



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**PARTICIPACIÓN DE LOS OVARIOS EN LOS EFECTOS  
ASIMÉTRICOS DE LA ACETILCOLINA EN POA-AHA  
SOBRE LA OVULACIÓN DE LA RATA ADULTA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ANA GABRIELA SANTANA CHÁVEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. María Esther Cruz Beltrán**

**Proyecto financiado por: DGAPA- PAPIIT- IN220014**

**MÉXICO, CDMX**

**JUNIO, 2016**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



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 la alumna **SANTANA CHÁVEZ ANA GABRIELA**, con número de cuenta **307312149**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **29 de junio de 2016** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Biól. CARLOS MARTÍNEZ MOTOYA  
**VOCAL** Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN  
**SECRETARIO** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA  
**SUPLENTE** M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ  
**SUPLENTE** Dra. JUANA MONROY MORENO

El título de la tesis que presenta es: **Participación de los ovarios en los efectos asimétricos de la acetilcolina en POA-AHA sobre la ovulación de la rata adulta.**

Opción de titulación: Tesis.

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

**ATENTAMENTE** DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad de México, a 08 de junio de 2016

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR DIRECCIÓN

RECIBI  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## DEDICATORIAS

*A mis padres Elena y Gabriel por ser la luz de mi vida, por su apoyo y amor durante tantos años; no existen palabras para expresar mi amor por ustedes.*

*A mis hermanos Erick y Carlos, gracias por ser mi ejemplo, mi fortaleza, y mi gran compañía.*

*A mis hermanas Daryl, Mara y Joss por compartir conmigo tantos recuerdos, por su amistad, su cariño y todas esas maravillosas enseñanzas que han dejado en mi memoria.*

*A ustedes Andrea y Arturo... que su recuerdo y ejemplo me acompañe siempre.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis sinodales:*

*M. Martínez Montoya Carlos*

*Dra. Leticia Morales Ledezma*

*Por su gran esfuerzo, su tiempo y colaboración para que esta tesis fuera terminada.*

*Dra. Juana Monroy Moreno por su tiempo, su apoyo, su confianza y por permitirme invadir su laboratorio en múltiples ocasiones.*

*M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez por su apoyo, sus palabras, su esfuerzo, su confianza y por hacerme sentir siempre bienvenida en su laboratorio.*

*Dra. María Esther Cruz Beltrán mil gracias por su paciencia y dedicación, por permitirme aprender tantas cosas a lo largo de estos años en su laboratorio, por ser un gran ejemplo y sobre todo, gracias por brindarme un ambiente de trabajo muy agradable... fue como estar en casa.*

*A la Dra. Isabel Arrieta Cruz por su ayuda y sus enseñanzas dentro del laboratorio, por su confianza y apoyo.*

*A mis madrinas Teresa y Sofía, a mis abuelas Elena y Angelina, a mi padrino Francisco y a mi tía Ángeles por estar siempre cuidándome y acompañándome, por su esfuerzo y todas esas ocasiones en las que me brindaron un hogar al cual llegar después de un duro día escolar.*

*A mis queridas primas hermanas Mariana y Sofía por compartir conmigo su espacio, por las horas de risa y por todo su cariño durante el tiempo en que vivimos juntas.*

*A Oscar, Luis, Amanda y Dany por su cariño y por haber compartido conmigo una vida llena de locuras y mucha diversión.*

*A Cesar Ortiz por tu amistad, tu confianza y por tu ayuda.*

*A mis queridos amigos:*

*Raúl, Katy, Gilberto, Luis porque no solo hicieron de nuestro laboratorio un lugar agradable, sino que, me dieron al mejor equipo de trabajo con su apoyo y compañía, mil gracias por todo lo que me enseñaron, por sus palabras de apoyo y lo que compartieron conmigo.*

*A ti Axa, por estar siempre al pendiente, por tu compañía y nuestras múltiples aventuras... por ser una gran persona.*

*A mis caballeros David y Vicente por 13 largos años de amistad y apoyo, sus palabras siempre me dieron fuerza y su cariño felicidad, mil gracias por eso.*

*A Mariell, Cesar, Estrella, Ceci, Salvador H., Jessica, Salvador J., por tantas aventuras, por sus palabras de aliento y por hacer mejores mis horas de clase. Gracias por todo.*

## INDICE

DEDICATORIAS .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
MARCO TEÓRICO .....	10
Ciclo estral.....	10
Eje hipotálamo-hipófisis ovario .....	13
Hipotálamo .....	15
GnRH .....	17
Receptores a GnRH .....	20
Receptores a estrógenos .....	21
Hipófisis.....	22
Ovario.....	23
Foliculogénesis .....	24
Esteroidogénesis .....	27
Participación de la Acetilcolina en la regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis- Ovario. ....	29
Acetilcolina: síntesis y liberación .....	31
Receptores para Acetilcolina .....	32
Vías colinérgicas aferentes al hipotálamo y receptores muscarínicos en POA-AHA.....	34
Asimetrías .....	34
JUSTIFICACIÓN .....	38
HIPÓTESIS.....	39
OBJETIVOS GENERALES:.....	39
OBJETIVOS PARTICULARES:.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES .....	41
CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS .....	43

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:.....	44
OBJETIVO PARTICULAR: CUANTIFICAR LOS EFECTOS DE LA ULO SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE E <sub>2</sub> , FSH Y LH. ....	45
MATERIALES Y MÉTODO .....	45
RESULTADOS .....	46
OBJETIVO PARTICULAR: CUANTIFICAR LOS EFECTOS DEL BLOQUEO UNILATERAL AGUDO DE LOS mAChR DE POA-AHA SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE E <sub>2</sub> , FSH Y LH. ....	48
MATERIALES Y MÉTODO .....	48
❖ <i>Experimento 1: Selección previa del vehículo en el que fue disuelta la atropina y que al ser microinyectada en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a las 13:00 del estro no altero la ovulación espontanea.</i> .....	48
RESULTADOS .....	50
MATERIALES Y MÉTODO .....	51
❖ <i>Experimento 2: Estudio del efecto de la microinyección de atropina en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a las 13:00 del estro sobre la ovulación espontánea</i> .....	51
RESULTADOS .....	51
OBJETIVO PARTICULAR: CUANTIFICAR LOS EFECTOS DEL BLOQUEO UNILATERAL AGUDO DE LOS mAChR DE POA-AHA EN ANIMALES A LOS QUE SE LES HAYA EXTIRPADO EL OVARIO IZQUIERDO O DERECHO, SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE E <sub>2</sub> , FSH Y LH. ....	56
MATERIALES Y MÉTODO .....	56
RESULTADOS .....	56
OBJETIVO PARTICULAR: ESTUDIAR LA SENSIBILIDAD DEL HIPOTÁLAMO AL E <sub>2</sub> , DE LA HIPÓFISIS A LA GnRH Y DEL OVARIO A LA LH EN RATAS CON ULO, CON EL BLOQUEO UNILATERAL AGUDO DE LOS mAChR DE POA-AHA, O CON BLOQUEO UNILATERAL AGUDO DE LOS mAChR DE POA-AHA EN RATAS CON ULO. ....	62
MATERIALES Y MÉTODO .....	62
RESULTADOS .....	63
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	65
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72



## RESUMEN

En la rata, la acetilcolina regula de manera estimulante la ovulación en cada fase del ciclo estral: en estro, el bloqueo permanente o crónico de los receptores muscarínicos (mAChR) de la porción derecha de la región preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA-D), provoca la falta de ovulación en el día del estro esperado, lo que no sucede en la porción izquierda de dicha región, mientras que en el diestro-2 estos efectos se invierten.

También en el día del estro, la ausencia de uno de los ovarios en ratas con bloqueo unilateral permanente de los mAChR invierte el efecto asimétrico que ejerce la acetilcolina, provocando ahora que el bloqueo de la porción izquierda sea el que disminuya la ovulación.

No solo la región POA-AHA funciona asimétricamente, se ha mostrado que en la rata con ovariectomía unilateral (ULO), cada ovario puede secretar diferente cantidad de estradiol ( $E_2$ ) una hora después de realizar la cirugía.

Por otro lado, se ha mostrado que el estradiol regula la actividad del sistema colinérgico en diferentes áreas del sistema nervioso central e inclusive en POA-AHA.

Por lo que la finalidad de esta investigación fue analizar si la falta de un ovario influye en la respuesta al bloqueo agudo o momentáneo de los receptores muscarínicos en POA-AHA sobre la ovulación y las funciones ováricas. Así mismo, estudiar la respuesta del hipotálamo al  $E_2$ , de la hipófisis a la GnRH y del ovario a la LH en ratas cuya ovulación fue afectada por la ausencia de uno u otro ovario, por el bloqueo unilateral agudo de los mAChR o por bloqueo agudo de los mAChR en animales con ausencia de uno u otro ovario mediante el remplazo hormonal.

Los resultados obtenidos mostraron que el bloqueo momentáneo o agudo de los mAChR mediante la microinyección de 62.5 ng de atropina en POA-AHA-D a las 13:00 h del día del estro causa el mismo efecto asimétrico de la acetilcolina sobre la ovulación, permitiéndonos concluir que la activación momentánea de los mAChR del lado derecho de POA-AHA a esta hora del día del estro, es necesaria para que ocurra la ovulación en el día del estro esperado.

Además, mostraron la existencia de una vinculación funcional e ipsilateral de carácter estimulante entre el ovario y el sistema muscarínico de POA-AHA del lado derecho, que culmina con la ovulación, ya que al eliminar las señales generadas por una u otra estructura de este lado no ocurre la ovulación.

## INTRODUCCIÓN

En mamíferos la reproducción está regulada principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, el cual participa en el control de las funciones del ovario, como el desarrollo folicular, la ovulación y la esteroidogénesis. La hormona liberadora de las gonadotropinas o GnRH (por sus siglas en inglés: **Gonadotrophin Releasing Hormone**) liberada y transportada hacia la eminencia media y enviada a la adenohipófisis, regula la síntesis y liberación de la hormona luteinizante o LH (por sus siglas en inglés: **Luteinizing Hormone**) y la hormona estimulante del folículo o FSH (por sus siglas en inglés: **Follicle Stimulating Hormone**), las cuales al ser liberadas al torrente sanguíneo estimulan las funciones del ovario (Prieto y Velázquez, 2002).

La secreción de GnRH y la liberación de LH y FSH se encuentran a su vez reguladas por el efecto “feedback” positivo o negativo provocado por las hormonas esteroideas ( $E_2$  y progesterona) y péptidos (inhibina, activina y folistatina), secretados por el ovario. La secreción de GnRH también es regulada por diferentes moléculas secretadas en el cerebro, como neurotransmisores (ácido  $\gamma$ -amino-butírico, dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina) y aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato) neuropéptidos (kiseptina, opioides endógenos, las  $\beta$ -endorfinas, neuropéptido Y, galanina, la hormona liberadora de corticotropinas, entre otras) (Herbison, 2015).

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático que participa en múltiples funciones fisiológicas, entre las cuales se encuentra la ovulación, donde actúa mediante su unión a los receptores muscarínicos (mAChR) regulando de manera asimétrica la ovulación en los diferentes días del ciclo estral. Cruz *et al.*, (1989) mostraron que el implante de cristales de atropina (antagonista del sistema muscarínico) en la porción derecha de la región preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) (a las 13:00 horas del día del estro) bloquea la ovulación, mientras que del lado izquierdo no la afecta.

Sin embargo, si el implante se coloca en el día del diestro-1, tanto en el lado izquierdo como en el derecho; bloquea la ovulación; en el día del diestro-2, sólo el implante del lado izquierdo causa una disminución en la ovulación, y en el día del proestro los implantes en uno u otro lado de POA-AHA no modifican la ovulación (Cruz *et al.*, 1989).

La falta de ovulación en animales con implante de atropina en POA-AHA-D realizado en el estro se modifica cuando se elimina uno u otro ovario, ya que, al extirpar un u otro ovario en este día, el efecto por el implante de atropina se invierte, siendo ahora los animales con implante en el lado izquierdo los que no ovulan (Cruz *et al.*, 1992).

Esta falta de ovulación en animales con ovariectomía unilateral (ULO) y con implante de atropina en POA-AHA es explicado por las modificaciones en la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de LHRH sintético a las 14:00 horas de este día, induce la ovulación en ratas con implante de atropina que no habían ovulado, modificación que parece ser el resultado de una alteración en el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos en POA-AHA-D, ya que al reestablecer esta señal ovárica en la tarde del diestro-2 (por la inyección subcutánea de 10 µg benzoato de estradiol), no se induce la ovulación (Cruz *et al.*, 1992).

Se ha mostrado que cada ovario puede regular de manera asimétrica la concentración sérica del E<sub>2</sub>, lo que sugiere que cada ovario secreta una cantidad diferente de esta hormona, ya que cuando se extirpa el ovario izquierdo, la concentración sérica de 17β-estradiol es semejante a un animal con ambos ovarios, mientras que cuando se extirpa el ovario derecho, la concentración de estradiol es menor (Cruz *et al.*, 2006).

## MARCO TEÓRICO

La ovulación es una función primordial de las especies animales y vegetales. En los vertebrados la ovulación es regulada por mecanismos neuroendocrinos que ocurren y cambian durante el ciclo estral.

### Ciclo estral

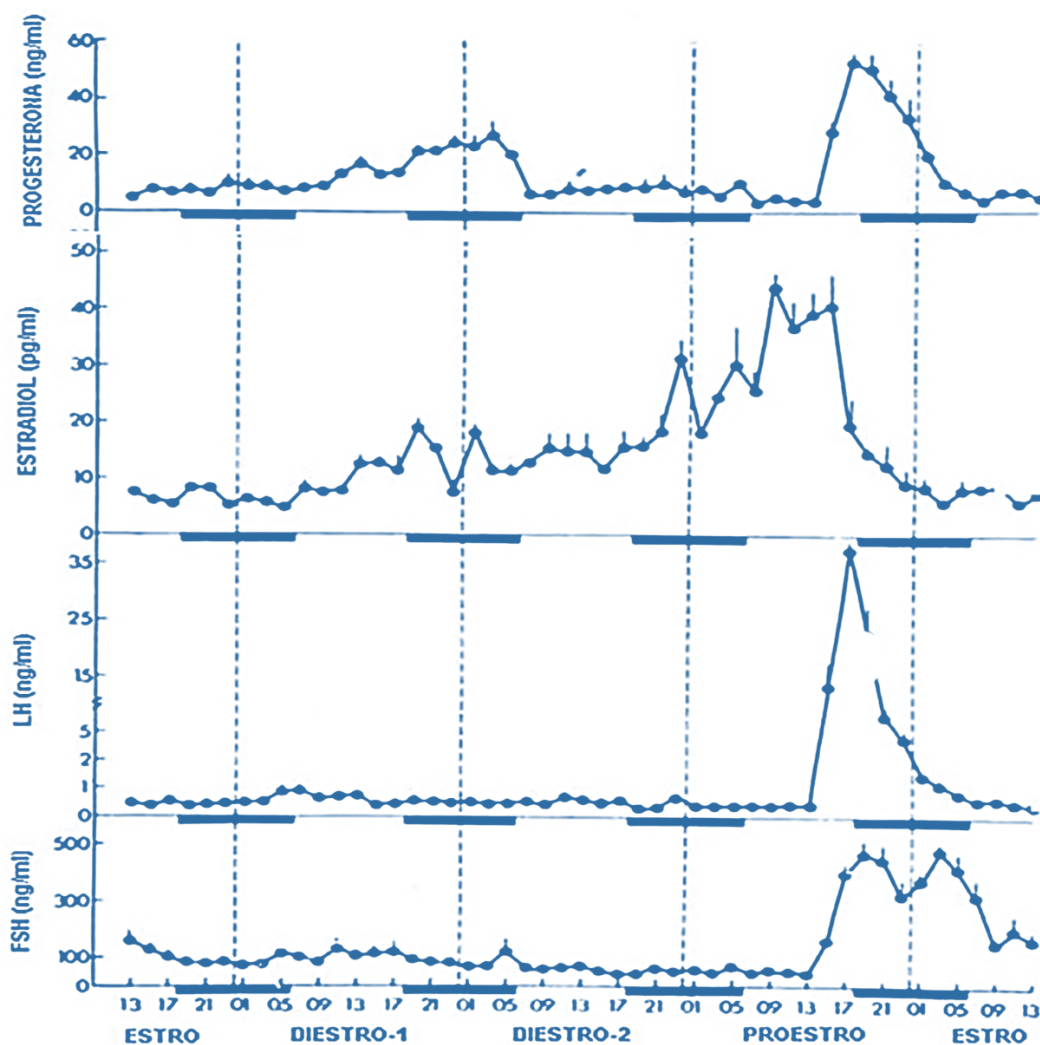
En los mamíferos, cuando la hembra alcanza la adultez, manifiesta cambios rítmicos en la conducta sexual que se repiten periódicamente denominados celo o estro; durante este tiempo la hembra se vuelve receptiva al macho y permite la cópula. El ciclo estral se define como el tiempo que transcurre entre un periodo de celo y el comienzo del siguiente (Freeman, 2006).

La progresión del ciclo estral involucra la recurrencia de tipos celulares distintivos correlacionados con el estado de la mucosa vaginal, el útero y los ovarios; de la misma manera, se asocia con alteraciones en la concentración de los esteroides sexuales y las gonadotropinas séricas. Un ciclo estral de 4 días presenta cuatro fases: estro cuya duración es de 25 a 27 horas, metaestro o diestro-1 con una duración de 6 a 8 horas, diestro-2 con una duración de 55 a 57 horas y proestro con una duración de 12 a 14 horas (Freeman, 2006); los cambios en la citología del epitelio de la vagina son la referencia que se utiliza para determinar de manera rápida cada fase del ciclo (Figura 1) (Goldman *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Características citológicas observadas en los frotis vaginales en cada fase ciclo estral en la rata adulta.

Cada una de estas etapas está caracterizada por cambios hormonales que dependen de la hora del día (Figura 2). En la madrugada del día del estro (entre las 1:00 y 3:00 h) cuando ocurre la ovulación, las concentraciones de progesterona (P<sub>4</sub>), 17β-estradiol (E<sub>2</sub>), y LH en suero se mantienen basales. En cambio, las concentraciones de FSH alcanzan un máximo en la mañana de este día. En el día del diestro-1 comienza a aumentar las concentraciones de P<sub>4</sub>, mientras que las de E<sub>2</sub>, LH y FSH siguen siendo basales. En el día de diestro-2 la P<sub>4</sub>, LH y FSH, se mantienen en concentraciones basales, sin embargo, en la tarde de este día, la secreción de E<sub>2</sub> comienza a aumentar paulatinamente. En el día del proestro, se observan las concentraciones máximas de P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>, LH y FSH, en forma de “picos” o secreciones pre-ovulatorias. Entre la mañana y el medio día, las concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub> alcanzan su valor máximo, el cual disminuye drásticamente hacia las 14: 00 h. Este cambio en la secreción de E<sub>2</sub> induce la secreción de la GnRH, la que, a su vez, estimula la secreción pre-ovulatoria de FSH y LH hacia las 17:00 h de este día (Freeman, 2006).



**Figura 2.** Perfil de las concentraciones séricas de progesterona, estradiol, de la hormona luteinizante (LH) y la fólculo estimulante (FSH), en plasma obtenido en intervalos de dos horas durante los 4 días del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la concentración media de la hormona ( $\pm$  SE) de 5 a 6 ratas. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad a las que fueron sometidas los animales (06: 00-18: 00) y los números por debajo de ellos representan la hora del día. (Freeman, 2006).

La ciclicidad ovárica tiene un profundo efecto sobre la mayoría de los sistemas del organismo, entre los cuales se encuentra el sistema nervioso, donde produce efectos temporales en la conducta reproductiva, el consumo de alimentos y fluidos, la actividad locomotora y la cognición (Caligioni, 2009).

La evaluación de los cambios en la estructura de las células epiteliales de la vagina ha sido utilizada como un método no invasivo para detectar los ciclos reproductivos en mamíferos proporcionando un índice del estado funcional del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Caligioni, 2009).

### Eje hipotálamo-hipófisis ovario

La reproducción es un proceso esencial para el mantenimiento y la continuidad de la especie resultado de la suma de múltiples mecanismos fisiológicos regulados en los mamíferos por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Figura 3). La GnRH representa el inicio de estos mecanismos, ya que, al ser liberada de las terminales nerviosas en la eminencia media, y llevada a la hipófisis anterior o adenohipófisis en la circulación portal hipofisaria, produce la síntesis y liberación de las gonadotropinas, que serán liberadas al torrente sanguíneo y serán capturadas por el ovario (Gay y Sheth, 1972).

