario izquierdo a las 13:00 h del diestro-2, bloqueó el proceso de ovulación (Hernández 2013), lo que sugiere la participación de los m_2 AChR en la regulación del proceso de la ovulación. Por lo que el objetivo de este trabajo fue detectar (durante el ciclo estral) la presencia del m_2 AChR en los ovarios y evaluar su participación en la ovulación a través del bloqueo farmacológico específico del receptor en el ovario derecho a las 13:00 h del diestro-2.

MARCO TEÓRICO

2. CICLO ESTRAL

El ciclo estral es un proceso biológico, que en la rata tiene una duración de cuatro o cinco días, que se manifiesta por la etapa de receptividad de la hembra al macho. 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 (1900), quien lo describe como “el periodo especial de deseo sexual de la hembra”.

La rata hembra es poliéstrica, ya que durante el año presenta varios momentos de receptividad sexual (Schwartz, 2000). La duración de su receptividad es regulada por variaciones en el período de luz/oscuridad, la alimentación, la temperatura y la presencia del macho (Fink, 1988). A partir de una muestra de 1,999 ciclos registrados en ratas, Long y Evans calcularon que el ciclo estral dura en promedio 4.4 días, dividido en 4 fases: diestro-1, diestro-2, proestro y estro. La determinación de la duración y el tipo celular característico en la citología del epitelio de la vagina en cada fase del ciclo estral es el siguiente: el proestro tiene una duración de 12 a 14 h; el estro de 25 a 27 h; el diestro 1 de 6 a 8 h y el diestro 2 de 55 a 57 h (Freman, 2006).

Con base en la citología vaginal, en el proestro predominan células epiteliales nucleadas y ocasionalmente cornificadas, sin la presencia de leucocitos (figura 1). En la fase del estro, en el frotis vaginal se observan predominantemente células epiteliales cornificadas (figura 2). En el día del diestro-1 o metaestro, en el frotis vaginal, el tipo celular predominante son los leucocitos, aunque también se observan algunas células nucleadas pero en menor proporción (figura 3). En la fase del diestro-2, en la citología vaginal se observa leucocitos y algunas células epiteliales nucleadas en proporción semejantes (figura 4) (Hrabovszky et al., 2000).

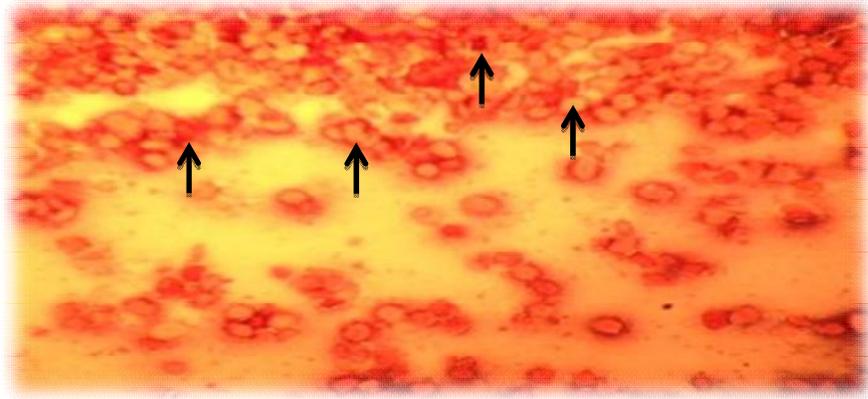


Figura 1. Tipo de células del epitelio vaginal de la rata que caracterizan la fase del proestro del ciclo estral. Las flechas indican células nucleadas observadas bajo el microscopio a un aumento de 10X.

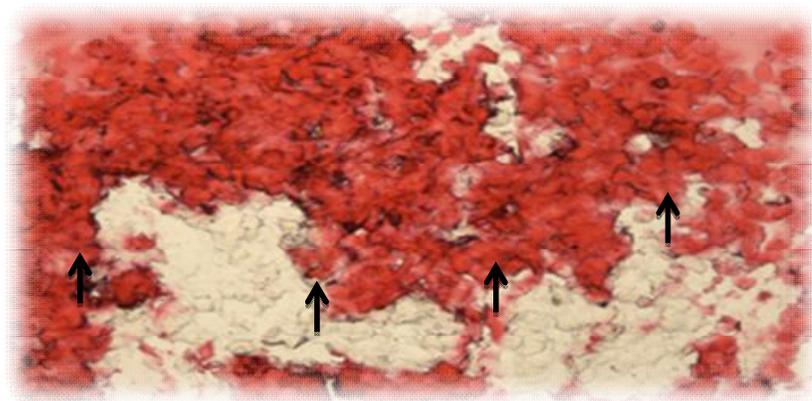


Figura 2. Tipo de células del epitelio vaginal de la rata que caracterizan la fase del estro en el ciclo estral. Las flechas indican células escamadas observadas bajo el microscopio a un aumento de 10X.

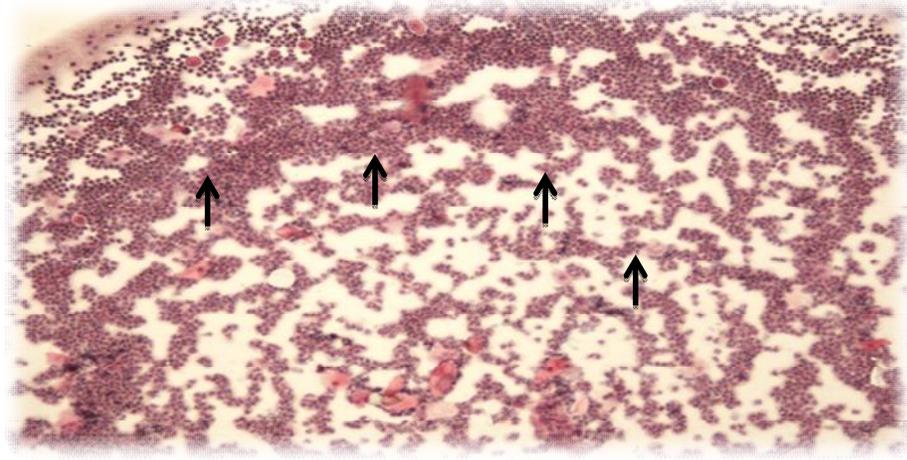


Figura 3. Tipo de células del epitelio vaginal de la rata que caracterizan la fase del diestro-1 del ciclo estral. Las flechas indican los leucocitos observados bajo el microscopio a un aumento de 10X.

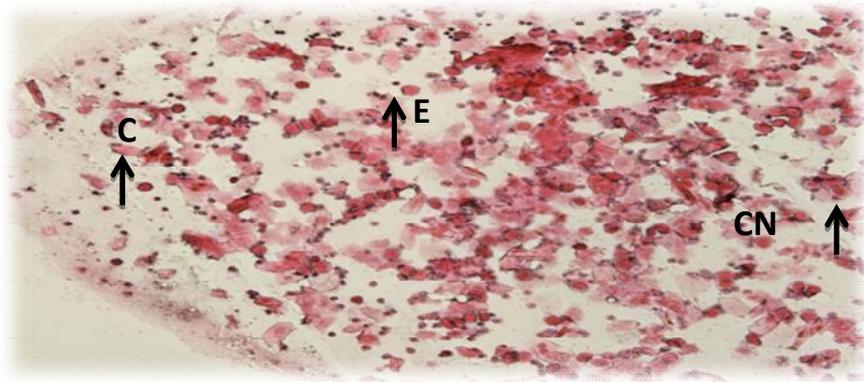


Figura 4. Tipo de células del epitelio vaginal de la rata que caracterizan la fase del diestro-2 del ciclo estral. Las flechas indican los eritrocitos (E), células cornificadas (C) y células nucleadas (CN), observados bajo el microscopio a un aumento de 10X.

Otros eventos que ocurren en cada fase del ciclo estral tienen que ver con cambios en la concentración de las gonadotropinas, del 17β -estradiol (E_2) y la progesterona (P_4) (figura 5), así como con el tipo de folículos que predominan en el ovario.

En el proestro, ocurre el aumento significativo de la concentración de E_2 , entre las 9:00 y 15:00 h, estímulo fundamental de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), lo que ocurre entre las 14:00 y las 15:00 h que resulta en el aumento de la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés), la que ocurre entre las 17:00 y 19:00 h. Por la tarde-noche de esta fase del ciclo (19:00 h), aumenta la concentración de P_4 , lo que favorece la ovulación y facilita el comportamiento sexual, el celo y la cópula en la noche de este día. En el ovario varios folículo maduran simultáneamente y alcanzan su tamaño máximo llamado folículo preovulatorio (Freeman, 1994; Schwartz, 2000).

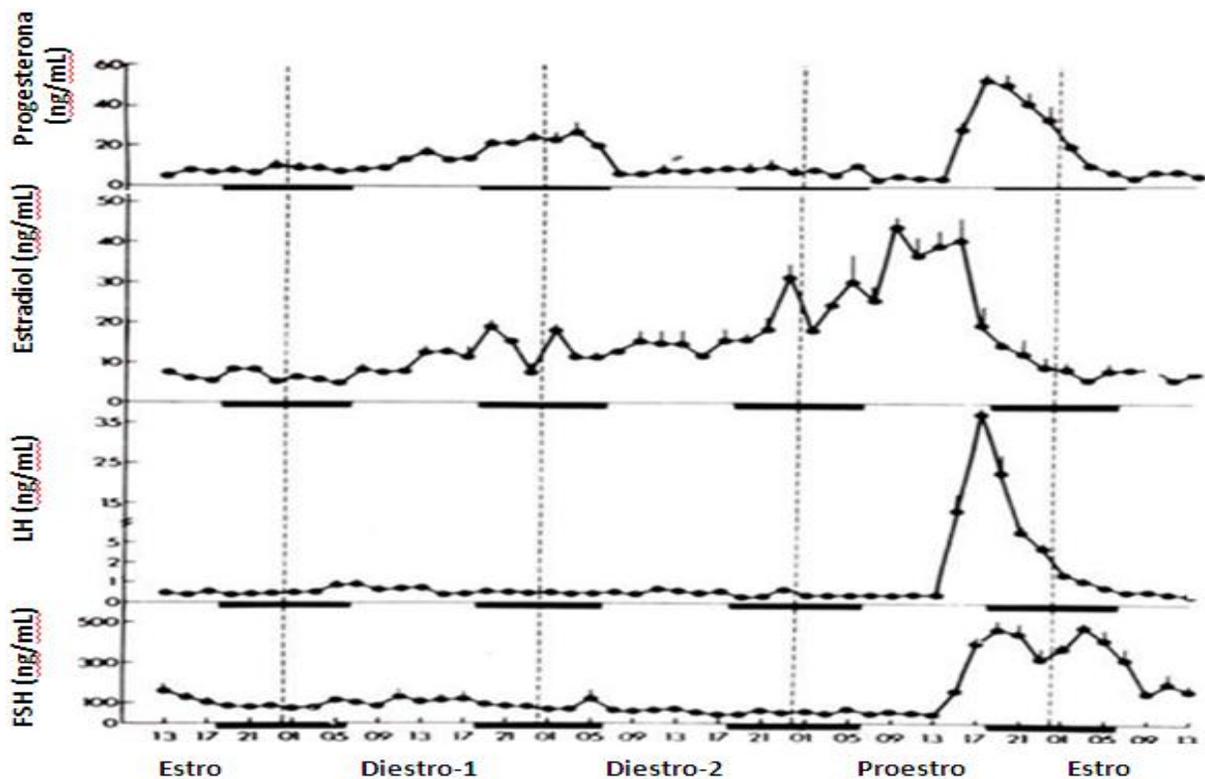


Figura 5. Concentración plasmática de LH, FSH, progesterona y estradiol cada 2 horas en cada día del ciclo estral. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de la concentración de la hormona de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan intervalos de luz/oscuridad en los que se mantuvieron a los animales (Tomado y modificado de Freeman 1994).

En el estro ocurre la ovulación inducida en las primeras horas de este día. La concentración de E_2 y P_4 en sangre es basal, mientras que la de FSH muestra un segundo aumento, cuyo papel es reclutar

los folículos que ovularán en los siguientes ciclos. En el ovario se puede observar folículos de más de 1000 μm que no ovularon y que son atrésicos, así como cuerpos lúteos recién formados (Freeman, 1994; Schwartz, 2000).

En el diestro-1, se observan los cuerpos lúteos, resultado de la ovulación del día anterior, lo que resulta en el incremento en la secreción de P_4 . La concentración de LH, FSH y E_2 en suero es basal. En los ovarios se observan folículos en diferentes etapas de crecimiento (Freeman, 1994; Schwartz, 2000).

En el diestro-2, la concentración de P_4 disminuye en la sangre, mientras que la de FSH y LH se mantiene baja, pero durante la tarde de este día, la de E_2 comienza a aumentar, debido al estímulo de la enzima aromatasa inducido por la FSH en la célula de la granulosa. En el ovario se observan folículos con antro y de dimensiones más pequeñas (Kilen y Schwartz, 1988; Schwartz, 2000).

3. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

En el Sistema Nervioso Central (SNC), el hipotálamo regula las funciones endocrinas (Domínguez et al., 1991). El hipotálamo y la hipófisis conforman una unidad funcional, cuya comunicación se establece por diversas hormonas peptídicas, como la GnRH (que en este proyecto denominamos “señal hipotalámica”), y cuya secreción es modulada por las hormonas esteroideas, péptidos, opioides y neurotransmisores (Yao y Bahr, 1999).

