



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Estudio de la activación neuronal
en la región de POA-AHA resultado
del bloqueo de los mAChR y su
efecto sobre la cantidad de GnRH.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

KATIA FERNANDA GONZÁLEZ GALDAMEZ



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

Proyecto Financiado por: DGAPA- PAPIIT-IN220014

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

DICIEMBRE, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

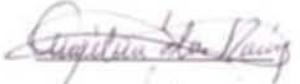
DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.**

Comunico a usted que la alumna **GONZÁLEZ GALDAMEZ KATIA FERNANDA**, con número de cuenta **412067356**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **05 de diciembre de 2017** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO
- 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: **Estudio de la activación neuronal en la región de POA-AHA resultado del bloqueo de los mAChR y su efecto sobre la cantidad de GnRH.**

Opción de titulación: Tesis.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad de México, a 15 de noviembre de 2017



DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA" DIRECCIÓN



RECIBI
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

Agradecimientos

De manera muy especial a la **Dra. María Esther Cruz Beltrán**, por darme la oportunidad de recibirme en su laboratorio, por hacerme sentir como en casa, por toda su paciencia e incondicional apoyo tanto en lo académico como en lo personal, por consentirnos y tener siempre esa actitud maternal, por creer en mí y confiar parte de su proyecto, de verdad doctora que nunca terminaré de agradecerle por todo lo que hizo por mí y solo me queda reiterarle mi admiración hacia usted, porque es un gran ejemplo a seguir como profesionalista, madre, esposa y persona.

A los miembros del jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo
Dra. Leticia Morales Ledesma
M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez
Dra. Juana Monroy Moreno

Por su apoyo, valiosos comentarios y observaciones en la revisión de esta tesis.

A la **M. en IBSH Angelica** muchas gracias por todo su apoyo, por sus consejos y por siempre recibirme muy bien en su laboratorio, y por ser una linda persona.

A la **Dra. Juana** muchas gracias por su ayuda en mi estancia en la unidad y por recibirme cuando estuve de colada en su laboratorio.

A la **Dra. Isabel** por todo su enorme apoyo brindado tanto en lo académico como en lo personal y por darme un espacio en su apretada y valiosa agenda para asesorarme y guiarme para la realización de esta tesis. Por forjar mejores profesionistas y compartir todo su conocimiento, de verdad doctora muchas gracias.

A **Raúl**, creo que nunca terminare de darte las gracias por todo en lo que me has apoyado, por ofrecerme tu valiosa amistad, por ser súper paciente y comprensivo, porque empezaste siendo mi compañerito de laboratorio pero ahora eres un gran y valioso amigo, de esos que ya no se encuentran, voy a extrañar trabajar contigo mientras escuchamos a Adele, pero espero sigamos cosechando esta amistad, te quiero.

A **Gaby**, por todo lo que me enseñaste y en todo lo que me ayudaste en este trabajo y sé que el equipo que formamos con Raúl nunca lo volveré a tener, porque compartimos el amor por lo que hacemos, pero lo disfrute y se volvió todo mas ligero.

Dedicatorias

A **mis padres** por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, por todas sus enseñanzas, esfuerzo, tiempo y dedicación que me han dado, en especial a **mi mamá** por dar todo de sí y más, por ser un ejemplo de mujer a seguir, por esforzarse en educarnos, darnos amor, cariño y comprensión, jamás podré pagarte todo lo que has hecho por mí, estoy muy orgullosa de ser tu hija y me siento bendecida de tenerte, Te Amo.

A mi **abuelito Ignacio**, porque cada que quiero rendirme recuerdo tu entereza, siempre fuiste la persona de la que más estuve orgullosa y espero algún día llegar tan lejos como tú, sé que donde quiera que ahora estés eres feliz.

A mis hermanos, a **Jorge** por todo lo que compartimos y ser una buena influencia en muchos aspectos y a **Yare** por los tres mejores regalos que pudo darme, a Dana, Abril y Emiliano, ustedes son parte de lo que me motiva a ser mejor persona y tratar de dejarles un mundo mejor, llegaron a iluminar mi vida.

A mi tío **Mauro**, por siempre estar para nosotros, al pendiente de lo que necesitáramos y más, a mi tía **Leo** por ser la mejor tía consentidora y siempre estar dispuesta a ayudarme y a mi tía **Luisa** por ser tan divertida y mi amiga.

A **Erik**, por ser el mejor novio, amigo y cómplice que la vida pudo darme, por todos los momentos maravillosos que hemos vivido juntos, por ayudarme y motivarme a ser mejor persona, por aceptarme con defectos y errores, por el sin número de aventuras, risas y locuras que hemos hecho, pero sobre todo por ser mi principal apoyo y fortaleza en los momentos difíciles, por confiar en mí y ayudarme siempre en lo que necesité, eres la persona más especial que conozco y jamás quiero perderte. Gracias por vivir esta aventura conmigo, por ir creciendo y cumpliendo metas y logros en nuestra vida, todo lo que vivimos jamás lo cambiaría por nada, y en este momento de mi vida sé que quiero compartir el resto de mis días contigo, TE AMO ♥.

A **Celik y Sus**, por todo lo que compartimos a lo largo de la carrera, por su amistad, las aventuras, las risas, y por el apoyo en los momentos difíciles, porque de compañeras de clase pasaron a ser mis amigas, las quiero mucho, y espero sigamos cumpliendo sueños y metas, cada una es muy especial a su manera y valoro y agradezco su amistad. Pd. las puse según el orden alfabético porque ambas son igual de importantes para mí.

Gracias por todo lo que ustedes hicieron por mí, por estar en mi vida y compartir momentos increíbles a su lado.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO	
Ovulación	3
Ciclo Estral.....	3
Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.....	6
Hipotálamo	7
Neuronas GnRHérgicas y GnRH.....	10
Acetilcolina: síntesis y liberación.....	13
Distribución de neuronas colinérgicas	15
Acetilcolina y Ovulación.....	16
Marcadores de Actividad Neuronal.....	20
Δ -Fosb	22
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS GENERALES.....	23
OBJETIVOS.PARTICULARES.....	23
MATERIALES Y MÉTODO.....	24
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	37
CONCLUSIÓN.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41

RESUMEN

La acetilcolina por medio de la activación de los receptores muscarínicos de POA-AHA regula de manera asimétrica la ovulación en los días del estro y diestro 2. En el estro, el implante o la microinyección de atropina en el lado derecho de POA-AHA bloquea la ovulación en el día del estro esperado del ciclo siguiente, lo que no sucede si el implante o la microinyección se colocan en el lado izquierdo. En ratas con tratamientos semejantes, la inyección subcutánea de LHRH sintética en la tarde del proestro, induce la ovulación. Este resultado llevó a sugerir que la activación de los receptores muscarínicos participa en los mecanismos que regulan la secreción preovulatoria de la GnRH.

Con la finalidad de estudiar esta posibilidad, se decidió cuantificar en la mañana del proestro esperado, el contenido de GnRH en el lado izquierdo y derecho de POA-AHA de ratas con bloqueo de los receptores muscarínicos del lado derecho, realizado en el estro. Además, se analizó si el bloqueo de estos receptores se acompaña de la disminución del número de células inmuno-reactivas al gen Δ -fosb en el lado de POA-AHA tratado, el contralateral o ambos.

Los resultados obtenidos muestran que en el animal intacto, el número de células inmuno-reactivas a Δ -Fosb y el contenido de GnRH es mayor en POA-AHA derecha (número de células: 18952 ± 415 vs. 16060 ± 440 , $p < 0.05$; contenido GnRH: 0.01942 ± 0.0017 vs. 0.00598 ± 0.00039 GnRH/ β -tubulina, $p < 0.01$).

La actividad neuronal medida por la proteína Δ - fosb aumenta en la zona anterior a la porción de POA-AHA microinyectada con la atropina. En la región inyectada, la atropina provocó disminución del número de células inmuno-reactivas a Δ -Fosb en ambos lados de POA-AHA. Mientras que en la zona posterior solo disminuyen en el lado derecho.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que en condiciones normales, tanto la actividad neural como el contenido de GnRH en POA-AHA son asimétricos a las 11:00 h del proestro. La activación de los mAChR del lado derecho de POA-AHA, a las 13:00 del estro, regula de forma estimulante la actividad de las neuronas de la zona central y posterior de POA-AHA, así como la liberación de la GnRH en el día del proestro.

INTRODUCCIÓN

La ovulación es el evento final de los mecanismos de regulación endócrinos y nerviosos que ocurren entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario. En el hipotálamo se genera la señal endócrina que inicia con la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas o GnRH (por sus siglas del inglés: **G**onadotrophin **R**eleasing **H**ormone). Las neuronas que secretan la GnRH, llamadas GnRHérgicas, se localizan en la región preóptica (POA) e hipotalámica anterior (AHA) (Silverman et al., 1994).

La secreción de la GnRH es regulada por al menos 38 moléculas que incluyen: neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas esteroides (Herbison, 2015). Uno de los neurotransmisores que regulan la ovulación y la secreción de la GnRH es la acetilcolina. En la rata, Turi et al., (2008) mostraron que las neuronas GnRHérgicas del área preóptica medial están inervadas directamente por axones colinérgicos, al identificar una fina red de fibras colinérgicas con inmuno-reactividad para la colino acetil-transferasa (CAT) y para la vesícula transportadora de acetilcolina (VACT).

La acetilcolina unida a los receptores muscarínicos de POA-AHA regulan en forma asimétrica la secreción de la GnRH y la ovulación, ya que, el implante o la microinyección de atropina en la porción derecha de POA-AHA, a las 13:00 horas del día del estro, bloquea la ovulación, mientras que el implante del lado izquierdo no lo hace. Si el fármaco se coloca en el día del diestro-2, sólo el tratamiento del lado izquierdo produce el bloqueo (Cruz et al., 1989). Dado que la inyección subcutánea de GnRH sintética a la 14:00 h del proestro, a ratas con implante de atropina en POA-AHA derecha, colocado en el día del estro, promueve la ovulación, se sugirió que la acetilcolina al unirse a los receptores muscarínicos (mAChR) regula de manera estimulante la secreción de la GnRH (Cruz et al., 1992; Santana, 2016; Espinosa-Valdez et al., 2016)). Sin embargo, se desconoce si este mecanismo regula la síntesis, la liberación o ambos procesos de la GnRH. Tampoco se conocen las zonas de la región POA-AHA que son activados o desactivados cuando se bloquean los receptores muscarínicos.

Por lo que en este estudio se analizaron los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos del lado derecho de POA-AHA, realizado en el día del estro, sobre el número de células inmuno-reactivas a Δ -Fosb y el contenido de GnRH en la mañana del proestro esperado.

MARCO TEÓRICO

Ovulación

Los ovarios de los mamíferos tienen dos funciones: la producción de hormonas y la liberación de ovocitos, conocida como ovulación (Espey, 1999).

En la rata, la época reproductiva está caracterizada por cambios periódicos en la secreción de las hormonas secretadas por el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, esta conducta rítmica que presentan las hembras se le llama ciclo del estro o ciclo estral (Kuiper et al., 1996).

Ciclo Estral

El ciclo estral es un complejo proceso que se repite a partir de la pubertad y durante la vida reproductiva de las hembras. Durante el ciclo estral se producen cambios conductuales, morfo-fisiológicos, histológicos y bioquímicos del aparato genital, que concluyen con permitir que la hembra admita la cópula con el macho (Álvarez, 2009).

La palabra *estrus* es una adaptación latina de la palabra griega “oistros” que significa frenesí. Este término fue utilizado por primera vez por Heape (1900) para describir el "período especial de deseo sexual de la hembra". Además, describió distintas etapas del ciclo, utilizando el término anestro para referir la estación no reproductiva o el período de descanso en el mamífero hembra, cuando los ovarios y los órganos reproductores accesorios están relativamente inactivos y son rechazados los intentos de apareamiento por el macho. También usó los prefijos pro-, di- y meta- junto con el sufijo estro para describir las etapas durante el ciclo sexual.

La primera parte del ciclo que Heape denominó proestro, se caracteriza como el momento en que el animal "viene en calor", el siguiente período es el celo llamado estro, en ausencia de la concepción, el estro es seguido por un corto período de recuperación llamado metaestro o diestro-1, durante el cual disminuye la actividad del tracto reproductivo. El período siguiente es el diestro o diestro-2, de duración variable en diferentes especies, antes del retorno al proestro y el inicio del siguiente ciclo.

Las etapas del ciclo estral pueden establecerse mediante el análisis de los tipos celulares que aparecen en el frotis vaginal: el proestro se caracteriza por un predominio de células epiteliales nucleadas, estas células son claramente redondas, visiblemente nucleadas y ocasionalmente, pueden aparecer también algunas células epiteliales escamosas cornificadas.

Al día siguiente, el estro, la célula dominante en el tejido epitelial es la escamosa cornificada, esta célula no tiene un núcleo visible, contiene un citoplasma altamente granular, tiene forma irregular y aparecen en grandes grupos.

Durante el metaestro (diestro-1) y el diestro-2, el tipo de célula dominante es el leucocito, que aparece junto con un número significativo de células epiteliales nucleadas. Los leucocitos son pequeños con citoplasma granular y con el núcleo vesiculado. (Fig. 1) (Levine, 2015).

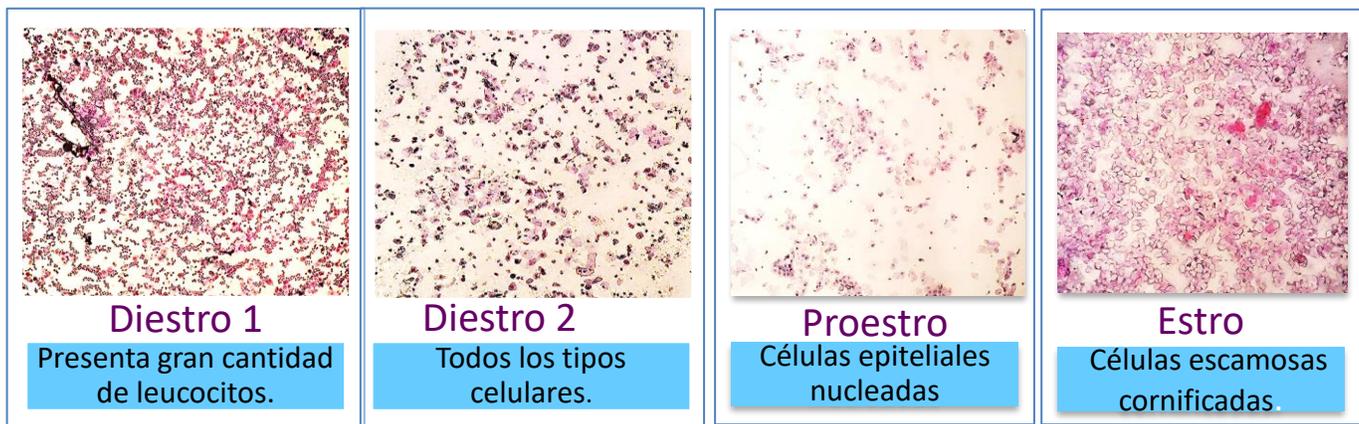


Fig. 1. Tipos de células del epitelio vaginal que caracterizan cada etapa del ciclo estral en la rata (tomado de Levine, 2015).

Cada una de estas etapas está caracterizada por cambios hormonales que dependen de la hora del día (Fig. 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_4), 17β -estradiol (E_2), y de la hormona luteinizante o LH (por sus siglas del inglés: Luteinizing Hormone) en el suero se mantienen basales.

En cambio, las concentraciones de la hormona estimulante del folículo o FSH (por sus siglas del inglés: Follicle Stimulating Hormone) alcanzan un máximo en la mañana de este día.

En el día del diestro-1 comienza a aumentar la concentración de P_4 , mientras que la de E_2 , LH y FSH siguen siendo basales. En el día de diestro-2, la P_4 , LH y FSH, se mantienen en concentraciones basales, mientras que, en la tarde de este día, la secreción de E_2 comienza a aumentar paulatinamente.

En el día del proestro, se observan las concentraciones máximas de P₄, E₂, LH y FSH, en forma de “picos”, denominadas secreciones pre-ovulatorias. Entre la mañana y el medio día, las concentraciones plasmáticas de E₂ alcanzan su valor máximo, el cual disminuye drásticamente hacia las 14:00 h. Este cambio en la secreción de E₂ induce la secreción de GnRH, la que, a su vez, estimula la secreción pre-ovulatoria de FSH y LH hacia las 17:00 h de este día (Fig. 2) (Freeman, 2006).

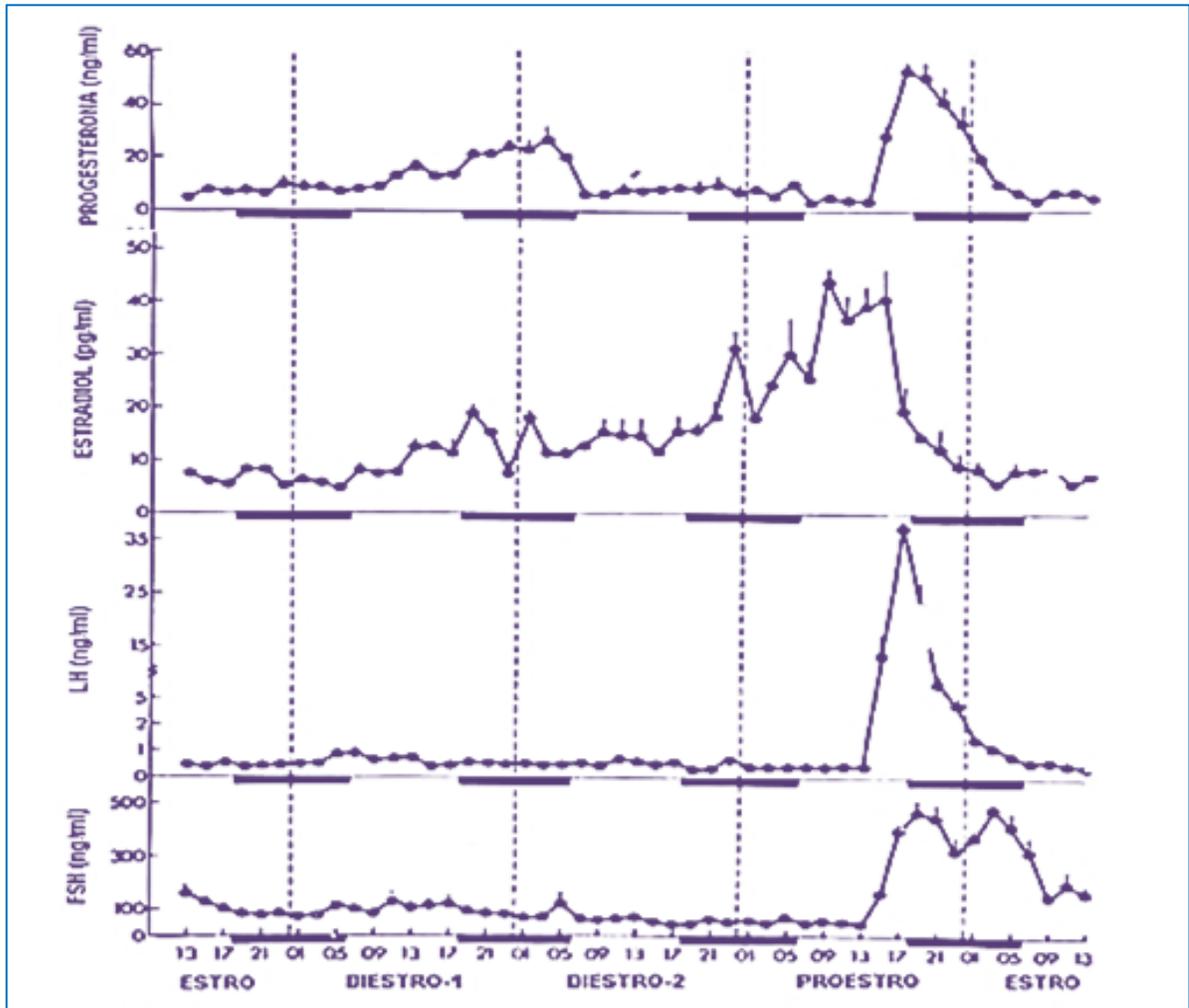


Fig.2 Perfil de concentraciones séricas P₄, E₂, LH y FSH obtenidas cada dos horas en cada día del ciclo estral. Cada punto representa la concentración media de la hormona (\pm SE) de grupos de 5 a 6 ratas (Tomada de Freeman, 2006).

