



Universidad Nacional Autónoma De México
Facultad De Estudios Superiores Zaragoza
Carrera De Biología

La participación de los receptores dopaminérgicos de la familia RDA-2 del área preóptica en la regulación de la ovulación de la rata adulta

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

Presenta:

ILSE JACQUELINE ROMERO VERA

Director de Tesis

Dr. Carlos Camilo Silva Méndez

Laboratorio de Investigación en Cronobiología de la Reproducción

Ciudad de México, Junio 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional Autónoma De México
Facultad De Estudios Superiores Zaragoza

Carrera De Biología

La participación de los receptores dopaminérgicos de la familia RDA-2 del área preóptica en la regulación de la ovulación de la rata adulta

T E S I S

Que para obtener el título de

B I Ó L O G A

Presenta:

ILSE JACQUELINE ROMERO VERA

Director de Tesis: **Dr. Carlos Camilo Silva Méndez**

Asesora: **M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez**

Asesor: **Dr. Roberto Domínguez Casalá**

Sinodal: **Dra. Elizabeth Vieyra Valdez**

Sinodal: **Dra. Juana Monroy Moreno**

Ciudad de México, Junio 2022





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CARRERA DE BIOLOGÍA
FORMATO F-5



OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
Presente

Le comunico que al alumno: **ROMERO VERA ILSE JACQUELINE** con número de cuenta **310257066** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **24 de Junio de 2022** a las **13:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DR. DOMINGUEZ CASALA ROBERTO	
VOCAL	DR. SILVA MENDEZ CARLOS CAMILO	
SECRETARIO	MTRA. FLORES RAMIREZ ANGELICA	
SUPLENTE	DRA. MONROY MORENO JUANA	
SUPLENTE	DRA. VIEYRA VALDEZ ELIZABETH	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

La participación de los receptores dopaminérgicos de la familia RDA-2 del área preóptica en la regulación de la ovulación de la rata adulta

En la modalidad de: **TESIS**

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CDMX, a 18 de Mayo de 2022

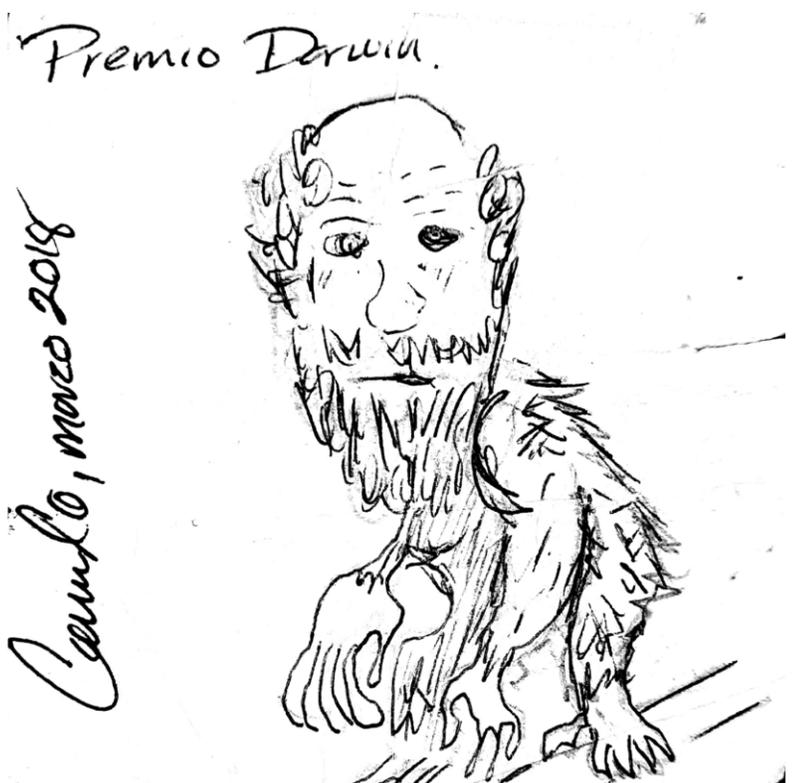
DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD

DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto: 236908; el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, proyecto: IN 216015; el Programa de Beca de titulación-extemporáneos 2019-2020 de la Dirección de Becas y Enlace a la Comunidad, UNAM, folio: 75004; y el apoyo del Programa de Ayudante de Investigador del Sistema Nacional de Investigadores por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), expediente de investigador: 938 y de ayudante: 15721.

“Todas las grandes hazañas y todos los grandes pensamientos tienen un comienzo ridículo”.



DEDICATORIAS

Para mi **Galo**, aunque sea un cliché, eres el motor, el combustible y la grúa que me permitió llegar hasta acá. Aún eres muy pequeño para entender lo grandiosa que es tu presencia en mi vida, pero debes saber que tus ojitos y sonrisa fueron y son la inspiración para esforzarme a ser un mejor ser humano, este trabajo es por y para ti. Espero que cuando puedas comprenderlo te sientas orgulloso de tu madre, te amo con todo mi ser cachingüis.

A ti **Romerote**, porque esos regresos a casa escuchando al explicador determinaron lo que quería “ser de grande”, para mi **Verita**, espero que ahora puedas estar tranquila y que veas el fruto de tus jalones de oreja y baños de realidad. Para ambos, porque siempre han sido el ejemplo más grande de esfuerzo y superación. Sin su guía, apoyo y paciencia hubiera abandonado este sueño hace 7 años. Espero que la vida nos alcance para llenarlos de orgullo y retribuirles, aunque sea un poco de todo lo que me siguen dando.

A **Cristian**, sin importar nuestras circunstancias eres parte de este largo recorrido y de mi llegada a la meta, gracias infinitas pangolín.

Para **Cecy y César** pues su paciencia, apoyo y cariño se convirtieron en un pilar importante de este proceso, gracias por darme un lugar y recibirme con amor en su familia.

Para **mis hermanos** que aún a la distancia son fuente de inspiración y admiración. Esli ¡tu fortachona lo logró!

Para el **LIC**.

AGRADECIMIENTOS

Por supuesto que a todos los de arriba y a **YHWH**...

A **Camilo**, por abrirme la puerta al verdadero mundo de la ciencia. Gracias por todo el conocimiento científico y no científico, por confiar, por ayudarme a cumplir este objetivo, por la paciencia infinita y, sobre todo, gracias por poner la vara alta.

A la **Maestra Angy** por leerme la mente con la mirada y darme el aliento y apoyo cada vez que lo necesitaba. Al **Dr. Roberto** por el conocimiento transmitido y por la beca, sin esta, hubiera sido difícil seguir. A ambos, por el tiempo y las aportaciones que me brindaron para mejorar este trabajo.

A las **Dras. Juanita y Ely** por formar parte de mi sínodo y el tiempo valioso que invirtieron en mi trabajo, gracias por cada una de sus aportaciones enriquecedoras.

A **Linda y Carlos**, llegaron como un golpe de suerte a mi vida. No saben lo agradecida que estoy con ambos por todo lo que vivimos dentro y fuera del laboratorio.

Carlos gracias por todo el apoyo en el trabajo y por reírte, cuando seguro querías colgarme, de los Jimmys que hice durante el proceso. Gracias por escucharme y ser realista cuando nadie más lo era, por ponerme los pies en la tierra. Por todos los raites llenos de música, de pláticas o de silencio cuando era necesario. Gracias por tu amistad.

Linda, mi persona, gracias por el apoyo sin fin que me has dado, por escucharme hablar mil veces de las mismas cosas durante estos años. Por hacerme un huequito en tu bonita familia, por tus consejos y regaños, pero sobre todo por no juzgarme y permitirme ser yo misma cuando estamos juntas. Gracias infinitas grillito de Mulán.

A **Cintia y Gina**, gracias por enseñarme gran parte de lo que sé, por toda la paciencia que tuvieron en el proceso. Gracias por todas las risas, hicieron que acoplarme al laboratorio fuera más sencillo y que el trabajo siempre fuera ameno.

A **Fer** por todas las pláticas fuera de la UMIEZ, por las risas, por todas las palabras de aliento cuando creía que no podía y por los consejos que hacían cambiar mi perspectiva; por tu amistad que es tan bonita.

Moni gracias por siempre enseñarme y explicarme con esa sonrisa y buena vibra que te caracteriza. Gracias por ser el 4to miembro del LIC cuando era necesario.

A **Joanna, Trini, Paty, Luis y don Chava**, gracias por hacerme un cachito en sus corazones y su familia, su cariño ha sido reconfortante.

Al **LICR**, por los bonitos recuerdos que forjamos en estos años, por todo el crecimiento académico y personal.

A los **Dres. Adriana, Eli y Román** por todo el apoyo y el arduo trabajo que realizan en el bioterio, porque hacen que nuestros animales estén en óptimas condiciones y por todo el conocimiento que me transmitieron durante estos años.

A mis pequeñas, sobre todo a la rata 412, porque gracias a ella logré vencer el miedo de trabajar con roedores.

ÍNDICE

LISTA DE ACRÓNIMOS	1
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	2
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO.....	8
I. EL OVARIO	8
II. LA HIPÓFISIS	19
III. EL HIPOTÁLAMO.....	26
IV. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	36
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	51
HIPÓTESIS.....	52
OBJETIVOS.....	53
MATERIALES Y MÉTODOS	54
ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	58
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS	81
REFERENCIAS.....	82

LISTA DE ACRÓNIMOS

3-MT: 3-Metoxitiramina	L-DOPA: Dihidroxifenilalanina
3V: Tercer ventrículo	LH: Hormona Luteinizante
7-OH-DPAT: 7-Hidroxi-2-Aminopropilaminotetralina	LIF: Factor de Inhibidor de la Leucemia
aCSF: Líquido Ceforraquídeo Artificial	MAO: Monoamino Oxidasa
A1-A17: Grupos celulares de las catecolaminas	MAPK: Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos
AADC: Descarboxilasa de Aminoácidos Aromáticos	MB: Cuerpo Mamilar
AC: Comisura anterior	MHPA: 3Metoxi-4-Hidroxifenil Acetaldehído
AD: Alcohol Deshidrogenasa	Na: Sodio
AHA: Área Hipotalámica Anterior	NPY: Neuropeptido Y
ARC: Núcleo Arqueado	OCH: Quiasma Óptico
ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero	OVLT: Órgano Vasculoso de la Lámina Terminal
AVPv: Área Anteroventral Periventricular	P₄: Progesterona
BMP: Proteínas Morfogenéticas Óseas	PE: Núcleo Periventricular
Ca: Calcio	PGCs: Células Germinales Primordiales
cAMP: Adenosín Monofosfato Cíclico	PGI₂, PGE₂ y PGF₂: Prostaglandinas tipo I ₂ , E ₂ , F ₂
CIIZ-V: Campus II Zaragoza-Vencera	PH: Núcleo Hipotalámico Posterior
COMT: Catecol-O-Metil Transferasa	PKA: Proteína Cinasa A
CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina	PKC: Proteína Cinasa C
CYP19: Aromatasa, Citocromo P450 Familia19	PLC: Fosfolipasa C
DAG: Diacilglicerol	POA: Área Preóptica
DAT: Transportador de Membrana de la Dopamina	PV: Núcleo Paraventricular
DM: Núcleo Dorsomedial	RDA: Receptores Dopaminérgicos
DOPAC: 3,4-Dihidroxifenil Acético	RDA-1: Familia 1 de los Receptores Dopaminérgicos
DOPAL: 3,4-Dihidrofetil Acetaldehído	RDA-2: Familia 2 de los Receptores Dopaminérgicos
DP: Núcleo Premamilar Dorsal	SCH-23390: Halobenzazepina
E2: Estradiol	SCN: Núcleo Supraquiasmático
END: Endorfina	SKF 38393: Hidrobrimida
ENK: encefalina	SM: Núcleo Supramamilar
ERK: Cinasa Regulada por Señales Extracelulares	SM: Septum Medial
FF: Fluido folicular	SP: Sustancia P
FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos	TGF-β: Factor de Transformante de Crecimiento Beta
FSH: Hormona Estimulante de los Folículos	TH: Tirosina hidroxilasa
GABA: Ácido Gamma Aminobutírico	Vddb: Banda Diagonal de Broca
GAL: Galanina	VM: Núcleo Ventromedial
GDF-9: Factor de Crecimiento y Diferenciación 9	VMAT-2: Transportador Vesicular de Monoaminas del Tipo 2
GnIH: Hormona Inhibidora de las Gonadotropinas	VP: Núcleo Premamilar Ventral
GnRH: Hormona Liberadora de las Gonadotropinas	
HVA: Ácido Homovanílico	
IP3: Inositol Trifosfato	
K: Potasio	

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Anatomía general del ovario.

Figura 2. Desarrollo folicular.

Figura 3. Proceso de esteroidogénesis en el folículo preovulatorio y en el cuerpo lúteo.

Figura 4. Representación de la anatomía general de la hipófisis.

Figura 5. El sistema portal hipotalámico hipofisario y las células de la adenohipófisis.

Figura 6. Esquema de la división anatómica del hipotálamo.

Figura 7. Distribución de las neuronas de GnRH en el hipotálamo y su morfología.

Figura 8. Colocalización de las neuronas de GnRH con otros sistemas de neurotransmisión.

Figura 9. Vía clásica del metabolismo de la dopamina en el sistema nervioso central.

Figura 10. Grupos celulares que conforman las cuatro vías dopaminérgicas.

Figura 11. Estructura de los receptores dopaminérgicos.

Figura 12. Vías de señalización de las dos familias de receptores dopaminérgicos.

Figura 13. Posición de las cánulas y dispersión de las soluciones en el POA.

Figura 14. Porcentaje de animales cíclicos, de animales que ovularon y la mediana y el rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral.

Figura 15. Porcentaje de animales que ovularon en el grupo intacto, microinyectado con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o con Raclopride a las 09:00 h del día del estro, metaestro, diestro o proestro.

Figura 16. Mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por el grupo intacto y de los grupos tratados con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h del estro, metaestro, diestro o proestro.

Figura 17. Porcentaje de animales cíclicos, de animales que ovularon y mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados en el tercer ventrículo (3V) con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral.

Figura 18. Porcentaje de animales cíclicos, de animales que ovularon y mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados en el

Quiasma óptico (OCH) con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral.

Figura 19. Porcentaje de animales cíclicos, de animales que ovularon y mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados en el Núcleo supraquiasmático (SCN) con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral.

Figura 20. Porcentaje de animales cíclicos, de animales que ovularon y mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados en el Área retroquiasmática con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral.

Cuadro 1. Agonistas y antagonistas de los receptores dopaminérgico.

Cuadro 2. La media y el error estándar de la masa relativa de los órganos de los animales intactos o de aquellos microinyectados con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride, sin considerar la etapa del ciclo estral en la que se realizaron los tratamientos.