Existen al menos trece iso-formas de GnRH que han sido aisladas en diferentes vertebrados. Una especie puede poseer entre dos y tres formas de GnRH, que podrían tener distintas funciones a la de 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 primero en el pollo y luego en mamíferos (Chen et al., 1998) y la GnRH-III identificada en la lamprea (Millar, 2003).

La GnRH-I es un decapeptido cuya secuencia lineal de aminoácidos es: pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, y que es considerada como el principal factor hipotalámico que regula la ovulación y la secreción de LH en mamíferos. La GnRH-II cuya secuencia lineal de aminoácidos es: pyroGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂, es producto de la expresión de un segundo gen, que difiere de la GnRH-I en los aminoácidos 5, 7 y 8. La GnRH-II se conserva entre las especies, incluidos los humanos (excepto el ratón), se expresa ampliamente en todo el cerebro, por lo que es considerada un neuromodulador que coordina el comportamiento reproductivo; y que regula la actividad de la neurona GnRH-I (Millar, 2003), además de participar en la regulación de la ingesta de alimento. La GnRH-III regula preferencialmente la secreción de la FSH (Herbison, 2006), se ha postulado que en mamíferos sería el factor liberador de la FSH (FSH-RH), ya que *in vivo* como en *in vitro* la administración de este péptido promueve principalmente la liberación de FSH (Yu et al., 2002).

En los mamíferos, la hipófisis es una pequeña glándula situada en el hueso esfenoides (una cavidad ósea en la base del cráneo) 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). En el tallo hipofisario se encuentra el sistema porta hipofisario de vasos sanguíneos (Arimura, 2000).

La adenohipófisis regula entre otras, las funciones llevadas a cabo por las gónadas, mediante la secreción de la FSH y la LH (Brown, 1994; Arimura, 2000; Guyton y Hall, 2001).

La FSH y la LH cumplen un papel relevante en la regulación neuroendocrina del ciclo estral. Estas gonadotropinas son hormonas glucoproteicas conformadas por dos cadenas polipeptídicas: la α y la β . La subunidad α es idéntica en las dos hormonas, confiere la especificidad de especie, mientras que la subunidad β difiere entre ellas y 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). Estas dos hormonas se secretan en forma pulsátil, los

cambios en la frecuencia y la amplitud de cada pulso resulta en los cambios en la concentración en sangre durante el ciclo estral (Herbison, 2006).

La FSH y la LH regulan la función estereoidogénica del ovario, así como el crecimiento y la maduración folicular (Hafez, 1996). Entre otras funciones que desempeña la LH están la inducción de la ovulación y la luteinización del folículo (Bousfield, 1998).

4. EL OVARIO

El ovario es un órgano pareado, se localiza a cada lado de la cavidad pélvica, y se encuentra suspendido en un pliegue peritoneal llamado mesovario. La arteria útero-ovárica también conocida como arteria ovárica, recibe riego sanguíneo de la aorta abdominal y llega al ovario a lo largo del mesovario, entra a través del hilio, por donde también sale la vena ovárica (Yao y Bahr, 1988; Fawcett, 1995).

El ovario se encuentra recubierto por la bursa ovárica, la cual es una delgada capa de peritoneo que lo recubre. Está conformada por tres capas, la interna (capa de epitelio discontinuo, orientado hacia el ovario), la capa media (capa de tejido conjuntivo que contiene fibroblastos, células del músculo liso y vasos sanguíneos), y la capa externa (epitelio que se encuentra en contacto con la cavidad peritoneal) (Martin et al., 1981). La cavidad bursal es el espacio que se forma entre el ovario y la bursa ovárica, contiene líquido y su volumen es regulado por paquetes de células musculares lisas (Li et al., 2007).

En los roedores como la rata, la bursa ovárica regula el paso de los ovocitos hacia el oviducto y permite el cambio de flujo de sustancias entre la cavidad bursal y los vasos sanguíneos que están dentro de ella e impide la salida de líquido hacia la cavidad peritoneal, de esta manera regula la presión que se encuentra dentro de la misma (Martin et al., 1981).

Para su estudio anatómico, el ovario se ha dividido en tres zonas, la corteza, la médula y el hilio. La corteza contiene al llamado epitelio germinal e incluye a los folículos que se encuentran

alrededor del tejido conectivo del estroma ovárico. La médula contiene el estroma, formado por tejido conectivo laxo y fibroso. El hilio, se encuentra en la unión del ovario al mesovario y es a través del cual penetran y salen los vasos sanguíneos y las fibras nerviosas propias de esta gónada (Ganong, 2004) (figura 6).

Para su estudio funcional el ovario se ha dividido en tres compartimentos: el folicular, el luteal y el intersticial (figura 5). A partir del folículo ovárico se originan los dos compartimentos restantes (Domínguez et al., 1991; Fawcett, 1995) (figura 6).

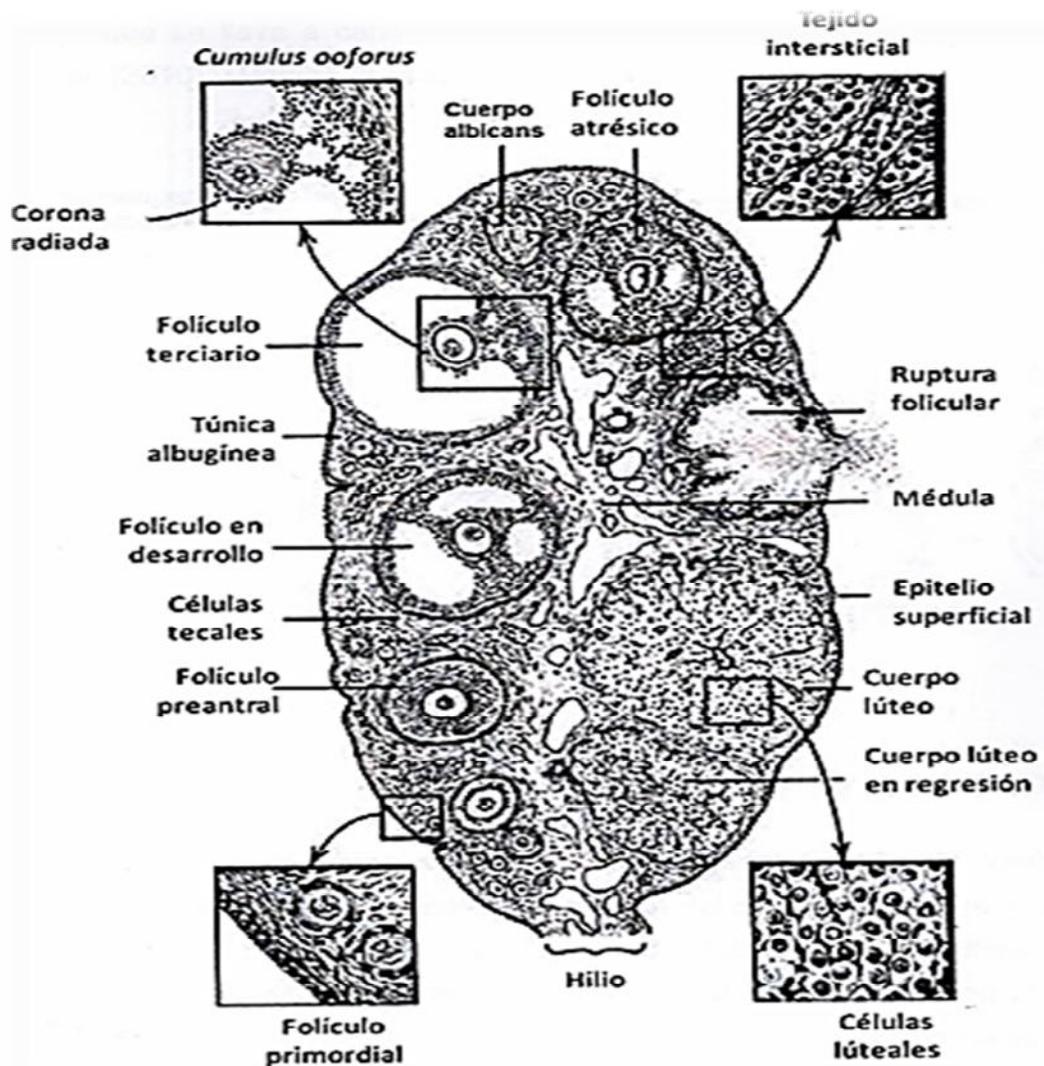


Figura 6. Ovario de mamífero donde se observa el compartimento folicular (en sus diferentes etapas de desarrollo), luteal e intersticial (Modificada de Freeman, 1999).

4.1 COMPARTIMENTO FOLICULAR

Está formado por folículos que se encuentran en la corteza del ovario, en diferentes etapas de desarrollo y crecimiento, como son los primordiales, primarios, secundarios, terciarios o preovulatorios (Domínguez et al., 1991; Ross et al., 1997).

4.2 COMPARTIMENTO LUTEAL

Está conformado por los cuerpos lúteos de la ovulación anterior y de ciclos previos. Se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que expulsan al ovocito (figura 6) como resultado del estímulo de la LH, que al actuar sobre sus receptores se transforman en células granulo-luteínicas y teco-luteínicas, cuya diferenciación metabólica y funcional conduce a la secreción de P₄ (Ross et al., 1997; Espey, 1999).

4.3 COMPARTIMENTO INTERSTICIAL

Incluye tanto a las células teco-intersticiales de los folículos en crecimiento como a las células de la teca de los folículos atrésicos (figura 6), y representa la unidad endócrina productora de andrógenos (Yao y Bahr, 1999; Sánchez-Criado, 2003).

4.4 DESARROLLO FOLICULAR

El desarrollo folicular inicia con el crecimiento de los folículos ováricos, que puede culminar en la atresia o en la ovulación (Van-Voorhis, 1999). El desarrollo folicular implica la transformación histológica y funcional del folículo y para su estudio se ha dividido en diferentes tipos: folículos primordiales, folículos primarios (también llamados preantrales), folículos secundarios (también llamados preantrales), folículos terciarios (folículos antrales) (figura 7).

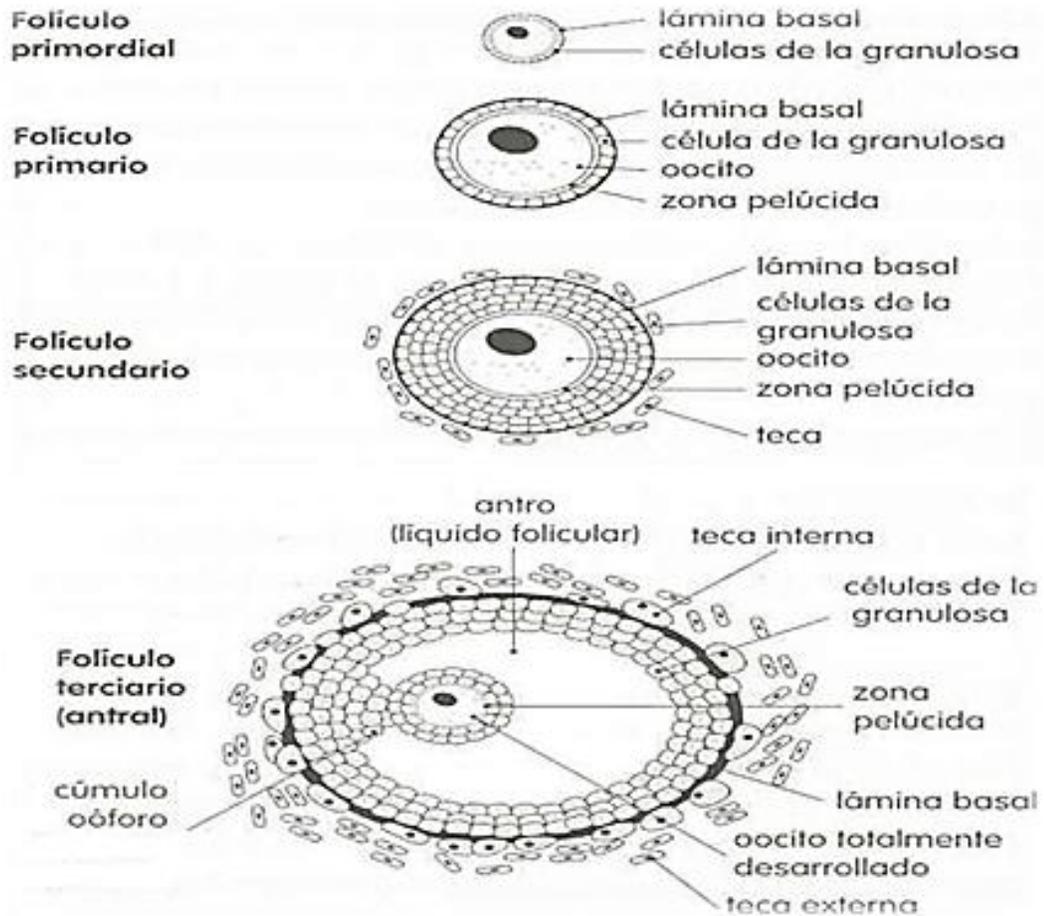


Figura 7. Cambios estructurales del folículo ovárico durante su crecimiento (Tomada y modificada de Gal et al., 2007).

El folículo está formado por el ovocito I, una membrana basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario y las células de la teca; estas últimas son conformadas por la teca interna y teca externa. Además de las células de la granulosa y las tecaes, el folículo está rodeado por un complejo sistema de fibras colágenas, células del tejido conectivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas (Domínguez et al., 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, y los separa de compartimento tecal y de los vasos sanguíneos (figura 7) (Greenwald y Roy, 1994).

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 et al., 1998; Geneser, 2000).