En los mamíferos hembras, la fertilidad se mantiene por las señales hormonales transmitidas entre el cerebro, la hipófisis y los ovarios, funcionando conjuntamente como el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Levine, 2015).

Eje Hipotálamo- Hipófisis- Ovario

El hipotálamo es el “centro nervioso” que inicia la cascada de eventos neuroendocrinos que culminan con la ovulación. En los roedores, este "centro nervioso" lo conforman un tipo de neuronas del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) que secretan GnRH. Ésta se libera en el sistema portal hipotalámico-hipofisario, que al unirse a su receptor en los gonadotropos de la hipófisis anterior, estimula la secreción de la LH y la FSH.

La LH y la FSH son glicoproteínas que regulan las funciones del ovario al estimular el crecimiento y la diferenciación de los folículos, la secreción de hormonas esteroides y la ovulación. En la hembra, la FSH actúa en los folículos ováricos estimulando su crecimiento y la secreción de E₂; mientras que la LH produce la ruptura del folículo e induce la liberación del ovocito, da origen al cuerpo lúteo y es mediadora en la producción de progesterona y andrógenos (Prieto y Velázquez, 2002).

Las hormonas ováricas ejercen efectos de “feedback” o retroalimentación en el cerebro y la hipófisis para mantener el control homeostático dentro del eje. Estos esteroides gonadales estimulan o inhiben la actividad de las neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo, al regular la respuesta a la GnRH en los gonadotropos, siendo el efecto "feedback" negativo el que se presenta en la mayor parte del ciclo reproductivo (Evans et al., 1994). Al final de la fase folicular, cuando las concentraciones de E₂ son más altas, el efecto "feedback" se vuelve positivo o estimulante, iniciando el aumento continuo de la liberación de GnRH mediante el incremento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de secreción (Herbison, 2015) (Fig. 3).

Estas señales de retroalimentación orquestan la secuencia de eventos que se desarrollan durante el curso de cada ciclo ovulatorio en animales que ovulan espontáneamente (Levine, 2015).

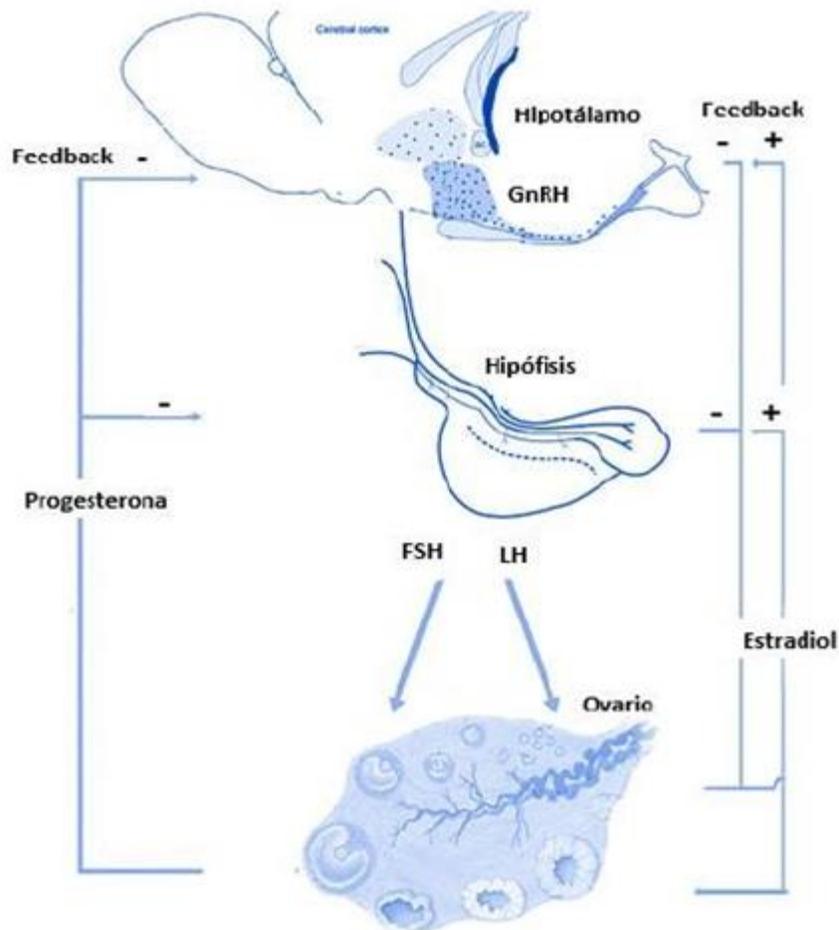


Fig. 3 Eje Hipotálamo-hipófisis-ovario. Las neuronas GnRH ubicadas en el hipotálamo secretan GnRH que es liberada al sistema portal hipofisario hacia los gonadotropos en la adenohipófisis, donde estimula la liberación de LH y FSH que son liberadas en torrente sanguíneo y llegan a los ovarios donde estimulan la síntesis y liberación de estradiol y progesterona que tienen un efecto “feedback” positivo o negativo en el hipotálamo y la hipófisis.

Hipotálamo

El hipotálamo es el centro de control esencial entre los sistemas endocrino, autónomo y somatomotor. Está constituido por células nerviosas, prolongaciones nerviosas (axones o dendritas) de neuronas intra y extra-hipotalámicas, células gliales o de sostén y de una rica red vascular (Norris, 1996).

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, por debajo del tálamo y se divide 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.

Palkovits (2000), lo divide en cuatro regiones principales organizadas rostro-caudalmente en: área preóptica, hipotálamo anterior, medio y posterior. Cada área se puede dividir además en áreas periventricular, medial y lateral.

Área Preóptica: Desde el punto de vista funcional se le considera parte del hipotálamo, aunque su origen embriológico es diferente. En la rata esta área 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. La parte medial está formada por los núcleos periventricular, supraquiasmático, hipotálamo anterior y paraventricular; la parte lateral contiene el núcleo supraóptico.
- Medio: En el hipotálamo medio se reconocen tres zonas: media basal, dorsal y lateral. La zona media basal incluye la eminencia media y los núcleos arcuato y ventromedial; la zona dorsal es ocupada completamente por el núcleo dorsomedial; el borde de la zona medial y lateral se localiza el núcleo perifornical.
- Posterior: Representa una pequeña parte del hipotálamo y también se le conoce como región premamilar. Incluye los núcleos: premamilar dorsal y ventral, tuberomamilar, supramamilar, hipotálamo posterior y núcleo arcuato.

En los mamíferos se ha mostrado que el hipotálamo regula el sistema cardiovascular, las respuestas termorreguladoras y las funciones viscerales abdominales, así como el comportamiento defensivo-agresivo y los comportamientos alimenticios que proporcionan nutrientes y agua. Además, el hipotálamo juega un papel esencial en asegurar la supervivencia de la especie controlando la expresión de comportamientos sexuales y maternos. De importancia fundamental para la función del hipotálamo es su íntima relación con la hipófisis y las vías claramente establecidas para el control neuronal de los patrones de secreción endocrina.

El hipotálamo secreta diferentes tipos de 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, donde actúan como neurotransmisores. Algunas de las neurohormonas liberadas por las neuronas del hipotálamo son: la GnRH, la hormona liberadora de la tirotrina (TRH), la hormona liberadora de la prolactina (PRH), el factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIF), la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) y la hormona inhibidora de la hormona del 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 se han localizado en POA-AHA (Fig. 4) (Prieto y Velázquez, 2002).

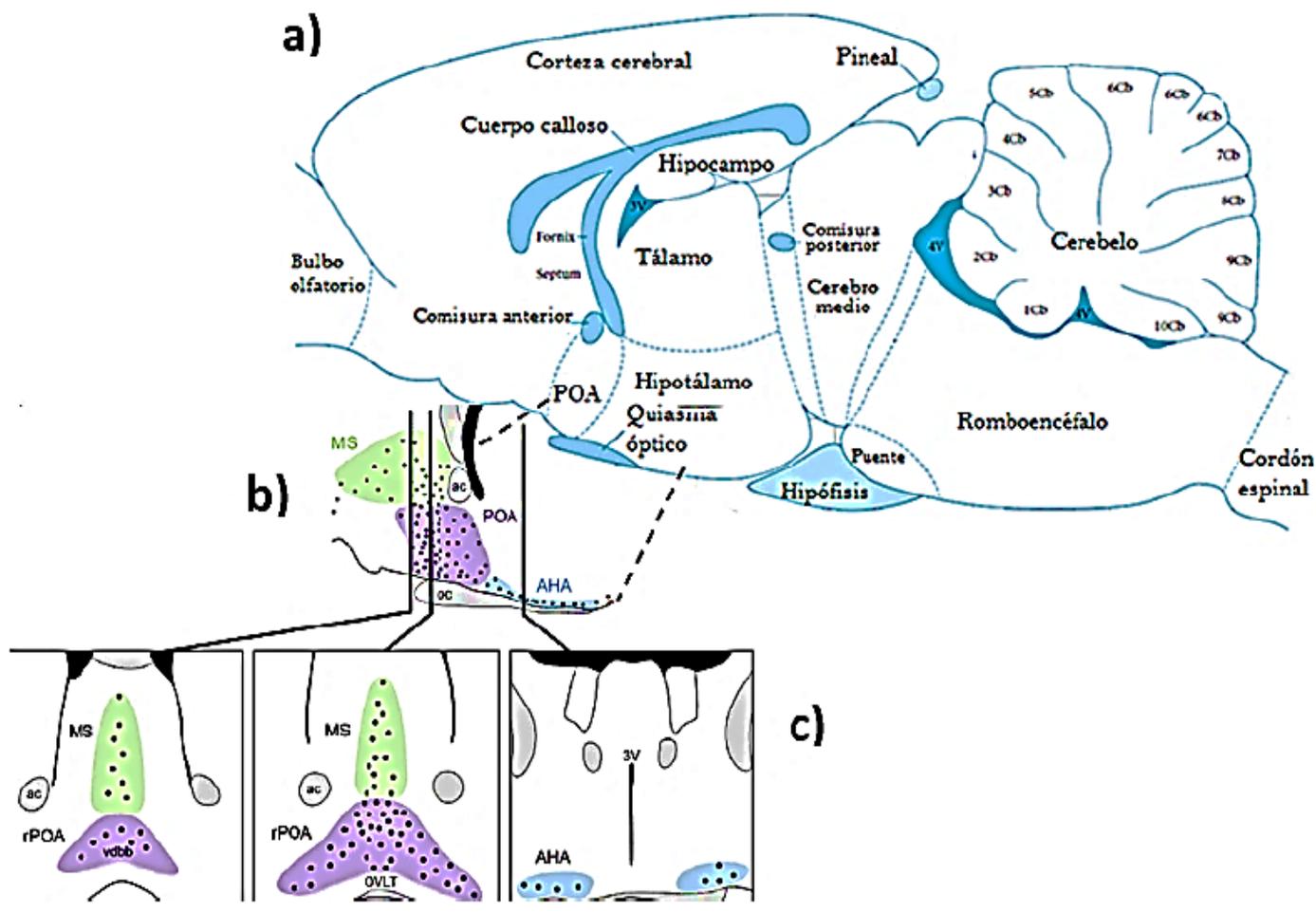


Fig.4 a) Corte sagital del cerebro donde se muestra la ubicación del hipotálamo y de área preóptica; b) corte sagital resaltando la distribución de las neuronas GnRH (puntos negros) proyectando el área donde converge POA-AHA y c) corte coronal de la distribución de las neuronas GnRH en el cerebro del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

Neuronas GnRHérgicas y GnRH

La red neuronal de la GnRH está conformada por las propias neuronas GnRHérgicas y otras que se localizan en la vecindad a ellas, así como las células de la glía (Herbison, 2015).

Las neuronas GnRHérgicas tienen su origen embrionario en la placoda olfatoria. Durante el desarrollo embrionario temprano migran hacia el hipotálamo, donde varios cientos de ellas se encuentran difusamente distribuidas en POA y áreas más caudales, como en el HMB (Schwanzel-Fukuda et al., 1989; Wray et al., 1989).

Las neuronas GnRHérgicas no forman agregados neuronales compactos, sino redes laxas y difusas. La principal red, por su participación directa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, conocida como la red septo-preóptica infundíbular, se extiende desde la banda diagonal de Broca hasta el área septal, atravesando el núcleo de la estría terminal y las áreas preóptica medial y lateral, el área hipotalámica anterior, el núcleo periventricular y el área retroquiasmática del diencefalo. También forman parte de este continuo, las neuronas secretoras de GnRH ubicadas en el hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico (Silverman et al., 1998).

En la mayoría de las especies, la neurona GnRHérgica se compone de un cuerpo celular y dos dendritas simples dándole una morfología bipolar (Fig. 5 A y B). Sin embargo, cabe señalar que no todas las neuronas GnRHérgicas tienen esta morfología, ya que algunas neuronas pueden mostrar una forma multipolar compleja como las que se encuentran cerca del *organum vasculosum* de la lámina terminal (OVLT) en ratones (Herbison, 2015).

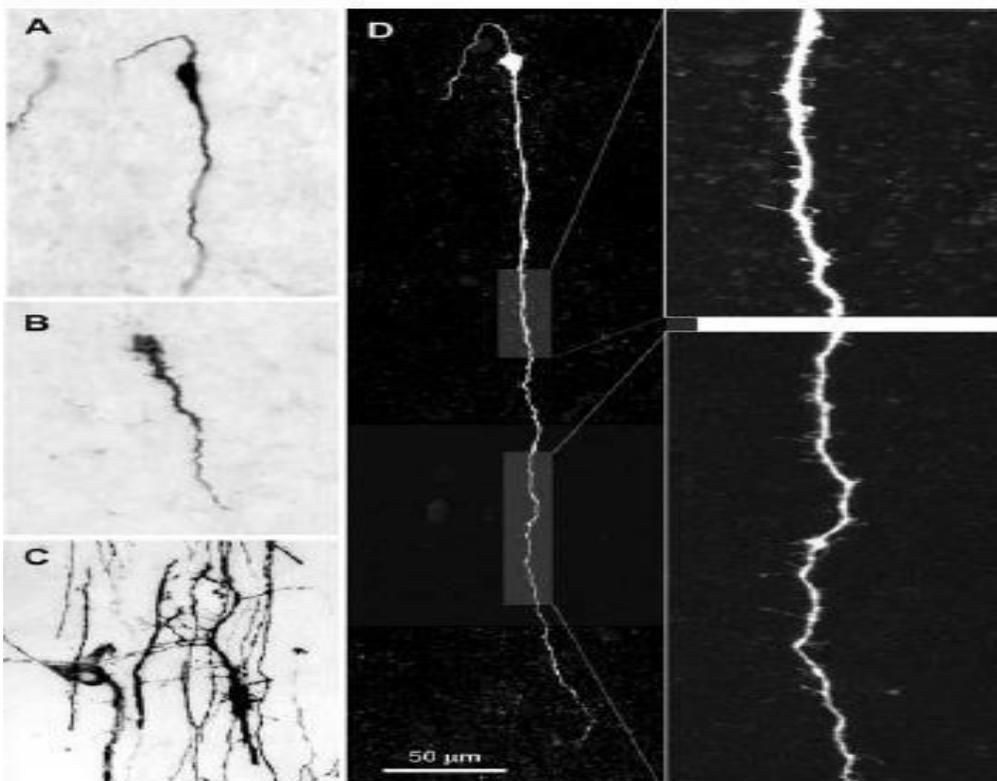


Fig. 5 Morfología de la neurona GnRH. **A** y **B** muestran la morfología típica de las neuronas GnRH de ratón, en **C** se observa la morfología multipolar y en **D** montaje mostrando el soma y la estructura dendrítica de una neurona GnRH de ratón adulto enfatizando en la longitud de la dendrita primaria (más de 500 μm) y la alta densidad de espinas a lo largo de la longitud de la dendrita (Herbison, 2015).

En ratones transgénicos se ha mostrado que las neuronas GnRHérgicas exhiben dendritas notablemente largas que pueden extenderse por más de 2000 µm (Fig. 5D). La observación de numerosas espinas alrededor de las dendritas largas de la neurona proporcionó evidencia clara de que reciben una gran cantidad de sinapsis (Herbison, 2015).

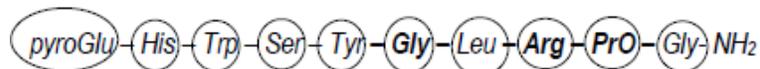
El sitio de proyección principal de la neurona GnRHérgica es la zona externa de la eminencia media, donde la GnRH es liberada en la circulación portal hipofisaria. Los estudios de rastreo han revelado que entre el 50% y el 70% de todas las neuronas GnRHérgicas proyectan hacia la eminencia media. Curiosamente, estas últimas proyecciones combinan características de dendritas y axones y han sido denominadas "dendrones" (Herbison, 2015).

En esencia, la neurona GnRHérgicas podría considerarse ahora, como un cable de procesamiento de información muy largo, con tres especializaciones clave:

- (1) un cuerpo celular que es responsable de la regulación biosintética y el patrón de actividad eléctrica
- (2) una zona de iniciación de potencial de acción en la parte proximal del dendrón
- (3) modificaciones terminales del dendrón en terminales nerviosas similares a axones que participan en la secreción de la GnRH en la circulación portal (Herbison, 2015).

Las sinapsis a toda lo largo del dendrón tienen un papel en la regulación de su actividad en la eminencia media. Aquellos cercanos al sitio de iniciación serán especialmente importantes en el estado general de excitabilidad celular, aquellos en el cuerpo celular regulan la expresión génica y aquellos en el dendrón distal deberían ser capaces de modular directamente la secreción de GnRH dentro de la eminencia mediana. (Herbison, 2015).