Cuadro 3. La media y el error estándar de la masa relativa de los órganos de los animales intactos o de aquellos microinyectados con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h del estro, metaestro, diestro o proestro.

RESÚMEN

La ovulación es regulada por la interacción del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovarios. En el hipotálamo, particularmente en el área preóptica (POA), se encuentran los somas de las neuronas de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). La secreción de la GnRH estimula la síntesis y la secreción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimulante de los folículos (FSH) por parte de los gonadotropos en la hipófisis anterior. La LH y la FSH, a su vez, estimulan las funciones ováricas: el crecimiento y maduración de los folículos, la síntesis de hormonas y la ovulación. Se ha descrito que las neuronas GnRHérgicas precisan de información directa o indirecta de otros grupos neuronales para llevar a cabo su función. La dopamina (DA) es uno de los neurotransmisores que se encuentran en estos grupos y actúa a través de dos familias de receptores, los RDA-1 y los RDA-2. La adición de DA al medio de cultivo de explantes de hipotálamo inhibe la secreción de la GnRH y la LH. En contraste, la inyección cerebroventricular de DA incrementa la concentración plasmática de la LH, lo que estimula la ovulación. Por otro lado, el bloqueo unilateral de ambas familias de receptores dopaminérgicos en el POA resulta en la inhibición parcial de la ovulación.

A partir de lo anterior, hipotetizamos que el bloqueo de los RDA-2 del POA a las 09:00 h de cada una de las etapas del ciclo estral resultará en el bloqueo de la ovulación. Para contrastar nuestra hipótesis, a ratas adultas y cíclicas de la cepa CIIZ-V se les implantó una cánula guía bilateral dirigida al POA. Posterior a la cirugía, una vez que cumplieron tres ciclos consecutivos de cuatro días, los animales fueron microinyectados con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o con Raclopride (12.5mg/mL) a las 09:00 h de cada una de las etapas del ciclo estral. Finalmente, se llevó a cabo la eutanasia a las 09:00 h del estro predicho inmediato y se evaluó el porcentaje de animales cíclicos, la tasa de animales que ovularon, el número de ovocitos liberados y la masa de los ovarios, el útero y las adrenales.

Los resultados mostraron que el bloqueo de los RDA-2 no modificó la tasa de ciclicidad ni de la tasa de animales que ovularon. Esto sugiere que la dopamina, a través de dichos receptores en el POA inhibe la ovulación, ya que al no acoplarse en éstos se estimuló la ovulación. Otra sugerencia es que la función de la dopamina a través de sus diferentes familias de receptores es redundante, es decir, que a través de ambas familias de receptores se puede estimular la ovulación. El tratamiento en la etapa de proestro resultó en el incremento del número de ovocitos liberados (Intacto: M= 14, RI= 13-14 vs. aCSF: M= 11.25, RI= 6.5-14 vs. Raclopride: M= 15, RI= 14-16.25; P= 0.0057 prueba de Kruskal-Wallis y P= 0.0092 prueba de Dunn). En la etapa de metaestro incrementó la masa de los ovarios (p= 0.0399 vs. aCSF) y en el diestro la del útero (p=0.0254 vs. aCSF). A partir de estos resultados sugerimos que, a través de los RDA-2 del POA, la dopamina ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de la GnRH en las etapas de diestro y proestro y uno estimulante en metaestro.

INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso imprescindible en el que los organismos aumentan su población y perpetúan su especie. En animales superiores, como los vertebrados, la reproducción por lo general es de tipo sexual (Finn, 2001; Bengtsson, 2003). Este tipo de reproducción implica la fusión de los pronúcleos de las células gaméticas del macho y de la hembra, dando lugar a una célula denominada cigoto, a partir de la cual se desarrollará un nuevo individuo. El gameto femenino es el óvulo u ovocito y para que este pueda fusionarse con el gameto masculino debe atravesar por un proceso de desarrollo, maduración y liberación, este último denominado ovulación (Harrison, 2001; Kornbluth y Fissore, 2015).

La ovulación es regulada por un eje neuroendocrino compuesto por tres elementos: el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, que en el caso de las hembras son los ovarios. El hipotálamo sintetiza y secreta un decapeptido conocido como la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que en la hipófisis estimula la síntesis y secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de los folículos (FSH). Ambas hormonas se denominan gonadotropinas y viajan a través del sistema circulatorio hasta llegar a su órgano blanco, los ovarios, en los que estimulan diversos procesos fisiológicos (Berga y Naftolin, 2012). Entre éstos está la síntesis y secreción de hormonas ováricas como el estradiol (E₂) y la progesterona (P₄); el desarrollo, crecimiento y maduración de los folículos ováricos y, finalmente, la ovulación (Garg y Berga, 2020).

En las hembras de los mamíferos se han observado dos tipos de ovulación; la inducida o refleja y la espontánea (Weir y Rowlands, 1973). Algunos ejemplos de mamíferos que presentan ovulación refleja son los conejos, los visones, los hurones, los gatos, los camellos, entre otros. Las hembras de estas especies ovulan en respuesta a un estímulo sensorial que se presenta en el momento del apareamiento. Por el contrario, las ratas, las ovejas, los primates no humanos y los humanos son ejemplos de animales que presentan ovulación espontánea. Éstos ovulan independientemente del apareamiento, en etapas o momentos determinados de su ciclo reproductivo en el que la ovulación es inducida por la acción de las gonadotropinas, que a su vez son reguladas por hormonas hipotalámicas y ováricas, las cuales fluctúan a lo largo de dicho ciclo (Kollar, 1953; Weir y Rowlands, 1973; Bakker y Baum, 2000).

En el mundo existen alrededor de 4900 especies de mamíferos, de las cuales una tercera parte está constituida por roedores como las ratas. Su gran presencia alrededor del mundo, así como su fácil y accesible manipulación y mantenimiento, hacen de estos animales el modelo biológico perfecto para su estudio en diferentes disciplinas científicas como la neuroendocrinología de la reproducción (Weir y Rowlands, 1973; Hamid y Zakaria, 2013). Las hembras presentan un ciclo reproductivo de cuatro días de duración conocido como ciclo estral, el cual se presenta de forma continua durante todo el año (Lohmiller y Swing, 2006). Dicho ciclo se divide en cuatro etapas que son identificadas por los cambios en la citología

del epitelio que recubre a la vagina. Estos cambios son el resultado de los procesos fisiológicos que ocurren en cada nivel del eje neuroendocrino y que son específicos de cada etapa (Hubscher *et al.*, 2005; Miller y Takahashi, 2014; Paccola *et al.*, 2013).

Las etapas del ciclo estral son: metaestro, diestro, proestro y estro que, a su vez, son agrupadas en dos fases. El metaestro y el diestro representan a la fase lútea del ciclo, mientras que el proestro y el estro a la fase folicular (Hubscher *et al.*, 2005; Paccola *et al.*, 2013; Byers *et al.*, 2012). El día del metaestro se caracteriza por el comienzo del incremento de la concentración del E₂ y la P₄. El E₂ alcanza su máxima concentración en la mañana del proestro, lo que estimula el aumento de la secreción, y de la concentración, de la GnRH, la LH y la FSH por la tarde. Por su parte, la P₄ también presenta su mayor concentración en la tarde del proestro. A estos incrementos bruscos en la concentración de hormonas ováricas se les denomina picos preovulatorios, ya que posterior a su incremento, se dará la ovulación en la mañana del estro. En esta última etapa, la concentración de cada una de las hormonas vuelve a su estado basal y el ciclo se repite hasta la senectud de la hembra (Marcondes *et al.*, 2002; Lohmiller y Swing, 2006; McLean *et al.*, 2012).

En conjunto, la fluctuación de estas hormonas durante el ciclo estral es un elemento imprescindible en la regulación de la ovulación (Caraty *et al.*, 1995). Por su parte, el E₂ es un factor de retroalimentación, tanto estimulante como inhibitorio, en la regulación de la actividad de las neuronas GnRHérgicas del hipotálamo, sin embargo, no es el único elemento que lo regula (de la Iglesia y Schwartz, 2006; Miller y Takahashi, 2014). Se ha mostrado que la actividad de estas neuronas es regulada por información nerviosa que proviene de distintas estructuras del sistema nervioso (Miller y Takahashi, 2014; Silva y Domínguez, 2019). Durante el último medio siglo se ha descrito la naturaleza de esta información y los resultados indican que es transmitida a través de diversos sistemas de neurotransmisión. Algunos de éstos son el ácido gamma aminobutírico, la serotonina, la arginina vasopresina, el péptido intestinal vasoactivo, la noradrenalina, la acetilcolina, la dopamina, entre otros (Halász *et al.*, 1988; Miller y Takahashi, 2014). Cada uno de estos neurotransmisores actúa a través de sus receptores, los cuales inhiben o estimulan la actividad de las neuronas GnRHérgicas dependiendo de la vía de señalización que activen (Ciechanowska *et al.*, 2010; Berga y Naftolin, 2012).

Estudios *in vitro* han mostrado que la dopamina disminuye de forma significativa la secreción de la LH (Tasaka *et al.*, 1985). De igual manera en la rata la administración sistémica de clorpromazina, un antagonista de la dopamina, en la etapa de proestro resulta en el bloqueo de la ovulación (Barraclough y Sawyer, 1957). Contrario a estos resultados Schneider y McCann (1970) mostraron que la infusión de dopamina en el tercer ventrículo del cerebro estimula el incremento de la concentración plasmática de la LH. De forma específica, el bloqueo general de los receptores dopaminérgicos (RDA) del área preóptica hipotalámica (POA) en los días de estro y metaestro, pero no del diestro y proestro, resulta en el bloqueo de la ovulación (Morán y Domínguez, 1995). Estos resultados sugieren que la

participación de la dopamina en la regulación de la ovulación depende del lugar de acción del neurotransmisor, la vía de señalización que active, así como de la etapa del ciclo en la que se realiza el tratamiento. En el presente estudio analizamos el papel de los receptores dopaminérgicos de la familia 2 (RDA-2) del POA a las 09:00 horas de cada etapa del ciclo estral de la rata adulta.

MARCO TEÓRICO

I. EL OVARIO

I.I DESARROLLO EMBRIONARIO

Los ovarios son las gónadas femeninas y forman parte del eje neuroendocrino que regula la reproducción de los vertebrados. Estos órganos tienen su ontogenia en etapas tempranas del desarrollo embrionario, las cuáles varían dependiendo de la especie (Smith *et al.*, 2014). El desarrollo de estos órganos comienza con la diferenciación de las células germinales primordiales (PGCs), éstas migran hacia los mesonefros embrionarios, estableciendo las crestas o primordios gonadales, en donde proliferan a través de una serie de divisiones mitóticas (Liu *et al.*, 2010; Rojas y Prieto, 2014; Suzuki *et al.*, 2015).

La diferenciación de la gónada depende de la expresión y acción de los genes *Rspo1*, *Wnt4*, y *Ctnnb1*, que actúan en conjunto con el ácido retinoico y la folistatina (Yao, 2005; Suzuki *et al.*, 2015; Díaz-Hernández y Merchant-Larios, 2017). Posteriormente, se pueden distinguir cinco tipos de células en el ovario: células epiteliales que conforman su superficie, células endoteliales que permiten la angiogénesis, células estromales, células pregranulosas y ovogonias (Konishi *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 2014). Varias ovogonias se agrupan en racimos y son rodeadas por las células pregranulosas, durante lo cual, atraviesan la meiosis I y quedan arrestadas en la profase I, dando lugar al ovocito. Posteriormente, cerca del nacimiento, se expresan los genes *FIGα* y *Foxl2*, que promueven que las células pregranulosas rompan los racimos y rodeen de forma individual a los ovocitos, lo que da lugar a la formación de los folículos primordiales (Yao, 2005; Liu *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2014; Grive y Freiman, 2015; Suzuki *et al.*, 2015). Algunos autores han señalado que las células germinales de roedores y humanos también continúan proliferando durante la maduración de los ovarios y aún durante la vida reproductiva de las hembras (Johnson *et al.*, 2004; De Felici, 2010). Los folículos ováricos, junto con la proliferación de las células somáticas antes mencionadas, dan lugar a la organización del ovario maduro.

I.II ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL OVARIO

Los ovarios maduros se localizan en la cavidad abdominal a cada lado de la pared pélvica. La disposición y fijación de estos órganos se da por el ligamento suspensorio, el ligamento ancho del útero y el mesovario (Erickson y Chang, 2007). Los ovarios se encuentran protegidos por una membrana denominada bursa ovárica, la cual los separa de la cavidad peritoneal y permite el intercambio selectivo de sustancias entre ambos elementos. De forma general, la función de dicha membrana es proveer el microambiente necesario para preservar la homeostasis de los ovarios (Martin *et al.*, 1981; Zhang *et al.*, 2013; Hosotani *et al.*, 2020).

De acuerdo con estudios histológicos, se pueden observar cuatro porciones diferentes en el ovario; el epitelio superficial, la túnica albugínea, la corteza y la médula (Erickson y Chang, 2007). El epitelio superficial es una capa de células cuboidales que provienen del mesovario, el cual contribuye en la remodelación, restauración y degradación de la corteza ovárica. Por debajo de éste se encuentra la túnica albugínea, ésta se conforma por células que dan lugar a un denso tejido conectivo que carece de irrigación sanguínea y en el que se pueden observar a los folículos primordiales (Figura 1) (Blaustein, 1977; Auersperg *et al.*, 2001).

La corteza y la médula conforman al estroma ovárico y son las porciones funcionales del ovario maduro (Vidal y Dixon, 2018). La corteza está constituida por tejido conjuntivo y remanentes de los elementos de la médula. Se caracteriza por contener a los folículos ováricos en diferentes estadios de maduración y cuerpos lúteos. Finalmente, la médula es un agregado de tejido conectivo, células estromales, vasos sanguíneos y linfáticos, así como de fibras nerviosas (Figura 1) (Erickson y Chang, 2007; Weidner *et al.*, 2009; Vidal y Dixon, 2018). Las células estromales de la médula dan lugar al hilio, constituido por células hiliares que sintetizan testosterona, otra hormona importante en la fisiología de los ovarios. El hilio también se caracteriza por ser el punto de unión entre el ovario y los ligamentos antes mencionados, así como por ser la vía de entrada de los vasos sanguíneos que irrigan a la médula y a la corteza (Figura 1) (Weidner *et al.*, 2009; Vidal y Dixon, 2018). Estos vasos se derivan de un plexo formado por ramificaciones de la arteria ovárica y la arteria uterina, que a su vez se originan en la aorta abdominal (Hossain y O'shea, 1983; Erickson y Chang, 2007).