Folículos secundarios: Se caracterizan por un estrato granuloso de siete a ocho capas (Domínguez et al., 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), En las áreas en que se pierde la unión entre las células de la granulosa se forman unas lagunas conocidas como cuerpos de Call-Exner, que son previa a la formación del antro (Yao y Bahr, 1988; Lawrence et al., 2006) (Figura 7).

Folículos terciarios o preovulatorios: Constituido por el ovocito que alcanza su tamaño máximo, un antro desarrollado completamente y lleno de líquido folicular, y varias capas de células de la granulosa (Hirshfield, 1997). Los vasos sanguíneos al igual que los nervios sólo llegan a la teca interna, ya que no penetran a la granulosa. Algunas de las fibras nerviosas terminan en el músculo liso presente en la teca externa y estos nervios regulan la contractibilidad de las mismas, lo que influiría en el mecanismo de la ovulación. En el ovario de la rata, los folículos llegan a este estadio de desarrollo entre 17 y 19 días después de haber iniciado el crecimiento (Yao y Bahr, 1999; Lawrence et al., 2006).

4.5 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 (Van-Voorhis, 1999), también 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, apoptosis 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 de la teca (Lawrence et al., 2006).

La estimulación en la zona pelúcida por la LH, forma un estigma 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).

El rompimiento y la salida de células de la granulosa que rodean al ovocito llamado *cumulus ooforus* y del ovocito requieren de 11 a 12 horas. Primero las células de la granulosa comienzan a ser expulsadas a través de la membrana basal, seguida por el ovocito. Una vez que el ovocito ha salido y encuentra el camino hacia el oviducto, sale una gran cantidad de líquido folicular. En la hora posterior a la ovulación, los ovocitos rodeados del *cumulus ooforus* pueden ser reconocidos en el tercio superior del oviducto (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 et al., 1966) y el incremento de contenido de colesterol (Everett, 1945).

4.6 PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES EN EL PROCESO DE LA OVULACIÓN

Las hormonas esteroideas 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 (Van-Voorhis, 1999).

En la mitocondria de las células de la granulosa del ovario, el colesterol es convertido a pregnenolona por acción del citocromo P450c, complejo enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol (Van-Voorhis, 1999). La pregnenolona es 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 $\Delta 4$, la pregnenolona 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 y luteales. Por lo general, esta ruta se lleva a cabo en las células del cuerpo lúteo (Van-Voorhis, 1999).

La progesterona es hidroxilada a 17α -hidroxiprogesterona por la enzima 17α -hidroxilasa; en el producto 17α -hidroxiprogesterona dentro de la mitocondria, que actúa la enzima 17-20 desmolasa, para separar la cadena lateral entre los carbonos 17 y 20 y obtener 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, por acción de la enzima 17-20 desmolasa es transformada en dehidroepiandroterona (DHEA), sobre la cual actuarán las enzimas 3β -HDS y $\Delta 5$ -4 isomerasa, para transformarla a su vez en androstenediona y a través de la enzima P450 aromatasa produce estrona que a su vez se transforma, mediante la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa a estradiol (Pedernera, 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 esteroideos (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, este estrógeno se difunden en la circulación general, que al llegar al hipotálamo y la hipófisis regulan la secreción de GnRH, FSH y LH respectivamente (Domínguez et al., 1991).

La LH estimula selectivamente el complejo enzimático que separa la cadena colateral del colesterol y la actividad de la 17α -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 et al., 1984).

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 adenosina monofosfato cíclico (AMPC) y estimula la síntesis de la aromatasa (Lawrence et al., 2006).

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 et al., 1983).

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 polipetídico de origen gonadal que disminuye selectivamente la tasa de secreción de la FSH (Domínguez et al., 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 (Van-Voorhis, 1999).

4.7 ASIMETRÍAS OVÁRICAS

En general se considera que los órganos pareados son fisiológica y anatómicamente muy similares, pero hay evidencia de que estos 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 et al., 1987).

En mamíferos poli-ovulantes, también se han observado diferencias en la capacidad ovulatoria entre el ovario izquierdo y el 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, por ejemplo, la ovulación ocurre predominantemente en la gónada derecha, pero el ovario contralateral tiene la capacidad de funcionar, sólo si se extirpa el ovario dominante este efecto sucede también en aves (Gerendai y Halász, 1997; Domínguez et al., 2003).

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 et al., 2003).

En la rata adulta, se ha observado que el ovario izquierdo libera un promedio de seis ovocitos, mientras que el derecho solo cuatro (Domínguez et al., 2003), el peso del ovario izquierdo es mayor que el derecho (Gerendai y Halász, 1997). También se ha mostrado en ratas hemiovariectomizadas que el ovario derecho e izquierdo tiene diferentes capacidades compensadoras, tanto en número de ovocitos liberados como en masa ovárica (Chávez et al., 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 et al., 2001).

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 et al., 1988).

4.8 INERVACIÓN EXTRÍNSECA DEL OVARIO

En la rata, los somas de las fibras nerviosas que llegan al ovario se encuentran en el ganglio celiaco (GC), el ganglio mesentérico y los nervios lumbares. El GC, localizado en la pared ventral de la aorta abdominal (Anesetti et al., 2009), se conecta con otros nervios a través de paquetes ganglionares (Baljet y Drukker, 1980).

Los componentes que inervan al ovario y entran por el hilio son el: nervio vago (NV), el plexo ovárico (PO) y el nervio ovárico superior (NOS) (Burden, 1978; Lawrence y Burden, 1980).

Plexo Ovárico. Contiene en su mayoría fibras de naturaleza sensorial (Burden, 1978) que aportan al ovario la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen que codifica la calcitonina (CGRP) (Dees et al., 1986; Klein y Burden, 1988). Algunas de sus fibras son de naturaleza simpática y transportan noradrenalina (NA) y neuropéptido Y (NPY), los cuales pueden ser sintetizados por una misma fibra. Las fibras nerviosas del PO se encuentran a lo largo de la arteria ovárica (Lawrence y Burden, 1980; Dissen et al., 1998). La inervación sensorial del ovario, deriva del ganglio nodoso y del ganglio dorsal, que se localizan entre el segmento torácico caudal (T9-T11) y el segmento lumbar craneal (L2-L4) de la médula espinal (Burden, 1978; Burden, 1985).

Nervio Ovárico Superior tiene axones de naturaleza simpática asociados al ligamento suspensorio en una matriz de tejido conectivo. Aporta catecolaminas y péptido intestinal vasoactivo (VIP) a los compartimentos ováricos. La porción simpática de la inervación ovárica se origina de los segmentos T9-T11 y L2-L4 de la médula espinal y hace sinapsis en los ganglios celiaco y mesentérico superior (Burden, 1978; Lawrence y Burden, 1980; Burden, 1985; Dissen et al., 1998).

Las fibras del NOS inervan el ovario, el oviducto y el útero. En el ovario, las terminaciones nerviosas del NOS se encuentran asociadas a la vasculatura, rodean a los folículos en desarrollo e inervan células de la teca y de la glándula intersticial. El cuerpo lúteo y la capa de células de

granulosa carecen de inervación, no obstante responden ante un estímulo catecolaminérgico, debido a la presencia de receptores β -adrenérgicos (Lawrence y Burden, 1980; Dissen et al., 1998).

Nervio Vago. Es un nervio mixto que contiene en su mayoría fibras de naturaleza parasimpática (75%). Así como algunas fibras sensoriales y motoras. Este paquete neural transporta acetilcolina, SP y en menor proporción VIP y somatostatina. Los somas de las neuronas del nervio vago, se proyectan desde el bulbo raquídeo (Burden et al., 1983).

5. ACETILCOLINA

La acetilcolina (ACh) que está almacenada en las vesículas de las terminales de las neuronas colinérgicas es sintetizada en el citoplasma de la neurona, a partir de acetato y de la colina, moléculas que son tomadas de la corriente sanguínea o de la recapturada en el espacio sináptico. La enzima colino-acetil-transferasa (CAT) es la enzima de síntesis de la ACh (Massoulie y Bons, 1982). La inactivación de la ACh, que implica la hidrólisis del neurotransmisor, es producida por la acetilcolinesterasa (AChE) en el espacio sináptico, la que produce colina y acetato (Figura 8).

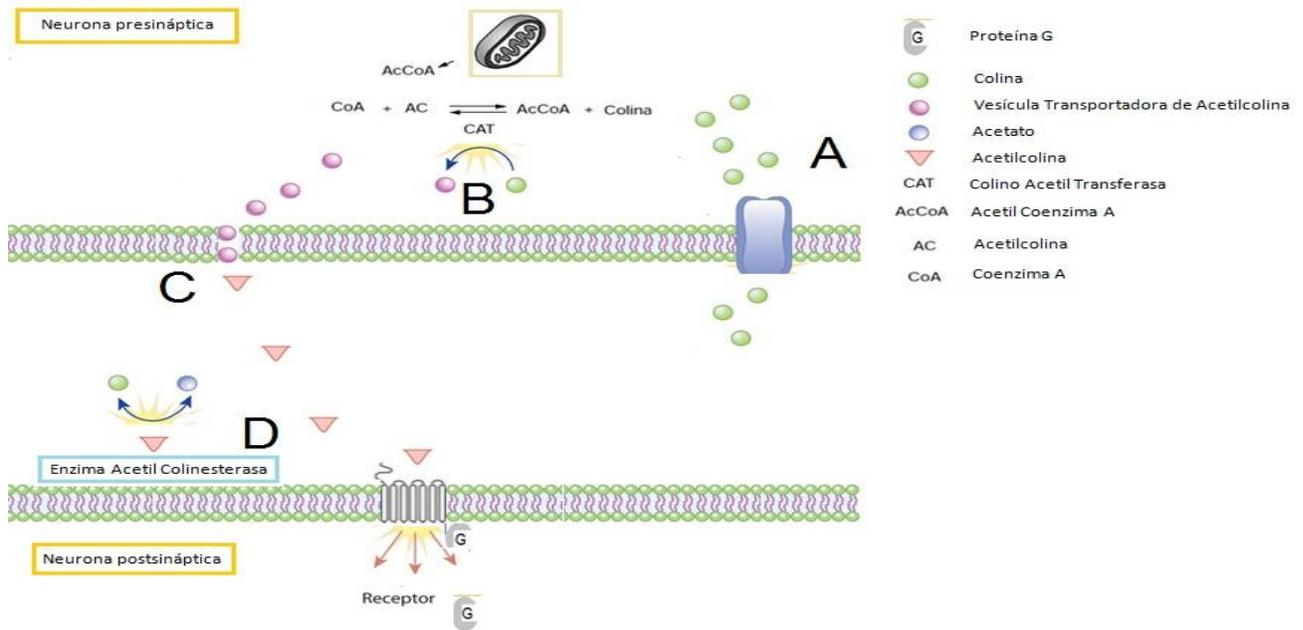


Figura 8. Síntesis y degradación de la acetilcolina. A) Captación de la colina del medio sináptico. B) En la unión de colina con la Acetil coenzima A por medio de la Colino Acetil Transferasa, se forma la acetilcolina y la Coenzima A. C) La Acetilcolina es llevada por la Vesícula transportadora de Acetilcolina hacia el botón sináptico. D) La Acetilcolina es liberada y esta se une con su receptor muscarínico o nicotínico o puede ser degradada por la Enzima Acetil Colinesterasa en acetato y colina, de esta manera la colina pueda ser recapturada.

En las terminales de neuronas colinérgicas, la ACh es liberada y se transporta a través de la membrana de manera activa y dependiente del Na^+ (McMahan, 1992; Alcaráz, 2001;) como resultado de un estímulo nervioso que induce el ingreso de Ca^{+2} a la célula y se acumula en el citoplasma de la neurona; esto activa las proteínas contráctiles del citoesqueleto y facilita que la vesícula que contienen la ACh, sean llevadas directamente a la membrana presináptica y sea liberado el neurotransmisor por exocitosis al espacio sináptico (Südhof, 1995).

Los receptores a ACh se dividen en dos categorías: nicotínicos (nAChRs) y muscarínicos (mAChRs). Los nAChRs son receptores asociados a canales iónicos (ionotrópicos), los que al interactuar con la ACh estimula la apertura del canal, mientras que los mAChRs son del tipo metabotrópico (Nathanson, 1987).

6. RECEPTORES MUSCARÍNICOS

Los receptores muscarínicos pertenecen a una gran familia de receptores acoplados a proteínas G, los cuales están constituidos por siete dominios transmembranales. Estos receptores transmiten varias señales químicas provenientes desde el espacio extracelular mediante cuatro clases heterotriméricas de proteínas G, que son activadas de manera distinta dependiendo de la vía o señal de comunicación (Michal et al., 2007).

Los receptores muscarínicos tienen dos sitios principales de activación, el primer sitio relacionado con la molécula de señalización (o su ligando) en la superficie de la membrana y el segundo sitio de activación está en el interior de la membrana por su asociación con una proteína G (Michal et al., 2007).

En la actualidad se han caracterizado cinco tipos de mAChRs, denominados como m_1 AChR, m_2 AChR, m_3 AChR, m_4 AChR y m_5 AChR (nomenclatura de Bonner, 1989) (Kubo et al., 1986; Bonner, 1988; Peralta et al., 1987).

6.1 RECEPTOR MUSCARÍNICO TIPO-2

El m_2 AChR se encuentra acoplado a tres tipos de proteína G: $G_{q/11}$, $G_{i/\alpha}$, y G_s . La activación de este receptor y su mecanismo de acción parecen depender del tipo de célula. La proteína G_s estimula la síntesis de AMPc, la proteína $G_{q/11}$ induce la acumulación de fosfato inositol (IP), el que a su vez tiene un efecto directo sobre la fosfolipasa C y la proteína $G_{i/\alpha}$ inhibe la síntesis de AMPc (Michal et al., 2001).