La GnRH es un péptido pequeño constituido por 10 aminoácidos, cuya secuencia lineal en mamíferos es la siguiente (Schally et al., 1971; Matsuo et al., 1971; Baba et al., 1971):



Este decapeptido es producido por una población de neuronas GnRHérgicas de entre 1,000 y 3,000 neuronas (Barry, 1979).

La GnRH se sintetiza 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 segmentos: 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 a la GnRH o GAP (por sus siglas del inglés: **GnRH-Associated Peptide**) (Yen, 2001).

La secuencia codificable de la GnRH se encuentra en el cromosoma ocho del humano y en el cromosoma 14 del ratón. El gen está compuesto por cuatro exones cortos y tres intrones largos que abarcan aproximadamente 4,5 kb (Herbison, 2015).

El primer exon (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 amino terminal de once aminoácidos del 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).

La transcripción del gen de la GnRH produce un transcripto primario poliadenilado de ~4200 bases que se procesa por empalme a un transcripto maduro de 560 bases. La traducción del transcripto maduro de la GnRH da lugar a la producción de la pre-pro-hormona de 92 aminoácidos. Al menos cuatro pasos enzimáticos diferentes están implicados en el procesamiento de la pro-hormona, Los pasos finales para generar el decapeptido biológicamente activo requieren la conversión de la glutamina N-terminal (Gln1-GnRH) a piroglutamato (pGlu1-GnRH), por glutaminil ciclasa y la amidación de la glicina C-terminal, por la mono-oxigenasa alfa-amidación de peptidilglicina (Fig. 6) (Herbison, 2015).

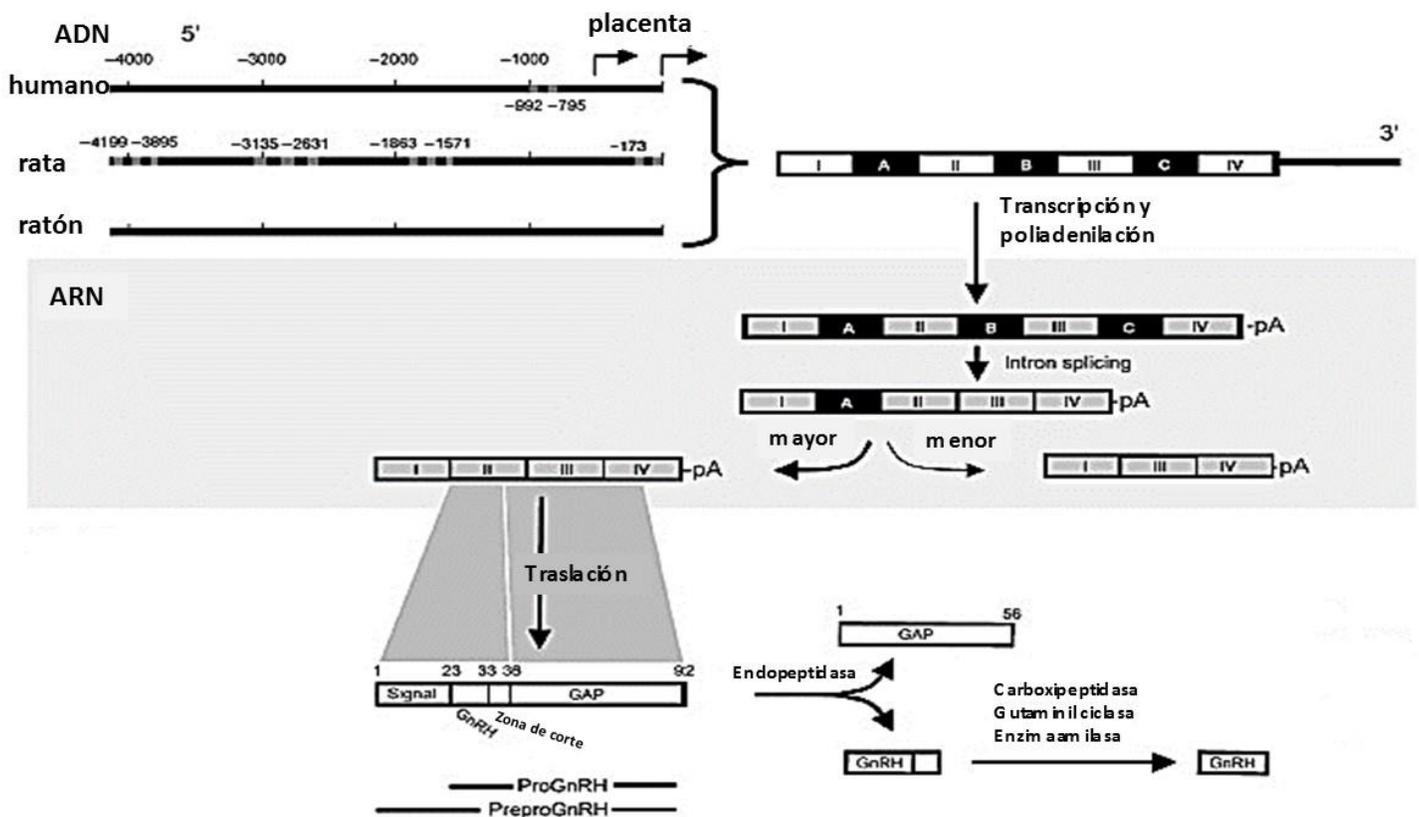


Fig.6 Biosíntesis de GnRH. El panel superior representa la estructura del gen GnRH con la secuencia reguladora 5' en ratón, humano y rata. El panel central representa ARN de GnRH y varios intermedios de empalme y procesamiento. El panel inferior muestra la traducción y las modificaciones pos- traduccional que dan como resultado el decapeptido GnRH final (Tomado de Herbison, 2015).

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, la cual posee una región que varía en estructura en diferentes especies, pero está altamente conservada en tejido cerebral, y la GnRH-II, que se encuentra en sitios extra-hipotalámicos donde actúa como neurotransmisor, la cual varía con la anterior en los aminoácidos cinco, siete y ocho (Pawson et al., 2003).

Se sabe que la naturaleza pulsátil de la liberación hipotalámica de la GnRH determina la secreción episódica de las gonadotropinas hipofisarias. La periodicidad y la amplitud del ritmo pulsátil de secreción de GnRH/gonadotropinas son fundamentales en la regulación de las funciones del ovario y por lo tanto, de todo el eje reproductivo (Yen et al., 1999).

La secreción de la GnRH es regulada por al menos 38 moléculas que incluyen: neurotransmisores (ácido gama amino butírico [GABA], glutamato, noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina, histamina, acetilcolina, cannabinoides), neuropéptidos[angiotensina, β-endorfinas, bombisina, bradiquinina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, factor liberador de la corticotropina, colecistoquinina, dinorfina, galanina, encefalina, GnRH, kipeptina, péptido natriurético, neuropéptido Y, neurotensina, orexina, oxitocina, somatostatina, vasopresina, péptido intestinal vasoactivo] y hormonas esteroides (Herbison, 2015).

Acetilcolina: síntesis y liberación

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor del sistema nervioso parasimpático, el cual participa en la regulación de diversas funciones como en la activación cortical, el paso de sueño a vigilia y procesos de memoria y asociación. Su estructura química resulta ser de gran simplicidad, un éter del ácido acético y la colina (Fig. 7).

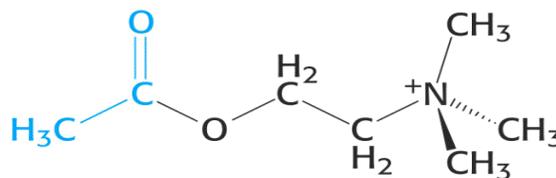


Fig.7. Estructura química de la acetilcolina (tomado de Berg et al., 2008)

La ACh se sintetiza en el soma de la neurona, a partir de la colina y del acetil coenzima A (CoA), en una reacción catalizada por la colino-acetil-transferasa (CAT) (Fig. 8) (Flores y Segura, 2005).

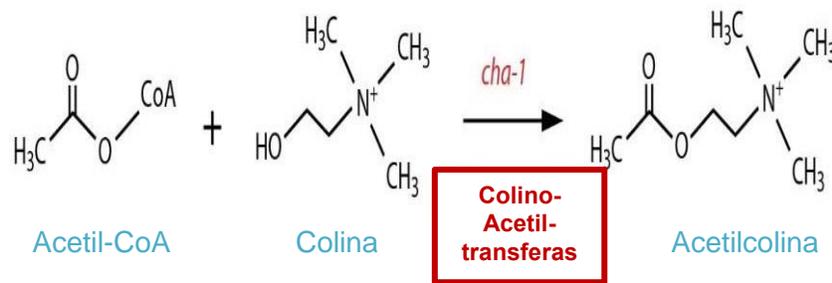


Fig.8 Síntesis de la acetilcolina tomado de <https://themedicalbiochemistrypage.org>

La acetilcoenzima A (Acetil.CoA) se sintetiza en la mitocondria a partir de un grupo acetilo proveniente del piruvato, que a su vez procede de la glucosa o del acetato. La colina, que está presente en el espacio sináptico, se transporta a la terminación nerviosa colinérgica por un sistema de transporte dependiente de sodio (Na^+). La colina proviene del metabolismo de la fosfatidilcolina de membrana y, hasta en un 50% de la hidrólisis de la acetilcolina liberada (Velázquez et al., 2008).

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 Ca^{+2} dependientes de voltaje, activando así proteínas contráctiles del citoesqueleto, lo que facilita que la vesícula que contiene a 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 ACh produce colina y acetato por acción de la acetilcolinesterasa (AChE) (Felder, 1995).

La ACh liberada al espacio sináptico actúa sobre sus receptores, lo que permite la inducción de cambios bioquímicos y eléctricos en la célula postsináptica, que depende del tipo de receptor y de la forma en que éste se encuentre sincronizado con los sistemas de transducción (Flores y Segura, 2005).

Los receptores colinérgicos son clasificados en dos categorías, muscarínicos y nicotínicos, basándose en la similitud entre los efectos observados por los alcaloides muscarina y nicotina y la estimulación de las fibras nerviosas autónomas.

🚦 Receptores nicotínicos. Pertenecen a la familia de receptores acoplados a canales iónicos y están constituidos por cinco subunidades que se disponen alrededor del canal que permite el paso de cationes como Na^+ , K^+ o Ca^{2+} (Velázquez, 2008), los cuales generan respuestas rápidas y están localizados en los ganglios simpáticos, en el SNC y en la placa motora (Gotti et al, 1997).

✚ Receptores muscarínicos (mAChR). Pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G y, por lo tanto, estructuralmente están formados por siete segmentos α - helicoidales transmembrana con el extremo NH₂ terminal localizado en la porción extracelular, y el COOH terminal en la citoplasmática (Richmond et al., 1999)..

Existen 5 subtipos de mAChR denominados m₁ hasta m₅, todos ellos son glicoproteínas que tienen 460-590 aminoácidos, los cinco subtipos poseen una similitud en su secuencia de aminoácidos hasta del 90% y, a su vez, cada subtipo posee una homología del 89-98% en las distintas especies de mamíferos (Bonner et al., 1988).

Los mAChR 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 los cinco mAChR (Velázquez et al., 2008).

La ATR es un alcaloide presente en plantas de la familia Solanáceas *Atropa belladonna* y *Datura Stramonium*; químicamente es un éster orgánico formado por el ácido trópico y una base orgánica (tropina) (Fig. 9) (Velázquez et al., 2008). Atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que sus efectos llegan a sistema nervioso central. La constante de afinidad (pK_d) promedio para los diferentes receptores es de 9 a 9.8, su acción puede durar de 45 min a 1 hora, y su vida media de eliminación es de 2.3 horas, posteriores a las cuales experimenta hidrólisis con la formación de metabolitos inactivos de ácido trópico y tropina (Stoelting, 1991).

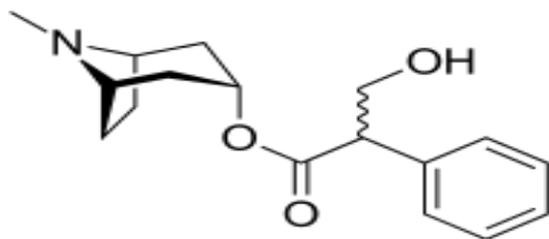


Fig. 9 Estructura química de la atropina (tomada de Baños y March, 2002).

Distribución de neuronas colinérgicas

La distribución y morfología de las neuronas colinérgicas es muy variada. Existen las que tienen axones cortos, que se consideran como interneuronas, las que son muy abundantes en el cuerpo estriado, los núcleos de los pares craneales y la médula espinal. Otras interneuronas colinérgicas se encuentran en la corteza cerebral de los roedores, pero no tienen su equivalente en primates (Mesulam, 1995).

Las vías cerebrales colinérgicas con axones largos tienen una localización más difusa, la vía colinérgica que sale de la base del cerebro anterior, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el septum, la banda diagonal de Broca, el núcleo pálido ventral y, sobre todo, el núcleo basal de Meynert, se extiende hasta el bulbo olfativo, la corteza, la amígdala y el hipocampo. Una segunda vía colinérgica tiene sus cuerpos neuronales localizados más caudalmente, en la zona del mesencéfalo y del núcleo tegmental lateral, en el piso del cuarto ventrículo. Los axones de este sistema inervan el tálamo, el hipotálamo y prácticamente todos los núcleos del cerebro medio (Perry, 1999).

Acetilcolina y ovulación

Las primeras evidencias de la participación del sistema colinérgico en la regulación de la ovulación fueron los experimentos realizados por Sawyer, Markee y Everett hace más de 60 años, quienes mostraron que el bloqueo del sistema colinérgico, por la inyección subcutánea de sulfato de atropina interrumpe la ovulación, cuando se administra inmediatamente después del coito, en el caso de la coneja, un animal de ovulación refleja y en la rata, un animal de ovulación espontánea, cuando se inyecta en la mañana del proestro (Everett 1949 y Everett et al., 1949).

En la rata, la inyección subcutánea de sulfato de atropina (70 mg/100 g de peso) o su aplicación directa al tercer ventrículo (250 µg) entre las 11:00 y 13:00 horas del proestro bloquea la secreción de LH, FSH y prolactina (PRL) horas más tarde. En estos animales, la inyección de GnRH sintético (LHRH) restablece la liberación preovulatoria de LH, por lo que se concluyó que el bloqueo de los mAChR altera la secreción normal de GnRH (Libertum y McAnn, 1973; Villegas et al., 1997).

En el POA existen diferencias sexuales en el número de sitios de unión de agonistas muscarínicos, siendo mayor en los machos que en las hembras. En ratas hembras cíclicas se observa que en POA, la población de sitios de unión de alta afinidad a agonistas muscarínicos es mucho mayor en el día del proestro que en los demás días del ciclo estral (60 vs. 35%) (Egozi y Kloog, 1985).

La lesión producida por la inyección de 6-hidroxidopamina intracerebral (destrucción masiva de neuronas catecolaminérgicas) produce un decremento de 1/6 del número total de mAChR en el hipotálamo, por lo que es posible pensar en la existencia de mAChR presinápticos ubicados en las terminales catecolaminérgicas del hipotálamo (Avisar et al., 1981).

Estudios *in vitro* muestran que, en POA de la rata hembra, el número de mAChR varía durante el ciclo estral. En la mañana del proestro se observa un aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad a agonistas muscarínicos (60%), comparado a lo observado en diestro-2 o en la tarde del proestro (35%). Cuando porciones homogenizadas de POA se exponen a la presencia de E₂ resulta en la conversión de los sitios de unión de alta afinidad a agonistas muscarínicos a sitios de unión de baja afinidad. Este efecto de la hormona se observa únicamente en muestras de POA obtenidas en la mañana del proestro y puede ser bloqueado por clomiféno (anti-estrógeno) o prevenido por la ocupación previa de los mAChR por sus propios ligandos antes de la adición de la hormona. Los cambios significativos en los mAChR de POA coinciden con el llamado (periodo crítico), caracterizado por altas concentraciones de estrógenos y gran número de receptores a estrógenos en POA (Egozi y Kloog, 1985).

En el hipotálamo y la adenohipófisis de las ratas, las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos evaluadas por ensayos de competencia con [³H]-N- metil-4 piperidil bencilato (antagonista muscarínico tritiado de alta afinidad), muestran que únicamente las hormonas sexuales E₂ y P₄, afectan las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos. Ambas hormonas provocan la disminución en la proporción de sitios de unión de alta afinidad y en la constante de disociación. Esto permite sugerir una vinculación entre el sistema colinérgico muscarínico y los mecanismos por los cuales los esteroides ováricos inducen la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis (Rajkovich y Choi, 2006; Speroff et al., 2006).

Tanto el contenido de ACh de POA-AHA, la actividad de las enzimas CAT y AChE, y el número y la afinidad de los mAChR presenta cambios durante el ciclo estral (Sánchez et al., 1994; Cruz et al., 1997). En la rata, la actividad de la CAT a las 13:00 h de cada fase del ciclo estral es diferente entre una y otra POA-AHA localizada en cada hemisferio cerebral. La ubicada en el hemisferio izquierdo es constante, mientras que en la situada en el hemisferio derecho, la actividad de la enzima es mayor en el día del estro y menor en el diestro-2 (Sánchez et al., 1994).

La concentración de ACh en POA-AHA a las 13:00 h de cada fase del ciclo estral es mayor en el diestro-1 y menor en el diestro-2 (Cruz et al., 1997).

La sensibilidad del sistema colinérgico al sulfato de atropina varía durante el ciclo estral y la dosis necesaria para bloquear la ovulación en el 100 por ciento de los casos depende del día del ciclo y la hora en que se administre; es el diestro-1 el día más sensible, ya que se requiere de la dosis menor (Domínguez et al., 1982). Durante el periodo crítico (en el día de proestro) la concentración de acetilcolina en POA cae y luego incrementa de modo abrupto (Domínguez y Cruz 1989; Egozi et al., 1986).

Durante el ciclo estral de la rata hembra, en POA existe un ritmo colinérgico endógeno. En el día del diestro-1 se presentan las concentraciones máximas de ACh y en diestro-2 las mínimas. El número y la afinidad de mAChR también varían durante el ciclo estral (Cruz et al., 1997). El marcaje con [³H]-N-metil escopolamina, agonista muscarínico, muestra que la unión específica y la constante de disociación para dicho fármaco es máxima en el día del estro y disminuyen progresivamente en los demás días del ciclo estral (Cruz et al., 1997). Mediante el marcaje con el antagonista colinérgico muscarínico [3H] bencilato de quinuclidina se observan también cambios cíclicos en el marcaje, con un máximo en proestro y un mínimo en los días del diestro (Rainbow et al., 1980). La discrepancia aparente de estos resultados podría explicarse por el hecho de que los fármacos usados en los experimentos posiblemente tengan diferente afinidad a los subgrupos de mAChR en POA-AHA, y abre la puerta a la especulación sobre la importancia de cada uno de estos subgrupos de receptores en la regulación del proceso reproductor. El número y la afinidad de los mAChR en el hipotálamo son regulados por las hormonas esteroides ováricas.