El ovario es inervado por fibras de naturaleza simpática y parasimpática, las fibras simpáticas provienen de segmentos de la médula espinal correspondientes a las vértebras torácicas y lumbares. Por otro lado, las fibras parasimpáticas surgen a partir de neuronas del núcleo del tracto solitario, del núcleo ambiguo y del área postrema. Estas fibras llegan al ovario a través del nervio ovárico superior, del nervio del plexo ovárico y del nervio vago (Domínguez y Cruz-Morales, 2011; Uchida y Kagitani, 2015). Estudios de inmunohistoquímica han mostrado que estas fibras nerviosas son reactivas a diferentes neurotransmisores como la acetilcolina, la adrenalina, la sustancia P, el ácido gamma aminobutírico, la calcitonina, entre otros. Estas fibras entran a través del hilio e inervan cada uno de los compartimentos del ovario (D'Albora y Barcia, 1996; Uchida y Kagitani, 2015; Pastelín *et al.*, 2017). Además de esto, existe evidencia de que el ovario contiene poblaciones de neuronas intrínsecas las cuales dependen de la especie y en el caso de las ratas, de la cepa. La distribución de éstas difiere en cada una de las porciones del ovario. En el hilio forman ganglios nerviosos, mientras que en la médula y en la corteza se encuentran aisladas. En conjunto, la innervación del ovario es fundamental en la regulación de sus funciones (D'Albora *et al.*, 2000; 2002; Domínguez y Cruz-Morales, 2011; Brauer y Smith, 2015).

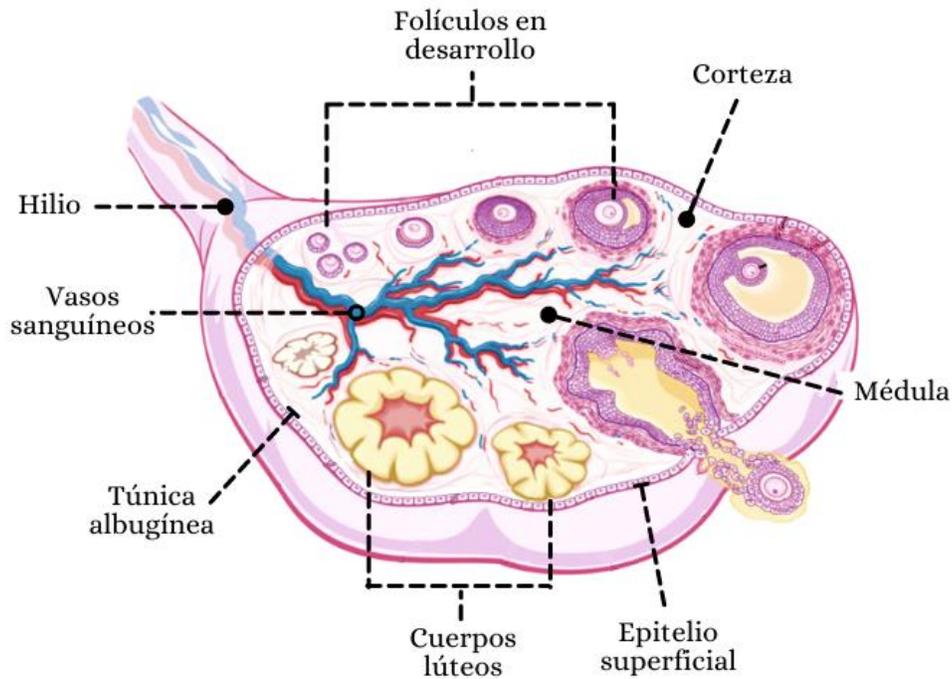


Figura 1. Anatomía general del ovario. Modificado de [Desai et al., 2013](#).

I.III DESARROLLO FOLICULAR Y OVULACIÓN

La unidad anatómica y funcional del ovario es el folículo y su desarrollo comienza con la formación de los folículos primordiales en la etapa perinatal ([Yao, 2005](#); [Grive y Freiman, 2015](#)). Tras el nacimiento, las hembras poseen una gran cantidad de folículos primordiales, sin embargo, muchos de estos serán degradados y solo un porcentaje se seleccionará para desarrollarse ([Gougeon, 2004](#); [Edson et al., 2009](#); [Jones y López, 2014](#)). A partir de la pubertad, durante cada ciclo reproductivo, se lleva a cabo el reclutamiento de un grupo de folículos a partir de la reserva antes mencionada. De éstos, solo unos cuantos alcanzarán la madurez necesaria para liberar a su ovocito, mientras que el resto atravesará por un proceso de degradación denominado atresia. Este proceso involucra la presencia de errores en la diferenciación y proliferación, así como la apoptosis de las células del folículo y puede ocurrir desde etapas perinatales hasta la menopausia ([Fortune, 1994](#); [Logothetopoulos et al., 1995](#)).

Los folículos en desarrollo pueden atravesar por diferentes estadios, en los que presentan características morfológicas específicas a partir de las cuáles pueden clasificarse (Figura 2). El folículo primordial está compuesto por un ovocito rodeado por una capa de células somáticas planas denominadas células pregranulosas. La transición de este estadio al folículo primario es un proceso independiente de la acción de las gonadotropinas y es mediado por la expresión de los genes *Foxl*, *Foxo3*, *Sohlhl*, *Nobox* y por la información

nerviosa que actúa a través del péptido intestinal vasoactivo y la noradrenalina, además de hormonas como la insulina (Oktem y Oktay, 2008; Richards y Pangas, 2010; Grive y Freiman, 2015). En el folículo primario el ovocito aumenta de tamaño y las células de la pregranulosa cambian de planas a cúbicas, ahora denominándose células de la granulosa. Este cambio morfológico parece estar relacionado con el incremento de su actividad metabólica, preparándose para los cambios posteriores. Entre el ovocito y las células foliculares se desarrolla una estructura denominada zona pelúcida, la cuál es importante para el reconocimiento del espermatozoide en el proceso de la fecundación (Blaustein, 1977; Erickson y Chang; 2007; Jones y López, 2014). A partir de este momento se expresan de manera continua distintos factores como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), GDF-9, BMP, LIF, FGF, que permiten la transición hacia los siguientes estadios de desarrollo (Oktem y Oktay, 2008; Picut *et al.*, 2015; Grive y Freiman, 2015).

En el folículo secundario las células de la granulosa se dividen, generando varias capas alrededor del ovocito. Algunas células del estroma se diferencian en las células de la teca que rodean al folículo, las cuales se encuentran separadas de las células de la granulosa por una membrana basal. Además, en este estadio se completa la maduración de la zona pelúcida, se expresan los receptores a las gonadotropinas y el folículo adquiere la capacidad de sintetizar estrógenos (Chedrese, 2003; Gougeon, 2004; Linher y Li, 2011; Jones y López, 2014). En el folículo terciario, las células de la teca se diferencian y se dividen en una capa interna y otra externa, ambas vascularizadas. La capa interna está formada por tejido glandular, células que sintetizan hormonas esteroideas, mientras que la capa externa por tejido conjuntivo, fibroblastos y células del músculo liso (Linher y Li, 2011; Duffy *et al.*, 2019). En este estadio la fusión de los cuerpos de Call-Exner da origen al antro, una cavidad que contiene fluido folicular. Éste provee al ovocito y a las células de la granulosa de sustancias como proteínas plasmáticas, enzimas intra y extracelulares, proteoglicanos, esteroideas, hormonas proteicas, entre otros (Jones y López, 2014; Picut *et al.*, 2015).

El folículo terciario presenta los últimos cambios morfológicos que dan lugar al folículo preovulatorio o De Graaf. En este estadio el ovocito queda excéntrico dentro del fluido folicular y se encuentra rodeado por células de la granulosa que se disponen en una columna denominada *cumulus oophorus*. El tamaño del folículo es mayor que en el estadio anterior debido a la acumulación del fluido folicular, del incremento de volumen de las células de la granulosa y de la vascularización en las células de la teca (Gougeon, 2004; Linher y Li, 2011). Una vez que el folículo ha adquirido estas características, la acción conjunta de las gonadotropinas y otras hormonas, la información nerviosa que arriba al ovario, así como la expresión de una gran variedad de genes, desencadena la ovulación (Fortune, 1994; Duffy *et al.*, 2019).

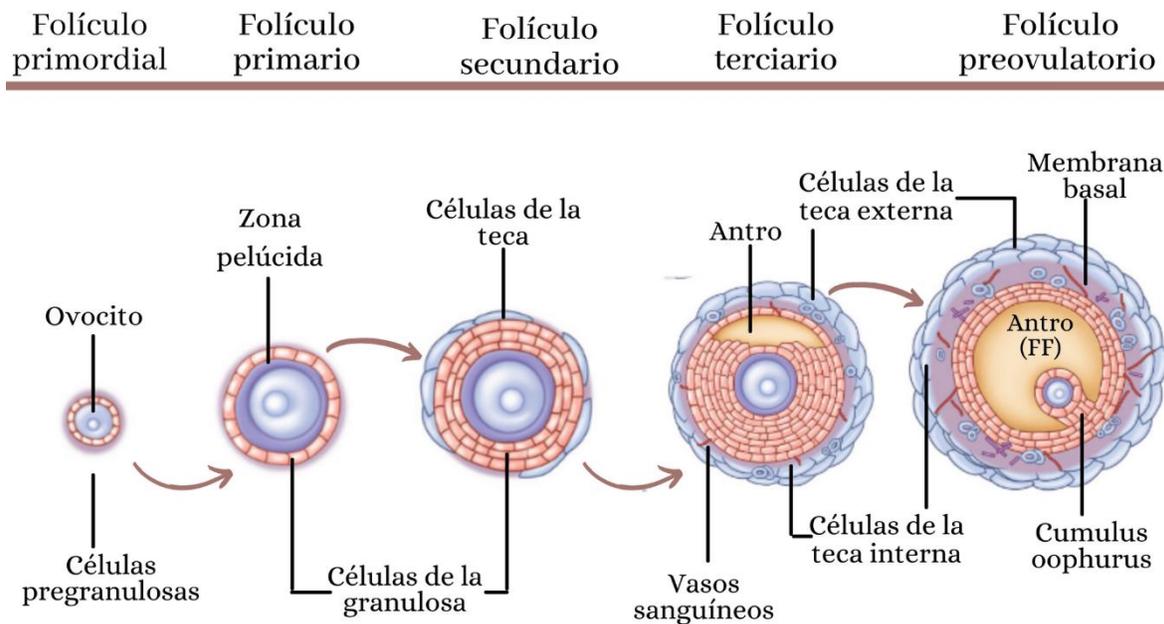


figura 2. Representación esquemática de los cambios morfológicos que presentan los folículos desde el estadio primordial hasta el preovulatorio o De Graaf. La abreviación FF corresponde al fluido folicular del antro. Modificado de Orsi *et al.*, 2014.

La ovulación es un proceso inflamatorio que requiere la interacción bioquímica entre las células que conforman al folículo y aquellas presentes en el resto de los compartimentos del ovario. Esta interacción da lugar a la ruptura del folículo, proceso que incluye la degradación y reorganización de cada una de sus capas celulares y vascularización (LeMaire, 1989; Reich *et al.*, 1991, Tokmakov *et al.*, 2020). Uno de los elementos que participa en dicho proceso es el activador del plasminógeno, el cual es secretado por las células de la granulosa. La reacción bioquímica de este activador da como producto a la plasmina, una enzima proteolítica que degrada la membrana basal del folículo y las fibras del tejido conectivo de las células de la teca (Reich *et al.*, 1991; Tsafirri, 1995). En los mamíferos se han identificados dos tipos de estas enzimas, la del tipo urocinasa y la del tipo tisular. Esta última es constitutiva en los folículos preovulatorios y su síntesis incrementa ante el estímulo hormonal previo a la ovulación (Tsafirri, 1995; Tsafirri y Reich, 1999).

Se ha observado que la ruptura folicular es mediada por otros elementos como las prostaglandinas, principalmente la PGI₂, PGE₂ y PGF_{2α}. Adicionalmente, se han identificado a otras proteínas que degradan de forma específica a las fibras de colágeno del folículo y del tejido conectivo de las otras estructuras ováricas (Reich *et al.*, 1991; LeMaire, 1989; Tsafirri y Reich, 1999). Dentro de las colagenasas que se han identificado en los ovarios de los mamíferos, las metaloproteinasas predominan en el estadio preovulatorio. Se ha observado un incremento de éstas en las células de la teca y del estroma ovárico, sin embargo, se encuentran como proenzimas y su activación es mediada principalmente por la enzima plasmina (Reich *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2002).

Además de la degradación celular, existen cambios en el sistema vascular del folículo y del ovario que se han observado previo a la ovulación. Se ha mostrado que la vasoconstricción es el primer cambio que sufre la vascularización y diferentes estudios han identificado que la endotelina y la angiotensina son los principales mediadores de este proceso (Ko *et al.*, 2006; Migone *et al.*, 2016). Posteriormente, sustancias como la bradicidina, la prorenina, la histamina, el péptido intestinal vasoactivo, la serotonina entre otras modulan cambios en la permeabilidad y la presión en los vasos sanguíneos (Thibault y Levasseur, 1988; Russell y Robker, 2007; Zackrisson *et al.*, 2011). Simultáneamente, en las células de la teca se da un incremento en la síntesis de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular o la angiopoyetina-1. Estos factores promueven el incremento del desarrollo de vasos sanguíneos en las células de la teca y del estroma, los cuales se ramifican dentro del folículo hasta entrar en contacto con las células de la granulosa (Zackrisson *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2019).

En conjunto, estos cambios y procesos en el sistema vascular, así como la degradación de las capas celulares del folículo, resultan en la activación de células locales y periféricas del sistema inmunitario que regulan el proceso inflamatorio (Thibault y Levasseur, 1988; LeMaire, 1989). Entre éstas se encuentran los macrófagos, los neutrófilos y los monocitos, que secretan proteasas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y adhesión por lo que se sugiere que participan en la proteólisis y en la digestión de los restos celulares, además, proveen el ambiente adecuado para que el remanente del folículo pueda realizar su transición al cuerpo lúteo (Duffy *et al.*, 2019; Tokmakov *et al.*, 2020). Una vez que las gonadotropinas estimulan la ovulación, el nivel de degradación y los sitios de acción de todas las proteínas y de las células inmunitarias son regulados por sus inhibidores, los cuales actúan de manera coordinada en una región específica del folículo y del ovario. Esto evita que la degradación se presente en folículos en desarrollo adyacentes o en células de los otros compartimentos del ovario y que esto resulte en la necrosis del tejido y el mal funcionamiento de la gónada (Tsafriri, 1995; Smith *et al.*, 2002; Russell y Robker, 2007).