La localización del m_2 AChR ha sido identificada en diferentes tipos de tejido y órganos como el músculo liso, el endometrio, el miometrio, el nódulo sinoauricular del corazón, la vejiga, el tubo digestivo y el testículo (Michal et al., 2001).

En la industria farmacéutica, se han creado de manera sintética sustancias agonistas o antagonistas para el m_2 AChR, los agonistas se fijan en el receptor y la energía química liberada con la fijación induce un cambio de conformación que pone en marcha una cadena de acontecimientos bioquímicos en el interior de la célula, lo que conduce a una respuesta similar a la de la acción de la acetilcolina unido al m_2 AChR, un ejemplo de los agonistas al m_2 AChR son: Oxotremorina, Betanecol, Pilocarpina.

Los antagonistas se fijan en el receptor, pero no los activan. No inducen un cambio en la conformación y, por tanto, no muestran ninguna “respuesta” al interior de la célula. Sin embargo, dado que los antagonistas ocupan al receptor, impiden que la ACh se fije y, por consiguiente, bloquean su acción, un ejemplo de antagonistas para el m_2 AChR es la Metoctramina (MTC) y el AF-64 (Michal et al., 2001).

La MTC (N, N'-bis[6-[[[2-metoxi fenil)-metil]hexil]-1, 8-octanol] diamino) se une específicamente con el m_2 AChR ya que este antagonista tiene una gran afinidad por este receptor (Melchiorre et al., 1987) y una muy baja afinidad por el m_3 AChR (Jakubik et al., 2014).

7. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA OVULACIÓN

En el humano, el mono y la rata la ACh no sólo llega al ovario a través de las fibras del nervio vago, sino que también es producida por células de la granulosa de los folículos preovulatorios, ya que estas células expresan la CAT (Mayerhofer y Kunz, 2005). Únicamente en la células de la granulosa de ovarios de humano y primates se ha mostrado por RT-PCR e inmunohistoquímica, la presencia de m_1 AChR, m_5 AChR y el m_3 AChR en el ovocito (Fritz et al., 2001). En el cuerpo lúteo de la vaca se ha identificado el m_2 AChR; y en cultivo de células luteales se ha mostrado la presencia de CAT. La adición de ACh y LH a los medios de cultivo de células luteales de bovino resulta en la síntesis de P_4 (Al-zi'abi et al., 2009). Los efectos de la activación de este sistema muscarínico del ovario son de índole mitogénico, autócrino y parácrino (Mayerhofer et al., 2003).

En la rata, la inyección subcutánea de MTC (0.5 mg/Kg peso) en el día del proestro, pero no en las otras fases del ciclo estral, disminuye el porcentaje de animales que ovulan en el día del estro esperado (Hernández, 2012). En el proestro, el bloqueo de los m_2 AChR del ovario izquierdo no interrumpe la ovulación, pero aumenta el peso de ambos ovarios y disminuye el peso del útero. En el estro, la micro-inyección de MTC por vía peritoneal bloquea los m_2 AChR el cual no modifica el porcentaje de animales ovulantes, sin embargo disminuye el porcentaje de animales ovulantes del ovario inyectado, aunque lo hagan del derecho (Hernández, 2013). La micro-inyección de MTC en el ovario izquierdo de la rata provoca el bloqueo de la ovulación en ambos ovarios, cuando el fármaco se inyecta en el diestro-2. Estos resultados sugieren la presencia de estos receptores en el ovario, aunque a la fecha no hay evidencias de su presencia en las distintas estructuras ováricas.

8. JUSTIFICACIÓN

Las células de la granulosa de los folículos preovulatorios de humano, mono y rata sintetizan CAT y ACh, pero sólo en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios de humano y de mono se ha identificado el ARNm de los m_1 AChR y m_5 AChR (Mayerhofer y Kunz, 2005). Los efectos de la activación de este sistema muscarínico en el ovario son de índole mitogénicos, autócrinos y parácrinos (Mayerhofer et al., 2003). En cultivo de células luteales de bovino, la adición de ACh y de LH incrementa la síntesis de P_4 (Al-zi'abi et al., 2009) y se sugiere la presencia del m_2 AChR en cuerpos lúteos de la vaca. En la rata, la micro-inyección de MTC en el ovario izquierdo de una rata en el día diestro-2 bloquea la ovulación (Hernández, 2013). A pesar de que estos resultados sugieren la presencia de los m_2 ACh en el ovario, a la fecha no se ha demostrado su presencia en la gónada. Por lo que en esta tesis se decidió detectar la proteína y la distribución del m_2 AChR en el ovario izquierdo y derecho de la rata en cada fase del ciclo estral. Así como estudiar a las 13:00 h del diestro-2, los efectos del bloqueo de los m_2 AChR del ovario derecho sobre la ovulación, con la finalidad de analizar si este receptor participa en la regulación de la ovulación en uno y otro ovario.

9. HIPÓTESIS

1.- Dado que la administración de un antagonista específico al m_2 AChR en el ovario de la rata, resulta en el bloqueo de la ovulación, entonces la proteína del m_2 AChR estará localizada en el ovario de la rata adulta.

2. La integración de las señales endocrinas en cada nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario son necesarias para que ocurra la ovulación, por lo que el reemplazo de GnRH, LH o del E_2 en animales tratados con un antagonista específico al m_2 AChR será necesario para el restablecimiento de la ovulación.

10. OBJETIVO GENERAL

Detectar la distribución del m_2 AChR en el ovario izquierdo y derecho de la rata adulta, en los diferentes días del ciclo estral y su posible participación en la ovulación.

11. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Detectar la proteína del m_2 AChR en las distintas estructuras anatómicas de los ovarios a las 13:00 h de cada fase ciclo estral de la rata adulta.
2. Analizar si existe asimetría en la distribución y el contenido de la proteína del m_2 AChR entre el ovario izquierdo y derecho de la rata adulta en las distintas fases del ciclo estral.
3. Detectar la proteína del m_2 AChR en el ovario de animales tratados con un antagonista específico de m_2 AChR.
4. Evaluar la respuesta ovulatoria al restablecimiento de la señal hipotalámica, hipofisaria y ovárica en animales tratados con un antagonista específico para m_2 AChR.

12. MATERIALES Y MÉTODOS

12.1 ANIMALES EXPERIMENTALES

El estudio se realizó en ratas hembras adultas de la cepa CIIZ-V (Facultad de Estudios Superiores Zaragoza), de 3-4 meses de edad, con pesos de 195 a 225 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de luz/oscuridad controladas (14 horas luz/10 horas oscuridad, luces de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso al alimento (Harlan SA, México) y agua. Los ciclos estrales se estudiaron mediante la toma diaria de frotis vaginales. Solamente las ratas que mostraron dos ciclos estrales consecutivos de 4 días se utilizaron. Para el estudio de la distribución del m_2 AChR, en cada ovario se tomaron cuatro ratas en cada fase del ciclo estral y fueron sacrificadas en una cámara de cloroformo entre las 12:30 y 13:30 h.

Los ovarios y el útero fueron disecados y en los oviductos se contaron el número de ovocitos liberados con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Olympus, Modelo SZ51, Tokio, Japón). Los ovarios y el útero se pesaron en una balanza analítica (Electronic Balance, Modelo ESJ 200-4, Guangdong, China), y su peso fue expresado en mg/100g de peso corporal. El porcentaje de animales ovulantes se determinó bajo la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{número de animales ovulantes}}{\text{número de animales}} \times 100$$

12.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A las 12:15 h del diestro-2 (n=16) otras ratas fueron inyectados con un “cocktail” de ketamina/xilazina (25 mg / 0.1 mg, respectivamente). Una vez que fueron anestesiados, entre las 12:30 y 13:30 h, se les realizó una incisión dorso-lateral en el costado derecho, a través de la piel y músculo, el ovario derecho se extrajo, evitando la manipulación de otros órganos, y se inyectó 1 μ L de MTC o del vehículo (Veh), a través de un tubo de teflón (0,65 mm de diámetro exterior

Bioanalíticos Systems, INC), conectado a una jeringa (29G) de acero inoxidable, que fue conectada a una jeringa Hamilton de 20 μL , montada a una bomba de microinyección (CMA 100, BAS, Estocolmo, Suecia). Ocho de estos animales fueron inyectados con 19 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de MTC (Sigma-Aldrich, México), esta dosis fue seleccionada a experimentos previos por nuestro laboratorio que demuestra el efecto farmacológico deseado (datos no publicados) y las ocho ratas restantes fueron inyectadas con el vehículo (agua destilada). La velocidad a la que se inyectaron las soluciones fue de 60 segundos. Para evitar que la solución saliera de la bursa, la aguja se mantuvo en la bursa del ovario, durante un minuto después de la inyección. Posteriormente, la superficie del ovario se enjuagó cuidadosamente con solución salina fisiológica y se volvió a colocar en la cavidad abdominal. La incisión quirúrgica se suturó con hilo de seda y los animales se sacrificaron a la mañana del estro esperado (09:00-10:00 h) en una cámara de cloroformo.

Para llevar a cabo el restablecimiento de las señales hipotalámica, hipofisaria y ovárica en animales no ovulantes por la micro-inyección de MTC en la bursa del ovario derecho se utilizaron tres diferentes grupos de animales con los siguientes tratamientos:

- Grupo I. 3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso de LHRH-Gly sintética (Zigma Aldrich, México) a las 14:00 h del proestro del ciclo tratado,
- Grupo II. 25 UI hCG (Gonadotropina Coriónica humana) a las 14:00 h del proestro del ciclo tratado
- Grupo III. 10 μg de BE (benzoato de estradiol) a las 14:00 h del diestro-2 del ciclo tratado.

Todos los animales fueron sacrificados en una cámara letal con cloroformo en la mañana del estro esperado.

12.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunorreactividad (IR) se detectó usando un protocolo convencional basado en avidina-biotina peroxidasa. Los ovarios fueron incluidos en parafina y se obtuvo secciones de ovario de 6 μm de grosor de grupos de cuatro ratas intactas en los diferentes días del ciclo estral, así como también a un grupo que fueron tratados con Veh y MTC. Los cortes de tejidos fueron desparafinados, hidratados y pre-tratados con agua oxigenada (H_2O_2) al 1% durante 30 minutos, para desactivar la peroxidasa endógena, se hicieron tres lavados de una solución de buffer de fosfatos (PBS) 0.1 M/L y después se incubaron con boro hidruro de sodio (NaBH_4) al 1% para reducir los grupos aldehídos. Para facilitar la interacción del anticuerpo con su antígeno se utilizó una solución de citrato de sodio 10 mM, las secciones de tejido se incubaron con el anticuerpo primario m_2AChR (NB120-2805, Novul Biologicals, Littleton, Colorado) a una dilución 1:50 a 4°C durante 48 horas. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario dilución 1:100 a temperatura ambiente durante 2 h (pk-6101, Kit Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). El complejo inmuno-reactivo se detectó con avidina-biotina (AB) (PK-6100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) peroxidasa (figura 9). Las secciones fueron teñidas con diaminobencidina (DAB) (Sk-4100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) y se contratiñeron con hematoxilina de Meyer (H-3404, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Posteriormente los cortes se deshidrataron y fueron cubiertos con medio de montaje (H-5000, Vect Mount, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) para ser observados en el microscopio de luz equipado con una cámara digital (Nikon Eclipse Modelo E400, Tokio, Japón). Como control negativo, el anticuerpo primario se omitió, y se procedió con el resto del procedimiento como se mencionó anteriormente. Se midió la intensidad media de la IR con el programa NIS-Elements (Nikon, software versión 3.0), la intensidad de la ir- m_2AChR se determinó con el promedio obtenido en el rango de luz entre 0 y 250 (rango negro y blanco respectivamente) la fórmula para clasificar fue la siguiente $A = \frac{R}{K}$ (R=Recorrido [valor máximo - valor mínimo], K=Intervalos [tres intervalos debido a las cruces], A=Amplitud [rango de los intervalos]), donde si el promedio presentó mayor IR se colocaron tres cruces (+++), si presentaron un rango intermedio se colocaron dos cruces (++) y si presentaron un promedio bajo se colocó una cruz (+). También se cuantificó los folículos que presentaron ir- m_2AChR .

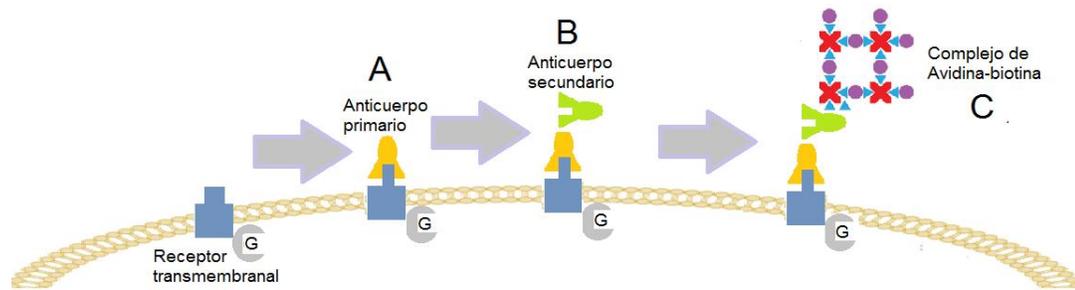


Figura 9. Representación esquemática de la técnica de inmunohistoquímica. Se observa el proceso por el cual los cortes de ovario de rata fueron incubados con el anticuerpo primario (A), después por el anticuerpo secundario (B) y finalmente con el complejo de Avidina-biotina (C) para la detección del m₂AChR.