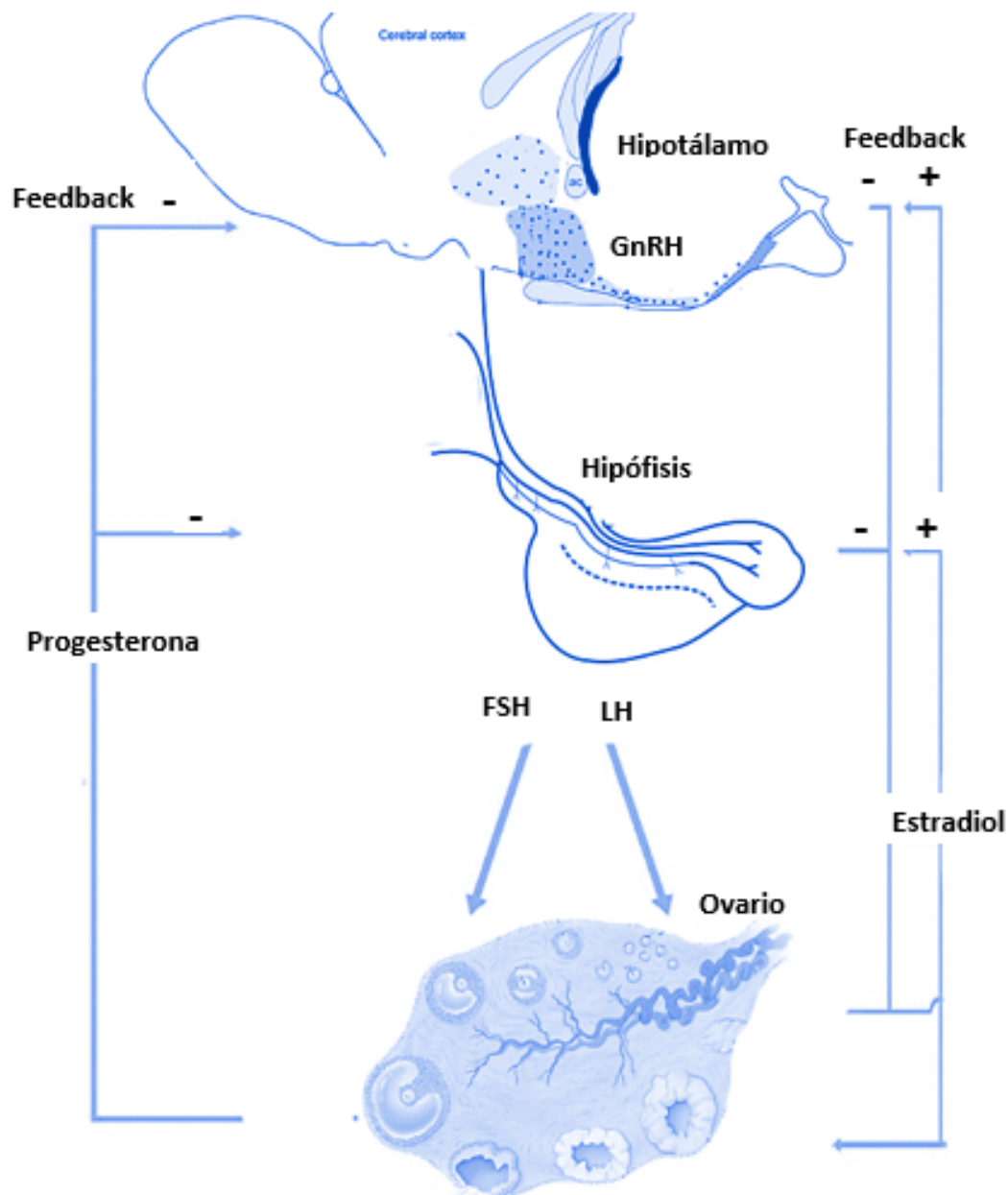
La LH y la FSH son glucoproteínas que intervienen en la maduración gonadal y la esteroidogénesis. En la hembra, la FSH actúa en los folículos ováricos estimulando su crecimiento y la secreción de E<sub>2</sub>; mientras que la LH produce la ruptura del folículo para la liberación de ovocito, da origen al cuerpo lúteo y es mediadora en la producción de progesterona (Prieto y Velázquez, 2002). La liberación de GnRH y de gonadotropinas se encuentra a su vez regulada por el efecto de retrocontrol o “feedback” generado por las hormonas secretadas por el ovario, así como por diversos estímulos ambientales (Gay y Sheth, 1972).

Los esteroides gonadales estimulan o inhiben la actividad de las neuronas GnRH en el hipotálamo, al regular la respuesta a la GnRH en los gonadotropos, siendo el efecto “feedback” negativo o inhibitorio el que predomina en la mayor parte del ciclo reproductivo (Evans *et al.*, 1994).

Al final de la fase folicular (proestro en roedores), cuando las concentraciones de E<sub>2</sub> son más altas, el efecto “feedback” cambia a positivo o estimulante, iniciando el aumento continuo



de la liberación de GnRH (Herbison, 2015), mediante del incremento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de secreción.



**Figura 3:** Eje Hipotálamo- Hipófisis- Ovario. La GnRH liberada hacia las terminales nerviosas de la eminencia media y transportada desde la eminencia media hacia la adenohipófisis donde produce la síntesis y liberación la hormona luteinizante (LH) y la foliculo estimulante (FSH) las cuales llegan al ovario por el torrente sanguíneo. Una vez en el ovario estimulan la síntesis de Estradiol y Progesterona las cuales causan un efecto “feedback” positivo o negativo hacia el hipotálamo o la hipófisis.



## Hipotálamo

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, por debajo del tálamo y es dividido por el tercer ventrículo en una porción derecha y otra izquierda (McGeer *et al.*, 1987). Para su estudio, el hipotálamo se divide en núcleos (Ganong, 2001) o conglomerados de cuerpos neuronales (Norris, 1996) y áreas de tejido en los que se reconoce una clara delimitación. Según Palkovits (2000), el hipotálamo se divide en cuatro regiones organizadas rostro-caudalmente:

- ❖ **Área preóptica (POA):** En la rata ocupa una cuarta parte del total del hipotálamo e incluye el núcleo preóptico medial, el núcleo preóptico periventricular y el órgano vasculoso de la lámina terminal.
- ❖ **Hipotálamo anterior:** Es una continuación del área preóptica, está conformado por los núcleos periventricular, supraquiasmático, paraventricular, el hipotalámico anterior y el núcleo supraóptico.
- ❖ **Hipotálamo medio:** se encuentra conformado en su parte basal por la eminencia media y los núcleos arcuato y ventromedial; en su parte dorsal por el núcleo dorsomedial y en su parte medial-lateral por el núcleo perifornical.
- ❖ **Hipotálamo posterior o región premamilar:** se encuentra conformado por el núcleo premamilar dorsal y ventral, el tuberomamilar, el supramamilar, hipotálamo posterior y núcleo arcuato.

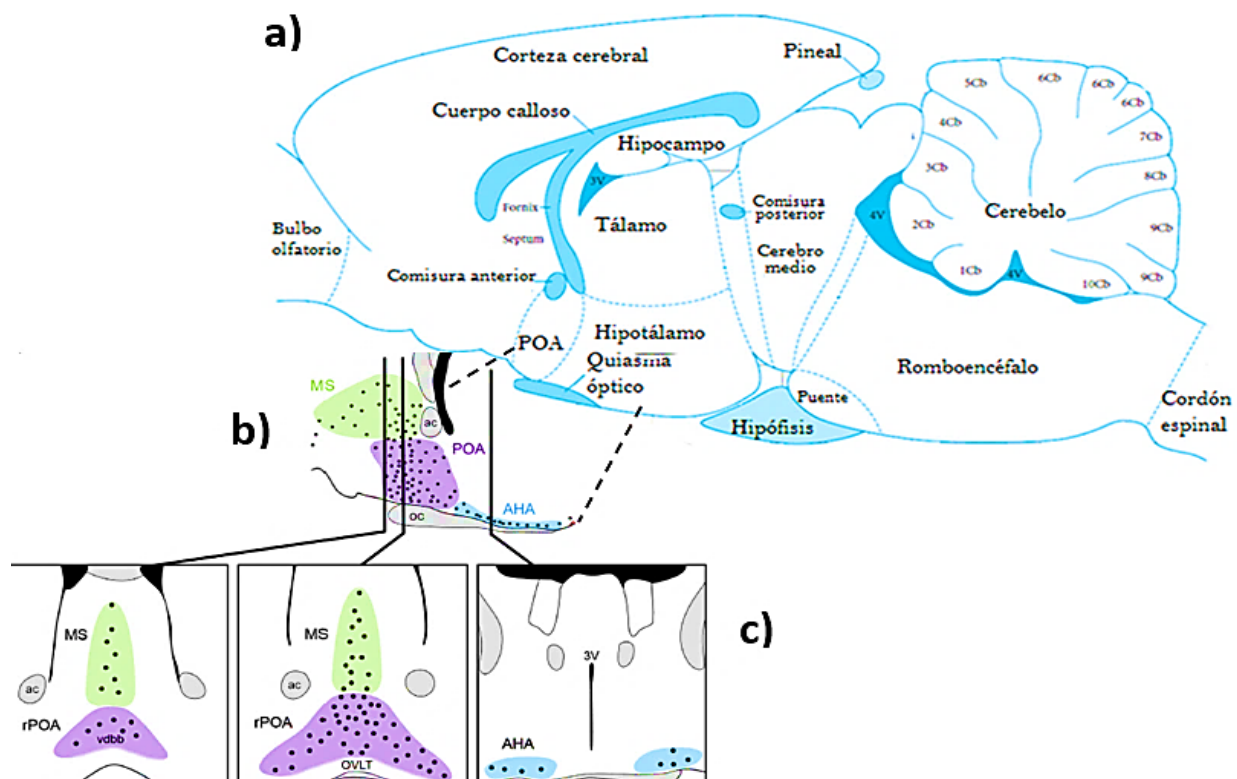
El hipotálamo realiza varias funciones, como regular la secreción hormonal por parte de la hipófisis, modula los mecanismos que regulan la temperatura corporal y los ritmos biológicos, se encarga del balance electrolítico, controla las conductas emocionales y regula el hambre, la sed, agresión y motivación sexual (Brown, 1994).

El hipotálamo secreta diferentes péptidos, algunos de ellos son liberados a la circulación sanguínea, en la cual viajan hasta sus células blanco, y otros son liberados en el Sistema Nervioso Central (SNC), donde actúan como neurotransmisores (Lerner y Urbina, 2008).

Algunas de las neurohormonas liberadas por las neuronas del hipotálamo son: la GnRH, la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH),

la hormona liberadora de la prolactina (PRH), el factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIF), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) y la hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento (GHIH) (Lerner y Urbina, 2008).

En la mayoría de los mamíferos incluyendo a la rata, los somas de las neuronas GnRH se localizan desde la banda diagonal de Broca y áreas septales hasta el hipotálamo medio basal (HMB), sin embargo, el mayor número de estos somas han sido localizado en el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) (Figura 4) (Prieto y Velázquez, 2002). Estas neuronas pequeñas, de tipo bipolar y fusiforme, denominadas GnRHérgicas, establecen contacto con los capilares y venas del sistema porta hipotálamo-hipofisario, donde se libera la GnRH y es transportada a la hipófisis anterior (Ferin, 1998).



**Figura 4.** a) corte sagital del cerebro en donde se muestra la ubicación del hipotálamo y del área preóptica, (tomado y modificado de Paxinos y Watson, 2004); b) corte sagital mostrando la distribución de las neuronas GnRH (puntos negros) proyectando el área donde converge POA-AHA y c) corte coronal de la distribución de las neuronas GnRH en el cerebro del ratón dentro de tres regiones cerebrales anatómicas definidas: la septal medial (MS), la población rostral área preóptica (rPOA), y el área hipotalámica caudal anterior (AHA) (tomado y modificado de Herbison, 2015).

## GnRH

La GnRH es el enlace entre el sistema nervioso y el endocrino, su síntesis se lleva a cabo en el soma de las neuronas GnRHérgicas (Charli *et al.*, 1991) a partir de un precursor (pro-GnRH), formado por 92 aminoácidos, dividido en tres partes: un péptido de 23 aminoácidos, seguido por una secuencia de Gly-Lys-Arg esencial para el procesamiento proteolítico y por un residuo de 56 aminoácidos conocido como péptido asociado con la GnRH (GAP) (Yen, 2001).

El gen que codifica para GnRH está situado en el cromosoma 8 en humanos y en el cromosoma 14 en ratón, está conformado por cuatro exones cortos y tres intrones largos (Herbison, 2006). El primer exón (I) contiene la región 5' no traducida; el exón dos (II) codifica para el péptido señal del decapeptido de la GnRH, para el sitio de amidación y para el sitio del precursor, también codifica para el sitio de amino terminal de once aminoácidos de un segundo péptido asociado de 56 aminoácidos denominado GAP, el cual contiene el segmento prepro-GnRH; el exón tres (III) codifica para los siguientes 32 residuos del GAP; el exón cuatro (IV) codifica para los últimos trece aminoácidos del GAP, para el codón de terminación y para la región 3' no traducida del ARN mensajero (Fan *et al.*, 1995).

Diversas especies contienen dos o más formas de GnRH de las 15 moléculas conocidas (Montaner *et al.*, 2001). En los mamíferos se han identificado dos formas moleculares de GnRH, la GnRH-I o hipotalámica, la cual posee una región que varía en estructura en diferentes especies y una forma altamente conservada en tejido cerebral y la GnRH-II que se encuentra en sitios extra hipotalámicos donde actúa como neurotransmisor, con una variación en la secuencia de tres aminoácidos (el número 5, 7 y 8) (Pawson *et al.*, 2003).

La secuencia lineal del decapeptido de GnRH en mamíferos es (Prieto y Velázquez, 2002):



El procesamiento molecular en el interior de las neuronas de GnRH ocurre fundamentalmente en el núcleo donde se da la transcripción y el procesamiento del gen de la Pro-GnRH, una vez que se ha formado el ARNm es transportado hasta el citoplasma o el ribosoma, donde tiene lugar la traducción (Yen, 2001). Una vez sintetizado el péptido, es transportado en la vesícula hasta la terminal sináptica, la cual finaliza en la eminencia media. La secreción de GnRH se da por exocitosis en respuesta a cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la apertura de canales de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) dependientes de voltaje. Como resultado de la entrada de calcio se activan las enzimas proteolíticas que degradan la membrana plasmática, de tal forma que es liberado el péptido (Charli *et al.*, 1991).

La secreción de GnRH se realiza en dos formas; la tónica o de frecuencia baja que favorecen la síntesis y liberación de FSH y puede observarse durante la mayor parte del ciclo ovárico, regula la foliculogénesis y esteroidogénesis, y el modo fásico o de frecuencia alta que genera el pico preovulatorio de LH (Marshall, 1993).

La liberación pulsátil de GnRH en la circulación porta hipofisaria, ocurre cuando es secretado el decapeptido de una manera sincronizada en la mayoría de las neuronas GnRHérgicas. En teoría, se han propuesto dos mecanismos para que se dé el impulso de la generación pulsátil de GnRH: el primero hace referencia a la activación periódica del soma de la neurona y el segundo al mecanismo de sincronización de la liberación de GnRH de las terminales neuronales de la eminencia media para su posterior recaptura en la adenohipófisis (Gay y Sheth, 1972).

La regulación en la síntesis y en el generador del impulso hipotalámico de la liberación de GnRH está influida por varios factores como el  $\text{E}_2$  y la  $\text{P}_4$ , neuropéptidos (kisseptina, opioides endógenos, las B- endorfinas, neuropéptido Y, Galanina y la hormona liberadora de corticotropinas (CRH)), Inhibina, Activina, neurotransmisores (ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA), Dopamina, Noradrenalina, Serotonina, Acetilcolina) y aminoácidos excitadores (Glutamato y Aspartato) (Herbison, 2015).

La acción del E<sub>2</sub> sobre la red de neuronas GnRHérgicas está dada de tres modos fundamentales para influir en la liberación de GnRH:

- Ruta indirecta o transináptica: se han definido cuerpos neuronales de diferentes neurotransmisores y neuropéptidos como GABA, glutamato y kisseptina que expresan receptores a estrógenos (ER) y se proyectan hacia los cuerpos celulares de la GnRH, los cuales pueden alterar la función y excitabilidad de esta neurona.
- Retroalimentación positiva: inducida por concentraciones de estradiol altos o crecientes que modula una liberación frecuente y alta de GnRH.
- Retroalimentación negativa: genera una disminución en la amplitud de los pulsos de secreción de GnRH. Los mecanismos mediante los cuales estradiol detiene la frecuencia del pulso y la amplitud de la GnRH puede incorporarse de manera transináptica indirecta o directa mediante la fosforilación de cAMP modulando canales de potasio y elevando las concentraciones de Ca<sup>+2</sup> intracelular de las neuronas de GnRH, y no neuronal indirecta.

Se ha mostrado que las neuronas GnRHérgicas expresan sólo el receptor a estrógenos beta (ER-β) en todas las especies de mamíferos examinados hasta la fecha, sin embargo, no se conoce del todo su función, pero podría estar implicado como mediador de los efectos rápidos de E<sub>2</sub> sobre neuronas GnRH. El receptor a estrógenos alfa (ER-α) sin embargo, actúa de manera indirecta sobre la neurona de GnRH al ser expresado en células gliales o las células endoteliales (Herbison, 2015).

## Receptores a GnRH

Los receptores a la GnRH se encuentran exclusivamente en membranas citoplasmáticas de los gonadotropos o en células blanco de la amígdala, el hipocampo, el núcleo arqueado, ventromedial y la sustancia gris central, donde pueden estar presentes por reciclamiento, biosíntesis de nuevos receptores y el desenmascaramiento de receptores que ya existían; mientras que su disminución es resultado de la degradación, internalización o enmascaramiento de los mismos cuando un agonista a GnRH se une a los receptores, los envuelve y son internalizados para asociarse con lisosomas o con el complejo de Golgi y los gránulos de LH donde son degradados o reciclados (Prieto y Velázquez, 2002).

La secuencia de aminoácidos del receptor de GnRH es de 327 en la rata y posee las características de un receptor acoplado a proteínas G, es decir, una sola cadena de aminoácidos con una amina extracelular y siete segmentos hidrofóbicos transmembranales (Prieto y Velázquez, 2002).

La activación de estos receptores por la unión de la GnRH actúa liberando segundos mensajeros a través de  $G_{q/11}$  principalmente para activar la fosfolipasa-C (PLC). En consecuencia, se genera la elevación citoplasmática de  $Ca^{2+}$  y la activación de la proteína quinasa C (PKC). Activando la señalización para mediar la síntesis y secreción de gonadotropina (McArdle y Roberson, 2015).

En la rata el número de receptores hipofisarios a la GnRH varía a lo largo del ciclo estral, siendo menor en el estro y diestro 1, y comienzan a aumentar gradualmente hasta la tarde del proestro, cuando alcanzan el mayor número de receptores (Prieto y Velázquez, 2002).

## Receptores a estrógenos

Las hormonas esteroides comprenden a los esteroides gonadales (estrógenos, progestágenos, andrógenos) y a los esteroides suprarrenales (glucocorticoides y mineralocorticoide).

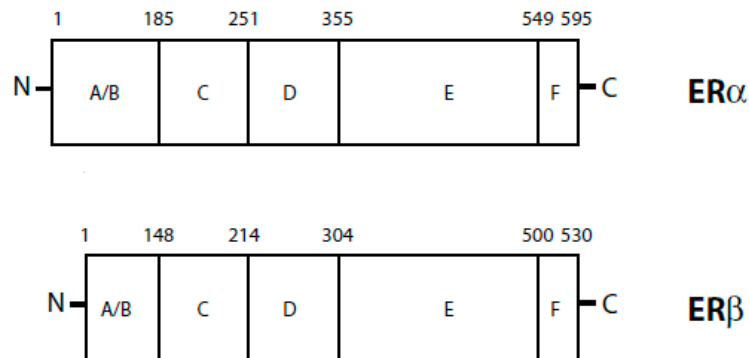
Los estrógenos realizan sus efectos por medio de la unión con sus respectivos receptores localizados en el núcleo y citoplasma de tejido mamario, uterino, vaginal, ovárico, testicular, del epidídimo, prostático y encefálico (Korach, 1994).

La unión del estrógeno a su receptor provoca la activación de este, mediante cambios conformacionales que permiten que este receptor adquiera una alta afinidad a secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN), regulando la transcripción de uno o varios genes minutos después de que el estrógeno se internalice en la célula blanco (Falkenstein *et al.*, 2000).

Se han identificado dos tipos de receptores a estrógenos:  $\alpha$  y  $\beta$  formados por seis dominios, que han sido denominados con las letras de la "A" a la "F" (Figura 5). La primera región A/B, está localizada en el extremo N-Terminal y es conocida como activador funcional-1 (AF-1), es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares (Gustafsson y Mathews, 2003). Inmediato a él se encuentra el dominio C o región de unión al ADN, esta región es la más conservada entre los diferentes receptores nucleares y está compuesta por nueve residuos de cisteínas, de los cuales, ocho están coordinados alrededor de dos iones de  $Zn^{2+}$  para formar los dedos de zinc, que permiten al receptor interactuar con el ADN. Esta secuencia está determinada por la composición de los aminoácidos localizados entre estos dos dedos de zinc, conocida como la caja P (P-box) (Freedman, 1992).

La región D o región de bisagra, permite alterar la conformación de la proteína, participa en la unión a la proteína chaperona de golpe de calor hsp 90 (heat shock protein 90), la cual permanece unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo. Esta región se une al dominio que se va a acoplar al ADN y el dominio donde está el ligando (Freedman, 1992). La siguiente región es el dominio E o dominio de unión al ligando, donde se une la hormona esteroide al receptor por lo que esta secuencia es altamente específica.

Finalmente, en el extremo C-terminal se encuentra el dominio F, esta región es importante en la transcripción, la activación y la represión de anti-estrógenos sintéticos. En el dominio F se asocian con mayor o menor afinidad antagonistas y agonistas sintéticos, lo que depende del tipo de célula y del ligando (Peters y Khan, 1999).



*Figura 5. Estructura del receptor a estrógenos (RE)  $\alpha$  y  $\beta$  (tomado y modificado de Richard, 2015).*

## Hipófisis

La hipófisis o pituitaria es una glándula endocrina que se encuentra en la base del cerebro alojada en el hueso esfenoides y cubierta por la duramadre (Fink, 2000). Está unida al hipotálamo por el tallo hipofisario, el cual contiene a la red de vasos sanguíneos del sistema porta hipofisario y se encuentra dividida en tres partes: el lóbulo anterior, el lóbulo intermedio (adenohipófisis) y el lóbulo posterior (neurohipófisis) que es una extensión del hipotálamo (Arimura, 2000). A su vez, la neurohipófisis se divide en tres regiones: el proceso infundibular, el tallo infundibular y la eminencia media. La adenohipófisis se divide en la parte intermedia, la parte tuberal y la parte distal; en la que se encuentran cuando menos cinco tipos de células que secretan hormonas en respuesta a estímulos hipotalámicos y periféricos (Lerner y Urbina, 2008).



La adenohipófisis secreta diferentes hormonas entre las cuales se encuentran la Hormona Adreno-Corticotrópica (ACTH), Prolactina (PRL), Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH), Hormona Estimulante de los Melanocitos (MSH), la Hormona del Crecimiento (GH) y las gonadotropinas (Brown, 1994), las cuales, al ser liberadas a la circulación estimulan a sus órganos blancos (Brown, 1994; Arimura, 2000; Guyton y Hall, 2001).

Las células blanco para la GnRH en la adenohipófisis son los gonadotropos, en ellos la unión de esta neurohormona genera la liberación de gonadotropinas, sin embargo, existen otras respuestas provocadas por la GnRH, como el aumento o disminución de sus receptores a la GnRH mediante su biosíntesis y la desensibilización de los gonadotropos (Prieto y Velázquez, 2002). En condiciones *in vitro* existe una respuesta bifásica en el número de receptores a GnRH, los cuales inicialmente muestran una disminución asociada a la desensibilización de los gonadotropos, seguido de un incremento en el número de receptores el cual, es dependiente de la síntesis de proteínas y de las concentraciones de calcio extracelular (Prieto y Velázquez, 2002).