Los cambios estructurales y funcionales antes mencionados permiten que el ovocito sea expulsado del folículo junto con las células del *cumulus* hacia el oviducto, donde puede ser fecundado. Por otro lado, las células remanentes atraviesan un proceso hemorrágico transitorio y de luteinización que da lugar a un cuerpo lúteo maduro (Russel y Robker, 2007; Duffy *et al.*, 2019). La luteinización comienza con la degradación de la membrana basal, esto permite que fibroblastos, células endoteliales, inmunitarias y de la teca invadan y se mezclen con las capas de las células de la granulosa. Estas células comienzan a diferenciarse en células luteínicas esteroideogénicas, ya que al igual que las células de la teca y de la granulosa sintetizan hormonas esteroideas como la testosterona, el E₂ y la P₄. Dentro de las diferencias que presentan, la más evidente es que las células del cuerpo lúteo poseen una pigmentación amarillenta resultado de la acumulación de colesterol y de luteína (Ericksson y Chang, 2007; Jones y López, 2014). La función principal de este cuerpo es la de proveer la concentración adecuada de P₄ en caso de que ocurra la fecundación. Esta síntesis y secreción de P₄ persiste

hasta que se forma la placenta, la cual reemplaza al cuerpo lúteo en esta función (Weidner *et al.*, 2009; Jones y López, 2014). En el caso de que no se da la fecundación, el cuerpo lúteo atraviesa por un proceso de degeneración, denominado luteólisis, en el que las células luteínicas degeneran a través de la activación de vías apoptóticas. En este proceso, las células disminuyen de tamaño y sus núcleos presentan picnosis, además, las células endoteliales se necrosan y se pierde el suministro sanguíneo. Adicionalmente, se da una acumulación de fibras de colágeno y fibroblastos, lo que causa que el cuerpo lúteo adquiera un aspecto fibroso, semejante a una cicatriz, al que se denomina cuerpo *albicans*. Estos cuerpos se reabsorben con el tiempo sin afectar las estructuras adyacentes (Weidner *et al.*, 2009; Orsi *et al.*, 2014). La reabsorción del cuerpo *albicans* es el punto culminante del proceso de desarrollo del folículo primordial seleccionado para atravesar el proceso de desarrollo y de la ovulación (Desai *et al.*, 2013; Jones y López, 2014).

I.IV HORMONAS OVÁRICAS ESTEROIDES

Como se mencionó antes, una de las funciones del ovario es la síntesis de hormonas, las cuales, de acuerdo con su naturaleza bioquímica, pueden clasificarse en proteicas y esteroides (Orsi *et al.*, 2014). Las hormonas esteroides o sexuales se agrupan en tres grupos los progestágenos (la progesterona), los andrógenos (testosterona o androstenediona) y los estrógenos (estradiol o estrona) (Adashi, 1994). En el caso de las hormonas proteicas se han identificado una gran variedad como la inhibina, la folistatina, la activina, entre otras. Ambos tipos de hormonas ejercen acciones autocrinas y paracrinas en el ovario para regular la esteroidogénesis, el crecimiento de los folículos, la maduración de los ovocitos, la respuesta a las gonadotropinas, la ovulación y la función del cuerpo lúteo. También actúan de forma endocrina regulando la función del hipotálamo y de la hipófisis (Adashi, 1994; Knight y Glister, 2001).

La síntesis de las hormonas esteroides o esteroidogénesis se da a partir del colesterol (Adashi, 1994; Chedrese, 2003). El primer paso de la esteroidogénesis es la conversión del colesterol a pregnenolona, a partir de este punto el metabolismo puede seguir la vía Δ^5 que es la más común en el folículo o la vía Δ^4 , característica del cuerpo lúteo. En ambas se obtiene androstenediona como producto, sin embargo, en la vía del cuerpo lúteo se obtiene a partir de la 17-hidroxiprogesterona y en la vía folicular a partir de la dehidroepiandrosterona. En ambas vías la androstenediona sufre la conversión, dependiendo de la enzima limitante, a testosterona o estrona y finalmente, ambos productos son convertidos por la aromatasa CYP19 a 17 β -estradiol (Figura 3) (Domínguez, 1997; Andersen y Ezcurra, 2014; Jones y López, 2014).

La síntesis de la vía Δ^5 comienza en las células de la teca, a partir del estímulo de la LH, en donde el último producto sintetizado es la androstenediona. Posteriormente, ésta difunde a través de la membrana basal y llega a las células de la granulosa para la conversión a testosterona y la aromatización de esta última da lugar al E₂, por acción de la FSH (Figura 3). Finalmente, el E₂ difunde a través de la membrana basal hasta llegar a la vascularización

de las capas de las células de la teca a través de la cual viajan hasta llegar a sus órganos blanco (Andersen y Ezcurra, 2014; Jones y López, 2014). No todas las moléculas de las hormonas que se producen en la esteroidogénesis, como la progesterona o la androstenediona, son metabolizadas, ya que algunas son secretadas al sistema circulatorio antes de su conversión enzimática en el siguiente producto. De igual manera que el E₂, dichas hormonas son secretadas y viajan a través de la circulación sanguínea hasta llegar a sus órganos blanco para ejercer su función (Chedrese, 2003).

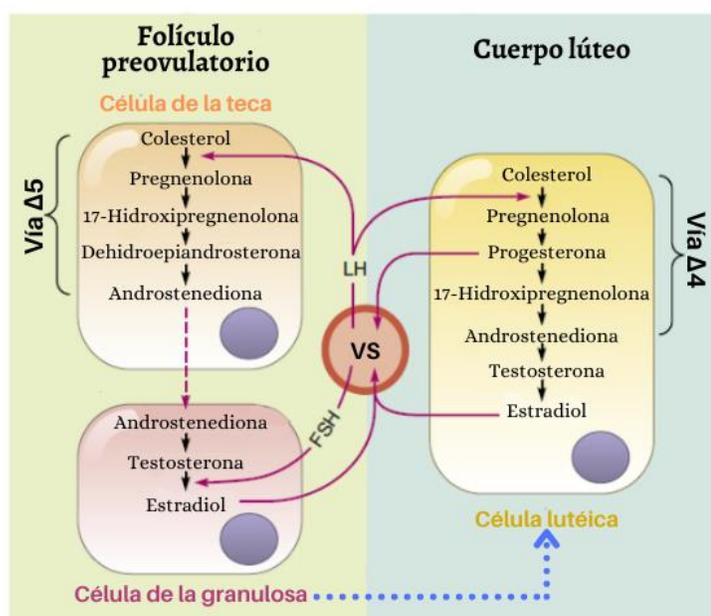


Figura 3. Proceso de esteroidogénesis en el folículo preovulatorio y en el cuerpo lúteo. En el folículo preovulatorio la síntesis de estradiol sigue la vía Δ^5 y depende del estímulo de la LH en las células de la teca y de la FSH en las células de la granulosa. En el cuerpo lúteo la vía Δ^4 da lugar a una síntesis mayor de progesterona que de estradiol. Ambas hormonas son secretadas a la circulación general a través de los vasos sanguíneos (VS) para llegar a sus órganos blanco. Modificado de Jones y López, 2014.

En el caso de los andrógenos su función no está limitada al folículo, sino que también actúa en tejidos extraováricos como el útero, en el que participa regulando procesos relacionados con la gestación. En el folículo, además de servir como sustrato para la aromatasas, una alta concentración de esta hormona estimula la actividad de dicha enzima aún en ausencia de la FSH. También se ha observado que los andrógenos estimulan la expresión de los receptores a FSH en las células de la granulosa (Adashi, 1994; Franks y Hardy, 2018). En algunos estudios se ha mostrado que estas hormonas participan en el reclutamiento y en el desarrollo folicular, siendo clave en la transición del estadio terciario al preovulatorio (Prizant *et al.*, 2014). A nivel del ovario, se ha mostrado que si la concentración de andrógenos es mayor que la del E₂ se da un incremento de los folículos atresicos. Aunado a esto, en diversas especies y principalmente en humanos, se ha asociado una alta concentración de andrógenos con el hiperandrogenismo de la mujer, dando lugar a la masculinización de ciertos caracteres y a la aparición de patologías como el síndrome de ovario poliquístico (Walters y Handelsman, 2018; Franks y Hardy, 2018).

Por su parte, la P₄ regula numerosos procesos reproductivos y no reproductivos. En el caso de los no reproductivos encontramos la regulación del crecimiento y mantenimiento de los osteocitos y de las funciones del sistema cardiovascular. En los procesos reproductivos, participa en el desarrollo de la glándula mamaria y regula las funciones del ovario, del útero y del sistema nervioso central (Domínguez, 1997; Al-Asmakh, 2007). En este último, regula los procesos de conducta sexual y maternal. A nivel del útero cumple funciones imprescindibles para la gestación, regula la proliferación de las células del endometrio durante cada ciclo reproductivo, preparándolo para la recepción del blastocisto en caso de que ocurra la fecundación. Adicionalmente, inhibe sus contracciones y la secreción de prolactina durante la gestación (Gupta y Chia, 2013). En los primeros estadios del folículo ovárico se ha observado que esta hormona actúa como un inhibidor de los factores proapoptóticos en las células de la granulosa. Debido a lo anterior, se ha sugerido que la P₄ salvaguarda a los folículos seleccionados de la atresia (Chedrese, 2003; Hobeika *et al.*, 2020). Por otro lado, cuando se inhibe la secreción de la P₄ en el estadio preovulatorio, también se inhibe la expresión de las proteasas que degradan al folículo, sugiriendo así que dicha hormona es clave en la ovulación. Aunadas a estas funciones, se sabe que la P₄ es imprescindible en la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo (Graham y Clarke, 1997; Chaffin y Stouffer, 2002).

El E₂ al igual que la P₄ actúa en los sistemas cardiovascular y óseo, proporcionando a las células protección y mantenimiento. En cuanto a funciones reproductivas, algunos autores han señalado a esta hormona como el principal modulador de dichos procesos en la hembra. En primera instancia, participa en la maduración y establecimiento de los caracteres sexuales primarios y secundarios. En el ovario se ha mostrado que el inicio del desarrollo folicular es independiente de esta hormona, sin embargo, se le ha asociado como un potente estimulante de otros factores que promueven la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (Domínguez, 1997; Hobeika *et al.*, 2020). Por otro lado, en ratones que no expresan el gen que codifica para la enzima CYP 19, se ha observado que la ausencia del E₂ resulta en la suspensión del desarrollo folicular en el estadio preovulatorio y en la inhibición de la formación del cuerpo lúteo (Fisher *et al.*, 1998). En este mismo modelo se ha observado que la inhibición de la síntesis de E₂ disminuye la expresión de los receptores a LH en las células de la teca. Adicionalmente, se ha mostrado que el estradiol tiene un papel importante en la formación del antro folicular (Britt y Findlay, 2002; Chedrese, 2003).

I.V HORMONAS OVÁRICAS PROTEICAS Y PEPTÍDICAS

Como mencionamos anteriormente, existen diversas hormonas proteicas en los ovarios y algunas de estas son la inhibina, la activina y la folistatina. La inhibina y la activina son glucoproteínas que forman dímeros y pertenecen a la familia del TGF- β (Desai *et al.*, 2013). La inhibina es un heterodímero compuesto por una subunidad alfa común unida con diferentes subunidades beta. La combinación de estos monómeros da lugar a dos tipos de estas proteínas: la inhibina A y la inhibina B (Adashi, 1994; Halvorson y DeCherney, 1996).

Ambas son secretadas por las células de la granulosa y de la teca durante todo el desarrollo del folículo, sin embargo, se ha observado sólo el tipo A se mantiene durante la formación del cuerpo lúteo (Findlay, 1994; Knight, 1996).

Los ratones genéticamente modificados que no expresan la inhibina presentan una proliferación descontrolada de las células de la granulosa en los folículos de diferentes estadios, mismos que derivan en atresia y en la aparición de tumores. Esto sugiere que la inhibina modula la proliferación de estas células (Matzuk *et al.*, 1992). En el caso de las células de la teca, se ha observado que la inhibina ejerce un papel estimulante en el inicio de la esteroidogénesis. Lo anterior se demostró en estudios *in vitro* en los que la ausencia de esta proteína en el medio de cultivo resulta en la disminución o inhibición de la concentración de andrógenos (Smyth *et al.*, 1993). Finalmente, esta proteína ejerce un papel endocrino a nivel de la hipófisis, en donde inhibe la secreción de la FSH. En algunos estudios en los que se inhibe de manera crónica la secreción de la inhibina se ha mostrado que los animales no ovulan y el número de folículos atrésicos aumenta (Findlay, 1994; De Kretser *et al.*, 2002).

Por otro lado, la activina es un producto de la dimerización de las subunidades beta de la inhibina, a partir de las cuales se han identificado tres tipos de esta proteína: la activina A, B y AB (Halvorson y DeCherney, 1996; Knight, 1996). Las activinas se sintetizan en mayor concentración en las células de la granulosa de todos los estadios del desarrollo de un folículo. En los primarios y secundarios se han observado a las tres activinas, sin embargo, en el terciario y preovulatorio sólo se ha observado al tipo A y B. Todas las inhibinas están implicadas en procesos de diferenciación y proliferación de las células de la granulosa y en estudios *in vitro* se ha mostrado que el tipo A regula la maduración del ovocito (Alak *et al.*, 1998; Knight y Grisli, 2001). También se ha identificado que la activina regula de forma estimulante la expresión de los receptores a FSH en las células de la granulosa y a LH en las células de la teca. Por otro lado, se han mostrado dos acciones opuestas de la activina en la síntesis de hormonas esteroides. En el primer caso, estimula la conversión de andrógenos a E₂ y en el segundo inhibe la síntesis de P₄ en las células del cuerpo lúteo (Alak *et al.*, 1998; de Kretser *et al.*, 2002). Dejando de lado las acciones intraováricas, se sabe que la activina también actúa a nivel de la hipófisis, en donde contrario a la inhibina, estimula la secreción de la FSH (Findlay, 1996; Gupta y Chia, 2013).

Por su parte, la folistatina también es una glucoproteína, sin embargo, no está relacionada con la familia del TGF- β (Halvorson y DeCherney, 1996; Knight, 1996). La folistatina se sintetiza en las células de la granulosa y de la teca con una mayor concentración en los primeros estadios foliculares que en el estadio preovulatorio. Esta hormona participa de forma inhibitoria en la síntesis de estrógenos y en la secreción de la inhibina (de Kretser *et al.*, 2002). Contrario a lo anterior, estimula la secreción de P₄ y participa en el proceso de luteinización de las células de la granulosa. Adicionalmente, la folistatina suprime la acción estimulante de la activina en la maduración del ovocito y en la secreción de la FSH (Alak *et al.*, 1998; Knight y Glistler, 2001).

Aunadas a estas tres proteínas, se han identificado una gran cantidad de hormonas peptídicas en el líquido folicular. Éstas son el inhibidor de maduración del ovocito, el factor

inhibidor de la unión de la FSH y de la LH a sus receptores, el inhibidor y estimulador de la luteinización, la relaxina, la hormona antimulleriana, entre otras (Domínguez, 1997; Hammond, 1981; Adashi, 1994). Se ha mostrado que estas hormonas tienen funciones similares a las antes mencionadas, además, regulan la selección y competencia folicular, así como el arresto meiótico del ovocito (Knight, 1996; Knight y Glister, 2001).