12.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

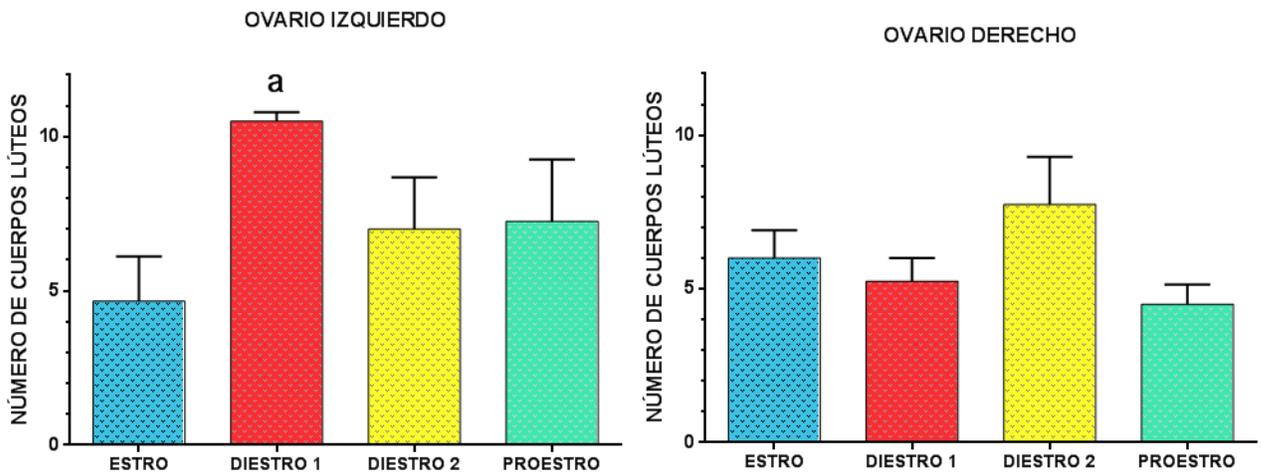
Los resultados del número de animales ovulantes se analizaron por la prueba de la probabilidad Exacta de Fisher. El número de ovocitos liberados así como el número de cuerpos lúteos ir-m₂AChR se analizó por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Los datos del peso de los ovarios, del útero se analizaron por la prueba de Análisis de Varianza (ANDEVA), seguida de la prueba de Turkey. En los casos en que se compararon dos grupos, se utilizó la prueba de “t” de Student o 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 .

13. RESULTADOS

Detección del m₂AChR en el ovario de la rata adulta durante el ciclo estral

Los resultados obtenidos mostraron que la proteína m₂AChR se detecta en todos los cuerpos lúteos del ovario izquierdo y derecho. En cada ovario el número de cuerpos lúteos depende de la fase de ciclo estral en la que se encontró el animal. Interesantemente, el número de cuerpos lúteos encontrados en el ovario izquierdo es ligeramente mayor (14%) al ovario derecho. En la fase del diestro-1 se observó la mayor cantidad de cuerpos lúteos en el ovario izquierdo. En cambio, en el ovario derecho no se observaron diferencias significativas en la cantidad de cuerpos lúteos por cada rata en las diferentes fases del ciclo estral (figura 10).

Figura 10. Número de cuerpos lúteos ir-m₂AChR en el ovario de la rata adulta a las 10:00 h de cada fase del ciclo estral

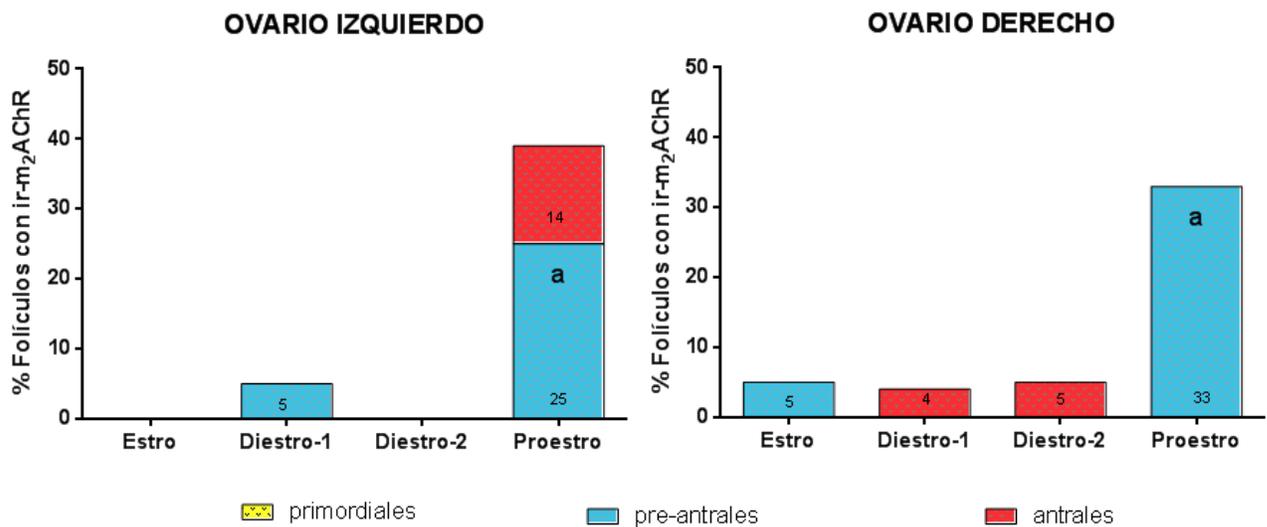


a<0.05 vs. estro (prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn)

Con respecto a la etapa de crecimiento de los folículos y el día del ciclo estral, se observó que la proteína del ir-m₂AChR no se encuentra presente en los folículos primordiales de ambos ovarios (figura 11). Sin embargo, en el estro, únicamente en el ovario derecho, el 5% del total de folículos

pre-antrales presentaron ir-m₂AChR. En el diestro-1, los folículos pre-antrales con ir-m₂AChR sólo estuvieron presentes en el ovario izquierdo, mientras que en el ovario derecho los folículos ir-m₂AChR fueron antrales. En el diestro-2 ningún tipo de folículo presentó ir-m₂AChR en el ovario izquierdo. En cambio, en el ovario derecho los folículos ir-m₂AChR fueron los antrales. En el proestro, el ovario izquierdo presentó folículos pre-antrales y antrales ir-m₂AChR. En cambio el ovario derecho sólo mostró folículos pre-antrales ir-m₂AChR (figura 11). En esta fase del ciclo, tanto en el ovario izquierdo como en el derecho, el porcentaje de folículos pre-antrales ir-m₂AChR es significativamente mayor que en la otra fase del ciclo donde se observó la ir-m₂AChR. Estos resultados sugieren una distribución diferencial del m₂AChR en las distintas estructuras anatómicas del ovario a lo largo del ciclo estral de la rata.

Figura 11. Porcentaje de folículos primordiales, pre-antrales y antrales ir-m₂AChR del ovario en la rata adulta en cada fase del ciclo estral



Ovario izquierdo: a, p<0.001 vs. Diestro-1, Ovario derecho: a, p<0.001 vs. Estro (Prueba de Ji². con corrección de Yates)

Con base en la intensidad promedio de la ir-m₂AChR que presentaron los cuerpos lúteos, se observó que en el ovario izquierdo mostraron mayor intensidad en la fase del diestro-1 y la menor en el

diestro-2 y el proestro. Mientras que en el ovario derecho la mayor intensidad estuvo presente en el proestro y la menor en el diestro-1 (Tabla 1, figura 12).

Tabla 1. Intensidad del m_2 AChR en los cuerpos lúteos del ovario de la rata adulta en las diferentes fases del ciclo estral

<i>Etapa del ciclo estral</i>	Grado de intensidad del Ovario Izquierdo	Grado de intensidad del Ovario Derecho
<i>Estro</i>	++	++
<i>Diestro 1</i>	+++	+
<i>Diestro 2</i>	+	++
<i>Proestro</i>	+	+++

Cuando se analizó la distribución de ir- m_2 AChR en los folículos y los cuerpos lúteos se observaron que en los folículos pre-antrales la ir- m_2 AChR se localizó predominantemente en el ovocito (figura 13). Mientras que, en los folículos antrales (sanos o atrésicos) la ir- m_2 AChR se localizó en el ovocito y las células de la granulosa de la corona radiada, murales o ambas (Figura 14). En cambio, en los cuerpos lúteos, la ir- m_2 AChR se localizó en todas las células luteinizadas, tanto granuloso-luteínicas como teco-luteínicas.

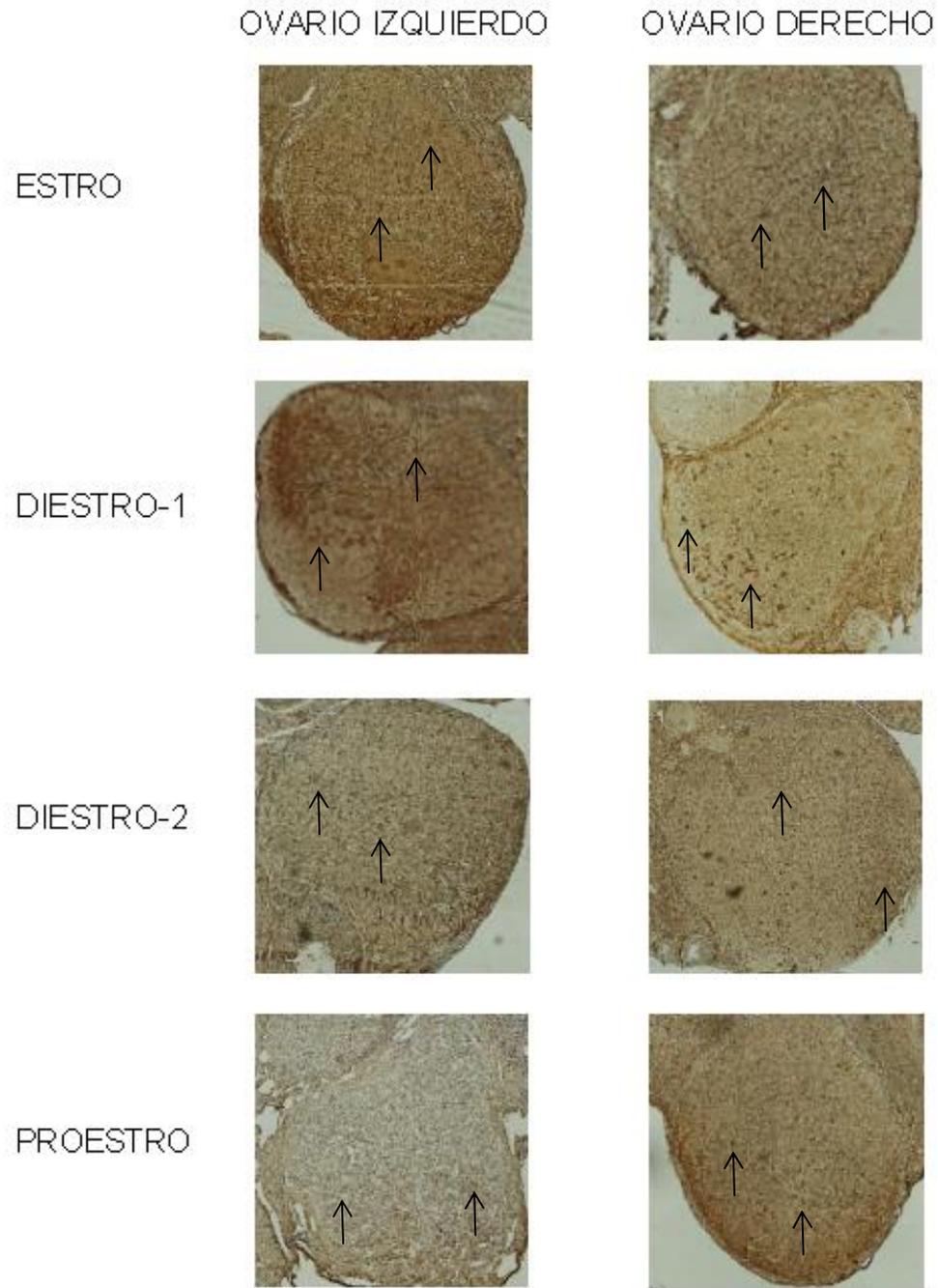


Figura 12. Inmuno-localización del m_2 AChR en el cuerpo lúteo del ovario izquierdo y derecho en cada fase del ciclo estral de la rata adulta. Fotomicrografías a 10X. Las flechas indican la inmuno-tinción (color café) del m_2 AChR. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina de Meyer (células azules sin ir)