Experimentos *in vitro* con POA muestran que existe una relación directa entre la concentración de E₂ y la proporción de mAChR de alta y baja afinidad. Durante la mañana del proestro se observa un incremento significativo en la proporción de mAChR de alta afinidad (60 %), comparado con el día de diestro-2 o la tarde del proestro (35%). Es posible que estos cambios en la afinidad de los RM reflejen variaciones en la actividad colinérgica en POA durante el ciclo estral (Egozi et al., 1986). En la rata hembra cíclica, la actividad máxima de la enzima AChE en el hipotálamo se presenta en los días de estro y diestro-1 y la mínima en proestro (Cruz et al., 1997).

En ratas ovariectomizadas, la administración sistémica de benzoato de estradiol aumenta significativamente el marcaje de los mAChR por [3H] bencilato de quinuclidina en el hipotálamo medio basal y lo disminuye en el área preóptica media de modo dosis dependiente (Dohanich et al., 1982). En el hipotálamo y la hipófisis, las progestinas y sus metabolitos inhiben el marcaje de los mAChR por antagonista colinérgico (Klangkalya y Chan, 1988).

Por otro lado, el sistema colinérgico a su vez regula la respuesta de las neuronas hipotalámicas a los estrógenos, ya que el tratamiento con betanecol, un agonista colinérgico muscarínico, incrementa en 38% el número de sitios de unión al E₂ en el citosol de neuronas hipotalámicas de ratas hembras ovariectomizadas, y el pretratamiento con sulfato de atropina bloquea los efectos del betanecol. En machos castrados, el betanecol no tiene efectos sobre la concentración de sitios de unión al E₂ (Lauber y Whalen 1988).

La liberación de GnRH desde la eminencia media en ratas cíclicas es estimulada significativamente por el antagonista muscarínico como son el 11{[2-[(dietilamino) metil]-1-piperidinil] - acetil}-5, 11 dihidro-6 H-pirido (2,3-b) (Avisar et al, 1981) benzodiazepina-6-uno (AF-DX- 116) y la metoctramina (López-Ramírez et al., 2016). Dicha estimulación

depende del día del ciclo estral en que se realice el tratamiento. Es posible que los efectos inducidos por la administración de estos fármacos sean mediados por mAChR del subtipo M4. El bloqueo de los efectos de los antagonistas muscarínicos solo fue posible en presencia de prazosin, (un antagonista α -adrenérgico). Una posible explicación para la estimulación de la liberación de GnRH por un antagonista muscarínico es que los efectos sean el resultado de una intercomunicación entre los mAChR y los receptores α -adrenérgicos. Así, los agonistas muscarínicos inhibirían la liberación de GnRH inducida por los agonistas α -adrenérgico y los antagonistas muscarínicos, al cancelar este efecto inhibitorio permite que los agentes α -endógenos (noradrenalina) induzcan la liberación de GnRH (Koren et al., 1992).

En ratas ovariectomizadas, la inyección en el tercer ventrículo de 20 a 100 mg de sulfato de atropina (2 μ l) redujo significativamente las concentraciones plasmáticas de LH. La inyección intraventricular de 20 mg de acetilcolina indujo un incremento significativo de la concentración de LH durante los 5 minutos siguientes a la inyección, mientras que la concentración de FSH se elevó 30 minutos después de la inyección. El bloqueo de los receptores dopaminérgicos con pimozide previene los incrementos en las concentraciones plasmáticas de LH y FSH, así como la disminución de PRL inducidos por la inyección intraventricular de acetilcolina. La supresión de la liberación de LH inducida por sulfato de atropina fue revertida y ocurrió una elevación en los animales que fueron tratados con el bloqueador de los receptores dopaminérgicos. La inyección de sulfato de atropina no tuvo efectos sobre las altas concentraciones de PRL en los animales tratados con pimozide. Estos resultados apoyan la idea de un papel estimulante de la acetilcolina sobre la liberación de las gonadotropinas e inhibitorio sobre la liberación de PRL, indicando que el control colinérgico podría ser por medio de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (Vuayan y McCann, 1980).

En ratas con inyección subcutánea de sulfato de atropina realizada a las 13 horas del estro se produce una disminución significativa en la expresión relativa del ARN mensajero de la GnRH medida a las 9:00 h del diestro-2 en POA-AHA, por lo que estos datos aportan más evidencia de que la ACh al unirse a sus mAChR regula de manera estimulante la ovulación (Arteaga, 2005)

En neuronas en cultivo celular de hipotálamo, provenientes de ratas en cada fase del ciclo estral, se analizó el papel funcional de los receptores nicotínicos y muscarínicos en la liberación de la GnRH. La activación de los m1AChR incrementa la liberación de GnRH al medio, mientras que la activación de los m2AChR inhibe la liberación de GnRH. Un efecto semejante se ha observado cuando se ponen a incubar las eminencias medias de ratas adultas con antagonistas muscarínicos como el AF-DX 116 o la metoctramina, lo que implica que los m2AChR inhiben la liberación de GnRH, efectos que varían durante el ciclo estral, siendo el día más sensible la fase de estro (Koren et al., 1992).

En estudios previos se ha demostrado que la ACh regula de manera estimulante la ovulación, que cambia durante el ciclo estral, ya que en el día del estro, el implante en el lado derecho de POA-AHA produce el bloqueo de la ovulación, mientras que en el diestro-2, el implante del lado izquierdo produce este mismo efecto (Cruz et al., 1989). La inyección subcutánea de LHRH sintética, a las 14:00 h del proestro esperado, en ratas con implante de ATR en el lado derecho de POA-AHA a las 13:00 h del estro provocó que todos los animales ovularan, lo que sugirió que el bloqueo de los receptores muscarínicos (mAChR) induce inhibición de la secreción preovulatoria de la GnRH (Cruz et al., 1992).

Recientemente se ha mostrado que también la inyección de ATR (62.5 ng disueltos en un μ L de agua), durante un minuto en uno u otro lado de POA-AHA, a las 13:00 h del estro provoca el mismo efecto asimétrico sobre la ovulación (Espinoza-Valdez et al., 2016; Santana, 2016) que ya había sido observado por los implantes.

Marcadores de Actividad Neuronal

La localización de poblaciones neuronales metabólicamente activas en diferentes regiones del cerebro es evaluada al detectar por inmuno-histoquímica (IHQ) o por retro-transcripción de la cadena de la polimerasa reversa (RT-PCR) la expresión de los llamados genes tempranos inmediatos o IEGs (por sus siglas del inglés :Immediate **E**arly **G**enes), especialmente Fos y Jun (Sagar et al., 1988, Hoffman et al., 1993). La transcripción de estos genes se induce rápidamente sin necesidad de la síntesis de proteínas, y muchos IEGs codifican factores de transcripción que inducen a genes de respuesta tardía, por lo que también son apropiados para actuar como efectores de la respuesta celular a largo plazo (Herschman, 1991; Segal y Greenberg, 1996).

Los IEGs, originalmente descritos en el campo de la regulación del crecimiento, son inducidos rápidamente por estímulos extracelulares y codifican proteínas que se requieren para los acontecimientos posteriores que se produzcan en la célula (Curran y Morgan, 1995).

La familia de proteínas Fos/Jun integran el activador de la proteína-1 (AP-1), que es el complejo del factor de transcripción que se une a sitios AP-1 (secuencia consenso: TGAC / GTCA) en los promotores de genes (Morgan, 1989). Los genes que codifican proteínas de la familia Fos y Jun son IEGs, debido a que se inducen muy rápidamente en respuesta a una variedad de estímulos. Esta expresión es transitoria, con cantidades de ARNm y proteínas que regresan a la normalidad a las pocas horas (McClung et al., 2004).

Los genes que contienen el complejo AP-1 son activados por el complejo de Fos / Jun, permitiendo de ese modo la expresión de los llamados genes de aparición tardía que codifican productos neuronales diferenciados tales como neurotransmisores (Krukoff, 1999).

El factor de transcripción AP-1 se compone de complejos diméricos formados entre los tres integrantes de la familia Jun (c-Jun, JunB, y Jun-D) y cuatro miembros de la familia Fos (c-Fos, fosB, Fra-1 y Fra-2). Estas proteínas comparten una región homóloga que contiene el dominio de unión a ADN básico y una cremallera de leucina (Hai y Curran, 1991).

Las proteínas Jun son capaces de formar homodímeros, mientras que las proteínas Fos sólo son capaces de formar complejos heterodiméricos con Jun. Tanto Jun y Fos contribuyen a la función de trans-activación del complejo AP-1, que estimula la transcripción mediante la unión a los elementos de AP-1 en las regiones potenciadoras y promotoras. AP-1 también puede reprimir la actividad de los genes a través de la interacción negativa proteína-proteína con otros factores de transcripción (Ransone y Verma, 1990; Kerppola y Curran, 1991).

El factor de transcripción AP-1 se ha implicado en diversos procesos celulares incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, y la función neural (Angel y Karin, 1991). La actividad de este factor de transcripción aumenta rápida y transitoriamente en respuesta a señales extracelulares en la mayoría de las células. Por lo tanto, se cree que AP-1 desempeñan un papel central en la transducción de señales mediante la reprogramación de la expresión génica (Korner et al., 1989).

Al analizar el gen temprano inmediato c-Fos se observó que se induce rápidamente por muchos estímulos extracelulares. Por lo tanto, la expresión de c-fos se ha propuesto como un marcador celular para la actividad neuronal (Kaczmarek y Chaudhuri, 1997; Sagar et al., 1988).

C-Fos es una proteína básica de cremallera de leucina que forma un heterodímero con la isoforma cJun, formando así un factor de transcripción AP-1 que se une el elemento de respuesta TPA en el promotor de los genes diana. C-Fos es un IEG que se activa rápidamente y de forma transitoria en la mayoría de los tipos de células. Es inducida por una variedad de factores de crecimiento, citosinas, neurotransmisores, y las señales hormonales, así como de estímulos del medio ambiente. A su vez, c-Fos controla una gran variedad de procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la supervivencia y la muerte. De todas las variaciones de las funciones celulares en las que está involucrado, el papel primario del c-Fos, en cualquier tejido dado, depende del tipo de célula y del tipo de estímulo (Shaulian y Karin, 2002; Wagner y Eferl, 2005).

En el gonadotropo la GnRH induce la activación de c-Fos (Ely et al., 2011). El análisis de la expresión de c-Fos en las neuronas GnRH comprobó que la actividad neuronal cambia drásticamente en el momento de la secreción preovulatoria de LH (Hoffman et al., 1990). En cambio, la expresión de c-Fos en las neuronas GnRH se mantiene ausente durante todas las etapas del ciclo estral, excepto en la tarde y noche del proestro. Aproximadamente la mitad de las neuronas GnRH se activaron en el área preóptica y el hipotálamo anterior; las neuronas GnRH situadas más anteriormente no expresaban Fos, lo que resulta en una estimulación global del 40% de las neuronas GnRH. Estos datos proporcionan evidencia directa de que la estimulación de las neuronas GnRH durante el proestro tiene lugar en los

cuerpos celulares de LHRH, e identifican la población específica de neuronas GnRH que se activan. (Lee et al., 1990).

La inyección de pentobarbital a las doce horas del proestro, impide la expresión de c-Fos en las neuronas GnRHérgicas así como la secreción preovulatoria de LH (Lee et al., 1990).

La expresión de c-Fos en las neuronas GnRHérgicas solo durante la tarde del proestro sugiere que la secreción preovulatoria de LH depende del aumento en las señales estimulantes en la neurona GnRH, y no de la sincronización de la actividad de las neuronas (Lee et al., 1990).

Δ -Fos

El factor de transcripción Δ -Fos o Fosb (también conocido como Fosb2 o Fosb) es un mediador importante de la plasticidad inducida a largo plazo en el cerebro por la exposición crónica a varios tipos de estímulos psicoactivos, incluyendo fármacos de abuso y el estrés. Una característica distintiva de Fosb es que, una vez inducida, persiste en el cerebro durante periodos de tiempo relativamente largos en ausencia de estimulación adicional (Nakabeppu y Nathans, 1991).

Δ Fosb es un miembro de la familia Fos, el cual es activado por factores de crecimiento y es una proteína nuclear de 338 aminoácidos que muestra 70% de homología con Fos, es una variante de empalme truncada en el extremo C del gen c-Fos (Rylski y Kaczmarek, 2004).

Al igual que el Fos, Fosb tiene un dominio básico de unión al ADN y una cremallera de leucina a través de la cual se dimeriza con las proteínas Jun para formar complejos de factor de transcripción de la proteína activadora 1 (AP-1), que regulan la expresión de muchos genes (Curran y Morgan, 1995; Rylski y Kaczmarek, 2004). A pesar de que carece de parte del dominio de trans-activación que se encuentra en el extremo C de Fos, lo que sugiere que está implicado en la regulación de la expresión génica. Además, estas proteínas muestran persistencia en el cerebro durante un período prolongado en comparación con todos los demás miembros conocidos de la familia Fos y Jun (Hope et al., 1994).

Se ha demostrado que varios tipos de perturbación crónica inducen las isoformas de 35 a 37 kDa de Fosb en el cerebro, y que, con cada tipo de estímulo, se inducen patrones de inducción específicos encada región (Bing et al., 1997).

Debido a que la presencia prolongada de Fosb se produce en ausencia de una inducción adicional de su ARNm (Chen et al., 1995), Fosb es un factor de transcripción estable (Hope et al., 1994b; Chen et al., 1997; Nestler et al., 2001; McClung et al., 2004).

JUSTIFICACIÓN

La ACh de POA-AHA a través de sus mAChR regula la ovulación de manera asimétrica en los días del estro y del diestro-2. En el día del estro, el bloqueo de los mAChR de POA-AHA derecha inhibe la ovulación. Aparentemente, este hecho resulta de la ausencia de la secreción fásica de la GnRH.

Además, la inyección subcutánea de SO₄-ATR a las 13:00 h del día del estro, resulta en la disminución de la expresión del ARNm de GnRH en ambos lados de POA-AHA, a las 13:00 h del diestro-2. Sin embargo, se desconoce cuánto de este ARNm es traducido a la proteína en el momento de la secreción fásica. Por lo que en este proyecto se evaluará a las 11:00 h del proestro predicho, la cantidad de GnRH en la parte anterior y medial del hipotálamo, que incluye a POA-AHA y al hipotálamo medio basal (HMB), en ratas con bloqueo de los mAChR del lado derecho de POA-AHA, realizado a las 13:00 horas del estro. Además, se cuantificará en cortes coronales de estas áreas, la cantidad de células inmunoreactivas a Δ -fosb, con el propósito de identificar las áreas donde se produjo un efecto por el bloqueo de los mAChR.

HIPÓTESIS

- Si la ACh unida a los mAChR del lado derecho de POA-AHA a las 13:00 h del estro regula la secreción GnRH, entonces el contenido de esta proteína disminuirá en la mañana del proestro esperado. Este efecto estará relacionado con un menor número de neuronas que expresan la proteína Δ -fosb en POA-AHA en la mañana del proestro.

OBJETIVO GENERAL

- Analizar los efectos del bloqueo de los mAChR del lado derecho de POA-AHA, llevado a cabo en el estro, sobre el contenido de la proteína GnRH e identificar cuáles son las zonas de POA-AHA en las que la actividad de las neuronas se modifica por el bloqueo muscarínico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- En cortes coronales de POA-AHA, cuantificar a las 11:00 h del proestro, el número de células que expresan la proteína Δ -fosb en animales intactos o microinyectados con vehículo o con atropina en POA-AHA derecha, a las 13:00 h del estro.
- En ambos lados de POA-AHA e HMB, cuantificar a las 11:00 del proestro, el contenido relativo de GnRH en animales intactos o microinyectados con vehículo o con atropina en POA-AHA derecha, a las 13:00 h del estro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas vírgenes de la cepa CIIZV de 3 meses de edad con peso corporal de 190 a 260 g, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas) y temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con libre acceso al alimento (Purina lab-chow 5001) y agua. Para conocer la duración de su ciclo estral se les realizó la toma de frotis vaginal diariamente, y se seleccionaron a las ratas que cumplieron dos ciclos consecutivos de cuatro días. En el día del estro fueron anestesiadas a las 12:15 pm con pentobarbital sódico (25 mg/kg peso) vía intra-peritoneal.

⇒ Microinyección en POA-AHA Derecha

Entre las 12:30-13.30 horas del día del estro, cada rata se colocó en un estereotáxico y se humedeció la zona dorsal de la cabeza con jabón quirúrgico; con una navaja Gillette se rasuró la piel, después se realizó una incisión de aproximadamente un cm de largo, posteriormente se procedió a limpiar el área con agua oxigenada para poder ubicar el punto de referencia Bregma (punto donde se unen los dos huesos parietales con el frontal) y se tomaron las coordenadas antero-posterior, lateral y ventral para obtener la ubicación de la zona de estudio, las coordenadas para alcanzar POA-AHA se seleccionaron con base en el Atlas del cerebro de la rata de König y Klippel (1963), las cuales fueron: Antero-posterior (AP)= -0.4mm, Medio-lateral (ML)=-0.6mm, Ventral= -0.86mm. Por medio del uso de una fresa acoplada a un roto-motor odontológico (Dremel modelo 300, México) se perforó el cráneo y se introdujo una aguja 25G que se encontraba conectada a una jeringa Hamilton de 50 μl acoplada a una bomba de microinyección (CMA/100, Bioanalytical System, Carnegie Medicin). A cada rata se le administró en la porción derecha de POA- AHA un μl de agua estéril durante un minuto (grupo control) o un μl de atropina en solución a una concentración de 62.5 ng/ μl , durante un minuto (grupo con tratamiento). Una vez microinyectadas se les retiró la aguja y se les suturó la herida. Las ratas fueron llevadas al bioterio una vez que recobraron la movilidad. Transcurridas 24 horas de la cirugía, se reanudó la toma de frotis vaginales hasta el día del sacrificio. Como grupos testigo absoluto se utilizaron animales intactos sacrificados a las mismas horas que los tratados con atropina. La dosis de atropina fue seleccionada con base a estudios previos realizados por García (2007) y Santana (2016).