II. LA HIPÓFISIS

II.I ANATOMÍA GENERAL

Anteriormente se describieron los diferentes procesos que se llevan a cabo en el ovario y observamos que en cada uno de éstos las gonadotropinas tienen un papel fundamental. Además, señalamos que las hormonas ováricas retroalimentan a la hipófisis, la glándula en la que se sintetizan y secretan la LH y la FSH. La hipófisis, conocida también como pituitaria, es una glándula endocrina que además de regular la fisiología de los ovarios, está implicada en la modulación del crecimiento, el metabolismo, el sueño, el equilibrio osmótico y otros procesos que permiten la homeostasis del organismo (Kontogeorgos *et al.*, 2012). Esta glándula se localiza en una depresión del hueso esfenoides en la porción media de la base del cráneo, por debajo del hipotálamo y próxima al quiasma óptico (OCH), así como a los nervios craneales oculomotor, troclear, trigémino y abducens (Herring, 1908; Amar y Weiss, 2003).

La hipófisis se origina a partir de dos estructuras diferentes derivadas del ectodermo, lo que da lugar a dos porciones anatómica y funcionalmente distintas, la neurohipófisis y la adenohipófisis. La primera es el lóbulo posterior, que se origina del diencéfalo a partir de una evaginación del tercer ventrículo (Dubois y ElAmraoui, 1995). Dicha evaginación da lugar al tallo neural que, junto con su porción rostral denominada eminencia media, forman al infundíbulo. A partir de éste se forma una especie de saco denominado proceso infundibular o *pars* nerviosa completando así la estructura de la neurohipófisis (Figura 4) (Dubois y ElAmraoui, 1995; Halász, 2004). Esta porción está constituida por fibras y terminales nerviosas que provienen de los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular, así como por células gliales que se asemejan a los astrocitos y a las cuales se les conoce como pituicitos, que ejercen funciones estructurales y de mantenimiento. Se ha mostrado que las fibras provenientes de dichos núcleos son inmunorreactivas a la arginina vasopresina y a la oxitocina, las cuales determinan la función de este lóbulo (Dorton, 2000). La oxitocina participa en procesos como el desarrollo folicular y la ovulación, las contracciones uterinas durante el parto, la eyaculación en los testículos, la eyección de la leche desde los alvéolos mamarios hacia los conductos mamarios, entre otras. Por su parte, la vasopresina participa en la osmorregulación del organismo, en la vasoconstricción y en la secreción de la corticotropina (Dorton, 2000; Amar y Weiss, 2003; Goodman, 2009).

La adenohipófisis es el lóbulo anterior, es la porción más grande y deriva del epitelio del estomodeo que da origen a la cavidad oral primitiva. Éste sufre una invaginación en sentido dorsal hacia el diencéfalo dando lugar a una estructura con forma de pera denominada bolsa de Rathke. Posteriormente, ésta se extiende hasta posicionarse delante de la neurohipófisis y se adhiere a ésta a la altura del infundíbulo. Finalmente, las células de la porción anterior de la bolsa de Rathke proliferan y forman a la *pars* distal, la porción de células que se adhirió al infundíbulo forma la *pars* tuberal y las células de la porción posterior de la bolsa constituyen a la *pars* intermedia (Figura 4) (Herring, 1908; Dorton, 2000;

Kontogeorgos *et al.*, 2012; Jones y López, 2014). El desarrollo de esta estructura, como el de cualquier otro órgano, es un proceso organizado que depende de la activación de diferentes vías de señalización mediadas por factores específicos en momentos y células particulares del desarrollo embrionario. Algunos de los factores que participan en la organogénesis de la adenohipófisis son las proteínas morfogenéticas óseas, el factor de crecimiento de fibroblastos, las proteínas de la familia hedgehog y WNT. Cada una de éstas activan o inhiben a otras proteínas como GATA2 y 4, LHX3 y 4, HESX1, PROP1 y otras más que promueven la organización histológica y funcional de las tres porciones que conforman a este lóbulo (Rizzoti y Lovell-Badge, 2005; De Moraes *et al.*, 2012).

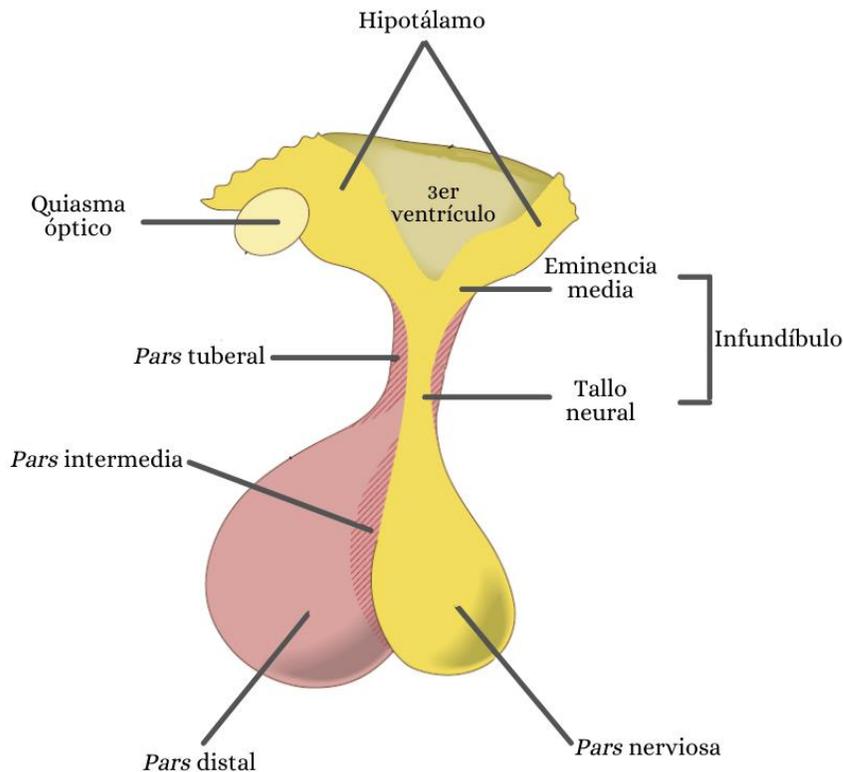


Figura 4. Representación de la anatomía general de la hipófisis. Las *pars* tuberal, intermedia y distal forman parte del lóbulo anterior o de la adenohipófisis. Por su parte el lóbulo posterior o neurohipófisis lo conforman el infundíbulo y la *pars* nerviosa. Modificado de Jones y López, 2014.

De forma general, podemos decir que la parte tuberal es el punto de conexión entre el hipotálamo y la adenohipófisis. La porción distal es glandular, ya que contiene células que secretan diversas hormonas en respuesta a los factores hipotalámicos que recibe. Finalmente, la parte intermedia no es funcional y únicamente separa a la adenohipófisis de la neurohipófisis, al menos en los primates. Los factores del hipotálamo llegan a la porción distal a través de una red de vasos sanguíneos que se encuentran en la parte tuberal y que es denominada sistema portal hipotalámico hipofisario (Halász, 2004; Amar y Weiss, 2003). Éste se conforma de dos plexos capilares que derivan de las arterias hipofisarias, las cuales

surgen de la carótida interna. El primer plexo se origina de la arteria hipofisaria superior y se localiza a la altura de la eminencia media y al inicio de la parte tuberal. Posteriormente, esta ramificación vascular se fusiona para formar vasos sanguíneos largos que recorren toda la parte tuberal hasta llegar a la porción distal, en donde se vuelven a ramificar dando lugar al plexo secundario. La sangre que recorre el sistema portal también transporta a las hormonas hipofisarias secretadas hacia las venas inferiores, que drenan hacia el seno cavernoso y a partir del cual se incorporan en la circulación general, a través de la cual llegan a sus órganos blanco. Cabe mencionar que los vasos sanguíneos del sistema portal están fenestrados, lo que promueve que las hormonas secretadas difundan con mayor facilidad a la circulación sanguínea (Figura 5) (Herring, 1908; Kontogeorgos *et al.*, 2012; Jones y López, 2014).

Durante el desarrollo embrionario se diferencian cinco tipos de células y cada una de estas sintetiza una o dos de las seis hormonas de la adenohipófisis. Además de estas células, se ha observado la presencia de otras que no tienen una función glandular, sino que actúan como reguladores paracrinos en la fisiología de la adenohipófisis y a las cuales se les denomina foliculoestelares (Halász, 2004; De Moraes *et al.*, 2012). De forma convencional, las células se han clasificado en cromófilas o cromófobas; dependiendo de la capacidad que presentan para teñirse al someterse a técnicas de tinción histológica. A su vez, las células cromófilas se dividen en acidófilas o basófilas dependiendo del tipo de colorante, ácido o básico, por el que tienen afinidad. Las células acidófilas son los somatotropos y los lactotropos mientras que las basófilas incluyen a los corticotropos, los tirotropos y los gonadotropos (Figura 5) (Christy, 1963; Amar y Weiss, 2003; Yeung *et al.*, 2006).

De acuerdo con Ooi y colaboradores (2004) los somatotropos constituyen aproximadamente el 40% de la población celular de la glándula y sintetizan a la hormona del crecimiento o somatotropina, la cual regula el crecimiento en la mayoría de los tejidos, participa en el metabolismo celular y en la degradación del tejido adiposo. Por su parte, los lactotropos constituyen el 20% de la población y producen prolactina, la cual participa en el crecimiento y maduración de la glándula mamaria, en la producción de la leche materna y modula la respuesta del ovario a las gonadotropinas. En el caso de los corticotropos, representan el 15% de las células de la adenohipófisis, sintetizan y secretan péptidos derivados de la propiomelanocorticona como la corticotropina, la β -endorfina y la β -lipotropina. Las funciones de éstas son estimular la síntesis de cortisol y corticosterona en las glándulas adrenales, la movilización de los lípidos en el tejido adiposo y regular la ingesta de agua y comida. Los tirotropos son las células que se encuentran en menor cantidad ya que forman menos del 10% del total, sintetizan a la hormona estimulante de la tiroides la cual a su vez se encarga de estimular la síntesis de las hormonas tiroideas como la tiroxina. Finalmente, los gonadotropos constituyen un 15% de la población celular, sintetizan a las gonadotropinas, que son esenciales en la fisiología del ovario (Amar y Weiss, 2003; Yeung *et al.*, 2006; Goodman, 2009).

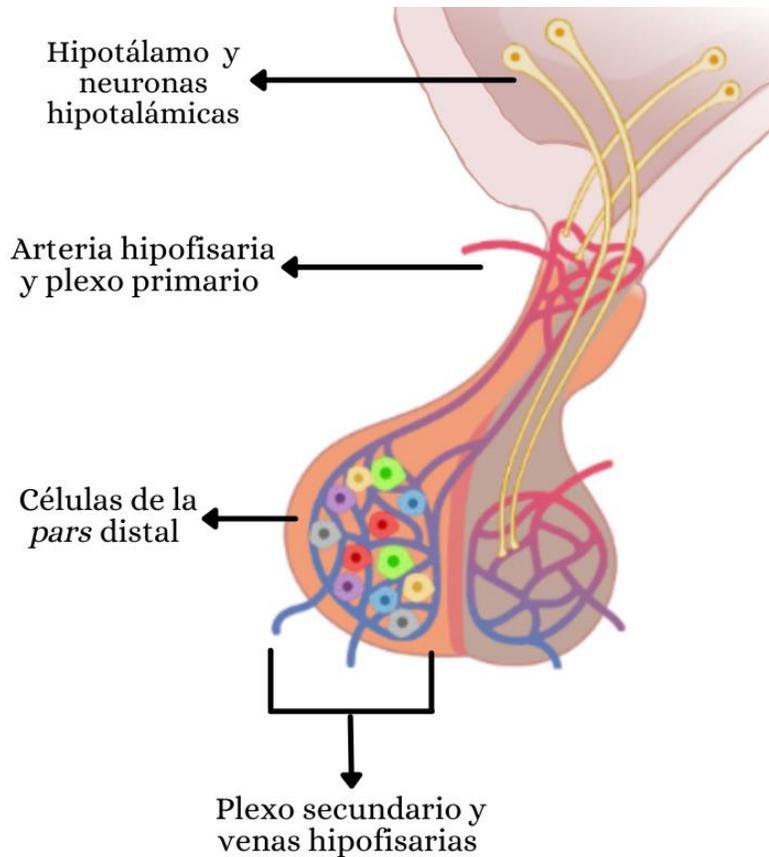


Figura 5. Representación de la anatomía de la adenohipófisis en donde se aprecia al sistema portal hipotalámico hipofisario a lo largo de este lóbulo y a las células que conforman a la *pars distal*. Las células se representan con diferentes colores: las de color gris corresponden a las células foliculoestelares y las de los otros colores a las células endócrinas que incluyen a los somatotropos, lactotropos, tirotropos, corticotropos y gonadotropos. Modificado de [Dorton, 2000](#).

II.II LOS GONADOTROPOS Y LAS GONADOTROPINAS

Los gonadotropos son el último tipo celular en diferenciarse durante el desarrollo embrionario de la adenohipófisis. Éstos derivan de una primera línea celular que expresa el gen que codifica para la subunidad alfa de las glucoproteínas. Posteriormente, estas células expresan a los factores de transcripción SF-1, PROP-1 y GATA-2 los cuales promueven su proliferación y diferenciación en gonadotropos ([Rizzoti y Lovell-Badge, 2005](#); [Suga *et al.*, 2011](#)). Las células funcionales de este tipo tienen forma ovalada y pueden identificarse fácilmente ya que son las de mayor tamaño dentro de este lóbulo. Tienen un núcleo excéntrico en el citoplasma, en el que además se encuentran una gran cantidad de gránulos secretores que contienen a las gonadotropinas. Además, poseen un retículo endoplasmático rugoso prominente ([Childs, 1997](#)). Se ha descrito en roedores y humanos que dentro de este grupo de células existe una diferencia en cuanto al tipo de gonadotropina que secretan, es

decir, hay gonadotropos que sólo secretan a la LH, otros que secretan ambas gonadotropinas y un tipo más que sólo secreta a la FSH (Pope *et al.*, 2006; Kaiser, 2017).

Las gonadotropinas forman parte de la familia de las glucoproteínas junto con la hormona estimulante de la tiroides y la gonadotropina coriónica. Son heterodímeros compuestos por una subunidad alfa, que es común en todas las glucoproteínas y por una subunidad beta que difiere. La subunidad alfa es una cadena de entre 92 y 96 aminoácidos codificada por un gen del cromosoma 6. En el caso de la subunidad beta de la FSH, es codificada por un gen localizado en el cromosoma 11 y consta de 111 aminoácidos. Por otro lado, la de la LH es codificada por al menos seis genes en el cromosoma 19, que dan lugar a una proteína de 121 aminoácidos (Choh, 1972; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998). Se ha observado en humanos y roedores que la expresión del gen de una de las subunidades beta determina el final de la diferenciación y proliferación de los gonadotropos, por lo que determina el número que la hembra poseerá durante toda su vida (Pope *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha establecido que las subunidades por separado no poseen actividad biológica y es imprescindible que se lleve a cabo la dimerización para adquirir su identidad y función hormonal (Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998; Themmen y Huhtaniemi, 2000).