## Ovario

El ovario es uno de los órganos principales del sistema reproductor (Guyton y Hall, 2001), en vertebrados se presenta como un órgano pareado a ambos lados de la cavidad pélvica superior (Bahr *et al.*, 1999). Está limitado por un epitelio cúbico simple derivado del peritoneo denominado epitelio germinativo, debajo del cual se encuentra la túnica albugínea, una capa delineada formada de tejido conectivo denso (Sánchez, 2003). Están suspendidos en un pliegue peritoneal llamado mesovario y son responsables de la ovogénesis, la secreción de hormonas esteroides ( $P_4$ , testosterona y  $E_2$ ) y de la secreción de hormonas proteicas (inhibina, actividad y folistatina) que participan en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Guyton y Hall, 2001). Está conformado por un compartimiento intersticial formado por células de la teca interna de folículos atrésicos, uno folicular conformado por los folículos en crecimiento y uno luteal formado por los cuerpos lúteos resultantes de la ovulación (Guyton y Hall, 2001).

Ambos ovarios reciben inervación la cual, en mamíferos está compuesta una por una inervación intrínseca formada por fibras sensoriales y una inervación extrínseca formada por fibras parasimpáticas y simpáticas. Las fibras parasimpáticas provenientes del nervio vago contienen diversos péptidos como la somatostatina, sustancia P, gastrina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Mayerhofer *et al.*, 2003).

Las fibras simpáticas, agrupadas en dos vías; el plexo ovárico (PO) y el nervio ovárico superior (NOS), están constituidas por neuronas catecolaminérgicas que contiene noradrenalina; peptidérgicas que sintetizan neuropéptido Y, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la sustancia P; así como por neuronas colinérgicas y gabaérgica (Mayerhofer *et al.*, 2003).

Mediante la administración del virus recombinante (Tóth *et al.*, 2007) se mostró que existen prolongaciones de neuronas del ovario que llegan hasta la médula ventrolateral, el núcleo gigantocelular, el área postrema, los núcleos vagales, el noradrenérgico (grupos celulares A1 y A5), los núcleos del rafe caudal, el *locus coeruleus*, el núcleo paraventricular del hipotálamo y el hipotálamo lateral.

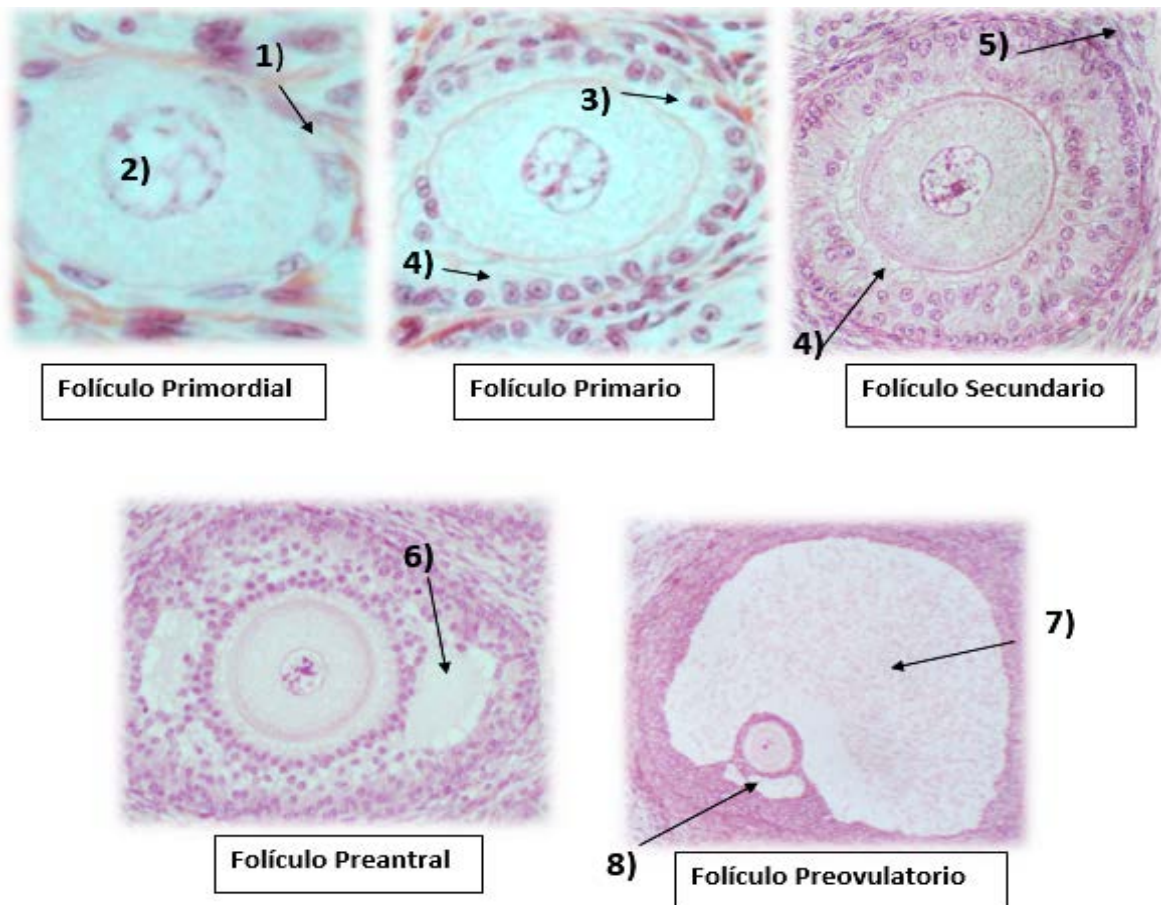
## Foliculogénesis

El folículo es la unidad anatómica y funcional del ovario y está conformado por el ovocito, las células de la granulosa, las células de la teca y una membrana basal.

La foliculogénesis es el proceso por medio del cual ocurre el crecimiento y diferenciación de los folículos (Figura 6), al pasar por varias etapas hasta la formación de un folículo preovulatorio (Spicer y Echternkemp, 1986), las cuales son:

- ❖ **Folículo Primordial:** formado por un ovocito primario, rodeado por una capa de células foliculares planas llamadas células pre-granulosa y una membrana basal.

- ❖ **Folículo Primario:** compuesto por un ovocito primario rodeado de 2 a 8 capas de células cúbicas (células de la granulosa); en esta etapa el folículo ha aumentado de tamaño y comienza la formación de la zona pelúcida que separa el ovocito de las células foliculares (Baker, 1982).
- ❖ **Folículo Secundario:** formado por un ovocito rodeado de 8-10 capas de células de la granulosa entre las cuales se empieza a acumular el líquido folicular rico en ácido hialurónico, esteroides y factores de crecimiento.  
En este estadio una red invade la trama fibrosa ubicada entre las células que rodean al folículo, constituyendo a la teca interna. Por fuera de esta capa se diferencia la teca externa rica en tejido conectivo y fibroblastos.
- ❖ **Folículo Preantral:** conforme el folículo va creciendo y diferenciándose, se forman espacios (cuerpos de call-exner) entre las células granulosas por la secreción de licor folicular, los cuales se irán uniendo para formar el antro folicular. La capa de células de la teca se hace aún más prominente.
- ❖ **Folículo Preovulatorio:** aparece el *cumulus oophorus* (acumulación de células de la granulosa que suspende al ovocito) y se forma el antro folicular (Baker, 1982).



**Figura 6.** Etapas y cambios en la estructura de un folículo durante su desarrollo; en la imagen se muestra señalado con el número 1) a las células de la pre-granulosa de un folículo primordial, 2) al ovocito, 3) a las células de la granulosa, 4) a la zona pelúcida, 5) a las células de la teca, 6) a los cuerpos de call-exner, 7) al antro folicular y 8) al cumulus oophorus (Tomado y modificado de <http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia>).

La formación y el crecimiento inicial de los folículos ováricos, no es mediada por la actividad de las gonadotropinas ya que las células de la pre-granulosa que conforman a los folículos primordiales no expresan receptores a gonadotropinas. El paso de un folículo primordial a un primario está regulado por proteínas que actúan entre las células somáticas del ovocito y las del folículo, como los activadores de AMPc, el factor de crecimiento y diferenciación-9 (GDF-9) perteneciente a la familia de los factores de crecimiento transformantes- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) / activina y el factor de crecimiento de fibroblasto-7 (FGF-7 o KGF). (Hunzicker y Mayo, 2015).

Tras la estimulación apropiada de la FSH y LH a su célula diana en el ovario, los folículos producen hormonas que proporcionan un ambiente óptimo para su crecimiento, la maduración del ovocito y la ovulación.

El  $17\beta$ - estradiol induce la mitosis de las células de la granulosa, evento que resulta en el crecimiento del folículo, así mismo estimula la formación de receptores a FSH a partir del folículo primario y los de LH cuando el folículo alcanza el estadio preovulatorio.

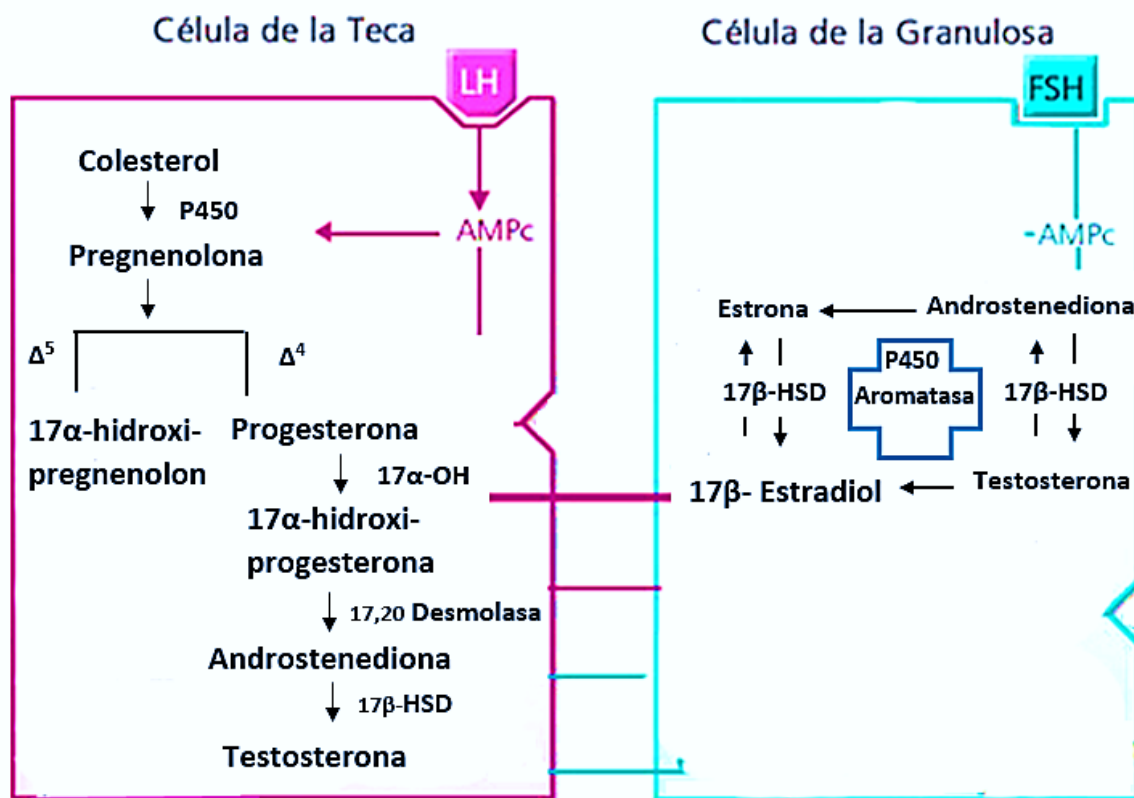
Una vez que las células de la granulosa proliferan y expresan receptores a FSH, el folículo continúa su crecimiento y como consecuencia desarrolla un antro lleno de líquido.

La FSH regula la expresión de 500 genes en la célula de la granulosa que promueven el crecimiento folicular, ya que codifican para moléculas de señalización intracelular y moléculas promotoras implicadas en la reorganización de los microtúbulos y citoesqueleto de actina. Sólo un pequeño subconjunto de los folículos ováricos sobrevive a la madurez, la mayor parte se pierde en el camino mediante un proceso de muerte celular programada denominado atresia (Hunzicker y Mayo, 2015).

## Esteroidogénesis

El proceso de esteroidogénesis en el ovario se lleva a cabo dentro de los folículos, de acuerdo con la teoría de la doble célula- doble hormona (Figura 7), es decir, se produce en dos tipos celulares que conforman el folículo: las células de la teca interna que contiene receptores a LH y células de la granulosa que pose receptores a FSH (Fernández., 1983).

Las hormonas esteroides tienen como precursor al colesterol, el cual puede obtenerse de tres fuentes principales: el colesterol que circula en la sangre unido a lipoproteínas de alta y baja densidad, el que se sintetiza *de novo* dentro del ovario a partir de la acetilcoenzima-A y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas (Tresguerres y Castillo, 1999).



**Figura 7.** Esquema de la esteroidogénesis en el folículo ovárico, basado en la teoría de la doble célula-doble hormona.

El primer paso en la síntesis de hormonas esteroides es la formación de la pregnenolona, a partir de la unión de la LH a los receptores que se encuentran en la membrana celular de las células de la teca interna, lo cual induce la formación de adenosin-monofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosin-trifosfato (ATP), este activa al complejo enzimático citocromo P450 que cataliza la formación de pregnenolona en la membrana interna de las mitocondrias de las células de la teca (Gore-Langton *et al.*, 1994; Hinshelwood, 1999).

Una vez sintetizada la pregnenolona, sale de la mitocondria y se transforma en progesterona (P4); es a partir de ésta que se forma la 17-hidroxiprogesterona la cual, por la acción de la C17, 20-liasa se biotransforma a androstenediona, que se convierte a testosterona por acción de la enzima 17 $\beta$ -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD) (Gore-Langton *et al.*, 1994; Hinshelwood, 1999).

La androstenediona y testosterona se difunden a través de la membrana basal y llegan a las células de la granulosa, donde son aromatizadas a estrógenos por el complejo enzimático P450-aromatasa, que se activa por el incremento de AMPc a partir de ATP inducido por la unión de la FSH a sus receptores en las células de la granulosa. La testosterona se transformará en estradiol ( $E_2$ ) y la androstenediona se transforma en estrona, que será transformada en  $E_2$  por medio de la enzima  $17\beta$ -HSD (Gore-Langton *et al.*, 1994).

### Participación de la Acetilcolina en la regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis- Ovario.

La ACh es uno de los neurotransmisores que participa en la regulación de la secreción de la GnRH, a pesar de que la vía colinérgica rara vez produce sinapsis en las neuronas GnRH, se ha sugerido una ruta no sináptica dominante en esta comunicación neural (Herbison, 2006).

Everett *et al.* (1949) mostraron que el sistema colinérgico participa de manera estimulante en la regulación de la secreción preovulatoria de la LH que ocurre en el día del proestro, al observar que la inyección de un antagonista del sistema muscarínico bloqueaba la ovulación en el día del estro esperado.

Experimentos *in vitro* muestran que en POA existe una relación directa entre la concentración de  $17\beta$ -estradiol y la proporción de receptores muscarínicos de alta y baja afinidad (Egozi *et al.*, 1986), que cambia a lo largo del ciclo estral, ya que en la mañana del día del proestro aumenta la proporción de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos (60%), comparado a lo observado en diestro-2 o en la tarde del proestro (35%).

Los cambios significativos en los receptores muscarínicos coinciden con el llamado "periodo crítico", caracterizado por altas concentraciones de estrógenos y un gran número de receptores a estrógenos en POA (Egozi y Kloog, 1985).

El contenido de ACh, y el número y la afinidad de sus receptores cambia durante el ciclo estral. En el día del diestro-1 se presentan las concentraciones máximas de ACh y en el diestro-2 las mínimas. Las concentraciones de ACh en POA-AHA presentan diferencias asimétricas, en el día del diestro-1 y en el proestro el lado derecho de POA-AHA tiene una mayor concentración de ACh que el lado izquierdo. También los receptores presentan diferencias asimétricas en la afinidad, la cual es mayor en el lado izquierdo de POA-AHA en los días del estro, diestro-1 y proestro (Cruz *et al.*, 1997).

En la hipófisis la ACh actúa como un factor parácrino mediador de la actividad de  $Ca^{2+}$ , pero no se han identificado los receptores que median su acción y los tipos de células en los que actúan estos receptores, sin embargo, se ha identificado la expresión de ARNm de los receptores muscarínicos  $M_4$ ,  $M_3$  en la hipófisis (Zemkova *et al.*, 2012). Estudios *in vitro* con células de hipófisis e hipotálamo muestran que la ACh estimula la liberación de la FSH y LH (Egozi y Kloog, 1985), y se ha mostrado que la activación de los receptores  $M_4$  por ACh en la hipófisis resulta en inhibición de AMPc causando la liberación de LH (Zemkova *et al.*, 2012).

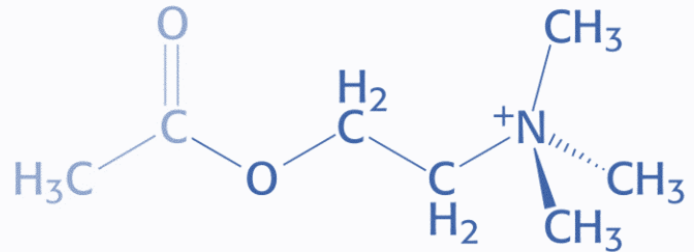
La ACh llega al ovario mediante los nervios parasimpáticos y el transporte de vasos sanguíneos a las células intersticiales, las células de la teca y posiblemente el cuerpo lúteo, sin embargo las células de la granulosa que son las células blanco de las ACh no hacen contacto con estas fibras nerviosas ya que estas no cruzan la lámina basal que separa a las células de la teca y la granulosa (Cooke y Payne 1988), esto hizo pensar que la ACh llegaba por difusión a las células de la granulosa (Mayerhorfer *et al.*, 1999).

Las células de la granulosa de humano y otros primates poseen receptores muscarínicos de los tipos  $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_5$  y que son estos los que median la función de la ACh autócrina y parácrina sobre el ovocito, las células de la granulosa luteales o ambas (Mayerhorfer *et al.*, 2003), modulando de manera estimulante la producción de hormonas esteroideas (Kornya *et al.*, 2001).



## Acetilcolina: síntesis y liberación

La ACh (Figura 8) es un neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático, se sintetiza a partir del acetato y colina, que son obtenidas de la corriente sanguínea o de la recapturada en el espacio sináptico, donde se encuentra como producto de su degradación por medio de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Mendoza, 2008).

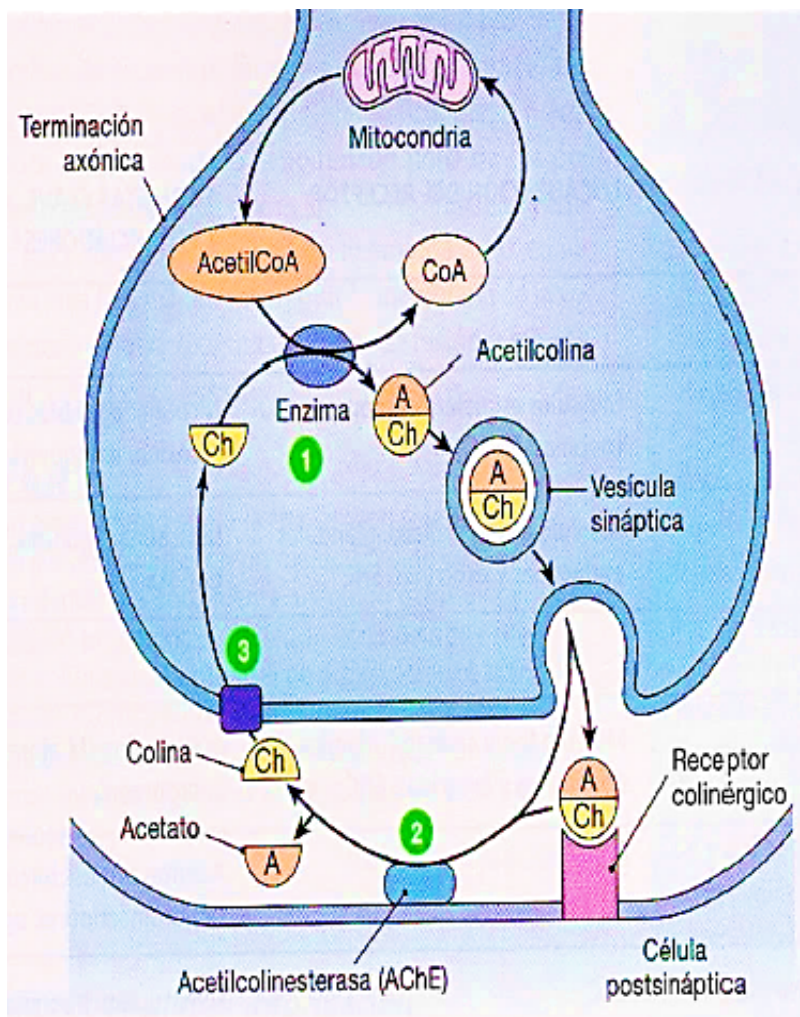


*Figura 8.* Estructura química de la Acetilcolina (Tomado de Mendoza, 2008).

La síntesis de ACh se lleva a cabo en el soma de la neurona y está catalizada por la enzima colino-acetil-transferasa (ChAT), cuya mayor actividad se encuentra en el núcleo interpeduncular, el núcleo caudado, la retina, el hipocampo, la corteza cerebral y las raíces ventrales de la médula espinal.

En las terminales colinérgicas, la ACh es liberada como resultado de cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la apertura de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje activando así proteínas contráctiles del citoesqueleto, lo que facilita que la vesícula que contiene la ACh, sea llevada directamente a la membrana presináptica y liberarla por exocitosis al espacio sináptico (Südhof, 1995).

La neurotransmisión colinérgica concluye con la inactivación de la ACh, que implica la hidrólisis del neurotransmisor, en la que la AChE produce colina y acetato (Felder, 1995).



**Figura 9.** Síntesis, liberación y recaptura de la acetilcolina (ACh), 1) Síntesis de la ACh en el soma de la neurona colinérgica a través de la colino-acetil-transferasa (ChAT), 2) liberación de la acetilcolina en la hendidura sináptica, una vez liberada es rápidamente degradada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y 3) recaptura de la colina en la terminal axónica (Tomado de <http://neuroquimicaclinica.blogspot.mx/2010/08/neurotransmisor-de-la-semana.html>).

## Receptores para Acetilcolina

La ACh se une a dos tipos de receptores colinérgicos de membrana:

- ❖ Los receptores nicotínicos permiten la apertura de canales iónicos, los cuales generan respuestas rápidas y están localizados en los ganglios simpáticos, en el SNC y la placa muscular (Gotti *et al.*, 1997).