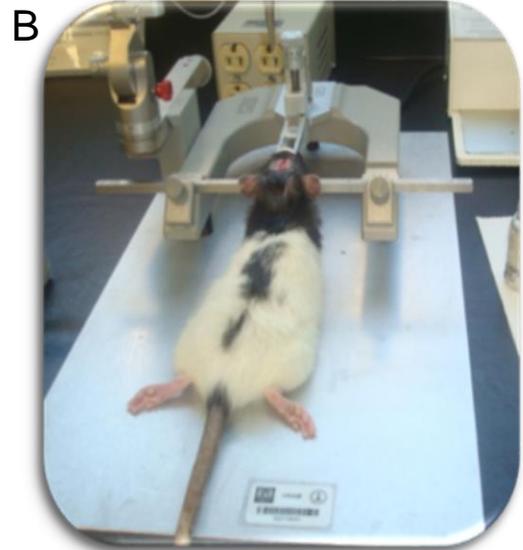
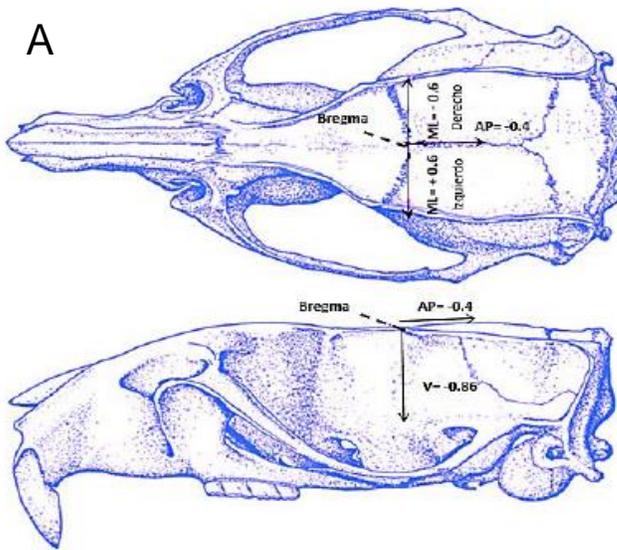


Fig. 10. **A:** Representación esquemática de la dirección de las coordenadas antero-posterior (AP), media lateral (ML) y ventral (V) en el cráneo de la rata, tomando como punto de referencia bregma. **B:** Fotografía de una rata montada en el estereotáxico para microinyección en POA-AHA.

- Inmunohistoquímica para Δ -Fosb.

Grupos de 3 ratas fueron sacrificadas en las horas y días del ciclo estral como se indica en la Tabla 1, para llevar a cabo el estudio distribución de la proteína delta-Fos (Δ -Fosb) por inmunohistoquímica en cortes coronales de la región de POA-AHA. Los grupos de animales intactos fueron sacrificados a las mismas horas que los tratados.

día y hora de la microinyección en POA-AHA derecha	solución microinyectada	día y hora del sacrificio
estro 12:30- 13:30 horas	agua estéril	11:00 proestro
	atropina	11:00 proestro

Tabla 1. Se muestra el día y la hora del ciclo en que animales micro-inyectados con vehículo o con atropina en POA-AHA derecha, a las 13:00 h del estro, fueron sacrificadas para el estudio de la distribución de la proteína Δ -Fosb en ambos lados de POA-AHA.

⇒ Perfusión

Se anestesiaron las ratas con 0.3 mL de pentobarbital sódico vía intra-peritoneal 15 minutos antes de efectuarse la perfusión, y se utilizaron 250 mL de solución salina y 250 mL de paraformaldehído al 4%, utilizando una bomba peristáltica (Mityflex 913, AnkoProducts) a una velocidad de 10 mL por minuto (Fig. 11).

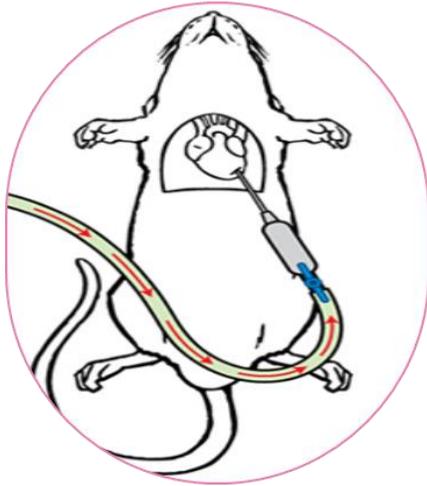


Fig. 11. Representación esquemática de la perfusión intracardiaca.

Una vez terminada la perfusión se extrajo el cerebro de la cavidad craneal, y con la ayuda de una matriz de corte coronal para rata, se seccionó la porción del hipotálamo a estudiar. Este segmento del hipotálamo se almacenó en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, y posteriormente se colocó en una solución de sacarosa al 20% durante 24 horas.

⇒ Cortes coronales en criostato

Con ayuda de tissue-tek® se montó el bloque de tejido nervioso de interés en la platina del criostato, y se realizaron cortes seriados de 50µm (Mycrom HN 505 N) a una temperatura de -22° C. Los cortes se almacenaron en los pozos de una caja de 12 pozos para cultivos celulares (Costar® 3516), que contenía 3mL de solución anticongelante (ver Anexo). Los cortes así almacenados fueron mantenidos a -20° C hasta el momento en que se realizó la inmunohistoquímica.

⇒ Inmunohistoquímica por flotación

Se transfirieron los cortes de la solución anticongelante a una caja petri con PBS, se seleccionaron un máximo de 10 cortes por cerebro y se pusieron en una caja de 12 pozos que contenía 3.5 mL de PBS 0.1 M por pozo y una malla que contuvo los cortes. Se pusieron en agitación durante 10 minutos, se realizaron cuatro lavados con PBS+ tritón en agitación durante 10 minutos por cada lavado, después se incubaron durante 10 minutos con una solución de peróxido de hidrogeno al 1% (H₂O₂) y se realizaron cuatro lavados con PBS+ tritón.

Una vez terminados los lavados, se incubaron con borohidruro de sodio al 1% durante 8 minutos y se hicieron lavados con PBS (0.1 M) hasta que desaparecieron las burbujas que se generan por este procedimiento, cambiando la solución cada 5 minutos. Después se lavaron con PBS+ tritón cuatro veces más en agitación durante 10 minutos.

La fase de bloqueo se llevó a cabo durante 2 horas, en agitación constante, a temperatura ambiente, en una solución denominada solución de bloqueo, que contenía PBS (0.1 M), 3% de suero normal y 3% de albumina. Terminado el tiempo, se incubó con el anticuerpo primario (FosB) en una dilución 1:1000 en la solución de bloqueo durante 24 horas en agitación a -4° C. Posteriormente se dejaron a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados durante 10 minutos con PBS + tritón. El anticuerpo secundario se incubó a temperatura ambiente durante dos horas en agitación, en una dilución 1:2000 en la solución de bloqueo. Transcurrido el tiempo, se llevó a cabo la incubación con la solución Avidina/Biotina del kit de vector durante una hora, a temperatura ambiente y se hicieron cuatro lavados con PBS + tritón durante 10 minutos, se tiñeron con diaminobencidina entre 3-10 minutos y se inactivó la reacción con agua destilada.

⇒Montaje

Los cortes de cerebro se colocaron en portaobjetos magnetizados y se dejaron secar. Un día después, se agregó solución de montaje, la cual se dejó secar, y la deshidratación se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito en la Tabla 2:

Agua	Alcohol 50%	Alcohol 70%	Alcohol 70%	Alcohol 90%	Alcohol 90%	Alcohol 96%	Alcohol 96%	Alcohol 100%	Xilol	Xilol
2 min	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min	2 min	5 min	10 min

Tabla 2.-Procedimiento utilizado para deshidratar los cortes de cerebro con inmunohistoquímica para Δ Fosb; en ella se muestran el tiempo y las concentraciones de alcohol etílico utilizados.

Una vez realizada la deshidratación se fijaron las laminillas con resina y cubreobjetos.

- Cuantificación de células inmunoreactivas

Las fotografías de los cortes de cerebro se captaron con un microscopio Nikon Eclipse E400 que tenía adaptada una cámara Nikon Digital SIGTHDM-7Mv y con el software Kodak NIS-Elements. Para conocer las zonas de activación o desactivación de la porción de POA-AHA, se seleccionó un corte representativo de la parte anterior, central y posterior. Las fotos obtenidas fueron modificadas con el programa Photoshop, donde se convirtieron a blanco y negro y se hizo un ajuste de brillo y contraste. La cuantificación de las células producto de la inmunoreacción, se realizó con el programa ImageProcessing and Analysis in Java (ImageJ). Para obtener la cuantificación relativa de toda el área de POA-AHA se utilizó el método de Abercrombie 1946).

- Cuantificación de GnRH

- ⇒ Obtención de las muestras

Tres grupos de 8 animales intactos, microinyectados con vehículo y atropina fueron sacrificados por decapitación a las 11:00 h del proestro esperado. Inmediatamente después de la decapitación, se obtuvo el cerebro y se depositó en solución salina (0.9% NaCl) fría (0° C). En frío, el cerebro se colocó en una matriz de metal y se disecó el lado izquierdo y derecho de la porción del hipotálamo, que incluye a POA-AHA y al hipotálamo medio basal (HMB). Las cuñas extraídas fueron depositadas dentro de un tubo Eppendorf de 1.5mL y expuestas a congelación rápida en nitrógeno líquido. Se procedió a calcular el peso de los tejidos extraídos.

- ⇒ Extracción y cuantificación total de proteínas

Para la extracción de proteínas de los tejidos, se realizó el cálculo del volumen de buffer de lisis (RIPA) que requirieron los tejidos extraídos de la porción hipotalámica, manteniendo la relación de 100 mg de tejido/1 ml de buffer de lisis; a los tejidos con peso menor a 25µg (se agregó 25µL), tejidos con peso entre 25 a 50µg (se agregó 50µL) y tejidos con peso entre 50 a 100 µg (se agregó 100 µL del buffer).

Una vez añadido el buffer de lisis, se homogenizó el tejido con un homogenizador manual. El tejido totalmente disgregado, se dejó reposar por 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 45 minutos a -4°C. Del tubo centrifugado se separó el sobrenadante del pellet, al cual se le midió el volumen en µL y se guardó en un nuevo tubo eppendorf a -70°C, al igual que el pellet. Se preparó una solución de 100µL de sobrenadante a una concentración de 1:50 (2µL de sobrenadante + 98 µL de agua estéril).

Con la alícuota preparada se realizó una curva de concentraciones de 25, 50, 100, 150, 200, 400 y 800 µg/µL a partir de ampollitas de albúmina con una concentración de 2mg/mL. Se realizó una curva patrón en una placa de 96 pozos, colocando en la primera

columna 25µL de las soluciones preparadas de albúmina a diferentes concentraciones, en la segunda columna un duplicado de esta curva. En la tercera columna se colocó 25µL de las muestras de la porción del hipotálamo diluidas a una concentración de 1:50. Dependiendo del número de muestras a analizar, fue el número de filas que fueron ocupadas. Todas las muestras problema se colocaron por triplicado.

La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico, la cual fue preparada a partir de 1 parte de la solución A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico, tartrato de sodio en una solución de hidróxido de sodio 0.2 N) disuelta en 50 partes de la solución B (sulfato de cobre 4%). Se agregaron 200µL de la solución AB a todos los pozos en donde se colocó una muestra para evaluar. La placa se cerró, se agitó levemente y se mantuvo a temperatura ambiente durante 40 minutos, tiempo en el cual la reacción ocurre, expresando un producto colorimétrico. Posterior a esto, se midió la absorbancia de los pozos a 540 nm con un espectrofotómetro multipozos (MultiSkanGo, Thermo Fisher Scientific, USA) y se calculó el valor del coeficiente de determinación (r^2) para la ecuación de la recta lineal. Se consideró como confiable a todas aquellas curvas patrón que tuvieran un coeficiente de determinación igual o mayor a 0.98 ($r^2 \geq 0.98$). Los valores de concentraciones ajustadas de proteínas totales para las muestras evaluadas, se obtuvieron mediante la sustitución del valor de la absorbancia en la ecuación obtenida.

⇒ Electroforesis SDS-PAGE

La concentración de proteínas para correr en electroforesis se estableció en 50 µg, por lo que se realizaron los cálculos para cada una de las muestras analizadas, a fin de conocer el volumen del sobrenadante que será requerido para tener dicha concentración. La muestra para cargar se preparó en un tubo Eppendorf de 1.5mL, disolviendo el volumen calculado para 50 µg del sobrenadante. Finalmente se añadió 15 µL de Laemmil buffer o buffer de carga (Anexo 1). El tubo eppendorf se agitó en un vórtex y se colocó en flotación a baño maría durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se transfirió inmediatamente a frío en hielo y se dejó reposar durante 10 minutos. Completado esto, la muestra estaba lista para cargar y correr.

Las muestras se cargaron en geles de 18 carriles a una concentración de poliacrilamida de 4 a 15%. El volumen empleado para cada carril fue de 30 µL. En el primer carril utilizado, se cargó 5 µL de Benchmark, que es un marcador visible de peso molecular, mientras que el último carril fue cargado con 5 µL del marcador de peso molecular infrarrojo, no visible, de nombre Magicmark. Los geles se montaron en una cámara de electroforesis vertical la cual fue conectada a una fuente de poder, inmersos en buffer de corrida (Anexo 1), y se corrieron a 150 V, durante 45 minutos.

⇒ Western blot

Una vez que las proteínas han sido separadas de acuerdo con su peso molecular, se desmontó el gel y se realizó el sándwich para la transferencia (cassette-esponja-papel filtro-gel-membrana de nitrocelulosa-papel filtro-esponja-cassette) en dirección cátodo- ánodo.

La transferencia de las proteínas desde el gel hacia la membrana de nitrocelulosa se realizó dentro de una cámara de transferencia, inmersa de buffer de transferencia (Anexo 1) y transferida a 100V durante 30 minutos. La transferencia se mantuvo a baja temperatura, con un sistema de enfriamiento dentro de la cámara de transferencia, y rodeado de hielo. Cuando la transferencia llegó a su fin, el sándwich se desmontó y la membrana de nitrocelulosa se colocó dentro de un contenedor de plástico oscuro con 15 mL de solución de bloqueo (Anexo 1). La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas o blot, permaneció en la solución de bloqueo en movimiento constante sobre un agitador y a baja temperatura 72 h. En el momento que terminó el tiempo de bloqueo, la membrana se retiró del cuarto frío y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se desechó la solución de bloqueo y se añadieron 15 mL de una solución de anticuerpo primario para GnRH en conejo policlonal a una concentración de 1:100. El blot se incubó a temperatura ambiente durante 2h en movimiento constante. Posteriormente, se recolectó la solución en un tubo cónico de 50mL y se guardó dentro de un congelador - 20°C para su posterior uso. El blot se lavó en cuatro ocasiones continuas con 15 mL de buffer de lavado (Anexo 1) a temperatura ambiente y movimiento constante durante 10 minutos cada uno. Todos los volúmenes de buffer de lavado se desecharon una vez concluido su uso.

Al término de los cuatro lavados, se agregó 15mL de solución de anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a un fluorocromo de 880nm a una concentración 1:10,000. Se dejó incubar por un día en cuarto frío y a movimiento constante. Veinticuatro horas después, el anticuerpo se recolectó en un tubo cónico y se guardó a -20°C. Se realizaron cinco lavados de 15 mL cada uno, con buffer de lavado a movimiento constante. Cuando concluyó el quinto lavado, se agregaron 15 mL de una solución PBS 1x (Anexo 1) y se mantuvo en temperatura ambiente a movimiento constante durante 10 minutos. Es de gran importancia cuidar que, en todas las etapas, la membrana permanezca húmeda. El blot se leyó en un equipo Odyssey CLx Imaging System (LI-COR Biosciences, EU) a una longitud de onda de 800 a 900nm. La imagen se analizó, ubicando la banda para GnRH de dos pesos moleculares: GnRH de 7.6 kDa y GnRH 10kDa. La banda para la proteína de interés (GnRH) se analizó mediante densitometría para la obtención de los valores en unidades arbitrarias de las concentraciones de la proteína para las condiciones evaluadas. Este procedimiento se realizó con los mismos blots, para la evaluación de la GnRH y para la proteína constitutiva o proteína control: β -tubulina. Para este último, la solución del anticuerpo primario anti tubulina policlonal se añadió a una concentración de 1:10,000; mientras que el anticuerpo secundario anti-conejo se preparó a una concentración de 1:15,000. La banda de β -tubulina se observa a los 56KDa.

- **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos del número de células inmureactivas a Δ -Fosb (ir- Δ -Fosb) y del contenido de GnRH fueron analizados por la prueba de Análisis de Varianza Múltiple, seguido por la prueba de Tukey. Estas pruebas se realizaron con el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.05.

RESULTADOS

El conteo de las células inmunoreactivas a Δ -Fosb (ir- Δ -Fosb) se efectuó en los cortes coronales del área donde se realizó la microinyección y en las zonas anterior y posterior a está. Las referencias anatómicas seleccionadas para la zona anterior fueron la comisura anterior (CA) y al quiasma óptico (QO), la cual correspondió a 400 μ m aproximadamente. En la región de la microinyección, la zona medial, la referencia anatómica fue el QO, la que correspondió a 300 μ m. La parte posterior, se refirió al estar presente el tracto óptico (TO), en 400 μ m. En la figura 1A se pueden observar los cortes representativos de cada zona en la que se contó el número de células ir- Δ -Fosb. En la figura 1B se muestra la microfotografía a 40X donde se observan las neuronas con inmunoreacción a Δ -Fosb, y en la figura 1C se presentan neuronas que no fueron expuestas al anticuerpo para la proteína Δ -Fosb (el control negativo).