La síntesis y secreción de las gonadotropinas es estimulada por la unión de un factor hipotalámico a su receptor en los gonadotropos, donde las proteínas Gq y Gs activan la vía de señalización de la fosfolipasa C (PLC) (Liu *et al.*, 2002; Yeung *et al.*, 2006). Ésta promueve la síntesis de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃) a partir del fosfatidilinositol difosfato. El IP₃ estimula la liberación de calcio del retículo endoplasmático, lo que activa a la calmodulina II. Por otro lado, el DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) causando la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos como la P38 MAPK, las proteínas cinasas activadas por señales extracelulares ERK I y II y la cinasa N-terminal de Jun. Adicionalmente, se produce adenosín monofosfato cíclico y el incremento de éste resulta en la activación de la proteína cinasa A. Ésta, en conjunto con las otras proteínas, es transportada al núcleo en donde estimula la inducción de genes como *Jun*, *Fos*, *Atf3* y *Egr1*, los cuales son responsables de la expresión de las subunidades beta de las gonadotropinas (Ciccione y Kaiser, 2009; Kahn mouyi *et al.*, 2018).

La síntesis de las gonadotropinas también es influenciada por la P₄ y el E₂ y, en el caso de la FSH, por la activina, la inhibina y la folistatina (Gharib *et al.*, 1990; Das y Kumar, 2018). En ratonas ovariectomizadas se ha mostrado que la concentración del ARNm de ambas gonadotropinas, así como la concentración de éstas en la adenohipófisis y en el plasma sanguíneo, incrementa significativamente en comparación con los animales intactos (Abel *et al.*, 2014). Este mismo comportamiento en la concentración de ambas hormonas se observó en ratas y ovejas, sin embargo, a estas además de la ovariectomía se les administró benzoato de estradiol de forma crónica. En el caso de las ovejas, mostraron una reducción del 96% del ARNm de la LH y por lo tanto una disminución en la concentración de ésta en el suero sanguíneo. En las ratas, el ARNm de ambas gonadotropinas también disminuyó

significativamente (Nilson *et al.*, 1983; Simard *et al.*, 1988). El papel de la P₄ también se ha estudiado en ratas ovariectomizadas y en estos experimentos se ha observado un incremento del ARNm de la FSH y un decremento del de la LH. Contrario a esto, cuando se administra P₄ al medio de cultivo de explantes de hipófisis de oveja, la concentración y transcripción de la FSH disminuye, mientras que los valores de la LH no se modifican. Estos resultados sugieren que las hormonas esteroides actúan en los gonadotropos modulando la expresión de los genes que codifican para las subunidades de las gonadotropinas y, por lo tanto, regulan la cantidad de la LH y FSH que se secreta (Gharib *et al.*, 1990; Nett *et al.*, 2002).

Por otra parte, algunos autores han señalado que la acción de las hormonas esteroides, en particular el E₂, sobre la síntesis y secreción de la FSH no es de forma directa, sino que actúa a través de la inhibición de la activina o la estimulación de la folistatina y la inhibina. En el capítulo anterior se mencionó que estas hormonas peptídicas se sintetizan en el ovario y actúan de forma endocrina en el hipotálamo y la hipófisis, sin embargo, se ha mostrado que también son sintetizadas en la adenohipófisis, donde ejercen acciones paracrinas sobre los gonadotropos (Gregory y Kaiser, 2004; Mitwally *et al.*, 2005). En estudios *in vitro*, la administración de activina al medio de cultivo con tejido de la adenohipófisis resulta en un incremento en la síntesis del ARNm y de la secreción de la FSH, contrario a esto, cuando al mismo medio se le añade inhibina o folistatina el ARNm disminuye drásticamente por debajo de la cuantificación basal. Estos resultados son similares cuando se realiza la administración sistémica de ambos péptidos en ratas hembra adultas (Carroll *et al.*, 1989; 1991).

La importancia de la regulación de la síntesis y secreción de las gonadotropinas se debe a la actividad biológica de estas hormonas en la fisiología del ovario y en la reproducción de los mamíferos. Retomando las funciones que desempeñan ambas gonadotropinas encontramos que la FSH es imprescindible en la diferenciación y proliferación de las células de la granulosa, en las cuales se expresa su receptor. Además de esto, la FSH participa en el reclutamiento y selección de los folículos y estimula la aromatización de los andrógenos a estradiol. Por su parte, la LH juega un papel importante en la formación del complejo del *cúmulus* con el ovocito, en la maduración de los folículos preovulatorios, así como en la ruptura de éstos durante la ovulación. La LH es imprescindible en la formación del cuerpo lúteo y en las primeras etapas de la esteroidogénesis, ya que regula la actividad de la proteína que transporta al colesterol dentro de las células de la teca para que sirva como sustrato en dicho proceso (Goodman, 2009; Kontogogeorgos *et al.*, 2012; Jones y López, 2014).

La síntesis y secreción de estas hormonas debe fluctuar durante la vida sexual de la hembra para que todos los procesos mencionados se lleven a cabo de forma óptima. Lo anterior se ha demostrado en las hembras de diferentes especies; en las que la expresión de la subunidad beta y la secreción de ambas gonadotropinas oscila durante el ciclo reproductivo (Mahesh, 1985; Nett *et al.*, 2002). En el ciclo estral de la rata, la síntesis del ARNm de la subunidad beta de la LH y la FSH, comienza a aumentar durante el diestro y metaestro, respectivamente. En el caso de la LH la mayor síntesis de su transcrito se da en las horas

previas al pico preovulatorio y vuelve a su concentración basal rápidamente, mientras que el transcrito de la FSH permanece elevado hasta la mañana del estro. En cuanto a la concentración sérica de ambas hormonas, se mantienen en condiciones basales durante el estro, metaestro y diestro y alcanza su punto máximo en el proestro. Con esta información podemos notar que los cambios en la expresión la subunidad beta de las gonadotropinas no se traslapan con los de la concentración en el suero sanguíneo (Childs, 1997; Kaiser, 2017). Cuando la síntesis y secreción no se da de esta forma se presentan alteraciones en los ovarios, por ejemplo, la hipersecreción de la LH durante todas las etapas del ciclo estral resulta en patologías como el desarrollo de tumores en las células de la granulosa o del síndrome de ovario poliquístico y ambas condiciones culminan en la infertilidad (Risma *et al.*, 1995).

Anteriormente se mencionó que la regulación de la síntesis y secreción de las gonadotropinas no es una función intrínseca de la adenohipófisis, sino que requiere de las hormonas y péptidos ováricos y de información proveniente del sistema nervioso. La idea anterior se ha sustentado a partir de diferentes métodos experimentales en donde la lesión o destrucción del hipotálamo resulta en la inhibición de la secreción de las gonadotropinas y en el bloqueo de la ovulación (Halász y Gorski, 1967). Por otro lado, la estimulación eléctrica, por si sola o tras una lesión, incrementa o reestablece la concentración de las gonadotropinas y la ovulación (Phelps *et al.*, 1976). Otros métodos involucran el uso de fármacos que permiten la manipulación bioquímica del hipotálamo lo que modifica las variables mencionadas (Cruz *et al.*, 2014). Estos estudios permitieron determinar que, dentro de las estructuras del sistema nervioso central, el hipotálamo es el que regula de forma directa la función de la adenohipófisis.

III. EL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo forma parte del sistema nervioso central, se origina de la parte ventral del diencefalo y su desarrollo, al igual que el de la adenohipófisis, es mediado principalmente por la expresión de las proteínas morfogenéticas óseas, las proteínas de la familia hedgehog y WNT. Dicha estructura se localiza por debajo del tálamo, forma las paredes y el suelo del tercer ventrículo y se encuentra delimitada por el quiasma óptico, los tractos ópticos y por los cuerpos mamilares (Xie y Dorsky, 2017; Pop *et al.*, 2018). El hipotálamo se ha dividido anatómicamente en sentido rostrocaudal en cinco regiones que son la preóptica, la anterior, la medial o tuberal, la posterior y la mamilar. Cada una de estas regiones contiene núcleos formados por la conglomeración de neuronas que sintetizan una gran variedad de neurotransmisores y neuropéptidos que regulan diversos procesos (Halász, 2004; Hahn *et al.*, 2019). La región preóptica es la que anteriormente se señaló como POA y se encuentra dividida en dos porciones una medial y una ventrolateral. Por otro lado, la región anterior contiene al núcleo supraóptico, al núcleo paraventricular, al núcleo supraquiasmático (SCN), al área hipotalámica anterior y al núcleo periventricular que se extiende caudalmente. La región tuberal incluye al núcleo arqueado (ARC), al núcleo ventromedial, al núcleo dorsomedial y al área hipotalámica lateral. Finalmente, en la región posterior y mamilar se encuentra el núcleo hipotalámico posterior y el núcleo premamilar (Figura 6). La función de cada uno de estos núcleos permite que el hipotálamo sea un centro regulador de la homeostasis del organismo, ya que coordina las respuestas fisiológicas de varios sistemas ante los estímulos que provienen del ambiente externo para mantener el equilibrio interno (Levine, 2012; Xie y Dorsky, 2017; Pop *et al.*, 2018).

Las neurohormonas que se sintetizan en el hipotálamo llegan a la hipófisis a través del sistema portal, sin embargo, en primera instancia las terminales nerviosas de estas neuronas deben llegar a la eminencia media. Ésta es una estructura nerviosa desprovista de actividad sináptica, se encuentra en la base del hipotálamo y se compone por una capa interna y otra externa (Rinne, 1966; Daniel, 1976). En ambas capas se pueden observar células gliales de diferentes tipos que se encargan de mediar la difusión y el transporte de sustancias entre el cerebro y el resto del cuerpo; ya que la eminencia media carece de la barrera hematoencefálica. Además de lo anterior, estas células proveen protección y mantenimiento a ambas capas. La interna se caracteriza por contener a las fibras nerviosas que provienen de los núcleos supraóptico y paraventricular. Por otro lado, en la externa se encuentran los vasos sanguíneos del plexo primario y las terminales nerviosas de las neuronas hipofisiotróficas que regulan la actividad de la adenohipófisis (Halász, 2004; Yin y Gore, 2010).

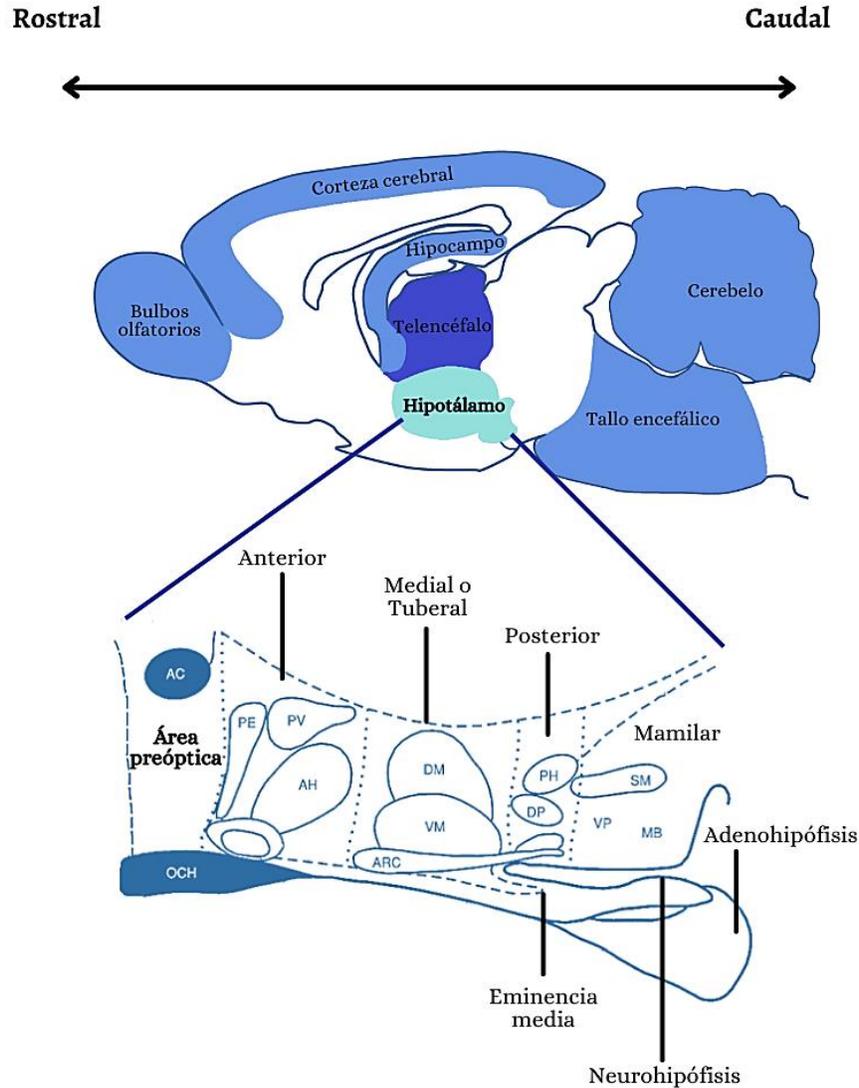


Figura 6. Esquema de la división anatómica del hipotálamo en sentido rostral caudal. Las abreviaciones corresponden a la comisura anterior (AC), quiasma óptico (OCH), núcleo periventricular (PE), núcleo paraventricular (PV), área hipotalámica anterior (AH), núcleo dorsomedial (DM), núcleo ventromedial (VM), núcleo arqueado (ARC), núcleo hipotalámico posterior (PH), núcleo premamilar dorsal (DP), núcleo premamilar ventral (VP), núcleo supramamilar (SM), cuerpo mamilar (MB). Modificado de Halász, 2004; Xie y Dorsky, 2017.