- ❖ Los receptores muscarínicos (mAChR) que interactúan con proteínas unidas a nucleótidos de guanina (proteína G); participan en los efectos de la ACh en las sinapsis post ganglionares, en el músculo liso, corazón y glándulas exocrinas; son responsables también de los efectos de ACh en el SNC y ganglios autonómicos (Unwin, 1995). Están localizados en varias zonas del cerebro como la corteza cerebral, el cuerpo estriado, el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo, el cerebro medio, la médula espinal, el cerebelo y el cordón espinal (Wei *et al.*, 1994).

Los receptores muscarínicos se encuentran en la membrana citoplasmática, poseen siete dominios transmembranales y los extremos tanto amino como carboxilo terminal, que se localizan dentro y fuera de la neurona respectivamente (Richmond *et al.*, 1999). Se han identificado cinco subtipos identificados como  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ,  $m_4$  y  $m_5$  (Bonner *et al.*, 1988).

Los receptores muscarínicos pueden ser inhibidos por fármacos específicos, como la atropina (ATR), que es clasificada como un fármaco antagonista que impide cualquier tipo de acción que pueda tener la ACh sobre cualquiera de los cinco receptores muscarínicos.

La ATR (Figura 10) es un alcaloide presente en plantas de la familia Solanaceae *Atropa belladonna* y *Datura stramonium*; químicamente es un éster orgánico formado por el ácido trópico y una base orgánica (tropina) (Velázquez *et al.*, 2008). Atraviesa la barrera hemato-encefálica, por lo que sus efectos llegan a SNC.

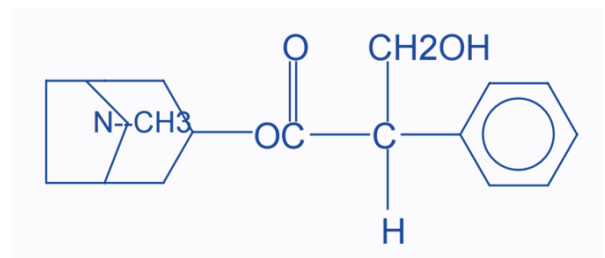


Figura 10. Estructura química de la atropina (Tomado de Stoelting, 1991).

Su constante de afinidad ( $pK_d$ ) promedio para los diferentes receptores es de 9 a 9.8 y su acción puede durar de 45 min a 1 h y su vida media de eliminación es de 2.3 h, posteriores a las cuales experimenta hidrólisis con la formación de metabolitos inactivos de ácido trópico y tropina (Stoelting, 1991).

## Vías colinérgicas aferentes al hipotálamo y receptores muscarínicos en POA-AHA

En el SNC las neuronas colinérgicas se organizan principalmente como circuitos locales y neuronas de proyección. En el cerebro anterior de la rata se han identificado dos vías colinérgicas principales:

- ❖ La vía tegmental dorsal, cuyos somas neuronales colinérgicos se localizan en el núcleo cuneiforme de la formación reticulada mesencefálica, que proyectan sus fibras hacia el tectum, el área pretectal, los cuerpos geniculados, el tálamo y el sistema límbico.
- ❖ La vía tegmental ventral, cuyas neuronas se encuentran en la sustancia negra y el núcleo tegmental ventral del cerebro medio y sus fibras nerviosas viajan a lo largo del haz tegmental ventral y atraviesan el hipotálamo y el subtálamo hasta llegar al tallo cerebral (Nistico y Müller, 1989).

Existen grupos neuronales colinérgicos densos en el núcleo submamilar del hipotálamo y otras neuronas dispersas en el área preóptica (POA), y en las áreas posterior y lateral del hipotálamo (Nisticó y Müller, 1989), áreas hipotalámicas donde también se encuentran las neuronas GnRHérgicas.

## Asimetrías

La primera evidencia que llevó a considerar la existencia de una asimetría funcional y una dominancia cerebral fue dada en 1861 por Paul Broca, al informar que las afasias cerebrales eran provocadas por malformaciones o lesiones en una región delimitada del hemisferio izquierdo. Esta fue la base fundamental para observaciones subsecuentes, a partir de las cuales se formuló la teoría clásica de la lateralización, que comprende la existencia de un hemisferio dominante para una función específica (Gerendai y Halász, 2001).

En cambio, la asimetría implica una respuesta desigual y opuesta que se produce ante un mismo estímulo, que puede provenir de un centro localizado en el mismo lado del cuerpo (ipsilateral) o del lado opuesto (contralateral) (Gerendai y Halász, 2001).

Desde finales de la década de 1960, se mostró que cada hemisferio es dominante en ciertas funciones y que la asimetría está presente en todo el reino animal. Por otra parte, una gran cantidad de datos indican la existencia de asimetría en las áreas subcorticales y en las estructuras neuronales, ya sea morfológica, bioquímica, farmacológica y funcionales. Los estudios que conducen a la primera descripción de asimetría en el control neural de las glándulas endocrinas fueron originalmente diseñados para demostrar la existencia de una relación neuronal directa entre el cerebro y las glándulas endócrinas (Gerendai y Halász, 2001).

La asimetría no solo se restringe a aspectos macroscópicos, sino que también incluye al tamaño de las neuronas y su distribución dendrítica. Estas asimetrías funcionales y anatómicas pueden acompañarse o no, de diferencias en el contenido de neurotransmisores y de algunos aminoácidos esenciales. En la rata se describen como asimétricas las concentraciones de noradrenalina en el cuerpo estriado y el tálamo, la concentración de serotonina en el cuerpo estriado y el núcleo *acumbens* y la cantidad de dopamina en la corteza cerebral y el núcleo *acumbens* (Mora *et al.*, 1948; Rosen *et al.*, 1984; Oke *et al.*, 1978; Robinson *et al.*, 1985).

Gerendai *et al.*, (2001) mostraron que los mecanismos neuroendocrinos que se generan en las porciones izquierda y derecha de POA-AHA son diferentes, al indicar que, en la rata hembra, la concentración de la GnRH en la porción derecha del hipotálamo medio basal (HMB) era el doble que la del lado izquierdo. Dicha asimetría también fue mostrada en la rata macho, pero ésta sólo se observa en horas específicas del día (Bakalkin *et al.*, 1984).

La región preóptica responde de manera asimétrica a las hormonas esteroides; el implante de estradiol en el lado derecho de POA o del núcleo ventromedial de ratas hembras prepúberes provoca masculinización cuando los animales llegan a la edad adulta, en cambio cuando el E<sub>2</sub> se implanta en el lado izquierdo ocurre defeminización (Nordeen y Yahr, 1982).

En la rata adulta con ambas gónadas, la lesión unilateral electrolítica en el hipotálamo anterior reduce en un 50% el número de animales ovulantes mostrando que cada lado de esta zona puede ser capaz de compensar parcialmente la ausencia de la otra, sin embargo, en estos animales la lesión causó una disminución en el número de ovocitos liberados de manera asimétrica, siendo mayor en el ovario derecho que en el izquierdo (Cruz *et al.*, 1990).

En la rata adulta con ovariectomía unilateral (ULO), la lesión electrolítica en POA izquierda reduce el porcentaje de animales ovulantes mientras que la del lado derecho no la afecta (Cruz *et al.*, 1990).

Hay resultados convincentes que sugieren la presencia de una asimetría funcional gonadal, indicando un mayor potencial funcional por parte del ovario izquierdo, ya que éste libera de manera normal más ovocitos que el del lado derecho (Domínguez *et al.*, 2003), así mismo en la rata hembra, la extirpación de uno de los ovarios resulta en el aumento del contenido de GnRH del mismo lado del HMB (Gerendai *et al.*, 1979).

Finalmente, Cruz *et al.*, (2006) mostraron que cuando se extirpa el ovario izquierdo, la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol es semejante a la de un animal con ambos ovarios, mientras que cuando se extirpa el ovario derecho, la concentración de  $E_2$  es menor; lo que sugiere que cada ovario secreta diferente cantidad de la hormona.

Diversas evidencias sugieren también una regulación asimétrica por parte de factores hormonales y neuroendocrinos implicados en la ovulación. Un ejemplo de esto es la influencia asimétrica de los receptores muscarínicos de POA-AHA sobre la secreción de GnRH durante el ciclo estral (Cruz *et al.*, 1989; Cruz *et al.*, 1992). De acuerdo con Cruz *et al.*, (1989) el implante de atropina en de POA-AHA-D (a las 13:00 horas del día del estro) bloquea la ovulación, mientras que el lado izquierdo no la afecta.

Sin embargo, si el fármaco se coloca en el día del diestro-1, ambos implantes (los del lado izquierdo y del lado derecho) bloquean la ovulación; en el día del diestro-2, sólo los implantes del lado izquierdo causan una disminución de la ovulación, y en el día del proestro los implantes en uno u otro lado de POA-AHA no la modifican (Cruz *et al.*, 1989).

Se ha mostrado que la falta de ovulación en animales con implante unilateral de atropina en POA-AHA-D realizado en el estro se modifica por la falta de uno u otro ovario, ya que, al extirpar un ovario en este día, el efecto por el implante de atropina se invierte, siendo ahora los animales con implante en el lado izquierdo los que no ovulan (Cruz *et al.*, 1992).

Esta falta de ovulación en animales ULO y con implante de atropina en POA-AHA es explicado por las modificaciones en la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de LHRH sintético a las 14:00 horas de este día, induce la ovulación en ratas con implante de atropina que no habían ovulado (Cruz *et al.*, 1992), modificación que parece ser el resultado de una alteración en el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos en la porción derecha de POA-AHA, ya que al reestablecer esta señal ovárica en la tarde del diestro-2 (inyección subcutánea de 10µg benzoato de estradiol), induce la ovulación sólo en aquellos animales con implante de atropina en el diestro-1 del lado izquierdo de POA-AHA (Cruz *et al.*, 1992).

Esta asimetría ha sido descrita del mismo modo en la actividad de la ChAT entre el lado izquierdo y derecho de POA-AHA a lo largo del ciclo estral, ya que en el estro donde esta diferencia es más marcada ya que la concentración de esta enzima es mucho mayor en el lado derecho (Sánchez *et al.*, 1994).

## JUSTIFICACIÓN

En POA-AHA, la unión de la ACh a los mAChR regula de manera estimulante la ovulación, y es asimétrica en los días del estro y el diestro-2. *Cruz et al., (1989)* mostraron que el bloqueo permanente o crónico por 96 horas de los receptores muscarínicos, mediante el implante de cristales de atropina, en la porción derecha de POA-AHA (a las 13:00 horas del día del estro) bloquea la ovulación, mientras que del lado izquierdo no causa efecto. Esta falta de ovulación se modifica por la falta de uno u otro ovario, ya que al extirpar un ovario en el día del estro el efecto por el implante de atropina se invierte, siendo ahora los animales con implante en el lado izquierdo los que no ovulan (*Cruz et al., 1992*).

Se ha sugerido que la cantidad de E<sub>2</sub> secretada por cada ovario es diferente, ya que cuando se extirpa el ovario izquierdo, la concentración sérica de esta hormona es semejante a un animal con ambos ovarios, mientras que cuando se extirpa el ovario derecho, la concentración de estradiol es menor (*Cruz et. al., 2006*), por lo que el efecto “feedback” enviado por los ovarios al hipotálamo podría verse alterado. Además, se ha mostrado que el E<sub>2</sub> regula la actividad de las neuronas colinérgicas (*Egozi et al., 1986*).

Por lo que en este estudio se decidió analizar si la falta de un ovario influye en la respuesta al bloqueo agudo de los receptores muscarínicos en POA-AHA sobre la ovulación. Así mismo, se estudiará en ratas con bloqueo de los receptores muscarínicos la sensibilidad del hipotálamo al estradiol, de la hipófisis a la GnRH y del ovario a la LH y cómo ésta puede estar alterada por la falta de un ovario.



## HIPÓTESIS

Dado que en el día del estro el bloqueo crónico por 96 horas del sistema muscarínico en POA-AHA regula de forma asimétrica la ovulación, que el  $17\beta$ -estradiol regula la actividad de las neuronas colinérgicas y de que este esteroide es secretado en cantidades diferente por uno u otro ovario, entonces la ausencia de una de las gónadas, que implica la disminución o no de la concentración de  $E_2$ , alterará la función asimétrica que ejerce el sistema muscarínico de POA-AHA sobre la ovulación.

## OBJETIVOS GENERALES:

- ❖ Estudiar la participación de los ovarios en los mecanismos de regulación del sistema muscarínico de POA-AHA sobre la función ovárica.
- ❖ Analizar la sensibilidad del hipotálamo al  $E_2$ , de la hipófisis a la GnRH y del ovario a la LH en ratas con ULO y bloqueo del sistema muscarínico de POA-AHA.

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

1. Cuantificar los efectos de la ULO sobre la función ovárica y la concentración sérica de E<sub>2</sub>, FSH y LH.
2. Cuantificar los efectos del bloqueo unilateral y agudo de los mAChR de POA-AHA sobre la función ovárica y la concentración sérica de E<sub>2</sub>, FSH y LH.
3. Cuantificar los efectos del bloqueo unilateral agudo de los mAChR de POA-AHA en animales con ULO, sobre la función ovárica y la concentración sérica de E<sub>2</sub>, FSH y LH.
4. Estudiar la sensibilidad del hipotálamo al E<sub>2</sub>, de la hipófisis a la GnRH y del ovario a la LH en ratas con ULO, con el bloqueo unilateral agudo de los mAChR de POA-AHA, o con bloqueo unilateral agudo de los mAChR de POA-AHA en ratas con ULO.

## MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

En este estudio se utilizaron ratas hembra adultas cíclicas de la cepa CIIZ-V de tres a cuatro meses de edad, con peso corporal de 190-260 gr, alojadas en grupos de siete individuos por jaula, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 5:00 a 19:00 horas) y temperatura ( $22 \pm 1$  °C), con acceso libre al alimento (Purina lab chow 5001) y al agua.

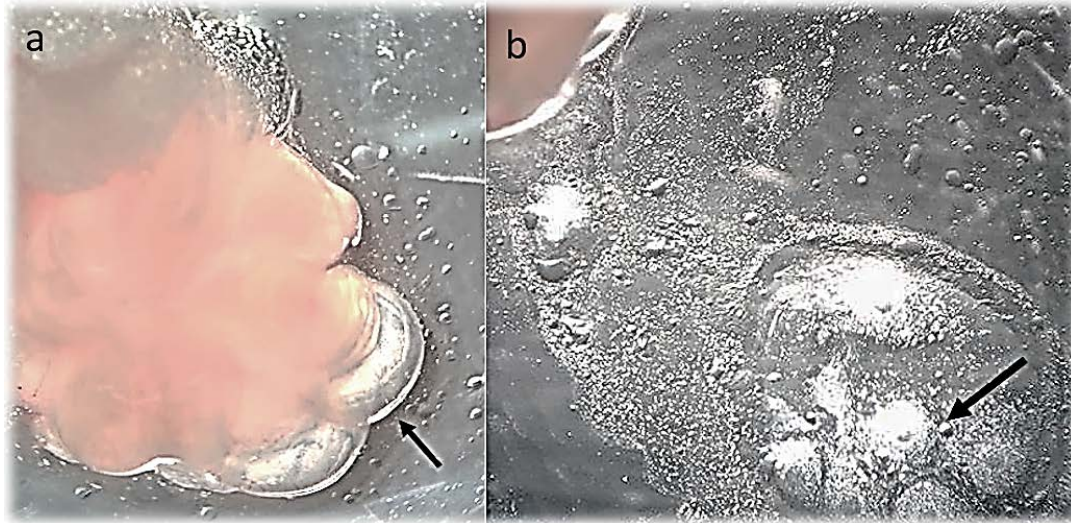
El ciclo estral de cada uno de estos animales fue estudiado mediante la toma diaria de frotis vaginal, que se realizaron entre las 9:00 y 9:30 h. Únicamente se utilizaron aquellos animales que presentaron al menos dos ciclos consecutivos de cuatro días.

En el día del estro, las ratas fueron seleccionadas al azar para incluirlas en algunos de los grupos experimentales (intactos o grupo testigo absoluto, con laparotomía unilateral izquierda o derecha, con ULO izquierda o derecha, con microinyección de agua izquierda o derecha, con microinyección de atropina izquierda o derecha y con ULO izquierda o derecha en animales con microinyección unilateral de atropina).

El grupo intacto o testigo absoluto fue conformado por 6 animales intactos sin ninguna manipulación adicional a la toma de frotis vaginal.

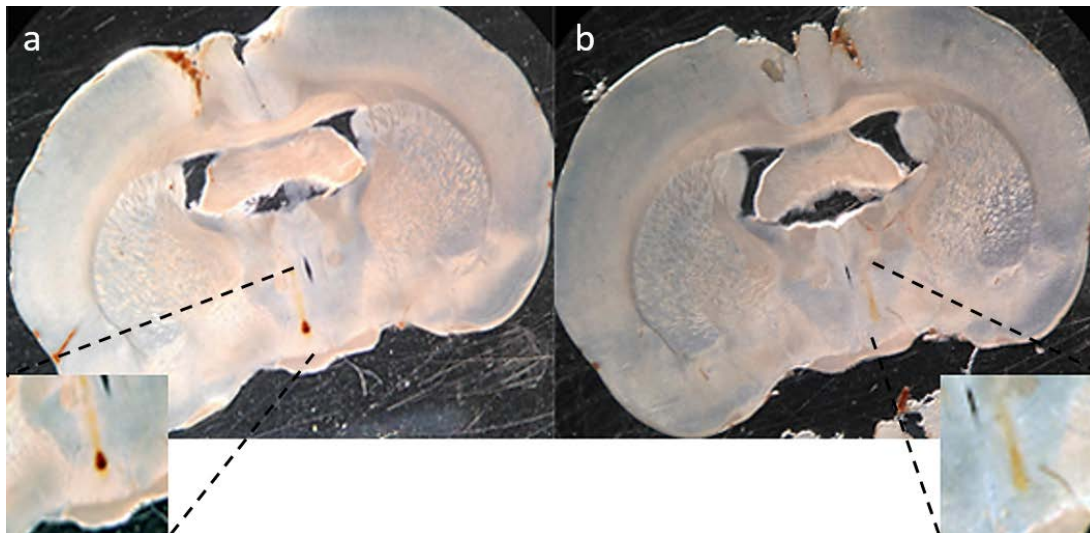
Todos los animales, excepto los del grupo testigo fueron anestesiados con (25mg/kg) de pentobarbital sódico, inyectado por vía intraperitoneal, entre las 12:10 y las 12:30 h del estro y fueron sometidos a los distintos tratamientos siguiendo la metodología particular para cada objetivo planteado.

Todos los animales de los grupos experimentales fueron sacrificados por decapitación entre las 9:00 y 10:00 horas del estro esperado. Se disecaron los ovarios y el útero, de los ovarios se separó el oviducto para contar el número de ovocitos liberados en un microscopio estereoscópico (Olympus SZ2-LGCL) (Figura 11). Los ovarios y el útero fueron pesados en una balanza de precisión (ESJ SERIES, modelo: ESJ200-4), su peso se expresó como media  $\pm$  e.e.m. del peso relativo (mg/100 g de peso corporal).



*Figura 11. Oviducto y ovocitos contenidos en el mismo de un animal intacto sacrificado en el día del estro. Las flechas señalan a los ovocitos dentro (a) y fuera del oviducto*

Los cerebros de los animales microinyectados se extrajeron del cráneo y fueron fijados en para-formaldehído al 4% por 48 horas; se cortaron en un vibratomo (Sectioning System 3000. Technical Products International, INC) en sentido coronal y en forma seriada a 60  $\mu\text{m}$ . Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se procedió a localizar el área de la microinyección, utilizando el atlas del cerebro de la rata (Köning y Klippel. 1963) (Figura 12).



*Figura 12. Zona de microinyección, a) del lado izquierdo y b) lado derecho de POA-AHA. Las flechas señalan la trayectoria de la aguja insertada*

## CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS

Para evaluar los efectos de aquellos tratamientos que modificaron la ovulación sobre la concentración preovulatorias de  $E_2$ , LH y FSH, grupos de 6 animales con estos tratamientos fueron sacrificados por decapitación para la obtención de suero sanguíneo a las 9:00 y 17:00 h del proestro esperado (Pe).

Para ello, la sangre del tronco que fue colectada en tubos de ensayo se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó (Centrifuge Power Spin MX. C5624) a 3500 rpm durante 15 min. Se obtuvo el suero y fue almacenado a 4°C en alícuotas de 300  $\mu$ L en tubos Eppendorf, hasta el día de la cuantificación de las hormonas.

La cuantificación de las concentraciones séricas de LH y FSH, fue realizada por Radio Inmuno Análisis (RIA) mediante el uso de estuches comerciales para LH (NIDDK-anti- r LH-S-11) y para FSH (NIDDK-anti- rFSH-S-11). Se utilizaron tubos de polipropileno impregnados con anticuerpo de coneja y viales marcadas de acuerdo a su hormona (para FSH fueron marcados con  $I^{-125}$  anticuerpo policlonal en fase líquida y anti-FSH monoclonal inmovilizado, utilizando una dilución inicial de 1:62500 en los tubos de polipropileno; para LH marcados con  $I^{-125}$  anticuerpo policlonal en fase líquida y anti-LH monoclonal inmovilizado con una dilución 1:25200 en los tubos de polipropileno). A cada tubo se le adicionaron 100 $\mu$ L del suero de la muestra más 1000 $\mu$ L de la hormona marcada, fueron agitados durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas.

Posteriormente se decantaron y se limpiaron por la parte externa del tubo y finalmente con la ayuda de un contador de centello Gama (modelo Cobra 5005, Packard), se cuantificó la cantidad de hormona problema con un coeficiente de variación para LH 7.4% y 12.1% intra e inter ensayo fueron, mientras que para FSH fueron de 9.3% y 14.6%.

Los datos de la concentración de FSH y LH se expresaron en ng/mL. La curva patrón fue establecida mediante calibradores para cada hormona (FSH- $I^{-125}$ : 0, 1.5, 5, 15, 30, 60 y 100 ng/mL; LH- $I^{-125}$ : 0, 1, 5, 7, 15, 30, 75, 150 y 300 ng/mL).