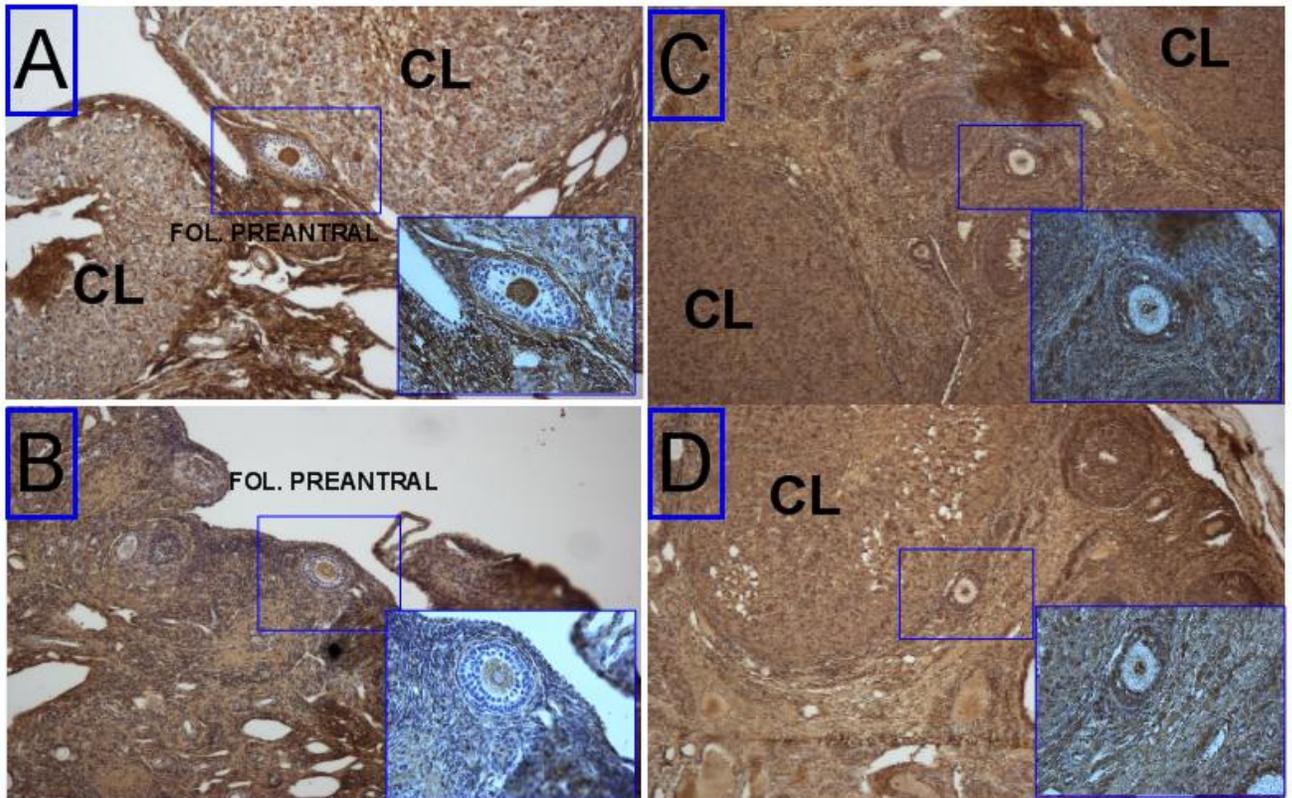


Figura 13. Inmuno-localización del m_2 AChR en el ovario izquierdo (panel A y B) y derecho (panel C y D) de la rata adulta. Se puede observar la ir- m_2 AChR en la membrana del ovocito de un folículo pre-antral (A), Fotomicrografía 10X. En el recuadro se muestra el folículo pre-antral (40X), con ir- m_2 AChR en la membrana citoplasmática del ovocito. Los ovarios fueron contrateñidos con hematoxilina de Meyer (células color azul sin ir). CL=Cuerpo Lúteo, Fol =Folículo.

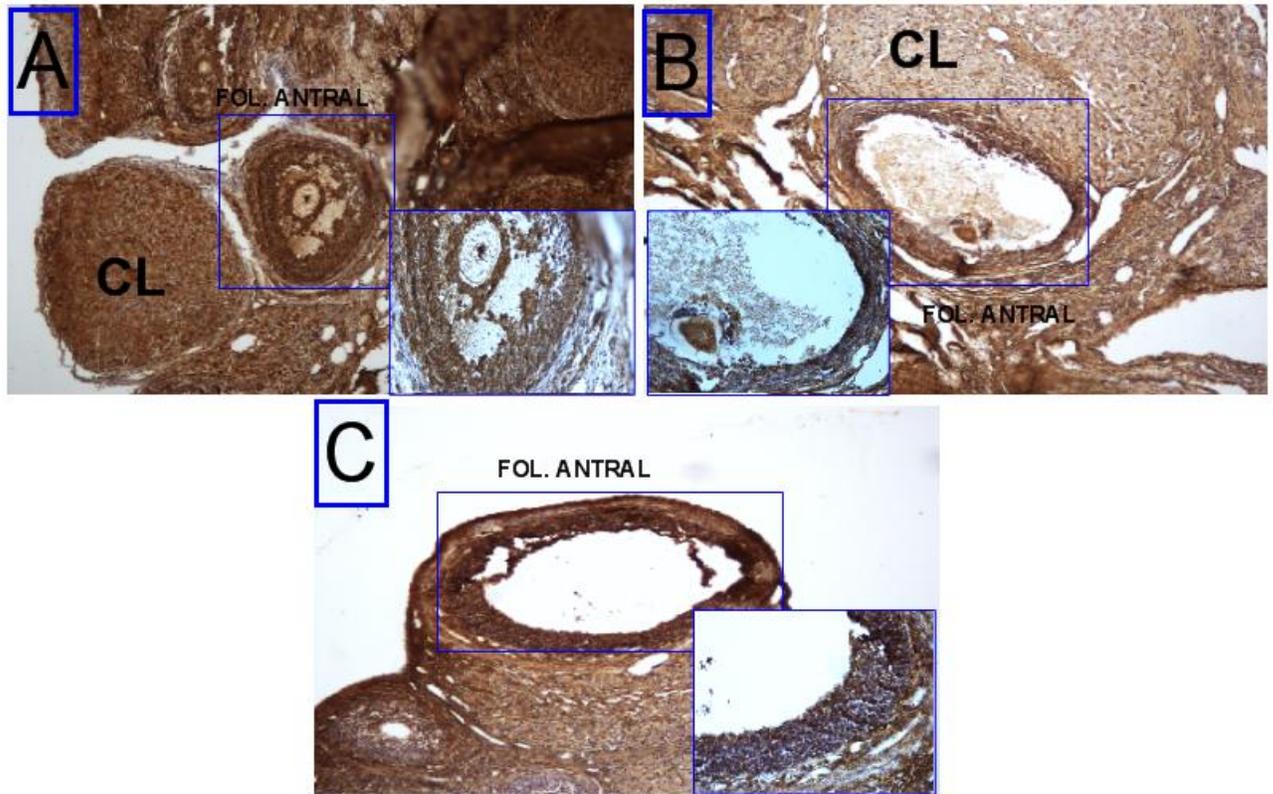
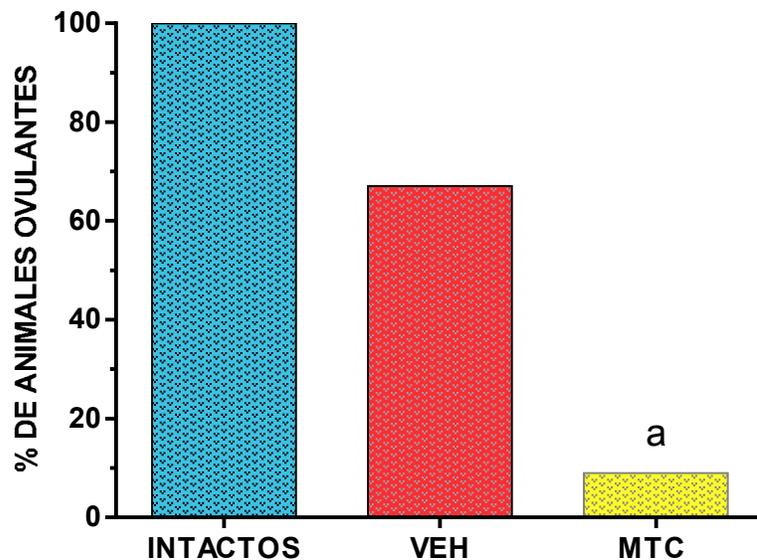


Figura 14. Inmuno-localización del m_2 AChR en folículos antrales del ovario de la rata adulta. Se puede observar la ir- m_2 AChR en la corona radiada y algunas zonas de la capa mural de células de la granulosa (panel A) o en el ovocito (panel B) y algunas zonas de la capa mural de células de la granulosa (panel C), fotomicrografías 10X. En cada recuadro se muestra una zona con ir- m_2 AChR (40X), que se presenta en la membrana citoplasmática (café). Los ovarios fueron contrateñidos con hematoxilina de Meyer (células color azul sin ir) CL=Cuerpo Lúteo, Fol =Folículo.

Efectos del bloqueo del m_2 AChR en el ovario derecho de la rata adulta

La microinyección del antagonista específico de m_2 AChR (MTC) en el ovario derecho, redujo significativamente el porcentaje de animales ovulantes en el estro esperado, en comparación con el grupo de animales tratados con vehículo (figura 15).

Figura 15. Porcentaje de animales ovulantes en el día del estro esperado después del tratamiento de metoctramina en el ovario derecho a las 13:00 h del diestro-2



a, $p < 0.001$ vs. VEH (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher)

El tratamiento con MTC bloqueó la ovulación en el ovario contralateral (ovario izquierdo), mientras que, en el ovario derecho solo el 7% de los animales tratados ovularon. El tratamiento no modificó el número de ovocitos liberados en el ovario derecho (Tabla 2).

Tabla 2. Media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados por los ovarios, en la mañana del estro esperado de animales intactos, micro-inyectados con Veh o MTC a las 13:00 h del diestro-2

<i>Grupo experimental</i>	<i>Número de ovocitos liberados por</i>		
	<i>ovario izquierdo</i>	<i>ovario derecho</i>	<i>ambos ovarios</i>
<i>Intacto</i>	6.1 \pm 0.7	7.3 \pm 0.5	13.4 \pm 0.5
<i>Vehículo</i>	6.6 \pm 0.7	6.4 \pm 0.3	13.0 \pm 0.4
<i>Metocramina</i>	0	5.5 (5,6)	-

Con respecto al peso de los ovarios y el útero no se observó cambios en los animales que recibieron la micro-inyección de vehículo o de metocramina con respecto al grupo de animales intactos (Tabla 3).

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

<i>Grupo experimental</i>	<i>Peso (mg/100g peso corporal)</i>		
	<i>ovario izquierdo</i>	<i>ovario derecho</i>	<i>Útero</i>
<i>Intacto</i>	15.7 \pm 0.8	16.5 \pm 0.8	156.6 \pm 6.6
<i>Vehículo</i>	14.1 \pm 0.8	14.2 \pm 0.7	166.6 \pm 7.8
<i>Metocramina</i>	12.9 \pm 1.0	13.4 \pm 0.9	191.4 \pm 12.9

Con respecto al número de estructuras e intensidad de la ir-m₂AChR en los ovarios derecho e izquierdo de los animales tratados Veh o MTC, a las 13:00 h del día del diestro-2, no se observó diferencias significativas en la ir-m₂AChR en el estro esperado comparado con el grupo intacto (Tabla 4 y 5, figura 16).

Tabla 4. Ir-m₂AChR en las estructuras anatómicas del ovario izquierdo después del tratamiento con Veh o MTC a las 13:00 h del diestro-2

<i>Estructuras</i>	<i>Ir/estructuras totales</i>	<i>%</i>	<i>Ir/estructuras totales</i>	<i>%</i>	<i>Ir/estructuras totales</i>	<i>%</i>
	<i>Intacto</i>		<i>Micro-inyección del vehículo</i>		<i>Micro-inyección de metocramina</i>	
<i>Folículos primordiales</i>	0/10	0	0/6	0	0/8	0
<i>Folículos pre-antrales</i>	0/1	0	0/13	0	0/16	0
<i>Folículos antrales</i>	0/3	0	0/12	0	0/16	0
<i>Cuerpos lúteos</i>	14/14	100	21/21	100	26/26	100

Tabla 5. Ir-m₂AChR en las estructuras anatómicas del ovario izquierdo después del tratamiento con Veh o MTC a las 13:00 h del diestro-2

<i>Estructuras</i>	<i>Ir/estructuras totales</i>	<i>%</i>	<i>Ir/estructuras totales</i>	<i>%</i>	<i>Ir/estructuras totales</i>	<i>%</i>
	<i>Intacto</i>		<i>Micro-inyección del vehículo</i>		<i>Micro-inyección de metocramina</i>	
<i>Folículos primordiales</i>	0/23	0	0/12	0	0/6	0
<i>Folículos pre-antrales</i>	1/21	5	0/16	0	0/9	0
<i>Folículos antrales</i>	0/12	0	0/16	0	0/9	0
<i>Cuerpos lúteos</i>	24/24	100	27/27	100	32/32	100