III.I EL ÁREA PREÓPTICA

El POA se encuentra dentro de la región periventricular rostral del tercer ventrículo. Posee aferencias y eferencias de diferentes núcleos del hipotálamo y de otras estructuras del cerebro. En el caso de las aferencias dentro del hipotálamos se han identificado fibras provenientes del área anteroventral periventricular (AVPv), del SCN, del ARC, de los núcleos dorsomedial, ventromedial, premamilar y tuberomamilar. También se han identificado aferencias extrahipotalámicas que provienen de estructuras como el tálamo y el

telencéfalo tales como el órgano subfornical, la región subtalámica, la zona incerta, los núcleos endopiriforme, accumbens y septal, así como de la banda diagonal de Broca, del núcleo basal de la estria terminal y de la amígdala. Por otra parte, el mesencéfalo y la médula presentan aferencias al POA a partir de estructuras como el núcleo del rafe, del pedúnculo del cerebelo, así como de los núcleos parabraquial, del tracto solitario y del reticular lateral (Berk y Filkenstein, 1981; Chiba y Murata, 1985; Simmerly y Swanson, 1986). En el caso de las eferencias, el POA envía fibras hacia la banda diagonal de Broca, el septum medial, el área tegmental ventral, los núcleos talámicos periventriculares, la amígdala, así como a la eminencia media. Adicionalmente, se han observado proyecciones hacia estructuras hipotálamicas como el ARC, el SCN, el núcleo supraóptico, los núcleos dorsomedial, premamilar y supramamilar (Swanson, 1976; Chiba y Murata, 1985; Larsen *et al.*, 1994).

En roedores y ovejas se ha identificado que el POA recibe y envía una variedad de neurotransmisores entre los que se han identificado a la noradrenalina, la adrenalina, la serotonina, la histamina, al GABA, al glutamato, la galanina y a la dopamina. También se ha mostrado la presencia de neuropéptidos como la kisspeptina, la dinorfina, la β -endorfina, la neuroquinina, el neuropéptido Y, la somatostatina y por supuesto la GnRH (Ciechanowska *et al.*, 2010; Tsuneoka y Funato, 2021). La identificación de las aferencias y eferencias, así como la naturaleza bioquímica de éstas, permiten elucidar el papel fisiológico que el POA desempeña en los mamíferos. Previamente se mencionó que el hipotálamo es un centro importante en la preservación de la homeostasis y el POA contribuye de forma particular con la termoregulación, la osmosregulación del sistema nervioso y la regulación de otros procesos autónomos como la ingesta de agua y comida, el sueño, la contracción pulmonar, la vasodilatación y la vasoconstricción (Chiba y Murata, 1985; Simmerly y Swanson, 1986). Además de estos procesos, ahora se sabe que el POA es un elemento importante en el eje neuroendocrino de la reproducción ya que regula procesos como la conducta sexual, los cuidados parentales y la secreción de las gonadotropinas (Gibson, 1986; Tsuneoka y Funato, 2021). Evidencia de lo anterior ha sido mostrada a través de experimentos en los que las lesiones parciales o totales de esta estructura resultan en la inhibición de la conducta de cortejo y monta en el caso de los machos, mientras que en las hembras se pierde la conducta de lordosis e incrementa el comportamiento agresivo imposibilitando la cópula (Christensen *et al.*, 1977; Nance *et al.*, 1977). En el caso de los cuidados parentales, el mismo modelo experimental en ratones resulta en un decremento de conductas como el acicalamiento, el reconocimiento por el olfato y el acurrucamiento sobre las crías. A pesar de que estos cambios se dan tanto en los machos como en las hembras, en estas últimas el decremento es mayor (Lee y Brown, 2002).

Por otro lado, la relación entre el POA y la regulación de la ovulación se ha mostrado con otra serie de experimentos. En primera instancia la lesión completa o parcial de esta área disminuye la concentración plasmática de la LH e inhibe su pico preovulatorio (Ma *et al.*, 1990). Adicionalmente, Tejasen y Everett (1967) analizaron el efecto de la desaferentación caudal, unilateral o bilateral, y la consecuente estimulación eléctrica de esta área, sobre la

ovulación. Los resultados mostraron que la pérdida de las aferencias y eferencias del POA bloquea la ovulación y que la estimulación eléctrica la reestablece parcialmente. Similar a la lesión y la desaferentación, la inyección de barbitúricos, que impide la neurotransmisión, resulta en un decremento en la concentración de LH y en el bloqueo de la ovulación si se realiza por la tarde del proestro (Everett y Sawyer, 1950; Meyer *et al.*, 1974). En este modelo, la estimulación bilateral del POA reestablece la ovulación en la mitad de los animales, mientras que en los grupos tratados unilateralmente todos los animales ovulan siempre y cuando la intensidad eléctrica sea mayor a la empleada en el grupo bilateral. En el caso de la concentración de la LH, ambos grupos presentaron el incremento y el consecuente pico preovulatorio, sin embargo, se observó un aumento más rápido y una secreción prolongada en los grupos donde se estimuló al POA de forma bilateral (Cramer y Barraclough, 1971).

En otro estudio donde sólo se llevo a cabo la estimulación eléctrica bilateral, se observó que la concentración de la LH incrementó de forma significativa en comparación con el grupo control (Clemens *et al.*, 1971). En conjunto, estos resultados nos muestran la importancia de la integridad de las vías aferentes y eferentes del POA en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación. Aunada a esta evidencia funcional, la anatomía de la región permite explicar los resultados anteriores, ya que en dicha estructura se han identificado somas de neuronas que envían sus terminales nerviosas a la eminencia media, las cuales sintetizan y secretan a la GnRH, el factor hipotalámico que estimula la síntesis y secreción de las gonadotropinas (Merchenthaler *et al.*, 1984; Castañeyra-Perdomo *et al.*, 1992). Por otro lado, diversos estudios han mostrado una gran cantidad de fibras que hacen contacto con éstas neuronas (Dudas y Merchenthaler, 2006), por lo tanto, la supresión de las vías aferentes y eferentes del POA resultan en la inhibición de la información que participa en la síntesis y secreción de la GnRH.

III.II LAS NEURONAS DE LA GnRH

Las neuronas de la GnRH se originan a partir de la placoda olfatoria en etapas tempranas del desarrollo embrionario, donde también comienza su migración, que es mediada por el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor inhibidor de leucemia, la lactosamina, el GABA, la colecistoquinina, entre otros (Cariboni *et al.*, 2007; Jasoni *et al.*, 2009). La migración de estas neuronas se da en un sentido rostrocaudal y su establecimiento dentro del cerebro varía dependiendo de la especie. Además de estar presentes en el POA, en roedores se ha identificado a estas neuronas en los núcleos periventricular, paraventricular y arqueado, en el hipotálamo anterior, la banda diagonal de Broca, el órgano vasculoso de la lámina terminal y el septum medial (Figura 7A). En el caso de los primates, estas neuronas se localizan principalmente en el hipotálamo mediobasal (King y Anthony, 1984; Whitlock, 2005; Castañeyra-Ruiz *et al.*, 2013).

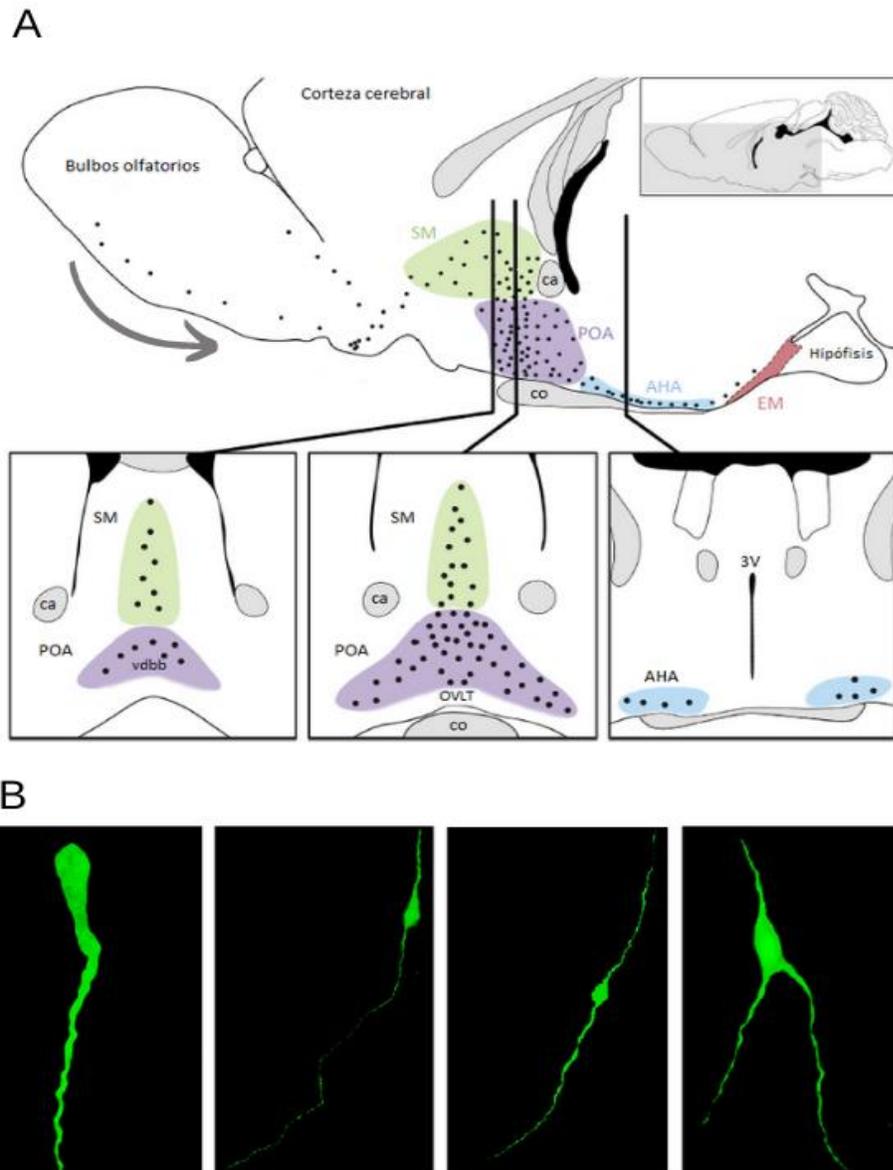


Figura 7. A) Representación gráfica de la migración de las neuronas de GnRH durante el desarrollo embrionario y su posterior establecimiento en el (POA), (SM) septum medial, (vdbb) banda diagonal de Broca, (OVLT) órgano vasculoso de la lámina terminal y el (AHA) área hipotalámica anterior; Modificado de [Herbison, 2015](#). **B)** Micrografía que muestra la diferente morfología de las neuronas GnRHérgicas del POA. Modificado de [Xue et al., 2014](#).

Las neuronas de GnRH se caracterizan morfológicamente por ser fusiformes de tipo unipolar o bipolar, las primeras poseen cuerpos celulares delgados mientras que las segundas presentan somas con forma triangular u ovalada y dos proyecciones que se disponen en sentidos opuestos (Figura 7B) ([Merchenthaler et al., 1984](#); [Xue et al., 2014](#)). A partir de su origen y hasta la pubertad, las neuronas GnRHérgicas sufren cambios en su morfología y actividad. En roedores y primates se ha mostrado que desde el nacimiento y hasta la pubertad estas neuronas presentan una mayor arborización dendrítica, menor densidad de espinas y menor actividad sináptica. A partir de la pubertad y durante la adultez, la complejidad

dendrítica disminuye, por el contrario, la densidad de espinas y la actividad sináptica aumenta. Estos cambios están asociados con la activación de estas neuronas para regular las funciones reproductivas. La transición morfológica de las neuronas de la GnRH es mediada principalmente por la acción de neurotransmisores como el GABA, el glutamato y la kisspeptina (Cottrell *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016).

Hasta antes de 1970, la GnRH era conocida como el factor liberador de la LH o FSH. Esta neurohormona se identificó, en primera instancia, en los cerebros de ovejas y cerdos en donde se mostró que es un decapeptido de secuencia lineal: pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pr-Gly o-NH₂ (Sherwood *et al.*, 1993; Somoza *et al.*, 2002). A partir de su descubrimiento se han identificado alrededor de 23 isoformas que presentan el 60% de homología con la primera. Cada una de estas isoformas deriva de un péptido precursor de 92 aminoácidos que se divide en una secuencia señal que consta de 23 aminoácidos, la GnRH con 10 aminoácidos, 3 aminoácidos que intervienen en el procesamiento molecular y una secuencia de 56 aminoácidos que corresponden al péptido asociado a la GnRH (Jones y López, 2014). De las 23 isoformas, sólo se han identificado tres tipos en los mamíferos, la GnRH I, II y III. El tipo I es el específico de la clase *mammalia* y se expresa principalmente en el POA y el área hipotalámica anterior. El tipo II se aisló de cerebros de gallinas y en la mayoría de los mamíferos se ha identificado en diferentes áreas del mesencéfalo y en el hipocampo. Por otro lado, el tipo III se identificó en lampreas y en algunas especies de mamíferos se encuentra en la porción que une al nervio olfatorio con el telencéfalo (Montaner *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2002).

Se ha mostrado que estos tipos de GnRH, además de diferir en su secuencia y en su localización, también poseen diferentes funciones biológicas. El tipo I regula la síntesis y secreción de las gonadotropinas. El segundo participa en el control de la pubertad, el comportamiento sexual, la ingesta de alimento y las funciones metabólicas. En el caso de la GnRH III, no es claro el papel que desempeña, previamente se asociaba con la síntesis y secreción selectiva de la FSH, pero más tarde se mostró que no es así. Otros autores sugieren que debido a su lugar de expresión está implicada en el comportamiento sexual relacionado con el olfato. Adicionalmente, se ha mostrado que la GnRH I y II también regulan la función de la placenta, el útero y los ovarios (Sherwood *et al.*, 1993; Montaner *et al.*, 2001; Dubois *et al.*, 2002; Desaulniers *et al.*, 2017). En el útero, la GnRH participa en la implantación del embrión, la formación de la placenta, la inhibición de las contracciones uterinas durante la gestación y en su estimulación durante el parto. En los ovarios, se ha mostrado que el decapeptido participa en la diferenciación y proliferación de las células de los folículos, sin embargo, otros autores la han asociado con procesos anti proliferativos y proapoptóticos que desencadenan la atresia folicular o que intervienen en la luteólisis (Kim *et al.*, 2007).

La síntesis de la GnRH comienza en el núcleo de la célula, donde se lleva a cabo la transcripción del gen que la codifica. El ARNm maduro resultante es trasladado al citoplasma y transportado al retículo endoplasmático, donde los ribosomas lo traducen, dando lugar al

péptido precursor. Posteriormente, éste es transportado al aparato de Golgi en donde se empaqueta en vesículas secretoras y en donde se continúa con el procesamiento por medio de enzimas que están dentro de dichas vesículas (Rangaraju *et al.*, 1991; Yin y Gore, 2006). La endopeptidasa es la primera enzima que procesa al péptido precursor, dando lugar a la separación de los 56 aminoácidos del péptido asociado. Posteriormente, los 36 aminoácidos restantes son procesados por las carboxipeptidasas D y E, la glutaminil ciclasa y la monooxidasa α -amidante de peptidilglicina lo que da lugar al decapeptido maduro, el cuál es secretado en las terminales nerviosas que se encuentran en la eminencia media (Wetsel y Srinivasan, 2002). Se ha observado que la síntesis de la GnRH depende de la etapa de la vida de los mamíferos y en el caso de la adultez, de la etapa del ciclo reproductivo. En los roedores se ha descrito que en las etapas embrionarias hay un incremento del transcrito, el cual decrece en los primeros días postnatales. Posteriormente, días previos a la apertura vaginal se da un incremento que se mantiene durante la pubertad y la adultez (Gore *et al.*, 1999). Se ha observado que una vez que las hembras han alcanzado la madurez reproductiva, el ARNm de la GnRH incrementa significativamente en el proestro en comparación con otras etapas del ciclo. Finalmente, cuando las hembras comienzan a envejecer, la concentración del transcrito disminuye significativamente y no se da el incremento preovulatorio descrito en el proestro de las ratas maduras (Malik *et al.*, 1991; Gore, 2002).