La cuantificación de la concentración sérica de E<sub>2</sub> se realizó mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA), mediante el uso del kit comercial (DRG® para Estradiol). Se utilizó una placa de 96 pozos sensibilizada al anticuerpo policlonal anti-estradiol, a cada pozo se le añadieron 25 µL de la muestra o del control del kit (dependiendo del arreglo en la placa) y se dejaron incubar durante 5 minutos. Inmediatamente después se le agregaron 200 µL de la enzima conjugada y se agitó durante 10 segundos. Pasado el tiempo se incubaron durante 120 minutos, se realizaron tres lavados con solución de lavado e inmediatamente se le adicionaron 100 µL de solución de sustrato y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Al finalizar el tiempo se agregaron 50 µL de solución de paro y se dejaron reposar durante 10 minutos. Finalmente se realizó la lectura de la placa utilizando el espectrofotómetro Multiskan™ GO (Marca Thermo Scientific™), a una absorbancia de 450±10 nm. Los datos de la concentración de E<sub>2</sub> se expresaron en pg/mL. La curva patrón fue establecida mediante calibradores a distintas concentraciones (0, 25, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg/mL).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los datos obtenidos del porcentaje de animales ovulantes fueron analizados por la prueba de Probabilidad exacta de Fisher y expresados como porcentaje del total de animales del grupo y el número de ovocitos liberados fue analizada por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn. El peso de los ovarios y del útero mediante un Análisis de Varianza Múltiple, seguido de la prueba de Tukey. Para los casos en que se compararon los resultados de dos grupos experimentales, se utilizó la prueba de “t” de Student o la “U” de Mann-Whitney. En todos los casos se consideraron significativas las diferencias en las cuales la probabilidad fue menor o igual a 0.05 ( $p \leq 0.05$ ).

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.05.

## OBJETIVO PARTICULAR: CUANTIFICAR LOS EFECTOS DE LA ULO SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE E<sub>2</sub>, FSH Y LH.

### MATERIALES Y MÉTODO

Con la finalidad de evaluar el efecto de extirpar uno u otro ovario a las 13:00 h del día del estro sobre la ovulación, 8 animales previamente pesados y anestesiados fueron sometidos a una laparotomía dorso lateral (LPD) del costado izquierdo o derecho (-I, -D) o a una ULO. Veinticuatro horas después del tratamiento se continuó con la toma de frotis diaria hasta el día de su sacrificio, en el día el estro esperado del ciclo siguiente al que se llevaron a cabo los tratamientos.

**Laparotomía dorso lateral (LPD):** usando jabón quirúrgico y una navaja de afeitar se procedió a limpiar y rasurar el costado izquierdo o derecho. Se realizó una incisión de piel y músculo de aproximadamente un cm, después de la cual se procedió a suturar el músculo y la piel.

**Ovariectomía unilateral (ULO):** una vez realizada la incisión del mismo modo que en las LPD, se exteriorizó uno de los ovarios (-I o -D) y con ayuda de unas pinzas Kelly se cortó el flujo sanguíneo entre el cuerno uterino y el ovario. Se realizó una ligadura en esta zona con sutura estéril, se separó el ovario y se introdujo el cuerno uterino a la cavidad para suturar el músculo y la piel. El ovario extirpado fue separado de la grasa y del oviducto, para ser pesado en la balanza de precisión.

Con los datos obtenidos del peso del ovario y del número de ovocitos liberados, se procedió a calcular la hipertrofia compensadora del ovario (HCO) y la ovulación compensadora (OC) mediante las siguientes formulas:

$$HCO = \frac{\text{peso del ovario } \textit{remanente} - \text{peso del mismo ovario del animal con LPD}}{\text{peso del mismo ovario del animal con LPD}} \times 100$$

$$OC = \frac{\text{\#ovocitos liberados por el ovario } \textit{remanente} - \text{\#ovocitos liberados por el mismo ovario del animal con LPD}}{\text{\#ovocitos liberados por el mismo ovario del animal con LPD}} \times 100$$

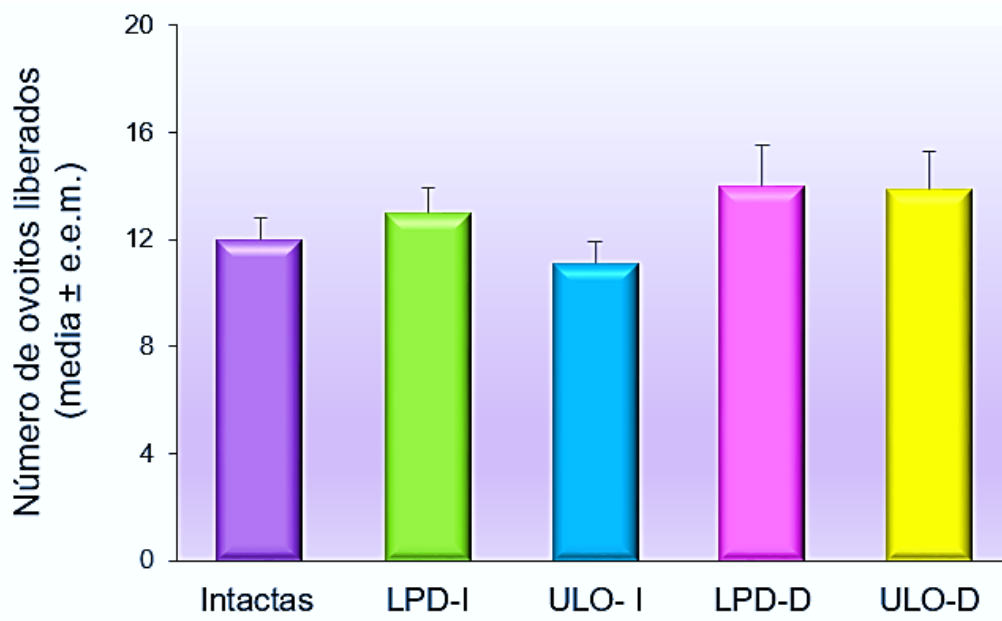
## RESULTADOS

**Porcentaje de animales ovulantes**

El porcentaje de animales ovulantes al día del estro esperado no se modificó por la LPD, con respecto a los animales intactos (LPD-I: 100% o LPD-D: 100% vs. Intactos: 100%). La ULO tampoco provocó cambios en el porcentaje de animales ovulantes con respecto a la LPD (ULO-I: 80% vs. LPD-I: 100%; ULO-D: 82 % vs. LPD-D: 100%).

**Número de ovocitos liberados**

La LPD unilateral no modificó el número total de ovocitos liberados con respecto a la de los animales intactos. Del mismo modo la ULO no modificó el número total de ovocitos liberados con respecto a las LPD (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Efecto de la LPD-I o LPD -D o de la ULO- I o ULO-D realizadas a las 13:00 h del estro, sobre el número total de ovocitos liberados en el día del estro esperado. En los grupos intactos o con LPD se grafican los ovocitos liberados por ambos ovarios.



El número de ovocitos liberados por el ovario remanente de las ratas con ULO aumentó con respecto al ovario correspondiente en la LPD (ULO-I:  $11.1 \pm 0.7$  vs. LPD-I:  $5.8 \pm 0.5$ ,  $p < 0.0025$ ; ULO- D:  $13.8 \pm 1.4$  vs. LPD- D:  $6.6 \pm 1.0$   $p < 0.0012$ )

Al expresar el número de ovocitos liberados como OC se observó que el ovario derecho del animal con ULO-I liberó un 90% más de ovocitos que el mismo ovario de los animales con LPD-I, del mismo modo, el ovario izquierdo remanente de los animales con ULO-D liberó un 108% más con respecto al mismo ovario de los animales con LPD-D.

### Peso de los ovarios y del útero

Ni las LPD ni las ULO, modificaron el peso de los ovarios y del útero (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Efectos de la LPD-I o LPD –D o de la ULO- I o ULO-D realizadas a las 13:00 h del estro, sobre la masa de los ovarios y del útero (mg/100 g de masa corporal) en el estro esperado.

Grupos experimentales	Ovario Izquierdo (media $\pm$ e.e.m.)	Ovario derecho (media $\pm$ e.e.m.)	Útero (media $\pm$ e.e.m.)
Intactas	$17.0 \pm 0.9$	$17.5 \pm 0.7$	$174.9 \pm 6.8$
LPD- I	$19.4 \pm 1.8$	$17.1 \pm 1.1$	$196.3 \pm 8.9$
ULO- I	.....	$20.4 \pm 0.8$	$164.7 \pm 9.3$
Intactas	$17.0 \pm 0.9$	$17.5 \pm 0.7$	$174.9 \pm 6.8$
LPD- D	$18.1 \pm 1.1$	$17.9 \pm 1.5$	$188.1 \pm 6.7$
ULO- D	$21.7 \pm 0.9$	.....	$185.6 \pm 8.8$

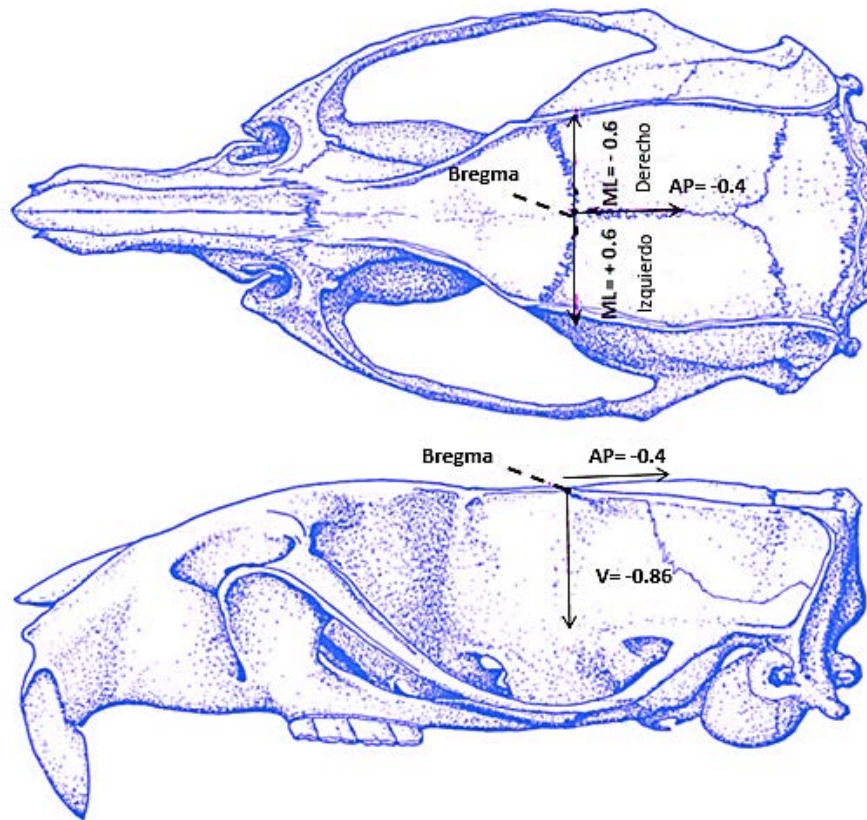
Al expresar el peso de los ovarios como HCO se observó que el ovario derecho remanente de las ratas con ULO-I compensa un 20% con respecto al mismo ovario de los animales con LPD-I. De igual manera, el ovario izquierdo remanente de los animales con ULO-D compensa un 18% con respecto al mismo ovario de los animales con LPD-D.

OBJETIVO PARTICULAR: CUANTIFICAR LOS EFECTOS DEL BLOQUEO UNILATERAL AGUDO DE LOS mAChR DE POA-AHA SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE E<sub>2</sub>, FSH Y LH.

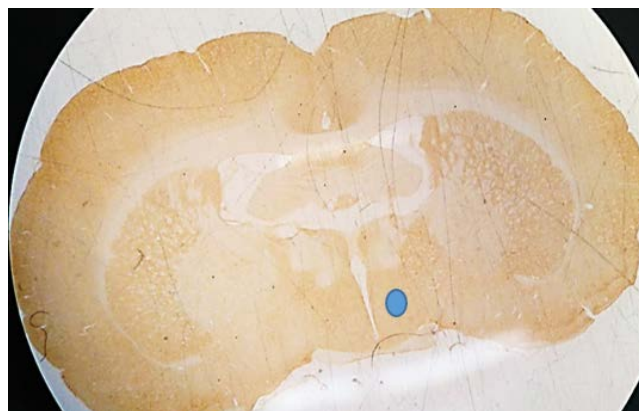
## MATERIALES Y MÉTODO

- ❖ *Experimento 1: Selección previa del vehículo en el que fue disuelta la atropina y que al ser microinyectada en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a las 13:00 del estro no altero la ovulación espontánea.*

Con el propósito de seleccionar el solvente en el que se diluiría la atropina, se utilizaron grupos de 5 animales previamente anestesiados, los cuales fueron colocados en un aparato estereotáxico (modelo 900, David Kopf Instruments, USA). Con jabón quirúrgico y una navaja Guillet se rasuró la piel de la zona dorsal de la cabeza, se realizó una incisión en el cuero cabelludo de aproximadamente un cm de largo, desde el hueso frontal a la parte media de los parietales; se limpió la zona con agua oxigenada para visualizar el punto de referencia Bregma (punto de unión de los huesos parietales con el frontal) (Figura 13); y con base en las coordenadas del atlas del cerebro de la rata de [Köning y Klippel \(1963\)](#) se seleccionaron las mismas para llegar a POA-AHA (Antero-Posterior (AP)= -0.4, Medio-Lateral (ML)=  $\pm$  0.6, Ventral= - 0.86). Se perforó el cráneo con un roto-motor odontológico (Marca DREMEL, modelo300, Hecho en México) y por medio de una aguja de acero inoxidable de 25G unida a una bomba de microinyección (CMA400, Byochemical System,USA), se microinyectó un  $\mu$ l de agua estéril (H<sub>2</sub>O estéril) o de agua inyectable (H<sub>2</sub>O inyectable) o de solución salina (0.09%), a una velocidad de 60 segundos en el lado izquierdo (-I) o derecho (-D) de POA-AHA a las 13:00 h del estro. Los animales fueron suturados y veinticuatro horas después a la cirugía se reanudó la toma de frotis vaginales hasta el día del sacrificio en el siguiente estro esperado.



**Figura 13.** Representación esquemática de la dirección de las coordenadas de microinyección media lateral (ML), anteroposterior (AP) y ventral (V) en el cráneo de la rata partiendo del punto de referencia cero (Bregma), (Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 2004).



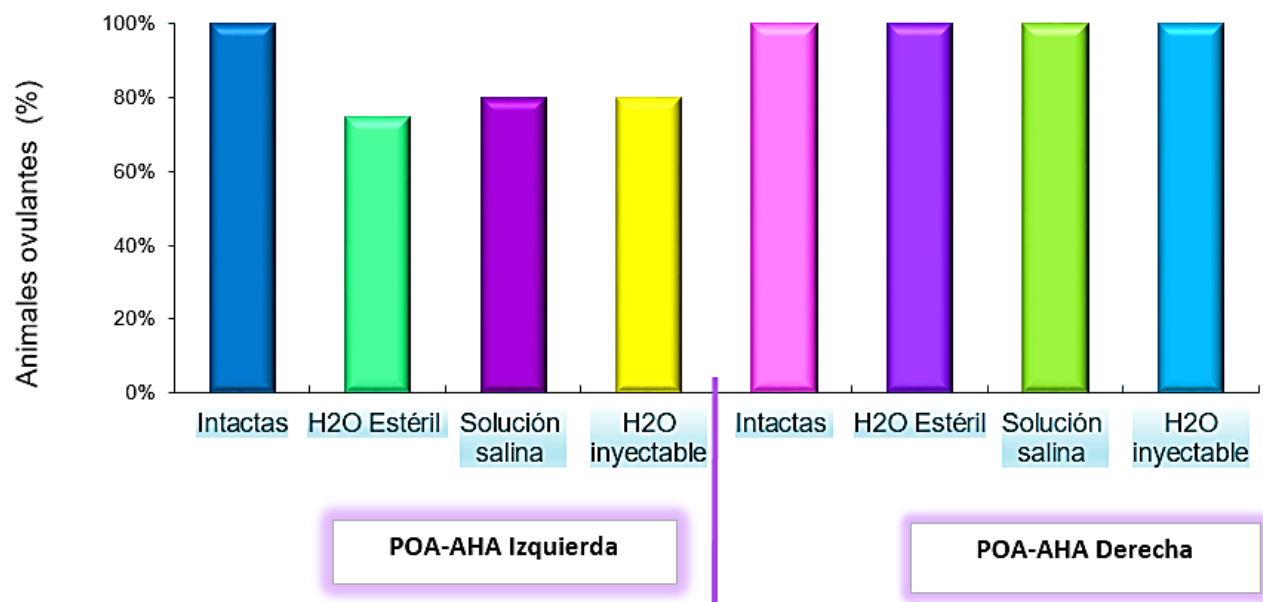
**Figura 14.** Corte coronal histológico que muestra la zona seleccionada para insertar la aguja a POA-AHA.

## RESULTADOS

**Porcentaje de animales ovulantes**

Los diferentes vehículos (H<sub>2</sub>O estéril, solución salina y H<sub>2</sub>O inyectable) microinyectados para la disolución de atropina, no modificaron el porcentaje de animales ovulantes en el estro esperado con respecto al grupo de ratas intactas (Gráfica 2).

Debido a que ninguno de los vehículos altero el porcentaje de animales ovulantes, se seleccionó al H<sub>2</sub>O estéril como vehículo idóneo dado que en estudios previos del laboratorio (García, 2007), se había utilizado como solvente para la dilución de atropina.



**Gráfica 2.** Efecto de la microinyección de H<sub>2</sub>O estéril, inyectable o Solución salina en POA-AHA-I o -D realizada a las 13:00 h del estro sobre el porcentaje de animales ovulantes en el estro esperado.

## MATERIALES Y MÉTODO

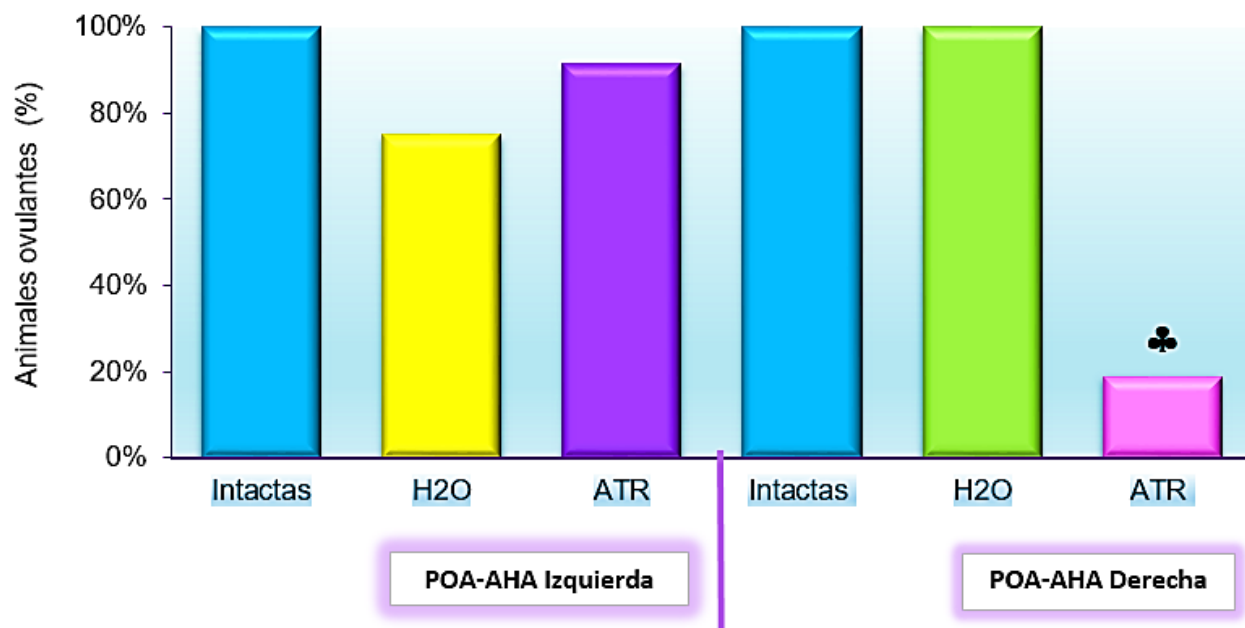
- ❖ *Experimento 2: Estudio del efecto de la microinyección de atropina en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a las 13:00 del estro sobre la ovulación espontánea*

Una vez seleccionado el solvente (H<sub>2</sub>O estéril) y con la finalidad de analizar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos, grupos de 8 animales fueron anestesiados y microinyectados con 62.5 ng/μL/minuto de atropina (ATR) en POA-AHA-I o -D. La dosis de atropina fue seleccionada con base a estudios previos (García, 2007). Veinticuatro horas después de la cirugía se reanudó la toma de frotis vaginales hasta el día del sacrificio en el siguiente estro esperado.

## RESULTADOS

### ***Porcentaje de animales ovulantes***

La microinyección de 62.5ng de ATR en POA-AHA-D a las 13:00 h del estro provocó una disminución en el porcentaje de animales ovulantes con respecto al grupo de H<sub>2</sub>O-D estéril, mientras que la inyección de ATR en POA-AHA-I no modificó la ovulación (Gráfica 3).



♣  $p < 0.0002$  vs. H<sub>2</sub>O. (Prueba de Probabilidad exacta de Fisher)

**Gráfica 3.** Efecto de la microinyección de ATR en POA-AHA-I o -D realizada a las 13:00 h del estro sobre el porcentaje de animales ovulantes en el estro esperado.

### Número de ovocitos liberados

La microinyección unilateral de H<sub>2</sub>O estéril en POA-AHA no modificó el número total de ovocitos liberados con respecto a la de los animales intactos (H<sub>2</sub>O-I:  $11.3 \pm 1.3$ , H<sub>2</sub>O-D:  $15.9 \pm 1.7$  vs. Intactos:  $12 \pm 0.8$ ). La microinyección de ATR en POA-AHA-I no modificó el número de ovocitos totales liberados en comparación con el H<sub>2</sub>O (ATR-I:  $11.6 \pm 1.1$  vs. H<sub>2</sub>O-I:  $11.3 \pm 1.3$ ). Los dos animales que ovularon después de la microinyección de ATR en POA-AHA-D liberaron 9 y 11 ovocitos respectivamente.