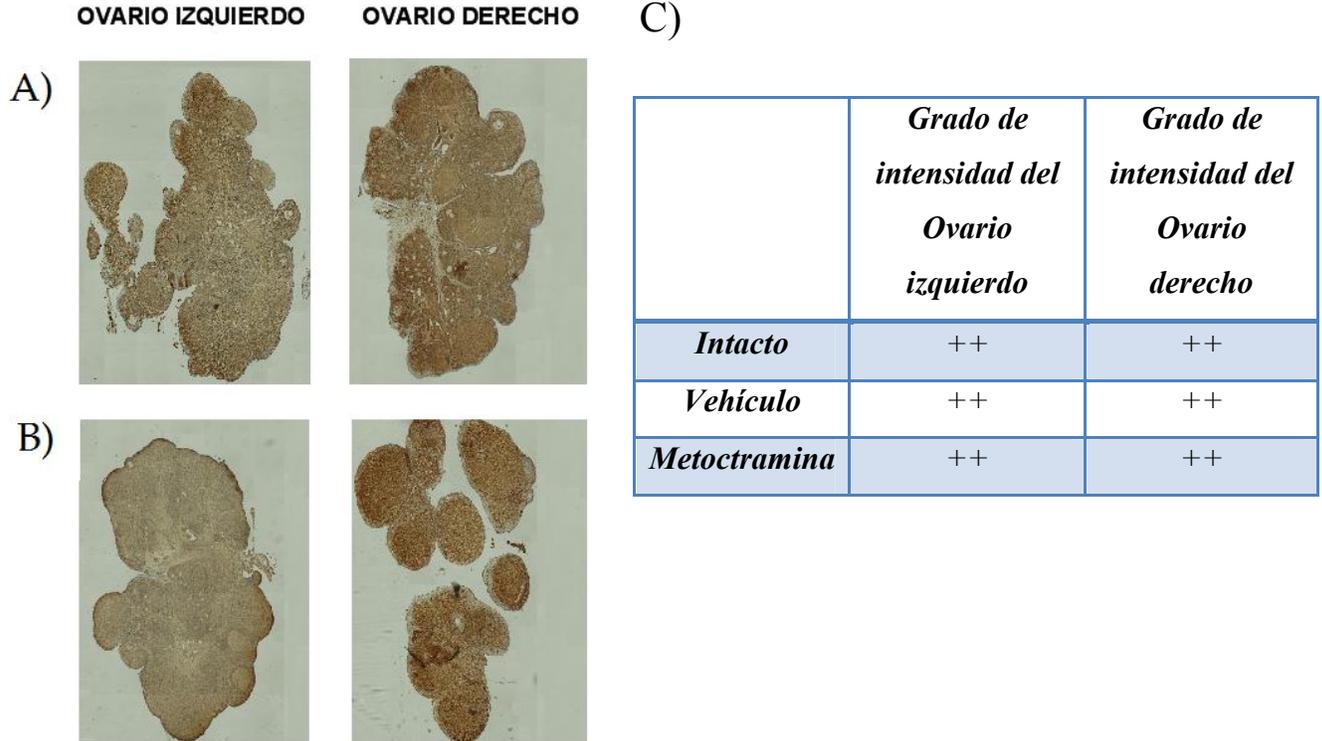
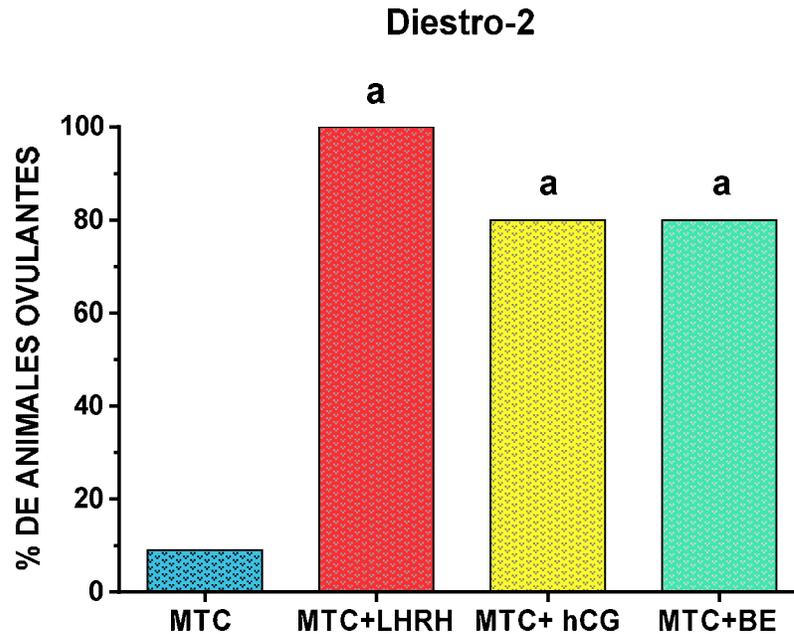


Figura 16. Ir-m₂AChR en ambos ovarios de animales tratados con Veh (panel A) o con MTC (panel B) en el ovario derecho, a las 13:00h del diestro-2. Las fotomicrografías panorámicas a 10X muestran la intensidad de la ir-m₂AChR en los cuerpos lúteos (Panel C).

Efecto del restablecimiento de las señales hipotalámica, hipofisaria u ovárica en animales tratados con un antagonista específico del m₂AChR

El restablecimiento de la señal hipotalámica por el reemplazo hormonal con LHRH-Gly sintética restableció la ovulación en el 100% de los animales tratados con el antagonista específico para m₂AChR (MTC). En cambio el tratamiento de reemplazo de la señal hipofisaria con hCG o de la señal ovárica con BE restableció en un 80% la ovulación en los animales tratados con MTC (figura 17).

Figura 17. Restablecimiento de la ovulación en animales tratados con MTC en el ovario derecho a las 13:00 h del Diestro-2



a, $p < 0.001$ vs. MTC (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher)

El restablecimiento de la señal hipotalámica, hipofisaria u ovárica en animales con bloqueo de los m_2 AChR en diestro-2 no afectó el número de ovocitos liberados con respecto a los animales tratados con MTC y Veh (Tabla 6).

Tabla 6. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados por los ovarios de animales tratados con Veh o MTC a las 13:00 h del día del diestro-2 después del reemplazo hormonal

Grupo experimental	Número de ovocitos liberados por		
	<i>ovario izquierdo</i>	<i>ovario derecho</i>	<i>ambos ovarios</i>
Vehículo	6.6 \pm 0.7	6.4 \pm 0.3	13.0 \pm 0.4
Metocramina	0	5.5 (5,6)	-
Metocramina +LHRH	6.7 \pm 0.6	3 \pm 0.4	9.7 \pm 0.5
Metocramina +hCG	5.3 \pm 0.6	6.2 \pm 1.1	11.5 \pm 0.6
Metocramina +BE	5.7 \pm 0.4	2.5 \pm 1.5	8.2 \pm 0.8

El restablecimiento de la “señal hipotalámica” a animales con bloqueo de m_2 AChR en el diestro-2, disminuyó el peso del útero en comparación con el grupo tratado con MTC. El restablecimiento de la “señal hipofisaria” o “señal ovárica” no modificó significativamente el peso del ovario y del útero en los animales tratados con MTC (Tabla 7).

Tabla 7. Media \pm e.e.m. del peso de los ovarios y del útero en animales tratados con Veh o MTC a las 13:00 h del día del diestro-2 después del reemplazo hormonal

GRUPO EXPERIMENTAL	PESO (mg/100g peso corporal)		
	<i>ovario izquierdo</i>	<i>ovario derecho</i>	<i>Útero</i>
<i>Metocramina</i>	12.9 \pm 1.0	13.36 \pm 0.9	191.4 \pm 12.9
<i>Metocramina +LHRH</i>	14.9 \pm 0.8	13.8 \pm 1.3	145.6 \pm 14.5*
<i>Metocramina +hCG</i>	16.1 \pm 1.5	15.6 \pm 0.8	160.2 \pm 13.6
<i>Metocramina +BE</i>	15.7 \pm 1.0	15.7 \pm 1.3	191.4 \pm 13.1

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

14. DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos mostramos que los ovarios de la rata adulta expresan el m_2 AChR. Dichos receptores están presentes en los cuerpos lúteos y en menor porcentaje en folículos. Durante el ciclo estral, ambos ovarios presentan un número similar de estructuras inmuno-reactivas para el m_2 AChR. La micro-inyección de Veh o MTC en el ovario derecho no modifica la intensidad de la ir- m_2 AChR en ninguno de los ovarios. Sin embargo, bloquear el m_2 AChR inhibe la ovulación como resultado de la alteración de la señal ovárica (17β -estradiol), y en consecuencia de la modificación de la secreción preovulatoria de GnRH y LH.

El m_2 AChR se acopla a la proteína G_i que inhibe a la adenilato ciclasa y activa canales de potasio (Michal et al., 2001, Golan et al., 2012). Deckel (1983) mostró que la maduración del ovocito de la rata es inhibida por AMPc. Dado que el ovocito de los folículos primarios y pre-antrales expresan el m_2 AChR, nos permite sugerir que en las primeras etapas de desarrollo del folículo, la maduración del ovocito estaría regulado de manera estimulante por la unión de ACh a los m_2 AChR.

En las células de cuerpos lúteos de bovino en cultivo, la ACh promueve la producción de P_4 al medio (Al-zí'abi et al., 2009). La presencia del receptor m_2 AChR en los cuerpos lúteos de la rata nos lleva a sugerir que estos receptores regularían la secreción de progesterona.

En nuestra cepa de rata, la concentración de P_4 a las 13:00 h del diestro-1 alcanza los valores máximos con respecto a las otras fases del ciclo (Flores et al., 2008). En nuestro estudio, en la fase del diestro-1 la desigual intensidad de ir- m_2 AChR en los cuerpos lúteos del ovario izquierdo respecto al derecho, sugieren una asimetría funcional. En la cerda, Rao y Edergton (1984) mostraron diferencias en la unión específica de hCG marcada con yodo radioactivo, en la concentración de P_4 , y en las actividades de la enzima citocromo C oxidasa (una enzima mitocondrial), de la acetil-D-glucosaminidasa (una enzima lisosomal) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

La P₄ es el esteroide gonadal dominante en la regulación de la secreción de la GnRH durante la fase lútea, ya que inhibe la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH (Herbison, 2006). En la rata con ciclos estrales de 4 días, la inyección de P₄ en los dos días de diestro resulta en el retraso de la ovulación (Everett, 1948). Con base en estos resultados y los mostrados por Al-zí'abi (2009), sugerimos que los m₂AChR presentes en los cuerpos lúteos tendrían un papel estimulante de la secreción de progesterona, la que se mantendría durante todos los días del ciclo estral por la presencia constante de los cuerpos lúteos.

También se plantea que la progesterona eleva la amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH (Krey et al., 1973; Clifton et al., 1975; Levine et al., 1980), pero este efecto es dependiente de la síntesis de los receptores a P₄ inducidos por estradiol (Chappel et al., 1997; Mahesh et al., 1998). Por lo que la falta de ovulación en ratas micro-inyectadas con MTC en el ovario izquierdo, a las 13:00 h del diestro-2 estaría apoyando esta hipótesis. Ya que tanto el reemplazo de E₂, de LH y de GnRH indujeron la ovulación. Esta hipótesis estaría apoyada por los resultados obtenidos.

La indometacina inhibe la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂), así como la ovulación inducida por LH (Tsafiriri et al., 1973) o por un análogo de la GnRH (Ekholm et al., 1982). Estos hechos explicarían el bajo número de ovocitos liberados en los animales tratados con MTC y LHRH-sintética o MTC y BE, lo que nos permite sugerir que el m₂AChR podría estar involucrado en la síntesis de PGE₂ y en las modificaciones de la respuesta del folículo a la LH endógena secretada, ya que la administrada (hCG) si indujo el rompimiento de los folículos que estaban listos a ovular.

El BE estimula la mitosis y la angiogénesis del endometrio del útero (Di Augustine et al., 1988). La disminución del peso de este órgano observada en las ratas con reemplazo de "señal hipotalámica" nos lleva a sugerir que en los animales con bloqueo de los m₂AChR la secreción de estradiol esté afectada, que la sensibilidad del útero al estradiol esté modificada resultado de un desfaseamiento en tiempo de la señal hipofisaria, o por ambos hechos. Esta idea es apoyada por el hecho que en las ratas con bloqueo del m₂AChR, la inyección de BE resulta en un útero con peso semejante al de las ratas sin BE.

15. CONCLUSIONES

En la mañana de cada fase del ciclo estral, la proteína del m_2 AChR se detectó en las células de los cuerpos lúteos de uno u otro ovario. La intensidad de la ir- m_2 AChR en los cuerpos lúteos varía con la fase del ciclo estral.

En los folículos en crecimiento la proteína se observó en el ovocito de folículos pre-antrales y en las células de la granulosa de folículos de diferentes etapas de crecimiento.

A las 13:00 h del diestro-2, la unión de la ACh a los m_2 AChR del ovario derecho regula de manera estimulante la ovulación. Mecanismo que está vinculado con una modificación de la secreción pre-ovulatoria de E_2 , y en consecuencia de la secreción fásica de la GnRH en el día del proestro y por tanto, de la secreción pre-ovulatoria de la LH.

La micro-inyección del Veh o de la MTC en el ovario derecho no modifica la distribución y la intensidad de la proteína del m_2 AChR en los ovarios.

16. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Alcaraz, V. (2001). Estructura y Función del Sistema Nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. *Instituto de Neurociencias*, 2(1): 23-27.
- ❖ Al-zi'abi, M., Bowolaksono, A., Okuda, K. (2009). Survival Role of Locally Produced Acetylcholine in the Bovine Corpus Luteum. *Biology of Reproduction*, 80: 823–832.
- ❖ Anesetti, G., Lombide, P., Chávez-Genaro, R. (2009) Prepubertal estrogen exposure modifies neurotrophin receptor expression in celiac neurons and alters ovarian innervation. *Auton Neurosci*, Jan 28; 145:35-43.
- ❖ Arimura, A. (2000). Hipotalámico hormonas. *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*,. Human Press Inc, 3: 41-58.
- ❖ Baljet, B., Drukker, J. (1980) The extrinsic innervation of the pelvic organs in the female rat. *Basel*, 107(3):241-67.
- ❖ Bassett, D. (1943). The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am J Anat*, 73: 251-291.
- ❖ Bergman, R., Afifi, A., Heider, P. (1998). Sistema Reprodutor Femenino. Editorial *McGraw-hill Interamericana*. Cap. 16. p.307-320.
- ❖ Bonner, T. (1989). New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 10:11-15.
- ❖ Bonner, T., Young, A., Brann, M., Burckley, N. (1988). Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*, 1:403-410.
- ❖ Bousfield, G. (1998). LH (Luteinizing Hormone). Encyclopedia of reproduction. Vol. 2. Knobil E y Neill. *Academic Press*, 1034-1054.
- ❖ Brown, R. (1994). The pituitary gland and its hormones. Introduction to neuroendocrinology. *Cambridge University Press*, 30-39.
- ❖ Burden, H. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. Catecholamines as Hormone Regulators. Ben-Jonathan N, Bahr JR, Weine RI. *New York Raven Press*, 261-278.
- ❖ Burden, H., Lawrence, I. (1978). Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat. *Anat Rec*, Feb;190(2):233-41.
- ❖ Burden, H., Leonard, M., Smith, C., Lawrence, I. (1983) The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *Anat Rec*, Dec;207(4):623-7.
- ❖ Carlson, B. (1999). Embriología humana y Biología del Desarrollo. Cuarta edición. Editorial *El sevier*, Amsterdam. Cap. 1, 16. 3-13, 416-428.
- ❖ Chappel, P., Lydon, P., Conneely, O., O'Malley, T., Levine, J. (1997). Endocrine defects in mice carrying a null mutation for the progesteron receptor gene. *Endocrinology*, 138:4147–4152.
- ❖ Chávez, R., Cruz, M., Domínguez, R. (1987). Diferences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi-and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J Endocrinol*, 113:197-401.
- ❖ 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.

- ❖ Clifton, D., Steiner, R., Resko, J., Spies, H. (1975). Estrogen-induced gonadotropin release in ovariectomized rhesus monkeys and its advancement by progesterone. *Biol. Reprod*, 13:190–194.
- ❖ Combamous, Y. (1988). Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod Nutr Develop*, 28:211-228.
- ❖ Cruz, M., 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.
- ❖ Dees, W., Ahmed, C., Ojeda, S. (1986) Substance P- and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology*, Aug;119(2):638-41.
- ❖ Dekel, N., Sherizly, I. (1983). A comparative study of the mechanism of action of luteinizing hormone and a gonadotropin releasing hormone analog on the ovary. *Biol. Reprod*, 28:161-166.
- ❖ Di Augustine, R., Petivez, P., Bell, G., Brown, C., Korach, K., Mc Lachlan, J., Tens, C. (1998). Influence of estrogen on mouse uterine ephidermal growth factor precursor protein and messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*, 122:2355-2363.
- ❖ Dissen, G., Smith, G., Danilchik, M., Levine, J., Wolf, D., Mayerhofer, A., Ojeda, S. (1998) Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci*, Sep 1;95(18):10990-5.
- ❖ Domínguez, R., Cruz, M., Chávez, R. (1991). Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Programa Universitario de Investigación en Salud. *Universidad Nacional Autónoma de México*. 163-181.
- ❖ Domínguez, R., Cruz, M., Chávez, T. (1988). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. Growth factors and the ovary. Editor A. Hirshfield. *Plenum Press Nueva York*, 321-325.
- ❖ Domínguez, R., Morales, L., Cruz, M. (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.
- ❖ Ekholm, C., Clark, R., Magnusson, C., Isaksson, O., Le Haire, J. (1982). A gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) antagonist inhibits GnRH- but not LH-induced meiosis in follicle-enclosed rat oocytes in vitro. *Endocrinology*. 110: 288-290.
- ❖ Espey, L. (1999). Ovulation. En *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 3. Eds: Knobil E, Neill JD. *Academic Press*, 590-595.
- ❖ Espey, L., Richards, J. (2006). Ovulation. *The Physiology of Reproduction*. Editores: Knobil E, Neill JD. Quinta edición. *New York. Raven Press*, 425–500.
- ❖ Everett, J. (1945). The microscopically demonstrable lipids of cyclic corpora lutea in the rat. *Am. J. Anat*, 77:293-323.
- ❖ Everett, J. (1948) Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology Dec*, 43(6):389-405.
- ❖ Fawcett, D. (1995). Tratado de histología. Duodécima edición. Editorial *McGraw-Hill Interamericana*, 885-893.

- ❖ Fink, K., Wieben, E., Woloschak, G., Spelsberg, T. (1988). Rpaid regulation og c-myc protooncogene expression by progesterone in the avian oviduct. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1796-1800.
- ❖ Freeman, M. (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.
- ❖ Freeman, M. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil and Neill`s Phisiology of reproduction, 3a ed. Cap. 43. Ed By Jimmy D. Neill. *Elsevier*, 2327-330.
- ❖ Fritz, S., Föhr, K., 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., Wessler, R., Breitling, W., Rossmanith, S., Ojeda, G., 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.
- ❖ Ganong, W. (2004). Fisiología Médica. Edit. *El manual modern*, 472-483.
- ❖ Geneser, F. (2000). Órganos de la Reproducción. En: Histología sobre Bases Biomoleculares. Tercera edición. Editorial *Médica Panamericana*, 22:613-638.
- ❖ Gerendai, I., Halász, B. (1997). Neuronendocrine asymmetry. *Neuroendocrinol*, 18: 354-381.
- ❖ Golan, A., Tannus, S., Weissman, A., Boaz, M., Horowitz, E., Ravhon, A., Levrán, D. (2012) The effect of delayed initiation of gonadotropin-releasing hormone antagonist in a flexible protocol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*, Mar 1;99(3):725-30.
- ❖ Goldfien, A., Monroe, S. (2000). Ovarios. Endocrinología básica y Clínica. Editorial *El Manual Moderno*, 497-554.
- ❖ Greenwald, G., Roy, S. (1994). Follicular development and its control. The physiology of reproduction. Editores: Knobil E, Neill JD. *Raven Press, Ltd., New York*,1:613-658.
- ❖ Guyton, A. (2007). Tratado de Fisiología Médica. Onceava edición *McGraw- Hill Interamericana*,.931-941.
- ❖ Guyton, A., Hall, J. (2001). Tratado de Fisiología Médica. Décima edición, *McGraw-Hill-Interamericana*, 100-120; 512-538.
- ❖ Hafez, E. (1996). Reproducción e inseminación artificial en animales. Editorial *Interamericana*, 542.
- ❖ Herbison, A. (2006). Physiology of the gonadotropin-Realeasing Hormone Neural Network. Cap 28. Editores: Knobil E, Neill JD. Physiology of Reproduction. *Raven Press, Ltd., New York*, 1:1415-1456.
- ❖ Hernández, S. (2012). Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos M2 a lo largo del ciclo estral, sobre la ovulación espontanea de la rata adulta. Servicio Social. UNAM.
- ❖ Hernández, S. (2013). 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. Tesis de licenciatura, UNAM.
- ❖ Hirshfield, A. (1997). Overview of ovarian follicular development: consideration of toxicologist. *Enviromental and molecular mutagenesis*, 29:10-15.
- ❖ Hrabovszky, E., Shughrue, P., Merchenthaler, I., Hajszán, T., Carpenter, C., Liposits, Z., Petersen, S. (2000). Detection of receptor messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen

- binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinal*, 141 (9):3506-3509.
- ❖ Jakubik, J., Pavel, Z., Alena, R., Kvetoslava, F., Esam, E. (2014). Molecular mechanisms of Methoctramine Binding and selectivity at Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology*, 1521-0111 (86)2:180-192.
 - ❖ Kilen, S., Schwartz, N. (1988). Estrous cycle. Encyclopedia of reproduction. Editores: Knobil E, Neill JD. *Raven Press, Ltd., New York*, 2: 127-136.
 - ❖ Klein, C., Burden, H. (1988). Anatomical localization of afferent and ostganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett*, 29:217-222.
 - ❖ Krey, L., Tyrey, L., Everett, J. (1973). The estrogen induced advance in the cyclic LH surge in the rat: dependency on ovarian progesterone secretion. *Endocrinology*, 93:385-390.
 - ❖ 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.
 - ❖ Lawrence, L., Burden, H. (1980) The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec*, Jan;196(1):51-9.
 - ❖ Lawrence, L., JoAnne, S. (2006) Physiology of Reproduction. Ovulation (pp 425-473). London U.K. El Sevier.
 - ❖ Levine, J., Ramirez, V. (1980). In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with pushpull cannulae from the mediobasal hypothalami of ovariectomized, steroid-primed rats. *Endocrinology*, 107:1782-1790.
 - ❖ 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.
 - ❖ Mahesh, V., Brann, D. (1998). Regulation of the preovulatory gonadotropin surge by endogenous steroids. *Steroids* 63: 616-629.
 - ❖ Martin, G., Sack, M., Talbot, P. (1981). Structure of bursae ovaricae surrounding the ovaries of golden hamster. *Anat Record*, 201 (3):485-498.
 - ❖ Massoulie, J., Bons, S. (1982). The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu Rev Neurosc*, 5:57- 106.
 - ❖ Mayerhofer, A., Dimitrijevic, N., Kunz, L. (2005). The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Sci*; 72:2039-2045.
 - ❖ Mayerhofer, A., Fritz, S. (2003). Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microsc Res Tech*, 59:503-508.
 - ❖ Mayerhofer, A., Fritz, S., Kunz, L., Dimitrijevic, N., Grünert, R., Heiss, C. (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*, Mar;87(3):1362-7.
 - ❖ Mayerhofer, A., Kunz, L. (2005). A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Ann Anat*, 187:521-528.
 - ❖ McMahan, R. (1992). Agrin released by motor neurons induces the aggregation of acetylcholine receptors at neuromuscular junctions. *Neuron*, May 8(5):865-868.
 - ❖ Melchiorre, C., Angeli, P., Lambrecht, G., Mutschler, E., Picchio, M., Wess, J. (1987) Antimuscarinic action of methoctramine, a new cardioselective M-2 muscarinic receptor

- antagonist, alone and in combination with atropine and gallamine. *Eur J Pharmacol*, Dec 1;144(2):117-24.
- ❖ Michal, P., El-Fakahany, V., Dolezal. (2007) Muscarinic M₂ Receptor Directly Activates G_{q/11} and G_s G-proteins. *The journal of Pharmacology and experiment Therapeutics*, 320 (2):607-614.
 - ❖ Michal, P., Lisíková, M., Tucek, S. (2001). Dual effects of muscarinic M₂ acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. *Br J Pharmacol*, 132:217-1228.
 - ❖ Millar, R. (2003). GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends in Endocrinol and Metabolism*, 14: 35–43.
 - ❖ Nathanson, N. (1987). Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu. Rev. Neurosci*, 10:195-236.
 - ❖ Ojeda, S., Aguado, L.(1985). Adrenergic control of the prepubertal ovary: involvement of local innervation and circulating catecholamines. *Serono Symposia Publications from Raven Press*, 135-142.
 - ❖ Parhar, I. (2002). Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes. Gonadotropin-releasing hormone Molecules and Receptors. *Prog. Brain Res*, 141:3-17.
 - ❖ Pedernera, E., Hernández-Vértiz, A., González, M., Velázquez, P. (1993) Morphological changes in the thecal layer during the maturation of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol*, Oct; 92(1):80-7.
 - ❖ Peralta, E., Ashkenazi, A., Winslow, J., Ramachandran, J., Capon, D. (1987). Differential regulation of P1 hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature*, 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, C., Balogh, K. (1966). Dehydrogenase in the rat ovary. I. A histochemical study of 5-3β and 20 α-hydroxysteroid dehydrogenases and enzymes of carbohydrate oxidation during the estrous cycle. *Endocrinol*, 79:316-327.
 - ❖ Rao, C., Edgerton, L. (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.
 - ❖ Ross; M., Romrell, G., Kaye. (1997). Histología. 3a edición. Editorial Médica Panamericana. México, 674-710.
 - ❖ Sanchez-Criado, J. (2003). Fisiología del ovario. En: Fisiología humana. 2ª Ed, McGraw-Hill Interamerican. México, 1036-1048.
 - ❖ Schwartz, N. (2000). Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. Neuroendocrinology in Physiology and medicine. Editores: Conn PM, Freeman. ME. EEUU Raven Press. 135-145.
 - ❖ Südhof, T. (1995). The synaptic vesicle: a cascade of protein interactions. *Nature*, 375:645-653.
 - ❖ Südhof, T., Ullrich. (1995) Differential distributions of novel synaptotagmins: comparison to synapsins. *Neuropharmacology*, Nov;34(11):1371-7.
 - ❖ Tsafiriri, A., Koch, Y., Lindner, H. (1973). Ovulation rate and serum LH levels in rats treated with indomethacin or prostaglandin E₂. *Prostaglandins* 3:461-467.

- ❖ Van-Voorhis, B. (1999). Follicular Development. En: Encyclopedia of Reproduction. Editores: Knobil E, Neill JD. *Raven Press, Ltd., New York*, 2: 389-195.
- ❖ Wimsatt, W. (1979). Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in chiroptera. *J Reprod Fertil*, 56:345-357
- ❖ Yao, H., Bahr, J.(1999). Ovary, overview. Enciclopedia of reproduction. U.S.A: *Academic Press*, 3: 590-595.
- ❖ Yao, H., Barh, J. (1988). Ovary, overview. En: Encyclopedia of Reproduction. Editores: Knobil E, Neill JD. *Raven Press, Ltd., New York*. 3:590-595.
- ❖ Yu, W., Karanth, S., Mastronarde, C., Sealson, S., Dean, C., Dees, W., McCann, S. (2002). Lamprey GnRH-III acts on its putative receptor via nitric oxide to release folliclestimulating hormone specific. *Exp Biol Med*, 227(9):786-93.