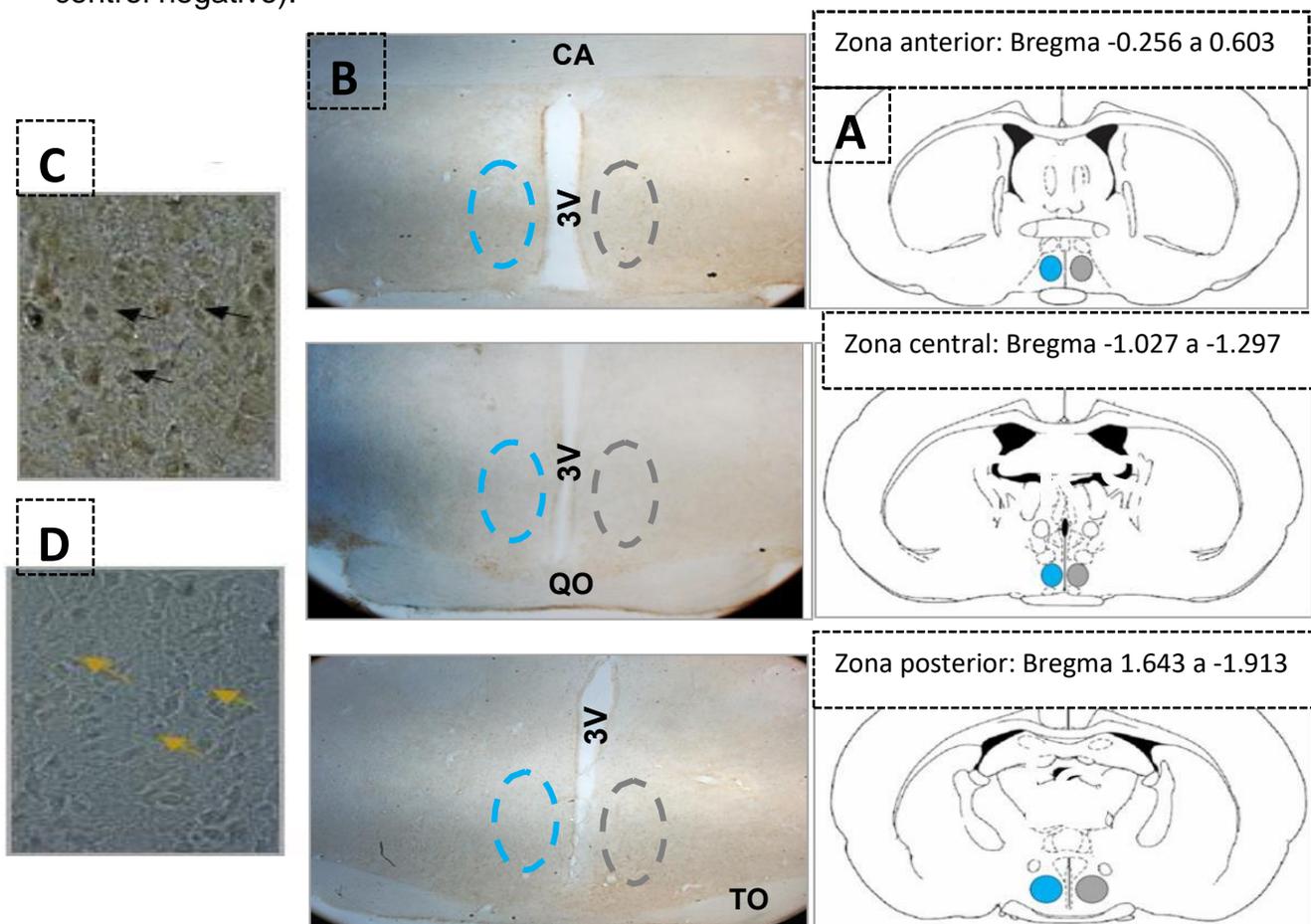
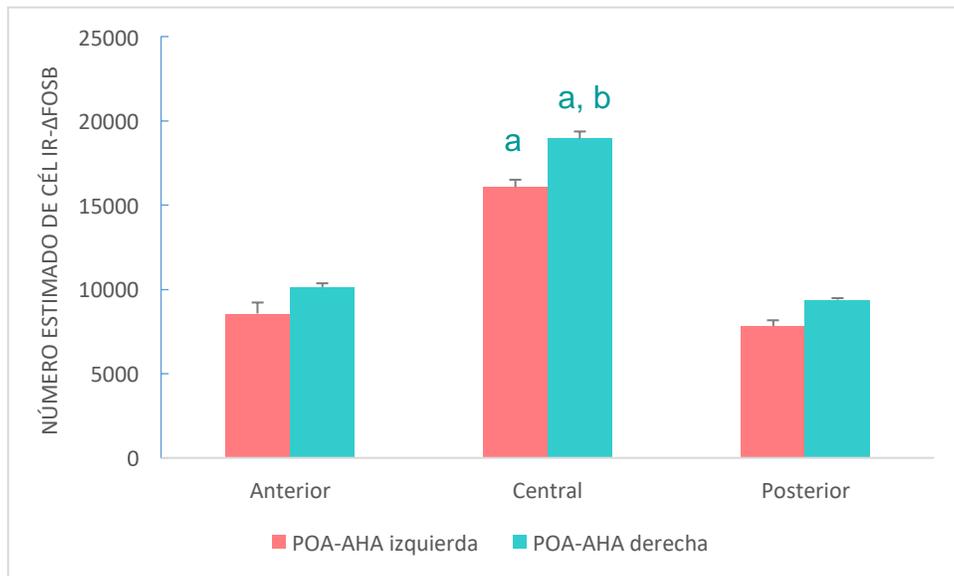


Fig.1. A: Esquemas del corte coronal del cerebro de rata en la zona anterior, central y posterior de POA -AHA, obtenidas del atlas de Paxinos (1998), donde se muestra con un círculo la región anterior, central y posterior del lado derecho (círculo azul) o izquierdo (círculo gris) de POA-AHA, así como el ancho de cada región donde se realizó el conteo de las células ir- Δ -Fosb, con base en las coordenadas conforme al punto Bregma. B: Microfotografía a 40X donde se muestra el área analizada en un corte con inmuno-reacción para Δ -Fosb. C: Microfotografía a 40X donde se muestra con flechas negras las células con inmunoreacción a Δ -Fosb. D: Microfotografía a 40X del control negativo donde se señalan con flechas doradas las células sin inmuno-reacción. CA. Comisura anterior; 3V tercer ventrículo; QO. Quiasma óptico y TO tracto óptico.

- Células ir- Δ -Fosb

La cuantificación de células ir- Δ -Fosb mostró que en un animal intacto, a las 11:00 h del proestro, la cantidad de células en la región central de POA-AHA es de 8532 neuronas más que en las regiones anterior y posterior (zona central: 17506 vs zona anterior: 9343, zona posterior: 8604, $p < 0.01$). En estas dos últimas regiones, la cantidad de células es semejante. En la región central, el número de células ir- Δ -Fosb es mayor en el lado derecho que del lado izquierdo de POA-AHA (18952 ± 415 vs. 16060 ± 440 , $p < 0.05$) (Gráfica 1).



a, $p < 0.01$ vs. del mismo lado de la región anterior y posterior de POA-AHA; **b**, $p < 0.05$ vs. POA-AHA izquierda (ANOVA seguida de la prueba de Tukey)

Gráfica 1. Número de células ir- Δ -Fosb en POA-AHA del lado izquierdo y derecho del cerebro de la rata, cuantificadas en animales sin tratamiento (Intactas) a las 11:00 h del proestro.

Zona anterior

La microinyección de vehículo en el lado derecho de POA-AHA a las 13:00 h del estro provocó aumento en el número de células ir- Δ Fosb en el lado izquierdo de POA-AHA, mientras que la microinyección de atropina resultó en el aumento de células pero en el lado derecho (Gráfica 2).

En la fig. 2 se muestran las fotografías representativas de los resultados antes descritos.

POA-AHA DERECHA POA-AHA IZQUIERDA

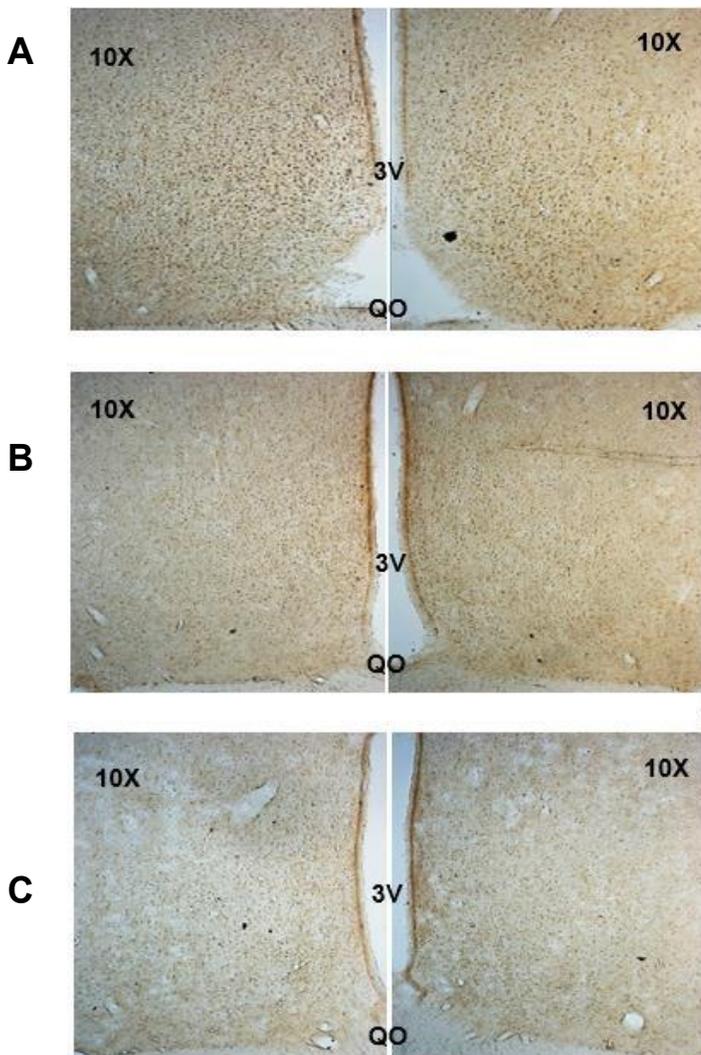
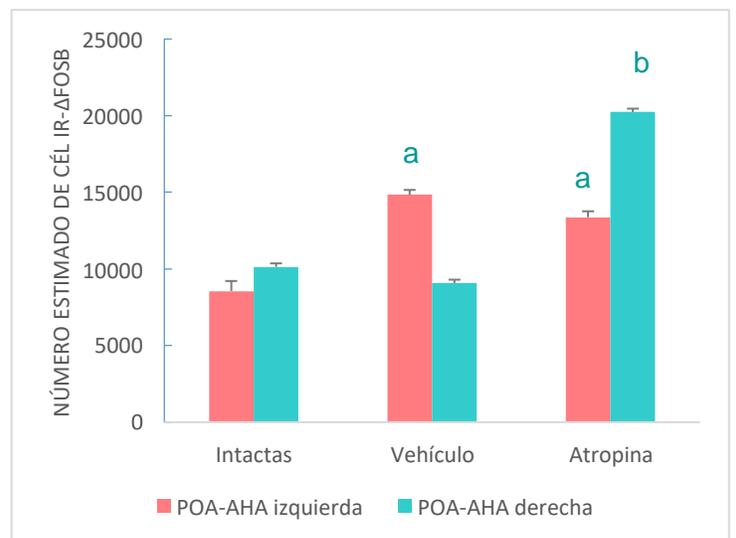


Fig. 2 Microfotografías representativas de la expresión al Δ Fosb en neuronas de la región de POA-AHA. Las fotografías del lado izquierdo corresponden a POA-AHA derecha y las del lado derecho a POA-AHA izquierda, tomadas a 10x. **A** animal intacto, animal microinyectado con vehículo y **C**. animal microinyectado con atropina. **3V**: Tercer ventrículo; **QO**: Quiasma óptico.



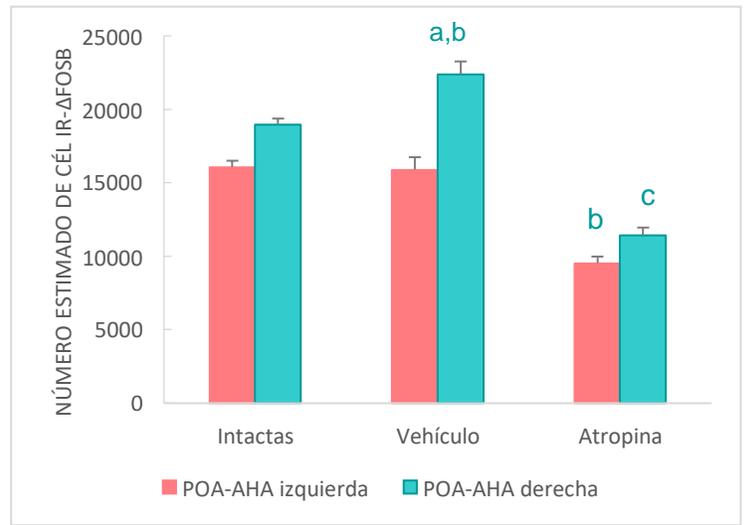
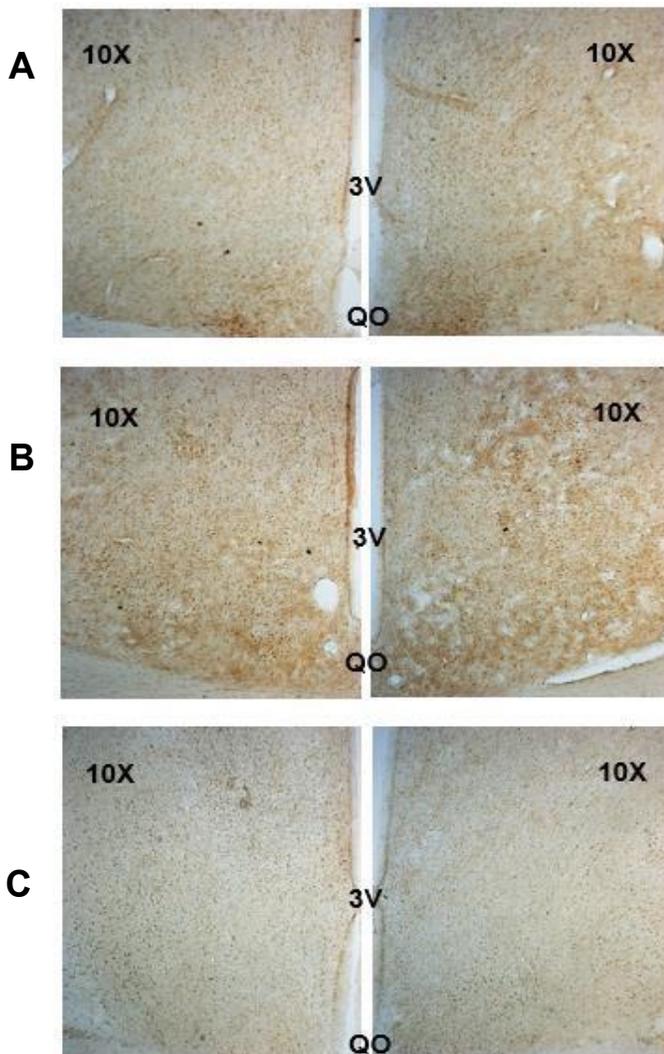
a, $p < 0.001$ vs. intactas del mismo lado
b, $p < 0.001$ vs. vehículo del mismo lado

Gráfica 2. Número de células ir- Δ Fosb en la zona anterior de POA-AHA izquierda y derecha, a las 11:00 h del día del proestro de animales intactos o microinyectados con vehículo o atropina en el lado derecho de POA-AHA derecha a las 13:00 h del estro

Zona Central

En la región central, zona donde entra la aguja de microinyección, el vehículo provocó aumento del número de células ir- Δ -Fosb en el mismo lado de POA-AHA en el que se inyectó el vehículo, así como con el lado opuesto. El bloqueo de los mAChR provocó disminución en el número de células ir- Δ -Fosb en ambas porciones de POA-AHA (Grafica3). De tal forma que en el lado izquierdo de POA-AHA hay 6365 menos neuronas activadas (intacto: 16060 \pm 440; vehículo: 15895 \pm 845 vs. atropina: 9530 \pm 443, $p < 0.001$), mientras que en el lado derecho hay 10966 (intacto: 18952 \pm 415; vehículo: 22378 \pm 880 vs. atropina: 11412 \pm 534, $p < 0.001$).

POA-AHA DERECHA POA-AHA IZQUIERDA



a $p < 0.05$ vs. intactas POA-AHA derecha
 b, $p < 0.01$ vs. vehículo POA-AHA izquierda
 c, $p < 0.001$ vs. vehículo POA-AHA derecha

Fig. 3 Microfotografías representativas de la expresión al Δ - Fosb en neuronas de la región de POA-AHA. Las fotografías del lado izquierdo corresponden a POA-AHA derecha y las del lado derecho a POA-AHA izquierda, tomadas a 10x. **A** animal intacto, **B**. animal microinyectado con vehículo y **C**. animal microinyectado con atropina. **3V**: Tercer ventrículo; **QO**.Quiasma óptico.

Grafica 3. Número de células ir- Δ -Fosb cuantificadas en la parte medial de POA-AHA a las 11:00 h del proestro en animales intactos o microinyectados en POA-AHA derecha con vehículo o atropina a las 13:00 h del estro.

Zona posterior

La microinyección de vehículo no provocó cambios en el número de células ir- Δ -Fosb en POA-AHA. En cambio, la atropina disminuyó la cantidad de células en la porción derecha de POA-AHA (Gráfica 4).

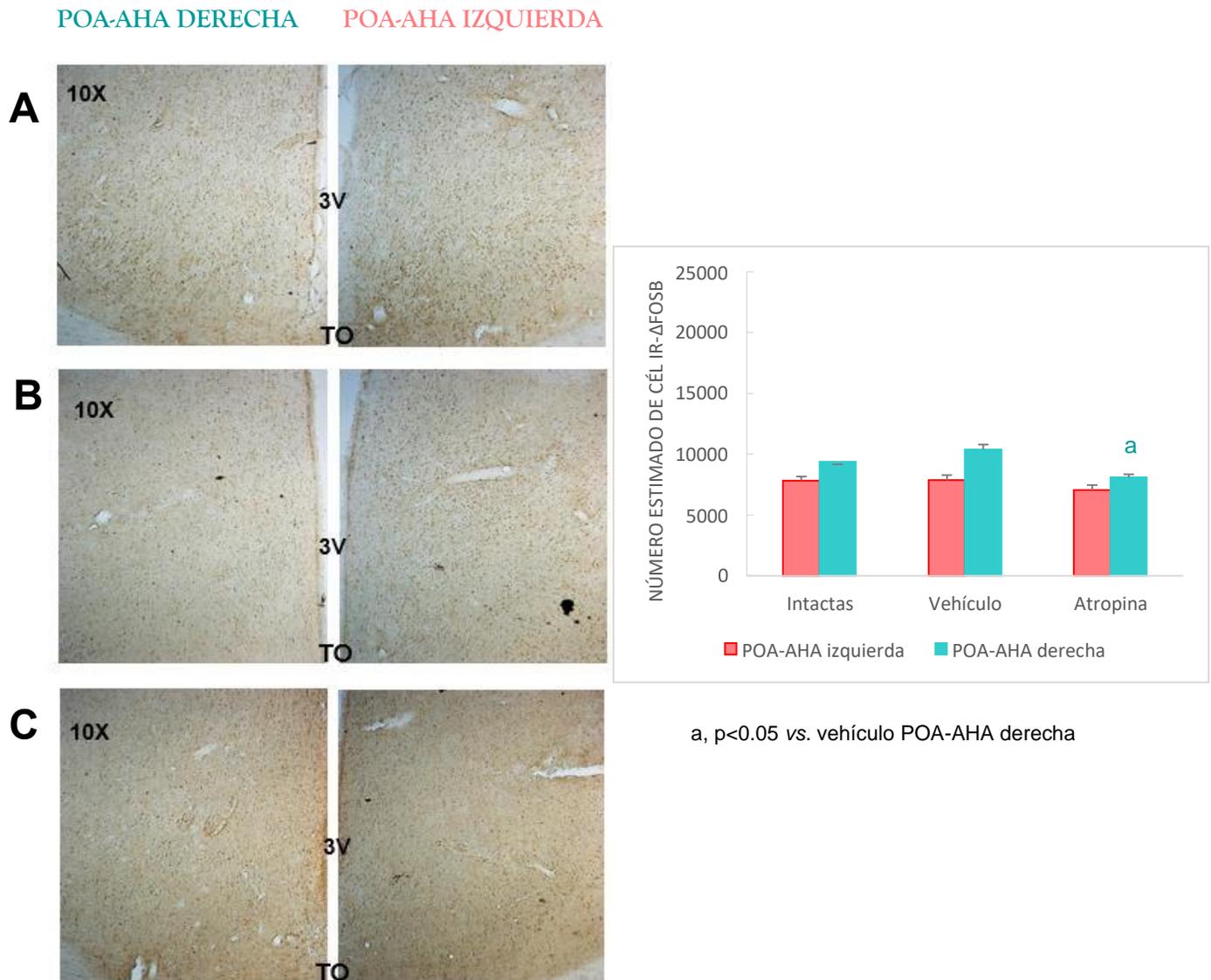
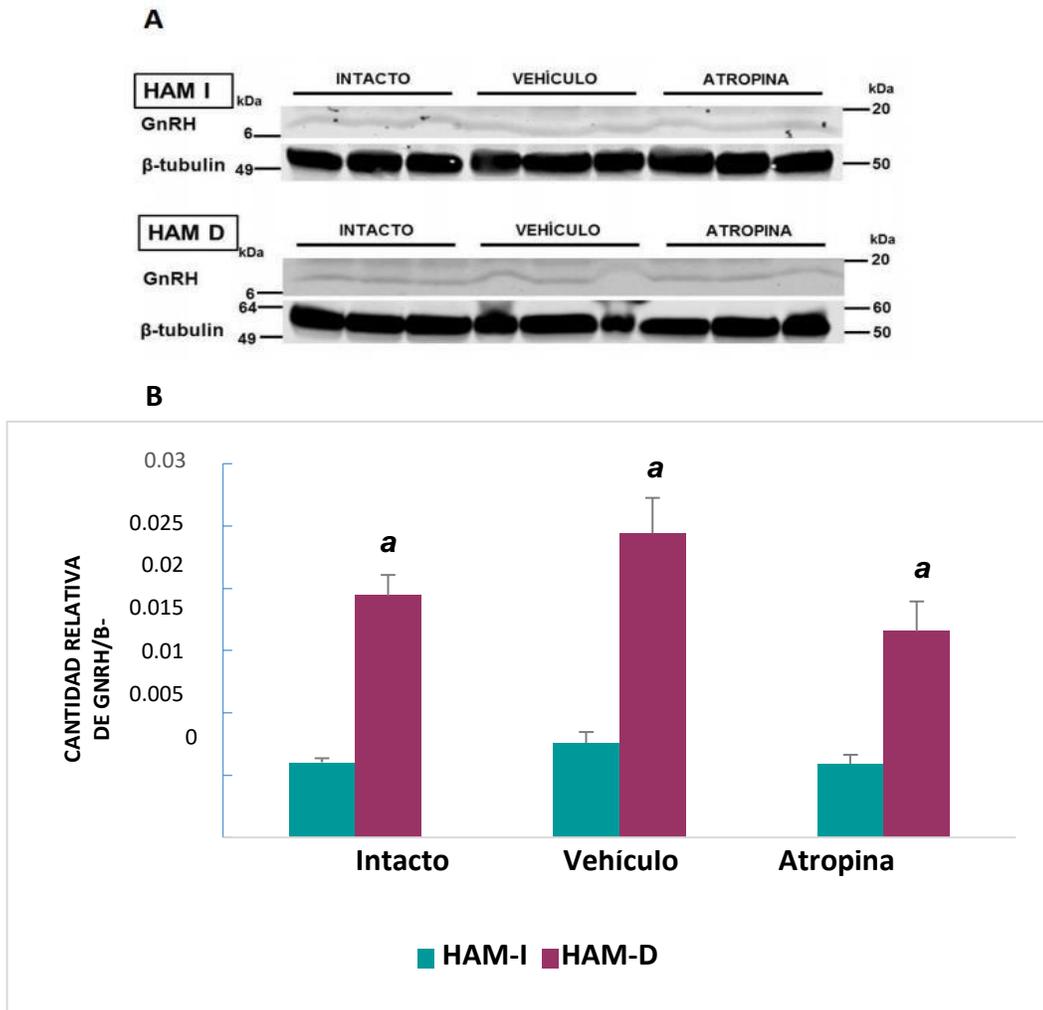