### Peso de los ovarios y del útero

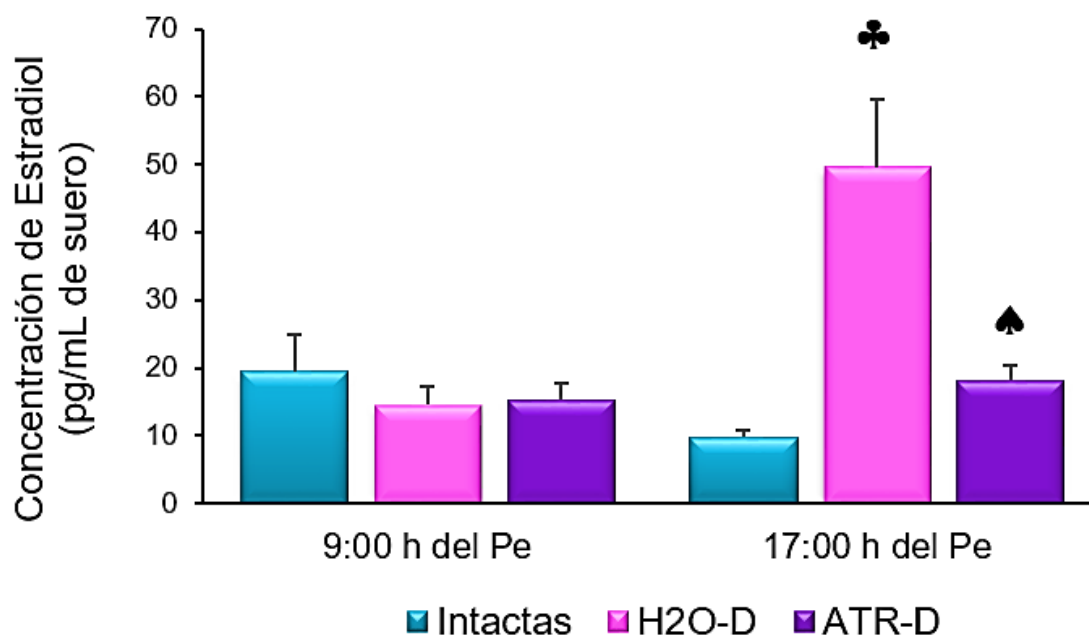
La microinyección de H<sub>2</sub>O o de ATR no modificó el peso de los ovarios y del útero (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Efecto de la microinyección de 62.5ng de ATR en POA-AHA-I o -D realizada a las 13:00 h del estro, sobre la masa de los ovarios y del útero (mg/100 g de masa corporal) en el estro esperado.

Grupos experimentales	Ovario Izquierdo (media ± e.e.m.)	Ovario derecho (media ± e.e.m.)	Útero (media ± e.e.m.)
Intactos	17.01 ± 0.9	17.5 ± 0.7	174.9 ± 6.8
H <sub>2</sub> O- I	17.7 ± 1.7	16.7 ± 1.3	216.6 ± 22.2
ATR- I	17.6 ± 0.9	16.7 ± 1.1	183.5 ± 14.4
Intactos	17.01 ± 0.9	17.5 ± 0.7	174.9 ± 6.8
H <sub>2</sub> O-D	14.9 ± 0.9	15.5 ± 0.5	212.2 ± 14.9
ATR-D	15.4 ± 0.7	15.4 ± 0.6	186.8 ± 10.8

### Concentración sérica de E<sub>2</sub>, LH y FSH

Ni la microinyección de H<sub>2</sub>O ni la de ATR en POA-AHA-D modificaron las concentraciones séricas de E<sub>2</sub> a las 9:00 h del Pe. Sin embargo, a las 17:00 h la microinyección de H<sub>2</sub>O resultó en el incremento de la concentración de esta hormona con respecto al grupo intacto. La microinyección de ATR en POA-AHA-D disminuyó la concentración de E<sub>2</sub> con respecto a la microinyección de H<sub>2</sub>O (Gráfica 4).

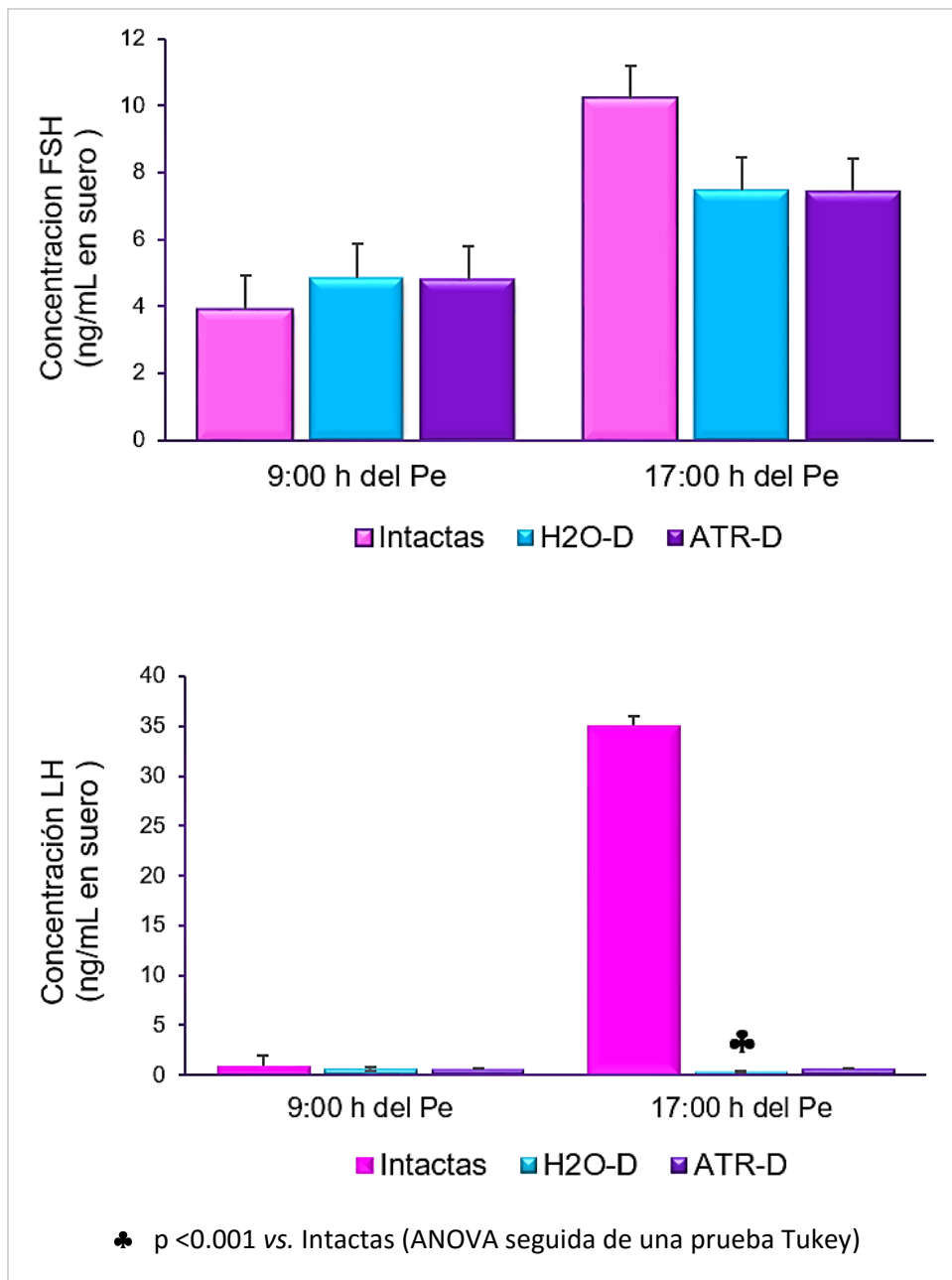


♣  $p < 0.01$  vs. Intactas, ♠  $p < 0.0015$  vs. H2O (ANOVA seguida de una prueba Tukey)

*Gráfica 4. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración sérica de  $E_2$  en animales sacrificados a las 9:00 o 17:00 h del Pe después de la microinyección de ATR en POA-AHA-D realizada a las 13:00 h del estro.*

La concentración sérica de FSH a las 9:00 y a las 17:00 h del Pe no se modificó por los tratamientos. En cambio, la concentración de LH no fue modificada a las 9:00 h del Pe, pero a las 17:00 h la concentración fue menor en los animales con microinyección de H<sub>2</sub>O en POA-AHA-D, efecto que se mantiene por la microinyección de ATR (Gráfica 5).





**Gráfica 5.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración sérica de FSH y LH de animales sacrificados a las 9:00 y 17:00 h del Pe después de la microinyección de ATR en POA-AHA-D realizada a las 13:00 h del estro.

OBJETIVO PARTICULAR: CUANTIFICAR LOS EFECTOS DEL BLOQUEO UNILATERAL AGUDO DE LOS mAChR DE POA-AHA EN ANIMALES A LOS QUE SE LES HAYA EXTIRPADO EL OVARIO IZQUIERDO O DERECHO, SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA Y LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE E<sub>2</sub>, FSH Y LH.

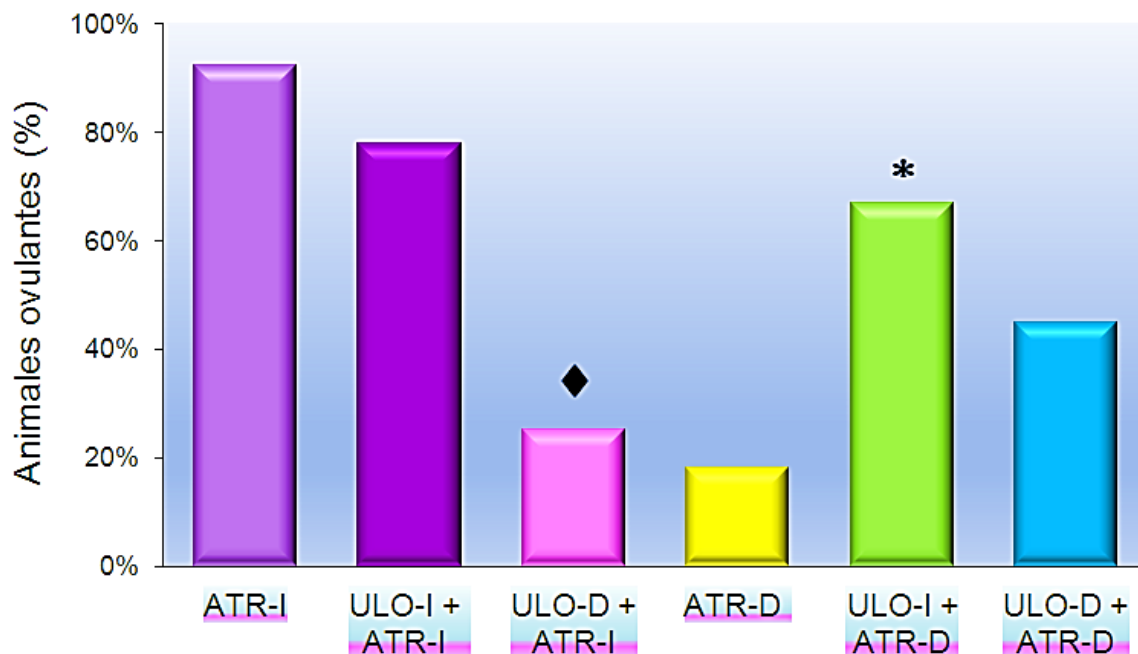
## MATERIALES Y MÉTODO

Con la finalidad de conocer el papel de los ovarios en los efectos que ejercen los receptores muscarínicos en la ovulación, a grupos de 8 animales previamente anestesiados, se les realizó la extirpación de uno de los ovarios (el ipsilateral o el contralateral al lado en que fueron microinyectados), y fueron colocados en el estereotáxico para microinyectar la atropina en POA-AHA-I o -D. Veinticuatro horas posteriores a la cirugía se reanudó la toma de frotis vaginales hasta su sacrificio en el día del estro esperado del ciclo siguiente en el que se llevaron a cabo los tratamientos.

## RESULTADOS

### ***Porcentaje de animales ovulantes:***

La microinyección de ATR en POA-AHA-I en ratas con ULO-D provocó disminución en el porcentaje de animales ovulantes con respecto al grupo tratado con ATR-I. Mientras que la microinyección de ATR en POA-AHA-D en ratas con ULO-I indujo la ovulación en un mayor número de animales (Gráfica 6).



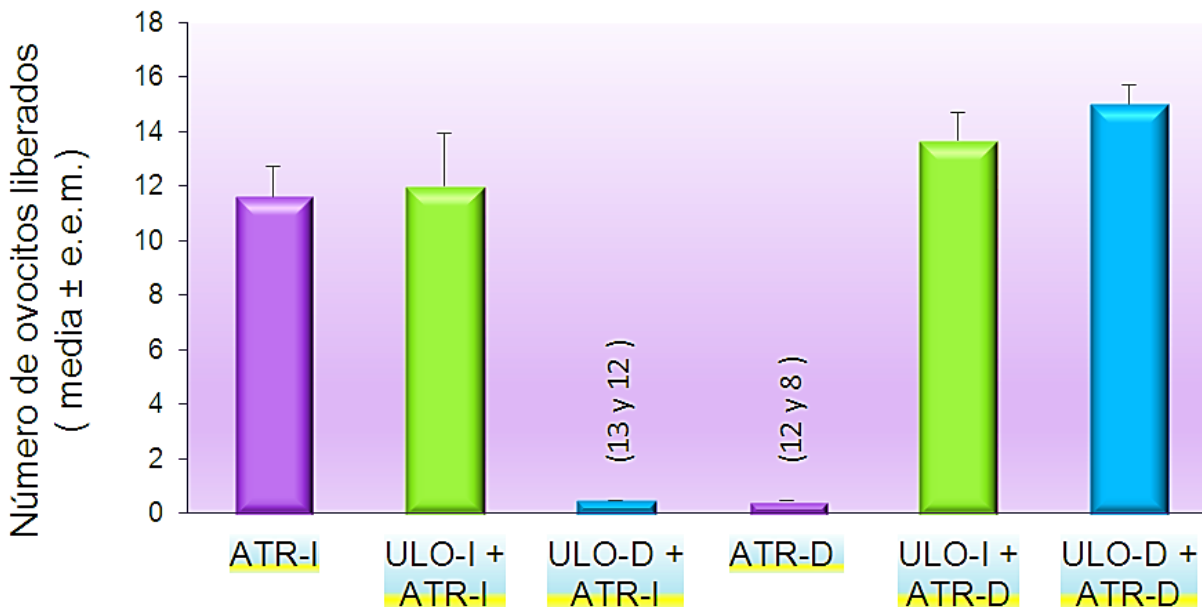
♦,  $p < 0.05$  vs. ATR-I, \* ,  $p < 0.05$  vs. ATR-D (Prueba de Probabilidad exacta de Fisher).

**Gráfica 6.** Efecto de la microinyección de ATR en POA-AHA- I o –D en ratas con ULO realizadas a las 13:00 h del estro, sobre el porcentaje de animales ovulantes en el estro esperado.

### Número de ovocitos liberados:

La microinyección de ATR en POA-AHA-I en ratas con ULO-I no modificó el número total de ovocitos liberados con respecto a las microinyección de ATR-I (Gráfica 7). Los dos animales con ULO-D y microinyección de ATR en POA-AHA-I que ovularon, liberaron un total de 12 y 13 ovocitos, resultado semejante al del grupo con atropina en POA-AHA-I ( $11.6 \pm 1.1$ ).

La microinyectados con atropina en POA-AHA-D en animales con extirpación de uno u otro ovario liberó un número similar de ovocitos que el grupo con LPD-D ( $14 \pm 1.5$ ) o los intactos ( $12 \pm 0.8$ ). Dado que solo 2 animales microinyectados con atropina en POA-AHA-D ovularon (9 y 11), no fue posible realizar una comparación estadística.



**Gráfica 7.** Efecto de la microinyección de ATR en POA-AHA- I o –D en ratas con ULO realizadas a las 13:00 h del estro, sobre el número total de ovocitos liberados en el día del estro esperado

Cuando se analiza el número de ovocitos liberados por el ovario remanente, observamos que los animales con ULO-I y microinyección de atropina en el mismo lado de POA-AHA resultó en un mayor número de ovocitos con respecto al ovario correspondiente de un animal con microinyección de atropina (ULO-I+ ATR-I:  $12 \pm 1.9$  vs. ATR-I:  $6.4 \pm 0.9$ ,  $p < 0.049$ ).

En los animales con ULO y microinyección de atropina en POA-AHA-D, el ovario remanente liberó un mayor número de ovocitos (ULO-I + ATR-D:  $13.6 \pm 1$ ; ULO-D + ATR-D:  $15 \pm 1$ ). No se realizó la comparación estadística con respecto al grupo con ATR-D, ya que solo se cuenta con dos datos (OI: 4 y 5; OD: 4 y 7).

### Peso de los ovarios y del útero:

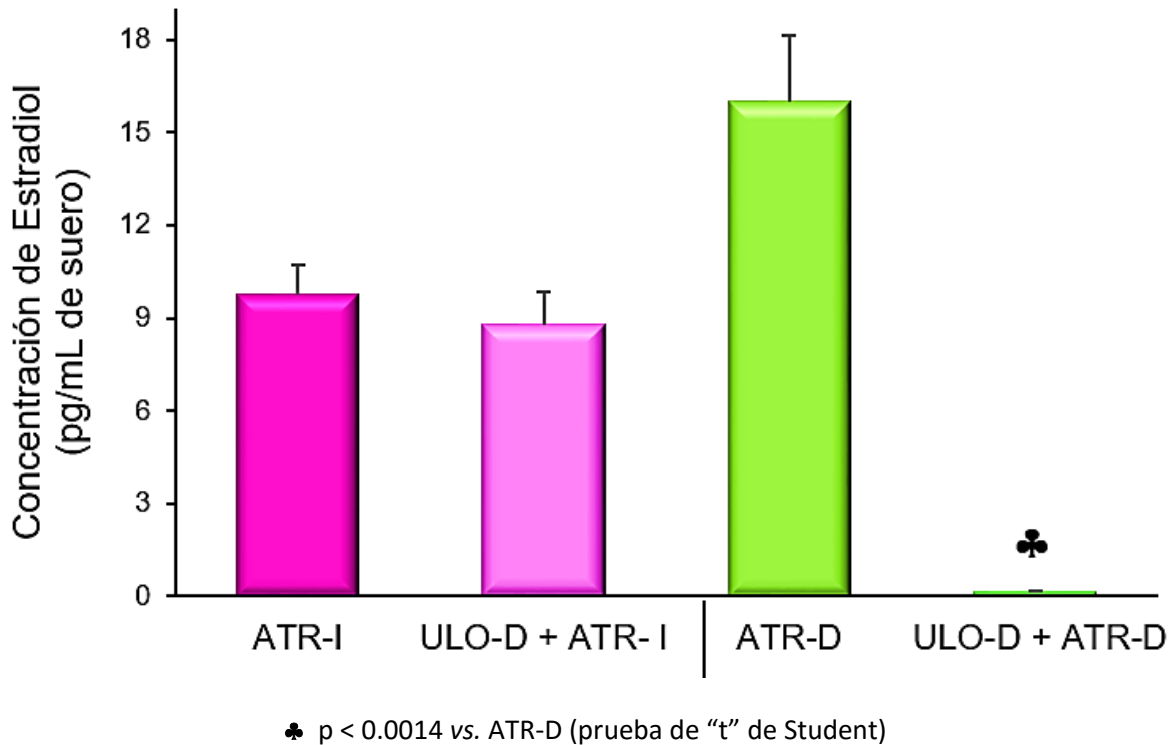
El peso de los ovarios y del útero no se modificó en los animales con ULO y microinyección de ATR (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Efecto de la microinyección de ATR en POA-AHA- I o –D en ratas con ULO realizadas a las 13:00 h del estro, sobre la masa de los ovarios y del útero (mg/100 g de masa corporal) en el estro esperado.

Grupos experimentales	Ovario izquierdo (media $\pm$ e.e.m.)	Ovario derecho (media $\pm$ e.e.m.)	Útero (media $\pm$ e.e.m.)
ATR-I	17.5 $\pm$ 0.9	16.7 $\pm$ 1.1	183.5 $\pm$ 14.4
ULO-I + ATR-I	-----	17.2 $\pm$ 0.9	199.7 $\pm$ 11.7
ULO-D + ATR-I	19.3 $\pm$ 1.2	-----	198.7 $\pm$ 8.6
ATR-D	15.4 $\pm$ 0.7	15.4 $\pm$ 0.6	186.8 $\pm$ 10.8
ULO-I + ATR-D	-----	16.6 $\pm$ 0.7	212.7 $\pm$ 15.9
ULO-D + ATR-D	17.4 $\pm$ 0.5	-----	209.8 $\pm$ 18.1

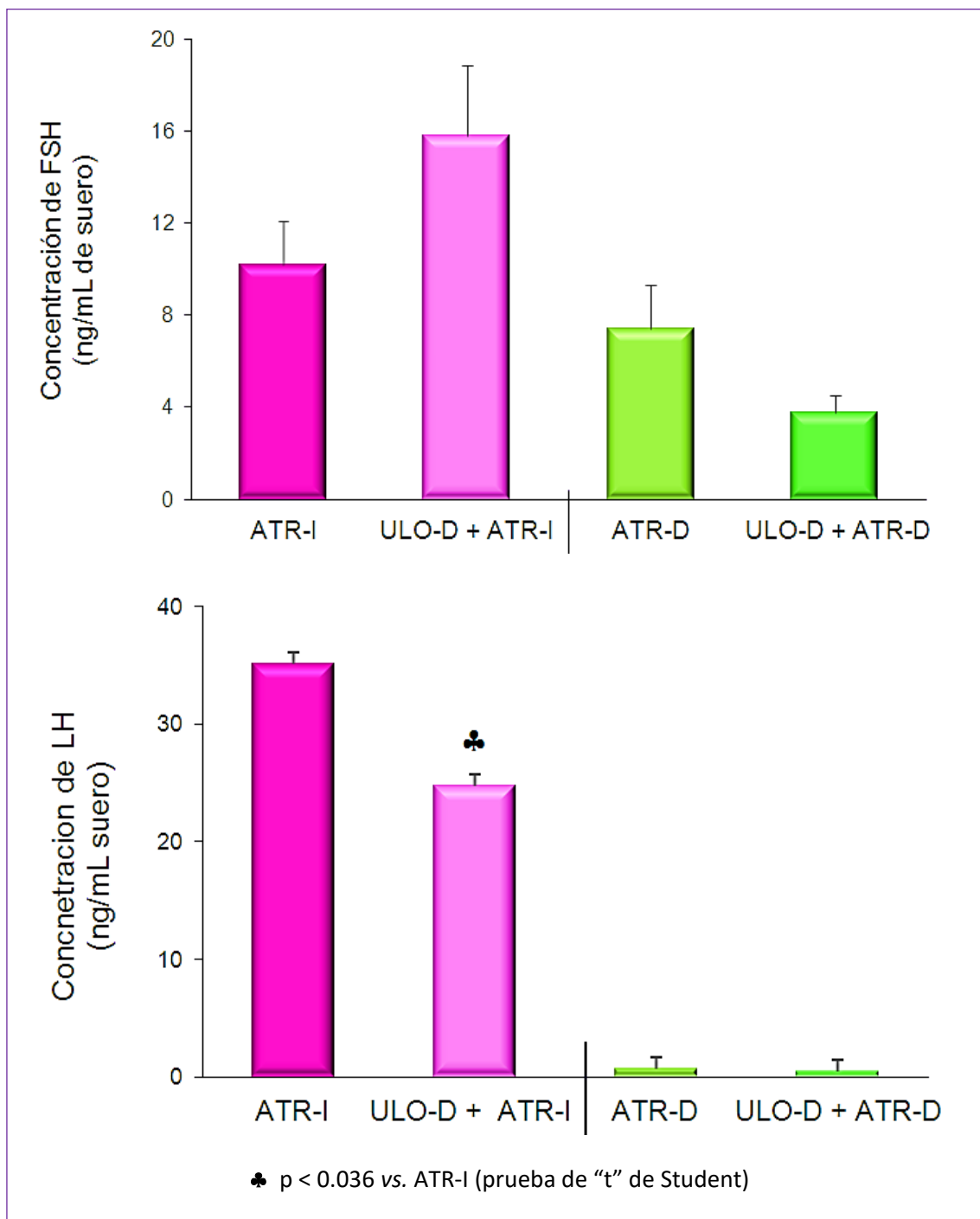
### Concentración sérica de E<sub>2</sub>, LH y FSH

La concentración sérica de E<sub>2</sub> a las 17:00 h del Pe disminuyó en los animales con ULO-D y microinyección de ATR en POA-AHA-D (Gráfica 8).



**Gráfica 8.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración sérica de E<sub>2</sub> en animales sacrificados a las 17:00 h del Pe después de la ULO-D y microinyección de ATR en POA-AHA-I o -D, realizadas a las 13:00 h del estro.

Las concentraciones séricas de FSH a las 17:00 h del Pe no se modificaron en los animales con ULO y microinyección de atropina en POA-AHA-I o -D (Gráfica 9), mientras que la concentración de LH disminuyó en ratas con ULO y microinyección de atropina en POA-AHA-I.



**Gráfica 9.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración sérica de FSH y LH en animales ULO-D y microinyección de ATR en POA-AHA-I o -D, realizada a las 13:00 h del estro, sacrificados a las 17:00 h del Pe.

OBJETIVO PARTICULAR: ESTUDIAR LA SENSIBILIDAD DEL HIPOTÁLAMO AL E<sub>2</sub>, DE LA HIPÓFISIS A LA GnRH Y DEL OVARIO A LA LH EN RATAS CON ULO, CON EL BLOQUEO UNILATERAL AGUDO DE LOS mAChR DE POA-AHA, O CON BLOQUEO UNILATERAL AGUDO DE LOS mAChR DE POA-AHA EN RATAS CON ULO.

## MATERIALES Y MÉTODO

Para conocer la sensibilidad del hipotálamo al E<sub>2</sub>, los grupos de animales que presentaron una disminución en el porcentaje de animales (Cuadro 4), fueron inyectados con 25µg de benzoato de estradiol (BE) a las 14:00 h del diestro-2 esperado. La sensibilidad de la hipófisis a la GnRH y del ovario a la LH se evaluó mediante la inyección por vía subcutánea de 3.7 µg/kg de hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) sintética o con 25 ui de gonadotropina coriónica humana (hCG) a las 14:00 h del proestro esperado (Pe). Todos los animales fueron sacrificados al estro esperado.

**Cuadro 4.** Grupos experimentales que presentaron disminución en el porcentaje de animales ovulantes y que fueron tratados con BE, LHRH-sintética y hCG

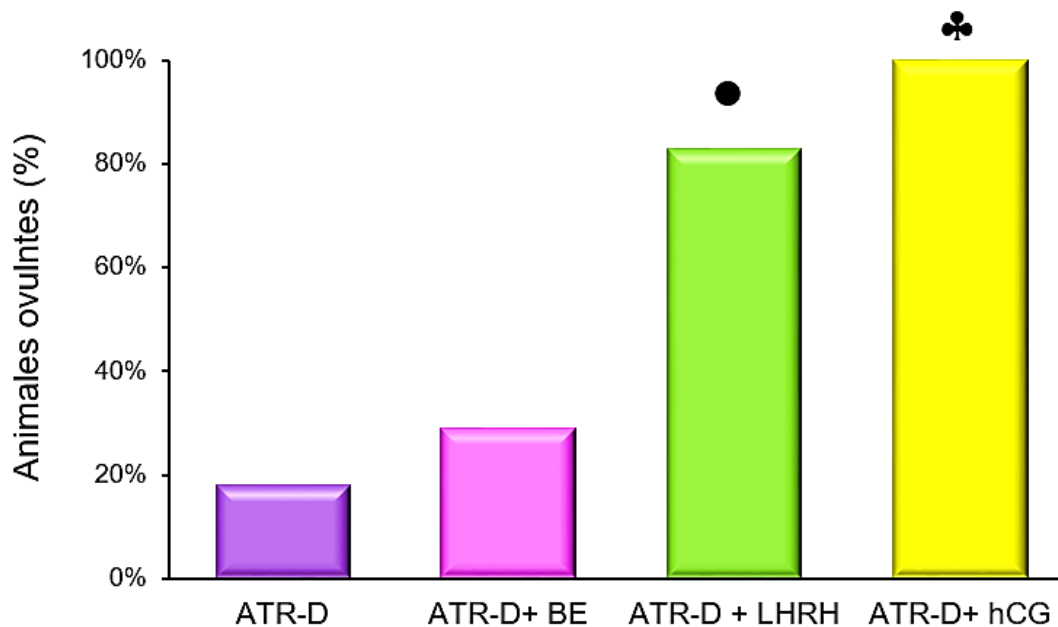
Grupos experimentales	Porcentaje de Ovulación
microinyección de ATR en POA-AHA-D	19%
ULO-D y microinyección de ATR en POA-AHA-I	25%
ULO-D y microinyección de ATR en POA-AHA-D	45%



## RESULTADOS

**Análisis de la sensibilidad del hipotálamo al E<sub>2</sub>, de la hipófisis a la GnRH y del ovario a la hCG en ratas con microinyección unilateral de ATR****Porcentaje de animales ovulantes:**

La inyección de BE en animales con microinyección de ATR en POA-AHA-D no indujo la ovulación, pero se indujo cuando se inyectó LHRH y de hCG (Gráfica 10).



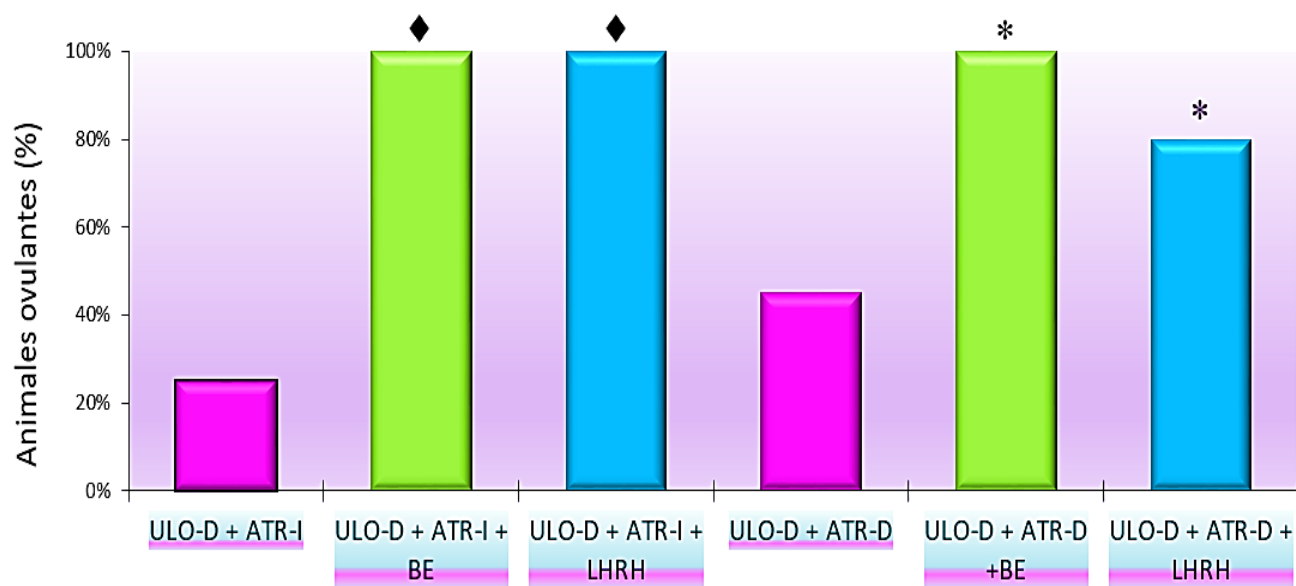
•  $p < 0.034$  vs. ATR-D; ♣  $p < 0.0007$  vs. ATR-D (prueba de Probabilidad exacta de Fisher)

**Gráfica 10.** Porcentaje de animales ovulantes con microinyección de ATR en POA-AHA- D realizadas a las 13:00 h del estro, sacrificados al estro esperado después de la inyección de BE, LHRH o de hCG.

**Análisis de la sensibilidad del hipotálamo al E<sub>2</sub> y de la hipófisis a la GnRH en ratas con ULO y bloqueo de los receptores muscarínicos**

**Porcentaje de animales ovulantes:**

La inyección de BE o de LHRH en animales indujeron la ovulación en ratas con ULO-D y microinyección de ATR en POA-AHA-I o -D (Gráfica 11).



◆  $p < 0.021$  vs. ULO-D + ATR-I; \*  $p < 0.05$  vs. ULO-D + ATR-D (prueba de Probabilidad exacta de Fisher)

**Gráfica 11.** Porcentaje de animales ovulantes con ULO-D y microinyección de ATR en POA-AHA-I o -D realizadas a las 13:00 h del estro, sacrificados al estro esperado después de la inyección de BE o LHRH.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la señal neural generada por la activación de los mAChR en POA-AHA-D, a las 13:00 h del estro, es esencial en el proceso de ovulación. Además, muestra que este mecanismo de regulación depende de la presencia de uno u otro ovario. Así mismo, corroboran que la ausencia permanente de la señal muscarínica (generada por los implantes de atropina (Cruz *et al.*, 1989) o momentánea (por la microinyección del fármaco) regula asimétricamente la ovulación.

A las 96 horas de la ULO, uno u otro ovario *in situ* compensa la ovulación por la ausencia del otro, ya que la cantidad de ovocitos liberados es semejante a la observada en un animal con ambas gónadas. Cruz *et al.*, (1992) mostraron que en los animales con ULO realizada en el día del estro, no se modifica el ciclo estral, ni en el número de animales ovulantes, independientemente del ovario que fuera extirpado, sin embargo, el número de ovocitos liberados aumenta con respecto al ovario extirpado.

El aumento en el número de ovocitos liberados ha sido explicado por el aumento en la concentración de FSH en suero, la cual se presenta a 12 horas posteriores a la ULO realizada en la mañana o en la tarde del día del estro (Howland y Skinner, 1972; Flores *et al.*, 1990). El aumento de FSH provoca un mayor crecimiento de los folículos antrales (Welschen *et al.*, 1978), lo que explica un mayor número de ovocitos liberados y una mayor OC.

La baja HCO que desarrollaron los ovarios de los animales con ULO es explicado si recordamos que el crecimiento y la diferenciación de los folículos en las primeras etapas del desarrollo no depende de gonadotropinas (Hunzicker y Mayo, 2015).

La microinyección de H<sub>2</sub>O a las 13:00 horas del estro en POA-AHA-D retrasa la secreción preovulatoria de LH, sin afectar la ovulación en el estro esperado. En un animal intacto de la cepa CIIZ-V el llamado “pico” preovulatorio de E<sub>2</sub> ocurre a las 15:00 horas y desciende a valores basales a las 19:00 horas; mientras que el de LH se presenta a las 17:00 horas en el proestro (Domínguez-González *et al.*, 1998).

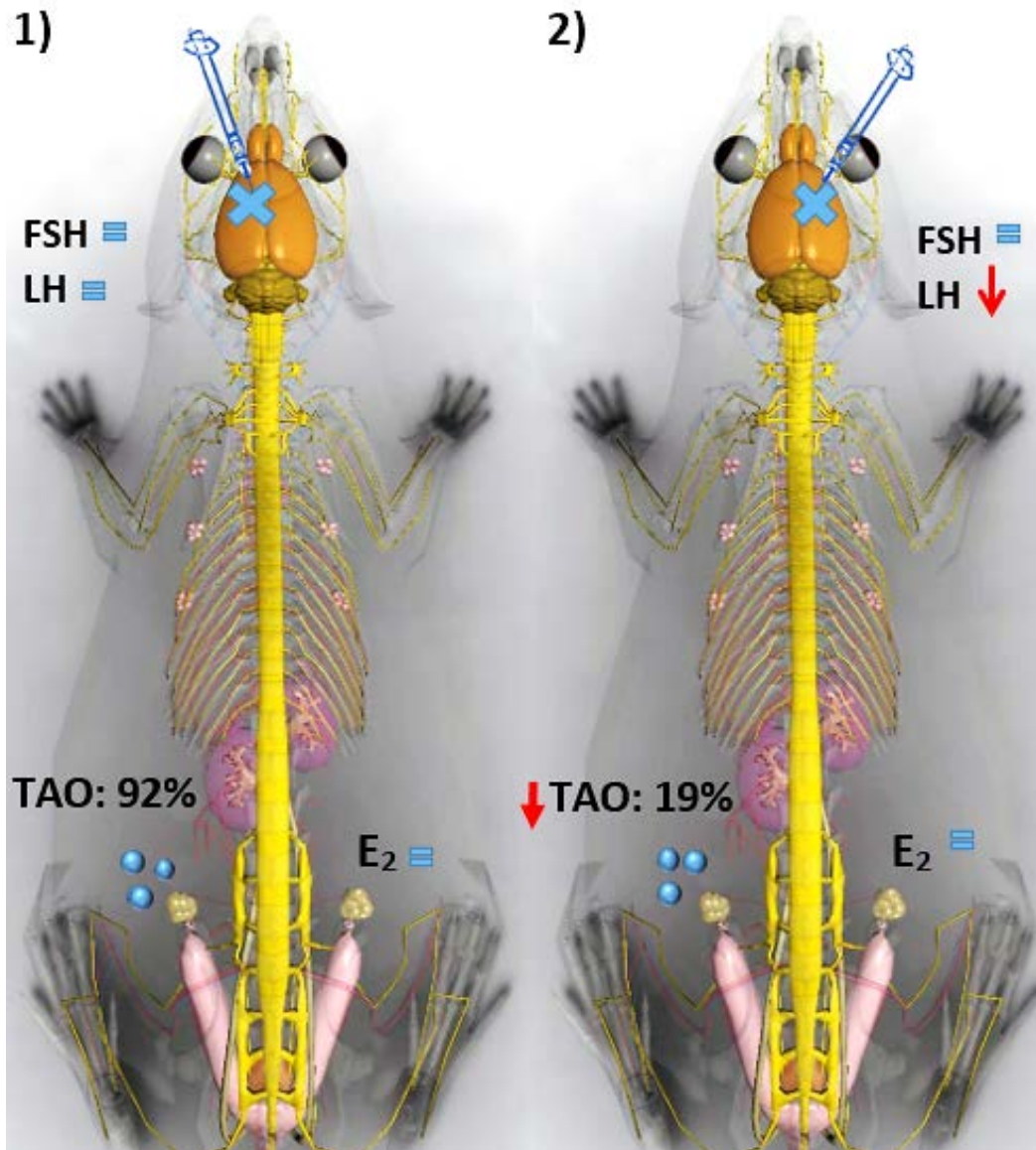
Dado que a las 17:00 horas del Pe la concentración de  $E_2$  en los animales microinyectados con  $H_2O$  es mayor que en un animal intacto, sugerimos la microinyección de  $H_2O$  mantuvo el “pico” por al menos 2 horas más, por lo que el “pico” preovulatorio de LH, que se encuentra ausente a esta hora, podría estar desfasado un tiempo semejante.

El papel asimétrico del sistema muscarínico de POA-AHA en la ovulación podría estar vinculado con la modificación en la actividad de este sistema de neurotransmisión, ya que en el día del estro, la actividad de la ChAT en POA-AHA-D es mayor que en la izquierda y la afinidad de los mAChR a la escopolamina (antagonista colinérgico) en membranas obtenidas de POA-AHA de ratas intactas a las 13:00 horas del estro (Sánchez *et al.*, 1994). Otra explicación a dicha asimetría podría estar relacionada con las neuronas GnRH, ya que en el ratón hembra adulta hay más neuronas de GnRH en el lado derecho del cerebro (Inase y Machida, 1992); la cantidad de ARNm de GnRH en POA-AHA derecha (Arteaga-López *et al.*, 2003) y de su proteína en el HMB derecho (Gerendai *et al.*, 1978) son mayores que en el izquierdo.

Los resultados de esta tesis muestran una vez más, que la ACh a través de los mAChR participa en los mecanismos de regulación estimulante de la secreción fásica de GnRH del día del proestro (Cruz *et al.* 1992). Esta alteración de la secreción de GnRH parece ser consecuencia de una ausencia o de una “inadecuada” sensibilización del hipotálamo o de la hipófisis al  $17\beta$ -estradiol, ya que en ratas con bloqueo de los mAChR de la porción derecha de POA-AHA responden a LHRH, pero no al benzoato de estradiol. Estos resultados confirman los observados previamente en ratas con bloqueo permanente de los mAChR (Cruz *et al.*, 1992).

Los resultados de la concentración de  $17\beta$ -estradiol en ratas con bloqueo de los mAChR de POA-AHA derecha nos permiten sugerir un posible mecanismo de regulación estimulante de los mAChR sobre la síntesis de los RE, ya que aun cuando la concentración de  $17\beta$ -estradiol es semejante al grupo microinyectado con agua o intactos, los que recibieron la atropina no ovularon (Figura 12, modelo 2). Previamente se ha mostrado que la inyección subcutánea de sulfato de atropina a las 13:00 horas del estro provoca la falta de expresión del ARNm para el RE $\alpha$  a las cuatro y 24 horas posteriores al bloqueo muscarínico (Arteaga-López, 2005).

Según Wintermantel *et al.* (2006) el efecto feed-back estimulante de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH y de LH depende de los  $RE\alpha$ . Esto explicaría la ausencia de la secreción preovulatoria de LH a las 17:00 horas del proestro en animales con bloqueo muscarínico del lado derecho de POA-AHA y la inducción de la ovulación por la administración de hCG.



**Figura 12.** Efectos del bloqueo agudo de los mAChR a las 13:00 h del estro, sobre el porcentaje de animales ovulantes (TAO) y la concentración de estradiol ( $E_2$ ), de la hormona foliculo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH); 1) modelo de animales con microinyección POA-AHA-I y 2) modelo se animales con microinyección POA-AHA-D.

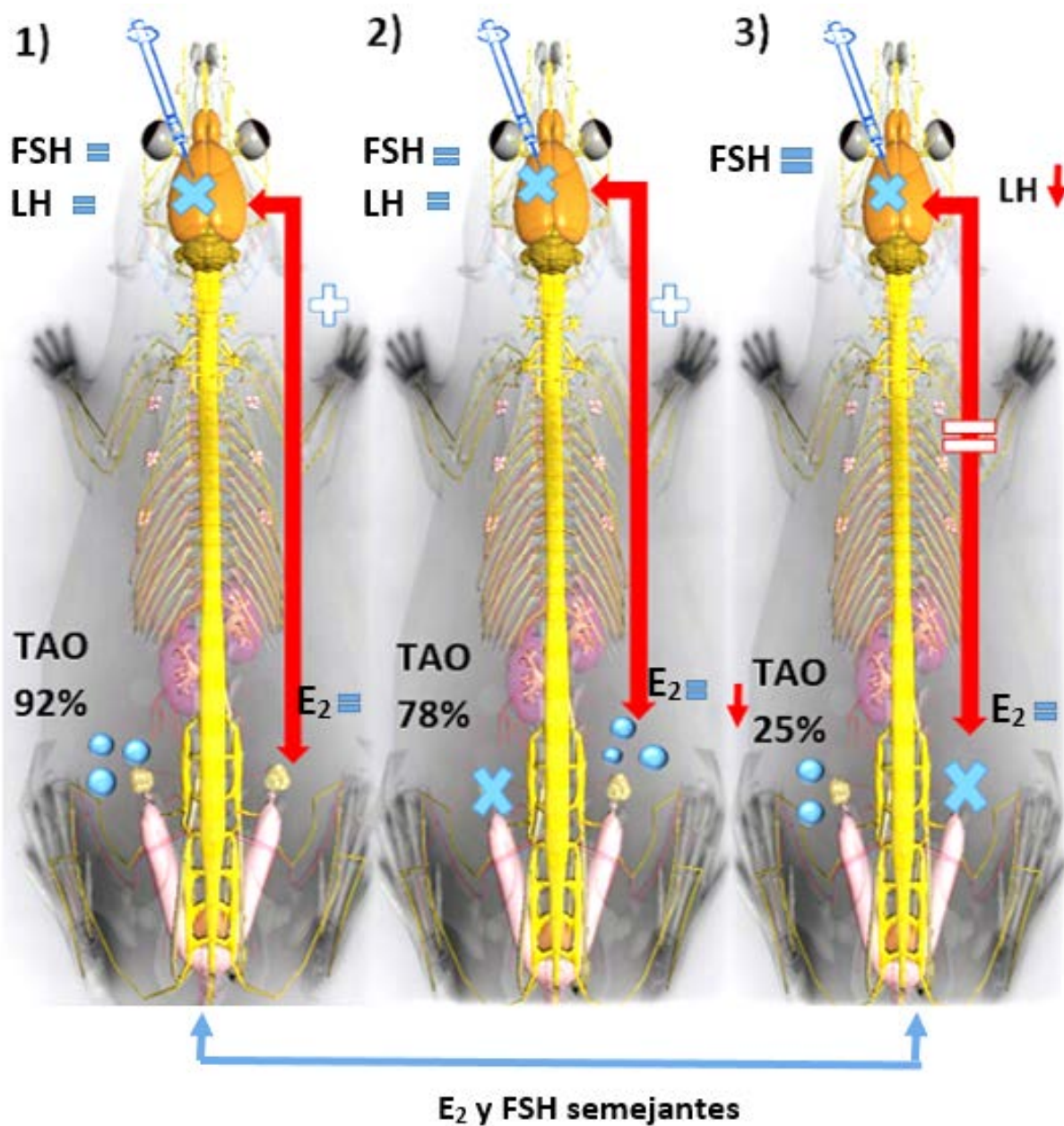
Los resultados obtenidos a partir de los tratamientos combinados (ULO y bloqueo de mAChR) nos permiten sugerir la existencia de una vinculación funcional de carácter estimulante entre el ovario derecho y el sistema muscarínico de POA-AHA-D, que culmina con la ovulación, ya que cuando se eliminan las señales generadas por una u otra estructura de este lado del cuerpo, el porcentaje de animales ovulantes es bajo (Figura 13, modelo 3; Figura 14, modelos 4 y 6). Esta vinculación entre los mAChR del lado derecho de POA-AHA y el ovario derecho regula de manera estimulante la secreción preovulatoria de LH, lo que explica el bloqueo de la ovulación.