Fig. 4 Microfotografías representativas de la expresión al Δ -Fosb en neuronas de la región de POA-AHA. Las fotografías del lado izquierdo corresponden a POA-AHA derecha y las del lado derecho a POA-AHA izquierda, tomadas a 10x. **A** animal intacto, **B**. animal microinyectado con vehículo y **C**. animal microinyectado con atropina. **3V**: Tercer ventrículo; **TO**: Tracto óptico.

Gráfica 4. Número de células ir- Δ -Fosb en la zona posterior de POA-AHA a las 11:00 h del proestro en animales intactos o microinyectados con vehículo o atropina en POA-AHA derecha, a las 13:00 h del estro.

- Cuantificación de GnRH

En ratas sin tratamiento (intactas) sacrificadas a las 11:00 h del proestro, el contenido de la proteína de GnRH es mayor en el HAM del lado derecho que del izquierdo (Gráfica 5). La microinyección de vehículo o de ATR en la porción derecha de POA-AHA en el día del estro, no provocó modificaciones en el contenido de la proteína con respecto a los animales intactos (Gráfica 5).



Gráfica 5. Contenido relativo de la proteína GnRH cuantificada a las 11:00h del proestro, en las porciones izquierda y derecha del hipotálamo anterior- medial (HAM) de ratas intactas, o microinyectadas con vehículo o atropina a las 13:00h del estro. **A:** se muestra las bandas de cada punto experimental (constituido por tejido hipotalámico de 8 ratas) del blot organizado para la porción izquierda y derecha de HAM, de la proteína GnRH (7.5 kDa) y beta-tubulina (proteína constitutiva). **B:** se muestra en forma gráfica el análisis densitométrico obtenido de los blots para cada grupo experimental.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que a las 11:00 h del proestro, el contenido de GnRH en el hipotálamo antero-medial, así como la expresión del gen Δ -Fosb en POA-AHA es mayor en el lado derecho, y que ACh al unirse a los mAChR localizados en POA-AHA derecha, regula de manera estimulante la liberación fásica de GnRH, así como la actividad de las neuronas de la región central de POA-AHA.

En el animal íntegro, la actividad neuronal a las 11:00 h del día del proestro es alta en la zona central de la región POA-AHA, ya que el número de células ir- Δ -Fosb es mayor en la parte central que en la anterior y posterior. En función de la expresión del gen cFos, las neuronas GnRHérgicas de POA-AHA están activas de las 15:30 a 22:00 h del proestro (Lee et al., 1990). Con base en los resultados de Lee et al. (1990), nuestros resultados podrían sugerir que la actividad neuronal de las 11:00 h ocurre en otro tipo de neuronas presentes en el lecho de la neurona GnRH, como podrían ser las kispetidérgicas, GABAérgicas, colinérgicas, glutamatérgicas, vipérgicas, serotoninérgicas, entre otras.

La asimetría en el número de células ir- Δ -Fosb en la zona central, es otro hecho más que demuestra la función asimétrica de POA-AHA y del hipotálamo en los mecanismos de regulación de las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Gerendai et al., 1978; Nance et al., 1984; Cruz et al., 1989; Espinoza, 2016 y Santana, 2016) (Fig. 5).

El aumento en el número de células ir- Δ -Fosb a 732 μ m de donde se inyectó el vehículo sugiere que neuronas del centro de POA-AHA regulan la actividad de otras localizadas en el área preóptica medial (MPOA) (Fig. 5). Anatómicamente, el POA se continúa dorsalmente con el macizo del núcleo de la estría terminal, el cuál entra a POA en su parte más anterior (Haymaker et al., 1969). Tanto el MPOA y AHA proyectan fibras de manera vertical y horizontal hacia la banda diagonal de Broca y al septum lateral (Ganten y Pfaff, 1981). Estas vías de conexión de POA-AHA explicarían que en la región opuesta al tratamiento aumentara el número de células ir- Δ -Fosb en las ratas inyectadas con el vehículo y nos lleva a sugerir que las fibras de un lado de POA-AHA decusen hacia la zona opuesta por la parte frontal del cerebro.

El aumento del número de células ir- Δ -Fosb en el lado derecho de la zona central de POA-AHA por la microinyección del vehículo podría estar relacionado con la respuesta a la cirugía (Fig. 5), ya que tanto lesiones como isquemia en el cerebro producen un aumento en la expresión de c-fos y Δ -Fosb (Dragunow y Robertson 1988 y Kumar et al., 1995). La expresión de la proteína c-fos en células gliales de la corteza parietal de rata ocurre a la hora de la lesión, y es máxima a las 24 h después del trauma (Verrier, 1986). Por lo tanto, el incremento en Δ -Fosb podría estar relacionada con la división de células gliales con la finalidad de regenerar el axón o dendritas de la zona después del daño neuronal (Morrison, 1987). La ausencia de cambios en el número de células ir- Δ -Fosb en la zona posterior sugiere que en el cerebro hay ciertas regiones que presentan mayor susceptibilidad al daño y su respuesta al mismo (Bing y col., 1997).

El incremento del número de células ir- Δ -Fosb en la parte anterior de POA-AHA, en ratas con atropina, permite sugerir que habitualmente la ACh unida a los mAChR de la porción central de POA-AHA regularía de manera inhibitoria la actividad de diferentes neuronas localizadas en su parte anterior, cuya vía de comunicación sería ipsilateral (Fig. 5).

La ACh unida a los mAChR localizados en las neuronas de la parte central de POA-AHA regula de manera estimulante su actividad, ya que la microinyección de atropina disminuyó el número de células ir- Δ -Fosb. Un 50% menos de células ir- Δ -Fosb parecería comprometer la ovulación en el día del estro esperado. Finalmente, la disminución del número de células ir- Δ -Fosb en la zona posterior de POA-AHA en las ratas tratadas con atropina nos lleva a sugerir la ACh unida a los mAChR del centro de la zona de estudio, regula de manera estimulante la actividad de las neuronas que se localizan en la parte caudal de POA-AHA. También nos lleva a sugerir que la conexión de neuronas en una y otra parte de POA-AHA sería ipsilateral (Fig. 5).

Gerendai et al. (1978) ya habían mostrado que en el hipotálamo medio basal de la rata adulta el contenido de GnRH era mayor en el lado derecho que en el izquierdo. Posteriormente, Arteaga-López et al. (2003) mostraron que la expresión relativa del ARNm de la GnRH era mayor en el lado derecho de POA-AHA, y que esta asimetría ocurría entre las 09:00 h del día del diestro-2. En el ratón hembra adulto, el número de neuronas GnRH en el lado derecho del cerebro es mayor que en el izquierdo (Inase y Machida, 1992). Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman los resultados previamente descritos, y muestran que habitualmente, a las 11:00 horas del proestro, el contenido de GnRH es asimétrico, ya que el contenido de esta proteína es mayor en el lado derecho del hipotálamo anterior y medio basal que en el izquierdo.

El bloqueo de los mAChR del lado derecho de POA-AHA, realizado a las 13:00 h del estro, interrumpe la ovulación esperada en el día del estro del ciclo siguiente (Cruz et al., 1989; Santana, 2016). La microinyección de atropina en el mismo momento del ciclo estral inhibió la secreción preovulatoria de LH a las 17:00 h del proestro (Santana, 2016). Estos resultados llevaron a sugerir que la secreción (síntesis y liberación) de la GnRH era regulada de manera estimulante por los mAChR de la región derecha de POA-AHA (Cruz et al., 1989; Cruz et al., 1997; Santana, 2016). Los resultados de nuestro estudio apoyan esta idea, pero demuestran que la ACh unida a los mAChR del lado derecho de POA-AHA, a las 13:00 h del estro estimula la liberación de la GnRH y no la síntesis. Esta idea se apoya en el hecho que el contenido de GnRH no se modifica por la inyección de la atropina. Nuestro argumento se apoya por los resultados obtenidos por Cruz et al. (1997) y Santana (2016) quienes, al inyectar GnRH sintética, a ratas con bloqueo de los mAChR, a las 14:00 h del proestro, se inducen la ovulación (Fig. 5).

Queda por estudiar en un futuro en ¿qué tipo de neuronas actúa la ACh? Turi et al. (2008) mostraron por inmunohistoquímica afinidades colinérgicas en aposición con neuronas GnRH de MPOA. Sin embargo, se desconoce si estas neuronas expresan los mAChR, y si expresan los cinco subtipos o algunos de ellos. También es posible que actúe en algún otro tipo de neurona que conforma el lecho de la neurona GnRH (Herbison, 2015).

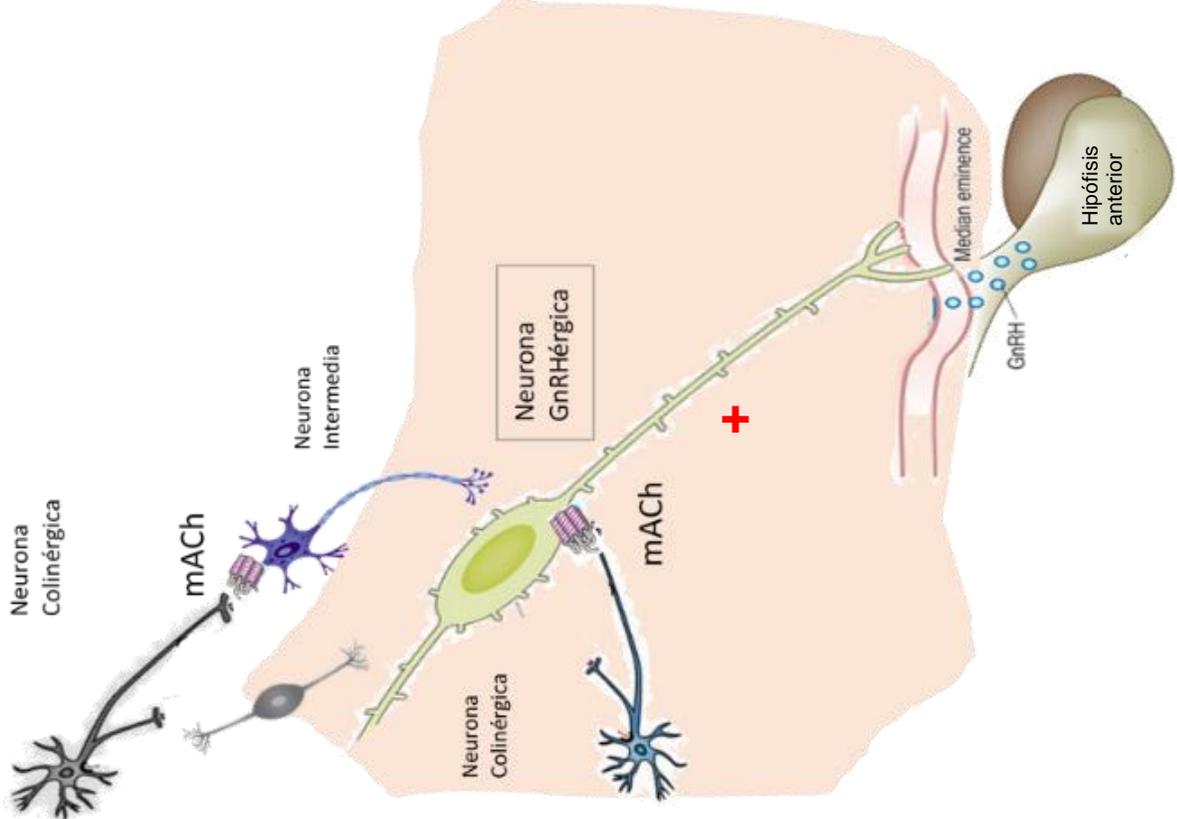
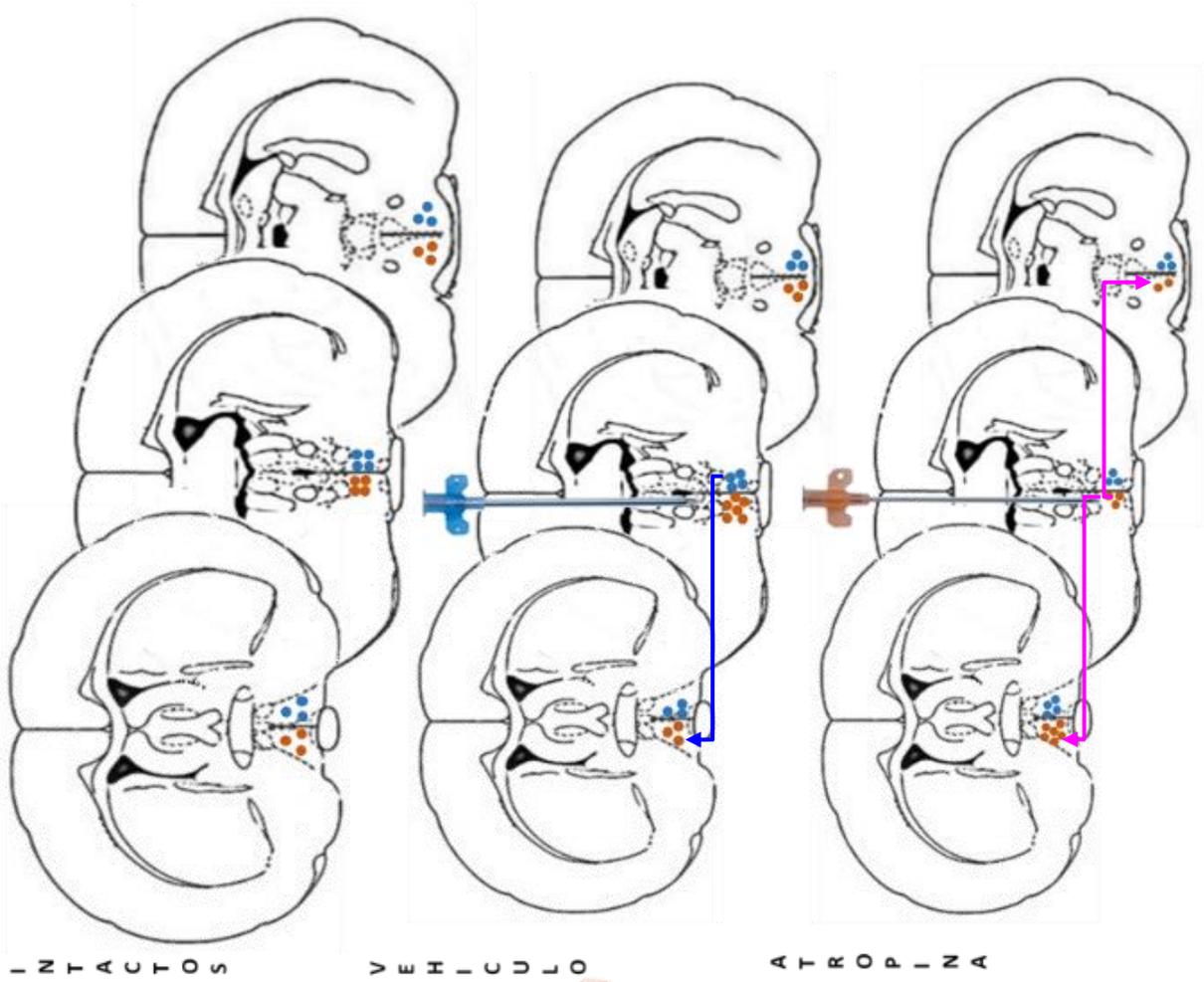


Fig. 5. Modelo conceptual hipotético del efecto de la ACh unida a los mACHr del lado derecho de POA-AHA a las 13:00h del estro, sobre la actividad funcional de las neuronas localizadas en POA-AHA y la secreción preovulatoria de la GnRH. Puntos rojos (neuronas ir- Δ -Fosb de POA-AHA izquierda), puntos rojos (neuronas ir- Δ -Fosb de POA-AHA derecha), flecha azul (decusación de fibras), flechas magenta (comunicación ipsilateral), signo + (estimulación).

CONCLUSIONES

- ⇒ Los resultados de este estudio nos llevan a concluir que a las 13:00 h del estro, la ACh unida a los mAChR del lado derecho de POA-AHA, regulan de manera estimulante la actividad de las neuronas de la región central y posterior de POA- AHA en la mañana del proestro esperado y que,
- ⇒ La ACh unida a los mAChR del lado derecho de POA-AHA, regulan de manera estimulante la liberación de la GnRH en el día del proestro.

BIBLIOGRAFÍA

- Abercrombie M. (1946). Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec.* 94: 239-247.
- Álvarez A., Pérez H., De la Cruz T., Quincosa J. y Sanchez A. (2009). *Fisiología animal aplicada*. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. Pp. 104.
- Ángel P. y Karin M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell- proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1072 (2-3): 129-57.
- Arteaga López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Mendoza-Rodríguez CA, Cruz ME. (2003). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine.* 21: 251-60.
- Arteaga López P.R. (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. Para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- Avisar S., Egozi Y. y Sokolovsky M. (1981). Studies in muscarinic receptors in mouse and rat hypothalamus: A comparison of sex and cyclical differences. *Neuroendocrinology.* 32(5): 295-302.
- Baba Y., Matsuo H. y Schally A. (1971). Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun.* 44(2): 459-463.
- Baños JE y March M. (2002). *Farmacología ocular*. 2da edición. Ediciones de la Universidad Politecnica de Cataluña.España. Pp. 181.
- Barry J. (1979). Immunohistochemistry of luteinizing hormone releasing hormone-producing neurons of the vertebrates. *Int Rev Cytol.* 60: 179-221.
- Bing G., Wang W., Qi Q., Feng Z., Hudson P., Jin L., Zhang W., Bing R. y Hong JS. (1997). Long-term expression of Fos-related antigen and transient expression of delta FosB associated with seizures in the rat hippocampus and striatum. *J Neurochem.* 68: 272- 279.
- Bonner TL., Young AC., Bran MR. y Burckley NJ. (1988). Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron.* 1: 403-410.

-
-
- Caulfield MP. (1993). Muscarinic receptors: characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther.* 58(3): 319–379.
 - Charli JL., Ponce G. y Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de las neuronas LHRGérgicas hipotalámicas. En: *Tópicos selectos de la biología de la reproducción*. Editado por Domínguez R. UNAM-Porrúa. México. Pp. 59-85.
 - Chen J., Nye HE., Kelz MB., Hiroi N., Nakabeppu Y., Hope BT. y Nestler EJ. (1995). Regulation of DFosB and FosB-like proteins by electroconvulsive seizure and cocaine treatments.) *Molec Pharmac.* 48(5): 880–889.
 - Cruz ME., Jaramillo LP. y Domínguez R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of cyclic rat. *J Endocrinol.* 123: 437–439.
 - Cruz ME., Castro J. y Domínguez R. (1992). A 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 Endocrinol.* 133: 205-210.
 - Cruz ME., Arteaga PR., Huerta-Delgadillo M., Sánchez MA. y Domínguez R. (1997). Differences in acetylcholine content, binding and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Med Sci Res.* 25: 823-825.
 - Curran T. y Morgan JI. (1995). Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol.* 26(3): 403-12.
 - Dohanich GP., Witcher JA., Waever DR. y Clemens LG. (1982). Alteracion of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Research.* 241(2): 347-350.
 - Domínguez R. y Cruz ME. (1989). Different effects of unilateral lesions of the hypothalamus on the spontaneous ovulation in intact and hemiovariectomized adult rat. XVI Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción.
 - Domínguez R., Rioboni L., Zipitria D. y Revilla R. (1982). Is the cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat?. *J Endocrinol.* 95(2): 175-180.
 - Dragunow M. y Robertson HA. (1998). Localization and induction of c-fos protein-like immunoreactive material in the nuclei of adult mammalian neurons. *Brain Research.* 440: 252-260.

-
-
- Egozi Y. y Kloog Y. (1985). Muscarinic receptors in the preoptic area are sensitive to 17 beta-estradiol during the critical period. *Neuroendocrinology*. 40(5): 385-392.
 - Egozi Y., Kloog Y. y Sokolovsky M. (1986). Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrus cycle. *Brain Research*. 383: 310- 313.
 - Ely HA., Mellon PL. y Coss D. (2011). GnRH induces the c-Fos gene via phosphorylation of SRF by the calcium/calmodulin kinase II pathway. *Mol Endocrinol*. 25(4): 669–680.
 - Espey L. (1999). Ovulation. En: Knobil E. y Neill JD. *Encyclopedia of Reproduction Vol. III*. Academic Press. USA. Pp. 605–614.
 - Espinosa-Valdez A., Flores A., Arrieta-Cruz I., Cárdenas M., Chavira R., Domínguez R. y Cruz M.E. (2016). The participation of the muscarinic receptors in the preoptic- anterior hypothalamic areas in the regulation of ovulation depends on the ovary. *Reprod Biol Endocrinol*. 14(1): 75.
 - Evans NP., Dahl GE., Glover BH. y 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.
 - Everett JW. (1949). Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in rat. *Endocrinology*. 43(6): 389- 405.
 - Everett JW., Sawyer CH. y Markee JE. (1949). A neurogenic timing factor in control of ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cycle rat. *Endocrinology*.44: 234- 250.
 - Fan NC., Peng C., Krisinger J. y 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 J*. 9: 619-625.
 - Felder CC., Bymaster FP., Ward J. y DeLapp N. (2000). Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem*. 43: 4333–4353.
 - Flores ME. y Segura JE. (2005). Estructura y función de los receptores a acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci*. 6(4): 315-326.
 - Freeman ME. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil E. y Neill D. *Physiology of reproduction*. 3a Ed. Academic Press. USA. Cap. 43. Pp. 2327-2330.

-
- Ganon WF. (2001). Regulación central de la función visceral. Fisiología Médica. Medina CA El Manual Moderno. Capítulo 14: 253-303.
 - Ganten y Pfaff. (1981). Current topics in Neuroendocrinology. Morphology of Hypothalamus and its connections. Springer-Verlag. Alemania. Pp. 161-163 y 197.
 - Gerendai I., Rotsztenjn W., Marchetti B., Kordon C. y Scapagnini U. (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. Neurosci Lett. 9(4): 333-336.
 - Gotti C., Fornasari D. y Clementi F. (1997). Human neuronal nicotinic receptors. Progress in Neurobiology. 53: 199-237.
 - Hai T y Curran T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. Proc Natl Acad Sci. 88: 3720-3724.
 - Herbison AE (2015). Physiology of the Adult Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. En: Knobil E, Neill JD. Physiology of Reproduction. Academic Press. USA. Cap.11. Pp. 413.
 - Herschman HR. (1991). Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. Ann Rev Biochem. 60: 281–319.
 - Hoffman GE., Lee S., Attardi B., Yann V. y Fitzsimmons M. (1990). LHRH neurons express c-fos after steroid activation. Endocrinology 126: 1736-41.
 - Hoffman GE., Smith, MS. Y Verbalis JG. (1993). C-fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol. 14: 173–213.
 - Hope HE., Nye MB., Kelz DW., Self MJ., Iadarola Y., Nakabeppu RS. y Nestler EJ. (1994). Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. Neuron. 13: 1235–1244.
 - Inase Y. y Machida T. (1992). Differential effects of right-sided and left-sided orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. Brain Res. 580 (1-2): 338-40.
 - Kaczmarek L. y Chaudhuri A. (1997). Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. Brain Res Rev. 23(3):237-256.
 - Kerppola TK. y Curran T. (1991). DNA bending by Fos and Jun: the flexible hinge model. Science. 256(5035):1210-1214.

-
- Klangkalya B. y Chan A. (1988). Inhibition of hypothalamic and pituitary muscarinic receptor binding by progesterone. *Neuroendocrinology*. 47(4): 294-302.
 - Koren D., Egozi Y. y Sokolovsky M. (1992). Muscarinic involvement in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat. *Molecular Cell Endocrinology*. 90(1): 87-93.
 - Korner M., Rattner A., Mauxion F., Ranjan S y Citri Y. (1989). A brain-specific transcription activator. 3: 563-572.
 - Krukoff TL. (1999). c-fos Expression as a Marker of Functional Activity in the Brain. En: Boulton A., Baker GB. y Bateson AN. *Cell Neurobiology Techniques*. Neuromethods. vol 33. Human Press. Pp. 213-230.
 - Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci*. 93(12): 5925-5930.
 - Kumar K., Wu XL., Evans, AT. y Marcoux F.(1995). Effect of hypothermia on induction of heat shock protein-72 in ischemic brain. *Metabolic Brain Disease*. 10(4): 283–291.
 - Lauber Ah. y Whalen RE. (1988). Muscarinic cholinergic modulation of hypothalamic estrogen binding sites. *Brain Research*. 443 (1-2): 21-26.
 - Lee W., Smith M. y Hoffman G. (1990). Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons express c-Fos during the proestrous LH surge. *Proc Natl Acad Sci*. 87: 5163-5167.
 - Lerner J. y Urbina M. (2008). *Fertilidad y Reproducción asistida*. Primera edición. Ed Médica Panamericana. Venezuela. Pp. 62-69.
 - Levine JE. (2015). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil E. y Neill JD. *Physiology of Reproduction*. Academic Press. USA. Cap.26. pp. 1200-1201.
 - Libertum C. y McAnn SM. (1973). Blockade of the release of gonadotropins and prolactin by subcutaneous or intraventricular injection of atropine in male and female rats. *Endocrinology*. 92: 1714-1724.
 - Matsuo H., Baba Y. y Nair RM. (1971). Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 43: 1334–1339.

-
-
- McClung C., Ulery P., Perrotti L., Zachariou V., Berton O. y Nestler E.(2004). DFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Molecular Brain Research* 132: 146–154.
 - Matsuo H., Arimura A. y Schally V. (1971). Synthesis of the porcine LH- and FSH- releasing hormone by the solid-phase method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 45 (3): 822-827.
 - McGeer PL., Eccles JC. y Mcgeer EG. (1987). *Molecular neurobiology of the mammalian*. 2da ed.Plenum Press U.S.A. P.p. 150.
 - Mesulam MM. (1995). Cholinergic pathways and the ascending reticular activating system of the human brain. *Ann NY Acad Sci*. 757: 169-79.
 - Montaner AD., Mongiat L., Luz-Lantos VA., Park MK., Fischer WH., Craig AG., Rivier JE., Lescheid D., Lovejoy D., Libertun C., Sherwood NM. y Somoza GM. (2001). Structure and biological activity of gonadotropin-releasing hormone isoforms isolated from rat and hamsters brains. *Neuroendocrinology*. 74:2-12.
 - Morgan JI. y Curran T. (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci*. 12:459-462.
 - Morrison, RS. (1987). Fibroblast growth factor: potential neurotrophic agents in the Central Nervous System. *J Neurosci Res*. 17(2): 99-101.
 - Nakabeppu Y. y Nathans D. (1991). A naturally occurring truncated form of FosB that inhibits Fos/Jun transcriptional activity. *Cell*. 64: 751-759.
 - Nance DM., Bhargava M. y Myatt GA.(1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Res Bull*. 13: 651-655.
 - Nestler EJ. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2(2):119–128.
 - Norris OD. y Carr JA. (1996). An overview of chemical regulation. *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press. Pp. 146-150.
 - Ojeda S. y Urbanski H. (1987). Puberty in the rat. En: E. Knobil J. y Neill ED. *The physiology of reproduction*. Raven Press. USA. Pp. 1697-737.
 - Palkovits M. (2000). Micro and Macroscopic structure, innervation, and vasculature of the hypothalamus. En: Freeman ME. *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Human Press. Pp.23-31.

-
- Pawson AJ., Morgan K. y Maudsley SR. (2003). Type II gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in reproductive biology. *Reproduction*. 126:271-278.
 - Prieto GB. y Velázquez PM. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. *Rev Fac Med UNAM*.45: 252-256.
 - Perry E., Walker M., Grace J. y Perry R. (1999). Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?. *TINS*. 22(6):273-80.
 - Rainbow TC., Dejroff V., Luine V. y McEwen B. (1980). Estradiol-17b increases the number of muscarinic receptors in hypothalamuc nuclei. *Brain Research*. 198: 239- 243.
 - Rajkovich A. y Choi Y. (2006). Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Reprod Biol Endocrinol*. 63: 579-590.
 - Ransone J. y Verma IM. (1990). Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Rev Cell Biol*. 6:539-57.
 - Richmond JE. y Jorgensen ME. (1999). One GABA and two acetylcholine receptors function at the C elegans neuromuscular junction. *Nature Neuroscience*. 2: 791-797.
 - Rylski y Kaczmarek. (2004). Ap-1 targets in the brain. *Front Biosci*. 1(9): 8-23.
 - Sagar SM., Sharp FR. y Curran T. (1988). Expression of c-fosprotein in brain: Metabolic mapping at the cellular level. *Science*. 240:1328–1331.
 - Sánchez MA., Lopez-García JC., Cruz ME., Tapia R. y Dominguez R. (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic- anterior hypothalamic área during the oestrous cycle of the rat. *Neuroreport*. 5:433- 434.
 - Santana G. (2016). Participación de los ovaries en los efectos asimetricos de la acetilcolina en POA-AHA sobre la ovulación de la rata adulta. Tesis de Licenciatura. Biología. UNAM.
 - Schally AV., Arimura A. y Baba Y.(1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun*. 43: 393–399.
 - Schwanzel-Fukuda M., Bick D. y Pfaff DW. (1989). Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Research Molecular Brain Research*. 6: 311–326.
 - Segal RA. y Greenberg ME.(1996). Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci*. 19:463–489.

-
- Shaulian E. y Karin M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 4: E131–E136.
 - Silverman AJ., Levine I. y Within JW. (1994). The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. Cap.28. Pp. 1963-1709.
 - Speroff L., Glass RH. y Kase NG. (2006). *Clinical Gynecologic Endocrinology and fertility*. 7a edition. Williams and Wikins. USA. Pp. 502.
 - Stoelting RK. y Hillier SC. (1991). *Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice*. 4a edición. Lippincott Williams and Wilkins. USA. Pp. 217.
 - Südhof TC. (1995). The synaptic vesicle: a cascade of protein interactions. *Nature.* 375: 645-653.
 - Turi GF., Liposits Z. y Hrabovszky E.(2008). Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *Neurochemistry International.* 52(4–5). Pp. 723-728.
 - Velázquez L., Moreno A., Lizasoain JC., Leza JC., Moro MA. y Portolés A. (2008). *Farmacología básica y clínica*. 18a edición. Ed. Médica Panamericana. Argentina. Pp. 133-137.
 - Verrier B., Muller D., Bravo R. y Muller R. (1986). Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-fos proto-oncogene. *EMBO J.* 5(5): 913- 917.
 - Villegas G, Cruz ME, Dominguez-González, Chavira R. (1997). El bloqueo de los receptores muscarínicos inhibe la secreción preovulatoria de LH pero no la de FSH. En: *XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*.
 - Vuayán E. y McCann SM. (1980). Effect of blockade of dopaminergic receptors on acetylcholine (ACh)-induced alterations of plasma gonadotropin and prolactin (prl) in conscious ovariectomized rats. *Brain research Bulletin.* 5(1): 23-29.
 - Wagner EF. y Eferl R.(2005). . Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. *Immunol Rev.* 208: 126–140.
 - Wray S. y Hoffman G. (1986). Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. *Neuroendocrinology.* 43:93–97.
 - Wray S., Grant P. y Gainer H. (1989). Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci.* 86(20): 8132–8136.

•Yen SC., Jaffe RB. y Barbieri RI. (2001). Endocrinología de la reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico. Ed. Médica Panamericana. Argentina. 31-85, 195,196, 119-114.

Referencia electronica

<https://themedicalbiochemistrypage.org>

ANEXO 1 - PREPARACION DE REACTIVOS

Buffer de lisis RIPA 1x

- RIPA
- Tableta de inhibidores de fosfatasa y proteasas.

Laemmil buffer

Preparación para 500mL 6x

- 3mL de glicerol
- 1.2mg de bromofenol
- 680µL de mercaptoetanol
- 500mL de solución BC (50mL de BC (SDS-Tris-Glicerol) + 450mL de agua desionizada)

El Laemmil buffer o buffer de carga, debe de ser almacenado a temperatura ambiente y protegido de la luz directa (envuelto en papel aluminio).

Buffer de corrida

Preparación para 1L

- 100mL de Odyssey Blocking Buffer
- 900mL de agua desionizada

Se disuelven 100mL de Odyssey Blocking buffer en 900mL de agua desionizada. La solución se almacena en un contenedor de vidrio y puede ser utilizada a temperatura ambiente.

Buffer de transferencia

Preparación para 2L

- 28.8g de glicina
- 6.04g de Tris Base
- 400mL de Metanol
- 1600mL de H₂O destilada

Se añade el Tris Base dentro de un matraz kitasato de 3L con 1L de agua y con agitación por magneto. Una vez disuelto el Tris base, se añade la glicina y se espera a su disolución.

Se añaden los 600mL restantes de agua destilada al matraz kitasato, posteriormente se añaden 400mL de metanol e inmediatamente es sellada la boca del matraz con un corcho, evitando toda salida de los reactivos. La tubulatura lateral del matraz es conectada al vacío, a través de una manguera de látex. La solución se mantiene en agitación constante y a vacío, mientras sucede la desgasificación, durante 1h. Al terminar la desgasificación, se mantiene tapado el matraz y se enfría la solución. Cuando el buffer haya reducido su temperatura, estará listo para la transferencia.

Solución de bloqueo

Preparación para 500mL

- 250mL de PBS 1x
- 250mL de Blocking buffer Oddissey

La concentración final de la solución de bloqueo es de 1:1. Se agregan y disuelven dentro de un recipiente de vidrio. Pueden ser almacenados y utilizados a temperatura ambiente.

Solución de lavado

Preparación para 500mL de solución de lavado a 0.05% tween-20

- 500mL de PBS 1x
- 2.5mL de Tween-20

Medir los 500mL de PBS 1x en una probeta, vaciar en un recipiente de vidrio e introducir un magneto para mantener en agitación constante sobre una parrilla de agitación. El volumen de tween-20 se vacía dentro del recipiente en un contacto directo con el PBS, para evitar una pérdida del reactivo. La solución se mantiene en agitación hasta el momento en que el tween-20 haya sido disuelto. Esta solución de lavado puede ser mantenida y utilizada a temperatura ambiente.

Solución PBS 1x

Preparación para 500mL

- 50mL de solución PBS (Phosphate Buffered Saline) 10X (Fisher Scientific, USA)
- 450mL de agua desionizada

Se disuelve el volumen de PBS 10x en el agua desionizada. El PBS se almacena y se utiliza a temperatura ambiente