Los mecanismos de regulación de los mAChR de POA-AHA derecha en la ovulación son diferentes en animales con ULO izquierda versus ULO derecha, ya que cuando el ovario derecho está *in situ* el 70% de los animales ovulan (Figura 14, modelo 5), pero si el ovario *in situ* es el izquierdo, solo ovula el 45% de las ratas tratadas (Figura 14, modelo 6). Este hecho estaría relacionado con la ausencia de estradiol en las ratas con ausencia del ovario derecho (Figura 14, modelo 6); lo que sugiere que el ovario derecho secreta más estradiol que el izquierdo a las 76 horas de extirpar la gónada. Este resultado apoya y concuerda con lo observado por [Cruz et al. \(2006\)](#) a la hora de realizada la ULO a las 13:00 h del diestro-2.

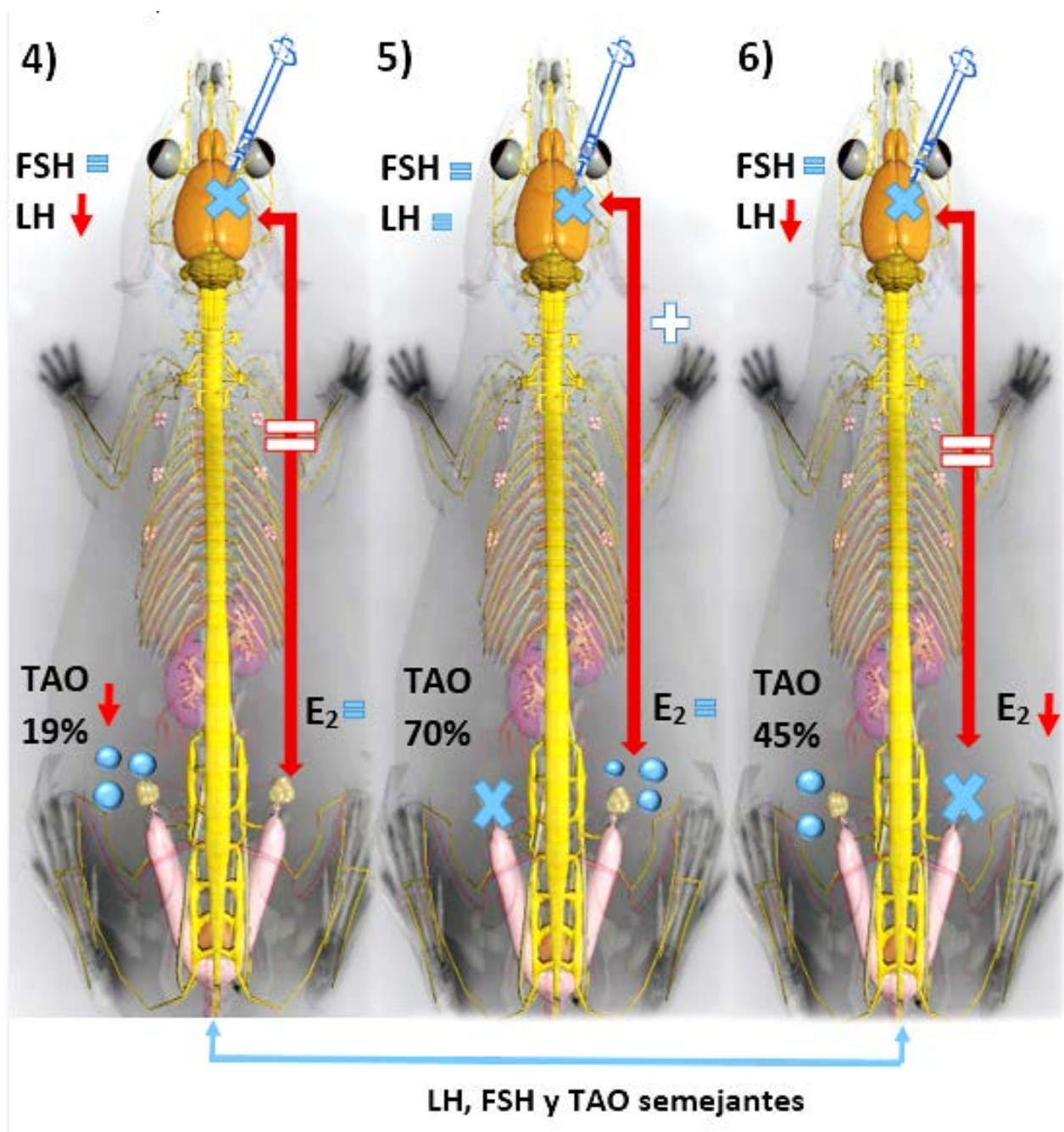
Con base en los modelos 3 de la Figura 13 y 6 de la Figura 14, sugerimos que el ovario izquierdo secreta estradiol si los receptores muscarínicos del lado derecho están activos y se inhibe si son desactivados. Esta idea es apoyada por el hecho de que la inyección de BE o de LHRH indujo la ovulación en la mayoría de las ratas con ULO y microinyección de ATR en POA-AHA-I o -D.

En resumen, el ovario derecho mantiene activo al sistema colinérgico muscarínico de POA-AHA-D, quizá al estimular la síntesis de ChAT y la mayor afinidad de los mAChR de este lado de POA-AHA ([Sánchez et al., 1994](#)). Estos resultados son parcialmente semejantes a los obtenidos con bloqueo permanente de los mAChR con los implantes de ATR ([Cruz et al., 1992](#)). La explicación a estas diferencias podría ser el tiempo que los mAChR permanecen bloqueados, ya que en los animales con implante es un tiempo estimado de 96 horas, mientras que en los microinyectados este es de 2½ horas aproximadamente ([Stoelting, 1991](#)).





**Figura 13.** Efectos de la ULO y del bloqueo agudo de los mAChR a las 13:00 h del estro, sobre el porcentaje de animales ovulantes (TAO) y la concentración de E<sub>2</sub>, FSH y LH; 1) modelo de animales con microinyección POA-AHA-I, 2) modelo de animales con microinyección en POA-AHA-I y ULO-I y 3) modelo de animales con microinyección en POA-AHA-I y ULO-D.



**Figura 14.** Efectos de la ULO y del bloqueo agudo de los mAChR a las 13:00 h del estro, sobre el porcentaje de animales ovulantes (TAO) y la concentración de E<sub>2</sub>, FSH y LH; 4) modelo de animales con microinyección POA-AHA-D, 5) modelo de animales con microinyección en POA-AHA-D y ULO-I y 6) modelo de animales con microinyección en POA-AHA-D y ULO-D.



## CONCLUSIONES

- A las 13:00 h del día del estro, la activación momentánea de los mAChR del lado derecho de POA-AHA es necesaria para que ocurra la ovulación en el día del estro esperado. Este mecanismo de regulación ocurre a través de la falta de respuesta del hipotálamo al estradiol y la ausencia de la señal pre-ovulatoria de la GnRH.
- El papel estimulante de los mAChR del lado derecho de POA-AHA en la ovulación es regulada en forma estimulante por el ovario derecho, a través de la secreción de LH en la tarde del proestro.

## BIBLIOGRAFÍA

- **Arimura A.** (2000). Hypothalamic hormones. Neuroendocrinology in Physiology and Medicine, Humana Press Inc., Totowa, N.J., capítulo 3: 41-58.
- **Arteaga LP.** (2005). Expresión asimétrica de la GnRH y del receptor a estrógenos en POA-AHA durante el ciclo estral de la rata: posible participación del sistema colinérgico, tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. UNAM. México. DF.
- **Bahr JM, Yao HC, McGee EA, Hsu SY, Minami S.** (1999). Restricted expression of WT1 messenger ribonucleic acid in immature ovarian follicles: Uniformity in mammalian and avian species and maintenance during reproductive senescence. *Biology of Reproduction*, 60: 365-373.
- **Bakalkin G. Ya, Tsibezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID, Krivosheev OG.** (1984). Lateralization of LHRH in rat hypothalamus. *Brain Research*, 296 (2): 361-364.
- **Baker T G.** (1982). Oogenesis and ovulation in Reproduction mammals. En: *Biología de la Reproducción*. Gustavo Palma A. Primera Edición. Editorial. Machala. Argentina, pp. 38-43.
- **Bonner TL, Young AC, Brann MR and Burckley NJ.** (1988). Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*, 1: 403-410.
- **Brown RE.** (1994). The pituitary gland and its hormones En: *Introduction to neuroendocrinology*. Cambridge University Press, pp. 30-39.
- **Caligioni CS.** (2009). Assessing Reproductive Status/Stage in Mice. *Current Protocols in Neuroscience*, appendix 4.
- **Charli JL, Ponce G, Joseph-Bravo P.** (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRHérgicas hipotálamicas. *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. Edit. R Domínguez, UNAM-PORRUA. México, pp. 59-85.

- **Cooke RG, Payne JH.** (1988). Effects of arterial infusions of adrenaline and acetylcholine on luteal secretion of progesterone and oxytocin in goats. *Theriogenology*, 50: 249-255.
- **Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R.** (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J. Endocrinology*, 123: 437-439.
- **Cruz ME, Moran JL, Jaramillo LP, Domínguez R.** (1990). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Research Bulletin*, 24: 739-742.
- **Cruz ME, Moran JL, Jaramillo LP, Domínguez R.** (1990). Differential effects of a unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rats. *J. Endocrinology*, 124: 37-41.
- **Cruz ME, Castro J, Domínguez R.** (1992). Comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J. Endocrinology*, 133: 205-210.
- **Cruz ME, Artega PR, Huerta DML, Sánchez MA, Domínguez R.** (1997). Differential in acetylcholine content, binding and affinity parameters of muscarinic receptor in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Medical Science Research*, 25: 823-825.
- **Cruz ME, Flores A, Palafox M, Meléndez G, Rodríguez J, Chavira R, Domínguez R.** (2006). The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Unit in Biology of Reproduction, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Reproductive Biology and Endocrinology*, 4:43.

- **Domínguez GA, Matsumura PD, Timossi C, Cruz ME, Domínguez R.** (1998). Characterization of monoamine neural activity in the preoptic anterior hypothalamic area and medial basal hypothalamus in rats during the day of pro-oestrus and its relation to gonadotrophin and sexual steroid hormone plasma levels. *Medical Science Research*, 26:275-278.
- **Domínguez R, Morales L, Cruz ME.** (2003). Ovarian asymmetry. *Annual Review & Research in Biology*, 5: 95 – 104.
- **Evans NP, Dahl GE, Glover BH, Karsch FJ.** (1994). Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology*,134: 1806 – 1811.
- **Egozi Y, Kloog Y.** (1985). Muscarinic receptors in the preoptic area sensitive to 17 beta -estradiol during the critical period. *Neuroendocrinology*, 40 (5); 385-92.
- **Egozi Y, Kloog Y, Sokolovskiy M.** (1986). Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrous cycle. *Brain Research* 383:310-313.
- **Everett JW, SAWYER CH, MARKEE JE.** (1949). A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cycle rat. *Endocrinology*, 44: 234-250.
- **Falkenstein E, Tillmann HC, Chris M, Meuring M, Wehling.** (2000). Multiple actions of steroid hormones a focus on rapid, nongenomic effect. *Pharmacological Review*, 52: 513-556.
- **Fan NC, Peng C, Krisinger J, Leung PC.** (1995). The Human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiples promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Mol Cell Endocrinology*, 107: R1-R8.
- **Felder CC.** (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB*. 9: 619-625.

- **Ferin M.** (1998). Ovarian Cycle, mammals. Encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. 3: 547-553.
- **Fernández MD, Margol LT.** (1983). Esteroidogénesis, Acta Medica Costarricense, vol. 26: Costa rica, pp. 144-149.
- **Fink G.** (2000). Neuroendocrine regulation of pituitary Function. Neuroendocrinology in physiology and medicine. Humana Press. Inc. Totowa, N.Y. pp. 107-133.
- **Flores RA, Ledesma ML, Ulloa AA, Domínguez R.** (1990). Acute changes in serum levels of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone, ovulation and follicular growth induced by stress, unilateral ovariectomy or mechanical stimulation of the ovarian pedicle at different stages of the oestrous cycle of the rat. Medical Science Research, 18: 819-821.
- **Freedman LP.** (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. Endocrine Reviews, 13(2): 129-145.
- **Freeman ME.** (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil and Neill's Physiology of reproduction, 3a ed. Cap. 43. Ed By Jimmy D. Neill Elsevier, 2327-2330.
- **Ganong WF.** (2001). Regulación central de la función visceral. Fisiología Medica. Medina CA El Manual Moderno. Capítulo 14: 253-303.
- **García MJ.** (2007). Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos de la porción izquierda o derecha de POA-AHA, realizado en el día del diestro- 2, sobre el eje hipotálamo- hipófisis-ovario de rata, tesis para obtener el título de Biólogo. UNAM. México. DF.
- **Gay VL, Sheth, NA.** (1972). Evidence for a periodic release of LH in castrated male and female rats. Endocrinology, January 90: 158-162.
- **Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U.** (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. Neurosci Lett, 9: 333-336.

- **Gerendai I, Rotsztejn W, Marchetti B, Scapagnini U.** (1979). LH-RH content changes in the medio-basal hypothalamus after unilateral ovariectomy. *Neuroendocrinology: Biological and Clinical Aspects. Proceedings of Sorono Symposia, Vol 19*, editor's A. Polleri y R. MacLeod. New York. Academic Press, pp. 97-102.
- **Gerendai I, Halász B.** (2001). Asymmetry of the Neuroendocrine System. *News in Physiological Science*, April 16: 92-95.
- **Goldman JM, Murr AS, Cooper RL.** (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research (part B)*, 80: 84-97.
- **Gore-Langton RE, Armstrong DT.** (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The physiology of reproduction*. 3th Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Raven Press USA. pp. 571-627.
- **Gotti C, Fornasari D, Clementi F.** (1997). Human neuronal nicotinic receptors. *Progress in Neurobiology*, 53; 199-237.
- **Gustafsson JA, Matthews J.** (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . Department of Bioscience at Novum, Karolinska Institutet, 3: 281- 292.
- **Guyton, AC, Hall, JE.** (2001). *Tratado de Fisiología Médica*. México: McGraw Hill Interamericana.
- **Herbison AE.** (2006). Physiology of the gonadotropin-Releasing Hormone Neural Network. En: *Physiology of Reproduction*. 3ra Edición. Knobil E y Neill J (Eds.). Elsevier. USA. pp. 1415-1483.
- **Herbison EA.** (2015). Physiology of the Adult Gonadotropin Releasing Hormone Neural Network. En: *Physiology of Reproduction*. 4ta Edición. Knobil E y Neill J (Eds.). Elsevier. USA. pp. 389-433.
- **Hinshelwood M.** (1999). Steroidogenesis, overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. 3th Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. pp. 644-653.
- <http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/practica4.htm>. Cortes histológicas de folículos.

- <http://neuroquimicaclinica.blogspot.mx/2010/08/neurotransmisor-de-la-semana.html>. Síntesis, liberación y recaptura de la acetilcolina.
- **Howland BE, Skinner KR.** (1972). Ovarian weight and ovarian compensatory on serum FSH and LH levels during the oestrus cycle in the rat. *Journal of Reproduction & Infertility*, 32: 501-503.
- **Hunzicker DM, Mayo K.** (2015). Gonadotropin Signaling in the ovary. En: *Encyclopedia of reproduction*. 4ta Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. pp. 877-900.
- **Inase Y, Machida T.** (1992). Differential effects of right-sided and left-sided orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Research*, 15: 580(1-2).
- **Köning JFR, Klippel RA.** (1963). *The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system*. Eds. Williams and Wilkins Co. Baltimore U.S.A.
- **Korach KS.** (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science Review*, 266: 1524-1527.
- **Kornya L, Bodis J, Copan M, Tinneberg HR, Torok A.** 2001. Modulatory effect of acetylcholine on gonadotropin-stimulated human granulosa cell steroid secretion. *Gynecol Obstet Invest*, 52: 104-107.
- **Lerner J, Urbina M.** (2008). *Fertilidad y Reproducción asistida*. Primera edición. Editorial Médica Panamericana. Caracas pp.62-69.
- **Marshall JC, Griffin ML.** (1993). The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Human reproduction*, 8: 57-61.
- **Mayerhofer A, Dimitrijevic N, Kunz L.** 2003. The expresión and biological role of the non-neural cholinergic system in the ovary. *Life Sciences*, 72: 2039-2045.
- **Mayerhofer A, Frungieri MB, Billing A, Fritz S.** 1999. Sources and function of neural signalling molecules in the gonads. *Medicina (B Aires)*, 59: 542-545.

- **McArdle CA, Roberson MS.** (2015). Gonadotropes and Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling. . En: Encyclopedia of reproduction. 4ta Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. pp.326-398.
- **McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG.** (1987). Molecular neurobiology of the mammalian brain. Segunda edición. Nueva York. pp. 150.
- **Mendoza P.** (2008). Farmacología médica. Editorial Médica Panamericana: Facultad de medicina. UNAM. México, pp 213- 215.
- **Montaner AD, Mongiat L, Lux-Lantos VA, Park MK, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lescheid D, Lovejoy D, Libertun C, Sherwood NM, Somoza GM.** (2001). Structure and biological activity of gonadotropin-releasing hormone isoforms isolated from rat and hamster brains. *Neuroendocrinology*, 74: 2-12.
- **Mora F, Peinado JM, Myers RD.** (1984). Symmetrical distribution of amino acids and neurotransmitters in the right and left cerebral cortex of the rat. *Neurochemical Research*, 9: 1109-1115.
- **Nistico G, Muller E.** (1989). Neurotransmitters, neuromodulators and neuromediators. Brain messengers and the pituitary, 2da Edition. Academic Press. New York. pp. 150-228.
- **Nordeen EJ, Yahr P.** (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science*, 218: 391-393.
- **Norris OD.** (1996). An Overview of Chemical Regulation. *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press, 1-22: 146-150.
- **Oke A, Lewis R, Adams RN.** (1984). Hemispheric asymmetry of norepinephrine distribution in rat thalamus. *Brain Research*, 188: 269- 272.
- **Palkovits M.** (2000). Micro and Macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Conn PM y Freeman ME. Human Press, pp. 23-31.
- **Paxinos G, Watson C.** (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates: the new coronal set. 5ta edition. Elsevier Academic Press. CHN.



- **Pawson AJ, Morgan K, Maudsley SR.** (2003). Type II gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in reproductive biology. *Reproduction*, 126: 271-278.
- **Peters GA and Khan SA.** (1999). Estrogen receptor domains E and F: Role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. *Mol. Endocrinology*, 13: 286-287.
- **Prieto GB, Velázquez PM.** (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. *Rev. Fac. Med. UNAM* Vol.45 noviembre-diciembre No.6.
- **Richmond JE, Jorgensen EM.** (1999). One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. *Nature Neuroscience*, 2: 791-7.
- **Richard JA.** (2015). Human Steroid Biosynthesis. En: *Physiology of Reproduction*. 4ta Edición. Knobil E y Neill J (Eds.). Elsevier. USA. pp. 389-433.
- **Robinson TE, Becker JB, Camp DM, Mansour A.** (1975). Variation in the pattern of behavioral and brain asymmetries due to sex differences. En *Cerebral lateralization in Nonhuman Species*. Editor Glick, D.D., Academic Press, Inc. Orlando, Florida, pp. 185-231.
- **Rosen GD, Finklestein S, Stoll AL, Yutset DA, Denenberg VH.** (1984). Neurochemical asymmetries in the albino rats cortex, striatum and nucleus accumbens. *Life sciences*, 34: 1143-1148.
- **Sánchez CJ.** (2003). Fisiología del ovario. En T. J., *Fisiología humana* (págs. 1036-1048). McGraw-Hill interamericana.
- **Sánchez MA, López GJ, Cruz ME, Tapi R, Dominguez R.** (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Neuropharmacology and Neurotoxicology, NeuroReport*. 5,433-434.
- **Spicer LJ, Echternkemp SE.** (1986). Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle. En: *Biología de la Reproducción*. Gustavo Palma A. Primera Edición. Machala. Argentina, pp.38-43.

- **Stoelting RK.** (1991). *Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 242-251.
- **Südhof TC.** (1995). The synaptic vesicle: a cascade of protein interactions. *Nature* 375; 645-653.
- **TresguerresAF, Castillo C.** (1999). *Fisiología Humana*. 2da Edición. Ed. Mac.Graw-Hill Interamericana. España, pp. 1007-1015.
- **Tóth IE, Wiesel O, Boldogkoi Z.** (2007). Predominance of Supraspinal Innervation of the left ovary. *Microscopy Research and Technique*, 70:710-7018.
- **Unwin N.** (1995). Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*. 375; 37-43.
- **Velázquez L, Moreno A., Lizasoain JC, Leza JC, Moro MA, Portolés A.** (2008). *Farmacología básica y clínica*. 18ª. Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires pp.133-137.
- **Wei J, Elizabeth A, Walton A. Milici and Jerry J. Buccafusco.** (1994). "m1 - m5 Muscarinic Receptor Distribution in Rat CNS by RT-PCR and HPLC". USA International society for Neurochemistry. 815-821.
- **Welschen R, Dullaart J, Jong FH.** (1978). Inter-relationships between circulating levels of estradiol-1713, progesterone, FSH, and LH immediately after unilateral ovariectomy in the cyclic rat. *Biol. Reprod.* 18:421-427.
- **Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Gröne HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Pérez CA, Schütz G, Herbison AE.** (2006). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron*. Oct 19;52(2):271-80.
- **Yen, S.** (2001). *Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo*. 4ta edición. Editorial Médica Panamericana, Argentina.
- **Zemkova H, Marek Kucka M, Bjelobaba I, Tomić M, Stojilkovic S.** (2012). Multiple Cholinergic Signaling Pathways in Pituitary Gonadotrophs. *Endocrinology*, January 2013, 154(1):421– 433.