La GnRH se secreta de forma tónica o fásica en la eminencia media. La secreción tónica se caracteriza por la liberación del neuropéptido en pulsos con intervalos de tiempo constantes, y la fásica se refiere al incremento abrupto de la secreción en la fase preovulatoria (Funabashi *et al.*, 2002). Se ha mostrado que la amplitud y la frecuencia de los pulsos de secreción determinan la selectividad de la síntesis y secreción de las gonadotropinas. Una frecuencia alta, de más de un pulso cada 30 minutos, estimula la síntesis y secreción de la LH. En contraste, una frecuencia baja, con un pulso cada 2 horas, desencadena la secreción de la FSH (Filicori y Crowley, 1984; Tsutsumi y Webster, 2009). Algunos autores han señalado que la síntesis y secreción de la FSH es constitutiva y que la GnRH tiene un papel estabilizador en ambas acciones. Por otro lado, se ha mostrado que la secreción de la LH está ampliamente relacionada con la secreción pulsátil de la neurohormona (Gay y Sheth, 1972). Evidencia de lo anterior se mostró en ovejas a las que la administración de antagonistas de la GnRH resultó en la inhibición de la LH, mientras que la FSH sufrió un lento decremento y su concentración permaneció detectable durante todo el estudio (Caraty *et al.*, 1984). Además de esto, se ha observado que las neuronas inmunorreactivas a este decapeptido presentan una mayor actividad en momentos cercanos al incremento de la secreción de la LH en el día del proestro en comparación con las otras etapas del ciclo (Hoffman *et al.*, 1993).

El papel de la pulsatilidad en la secreción de la GnRH se ha estudiado mediante diferentes modelos experimentales que han permitido elucidar su importancia fisiológica. El primer ejemplo es un estudio en primates en el que se implementó el modelo de lesión del hipotálamo, lo que resultó en la inhibición de la secreción de las gonadotropinas y de la ovulación. Posterior a las lesiones, se les administró GnRH artificial de forma continua o

episódica y los resultados mostraron que cuando la neurohormona se administra de forma continua la concentración de la LH y la FSH permanece basal. Contrario a esto, cuando la administración es de forma episódica la concentración de las hormonas hipofisarias incrementa comportándose como la concentración de los animales intactos (Belchetz *et al.*, 1978). Se ha mostrado que los efectos de la administración continua se deben a una desensibilización de los receptores a GnRH y a la reducción de estos en los gonadotropos (Bliss *et al.*, 2010; Limonta *et al.*, 2018). Este hallazgo se ha implementado para tratar el hipogonadismo en humanos, una patología en la que los individuos no maduran sexualmente y son infértiles. En el caso de las mujeres, la administración de agonistas naturales o sintéticos del decapeptido, de forma episódica, restaura la secreción de la LH y la FSH, así como la ovulación (Maeda *et al.*, 2010).

La secreción pulsátil de la GnRH parece depender de factores intrínsecos y extrínsecos a las neuronas que la sintetizan. En el primer caso, se ha mostrado la secreción pulsátil del decapeptido en líneas celulares de ratón y en tejido hipotalámico de primate cultivados *in vitro*. A pesar de lo anterior sabemos que, en el animal entero, estas neuronas necesitan de información neuroendocrina que les comunique el estado del medio interno y externo (Figura 8) (Halász y Gorski, 1967; Phelps *et al.*, 1976; Martínez de la Escalera *et al.*, 1992; Terasawa *et al.*, 1999; Bliss *et al.*, 2010). En el caso de la regulación endocrina, se ha observado que las hormonas ováricas modulan la secreción de la GnRH durante el ciclo estral. En la fase lútea, la concentración del E₂ y la P₄ resulta en un decremento de la frecuencia y un aumento en la amplitud de los pulsos de la GnRH. Contrario a esto, en la fase folicular, cuando los folículos preovulatorios maduran, la concentración plasmática del E₂ incrementa, lo que estimula el aumento de la frecuencia y la disminución de la amplitud de dichos pulsos (Clarke y Pompolo, 2005; Kanasaki *et al.*, 2017; Limonta *et al.*, 2018). También se ha mostrado que la corticosterona y el cortisol, hormonas que media las respuestas al estrés, inhiben la secreción de la GnRH (Ciechanowska *et al.*, 2010; Dobson *et al.*, 2020).

En el caso de la regulación nerviosa, las neuronas de GnRH reciben aposiciones directas de fibras que contienen a varios de los neurotransmisores y neuropéptidos que llegan al POA desde otras estructuras del encéfalo (Dudas y Merchenthaler, 2006). Además de las aposiciones, se ha confirmado la presencia de diversos receptores y de comunicación sináptica de estos sistemas con las neuronas GnRHérgicas mediante la identificación de vesículas presinápticas en las espinas dendríticas de dichas neuronas. En este mismo estudio se observó que una misma fibra aferente puede realizar más de una sinapsis con la misma neurona de GnRH, lo cual sugiere que los componentes que inervan a estas neuronas están integrados de forma compleja y precisa para controlar su función (Moore *et al.*, 2018; Spergel, 2019).

Se ha mostrado que los neurotransmisores modulan distintos procesos dentro de la neurona de GnRH en función de la región inervada. Por ejemplo, Wang y colaboradores

(2020) mostraron que la región distal del dendrón, cercana a la eminencia media, recibe más aposiciones que el soma. La interrupción de la comunicación sináptica en el soma inhibe la secreción fásica de la GnRH, pero no la tónica, contrario a esto, la interrupción en el dendrón distal inhibe ambos patrones de secreción. En adición a la región inervada, se ha mostrado que los neurotransmisores que llegan a las neuronas de GnRH pueden tener un papel estimulante o inhibitorio sobre su actividad (Maeda *et al.*, 2010). Actualmente se han descrito numerosos neuromoduladores de la actividad de estas neuronas y algunos de estos son el GABA, el glutamato, la acetilcolina, la histamina, la serotonina, el péptido intestinal vasoactivo, la sustancia P, la dinorfina, la neuroquinina, la neurotensina, la hormona inhibitoria de las gonadotropinas (GnIH), la kisspeptina y las catecolaminas (Figura 8) (Halász *et al.*, 1988; Dudas y Merchenthaler, 2006, Ciechanowska *et al.*, 2010).

Previamente mencionamos que el GABA es imprescindible en la migración y establecimiento de las neuronas de GnRH durante el desarrollo embrionario y también media los cambios morfofisiológicos que éstas sufren en el inicio de la pubertad (Cottrell *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2014). Estudios anatómicos en roedores han confirmado la presencia de los dos tipos de receptores a este neurotransmisor, así como su sustrato enzimático en dichas neuronas. Aunado a esto, la evidencia funcional señala que el GABA inhibe la actividad de las neuronas de GnRH y, en consecuencia, la secreción de la LH (Halász *et al.*, 1989; Funabashi *et al.*, 2002). Por otro lado, diferentes autores han señalado que la kisspeptina es el principal estimulante de las neuronas de la GnRH. De forma general, se ha observado que la administración sistémica o cerebroventricular de la kisspeptina induce un incremento sostenido de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas. Contrario a esto, la administración de un antagonista, a través de las mismas vías, resulta en la inhibición de la secreción de estas hormonas y en los tratamientos crónicos, en la infertilidad (Caraty y Franceschini, 2008). Los estudios anatómicos han identificado que la kisspeptina que inerva a las neuronas de GnRH proviene del ARC y del AVPv. Se ha mostrado que la señalización proveniente del ARC regula la secreción tónica de la GnRH e inhibe la secreción fásica; mientras que la del AVPv la estimula (Colledge, 2009; Oakley *et al.*, 2009). En el caso de la GnIH, la neuroquinina y la dinorfina, se ha observado que pueden actuar directamente sobre la neurona de GnRH, o indirectamente a través de las neuronas de kisspeptina (Skorupskaite *et al.*, 2014).

Los sistemas de neurotransmisión como el de la serotonina, la acetilcolina o las catecolaminas tienen funciones diferenciales que dependen del tipo de receptor al cual se acoplan en las neuronas de GnRH. Por ejemplo, se ha mostrado que la serotonina inhibe o estimula su actividad al unirse al receptor 5-HT1A y 5-HT2A, respectivamente (Spergel, 2019). En el caso de las catecolaminas, se ha observado que la eliminación de sus reservas, mediante la administración sistémica de reserpina por la tarde del proestro, resulta en el bloqueo de la ovulación (Barraclough y Sawyer, 1957). Resultados similares se han observado al inhibir la síntesis de la noradrenalina y de la dopamina en la etapa de proestro. El bloqueo de la ovulación en estos animales puede revertirse al administrar fármacos que

estimulan la síntesis de ambas catecolaminas, sin embargo, esto depende de la hora en la que se realiza el tratamiento (Kalra y McCann, 1974).

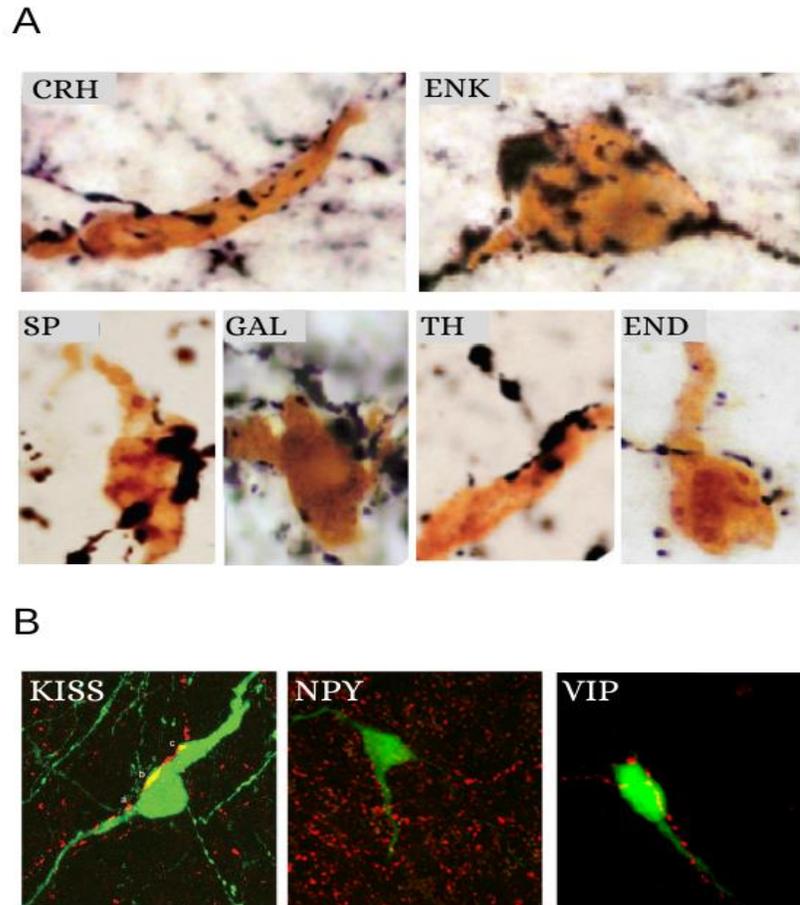


Figura 8. Panel A, micrografías de una inmunohistoquímica en la que se pueden identificar aposiciones entre las neuronas GnRHérgicas (color cobrizo) con diferentes neuropéptidos y una enzima limitante de la síntesis de catecolaminas. (CRH) hormona liberadora de corticotropina, (ENK) encefalina, (SP) sustancia (P), (GAL) galanina, (TH) tirosina hidroxilasa, (END) endorfina. Panel B, invasión de las neuronas de GnRH (color verde) por la kisspeptina, el neuropéptido Y y el péptido intestinal vasoactivo (color rojo). Modificado de Dudas y Merchenthaler, 2006; Ward *et al.*, 2009.

Aunado al bloqueo de la ovulación, se ha reportado que los tratamientos que eliminan la síntesis o las reservas de catecolaminas inhiben la secreción preovulatoria de la LH (Barraclough y Wise, 1982). De forma particular, se ha mostrado que la administración de dopamina o noradrenalina en el tercer ventrículo, durante las cuatro etapas del ciclo estral, induce cambios en la concentración de la LH. A partir de lo anterior se observó que la dopamina incrementa de forma significativa la concentración de la LH durante todo el ciclo y en el caso de la noradrenalina, solo estimula dicho incremento en la etapa de estro (Schneider y McCann, 1970). Estas evidencias muestran la variedad y complejidad de las redes neuronales que regulan la fisiología de las neuronas GnRHérgicas del POA. En el caso particular de las catecolaminas podemos notar que la noradrenalina y la dopamina son importantes para que se lleve a cabo la regulación de la secreción de la LH y de la ovulación.

IV. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO

V.I LA DOPAMINA Y SU BIOSÍNTESIS

En los años en los que se descubrió a la dopamina no se tenía la noción de que fuera un neurotransmisor, se creía que su importancia biológica se limitaba a ser el precursor de la noradrenalina. No fue hasta 1950 que las investigaciones realizadas por el equipo de Arvid Carlsson permitieron identificar a la dopamina como una sustancia importante en la fisiología de los organismos. Además de definir a la dopamina como un neurotransmisor consolidado, el equipo de Carlsson diseñó e implementó técnicas que permitieron la identificación y cuantificación del neurotransmisor junto con sus receptores, trabajo que los hizo acreedores del premio Nobel en medicina y fisiología en el año 2000. Antes de aislarse en animales, esta sustancia se identificó como metabolito secundario encargado de la pigmentación en una planta de la familia *Fabaceae*. Actualmente sabemos que se encuentra en plantas y animales, en estos últimos su composición bioquímica está conservada (Yeragani *et al.*, 2010; Meiser *et al.*, 2013).

La dopamina también es conocida como 3-hidroxitiramina y pertenece al grupo de las catecolaminas, ya que está compuesta por un grupo catecol, un anillo aromático con dos grupos hidroxilos, unido a una cadena de etilamina (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000; Peaston y Weinkove, 2004). La vía clásica de la biosíntesis de este neurotransmisor es una reacción enzimática de dos pasos que se da en el citoplasma de las neuronas presinápticas. La primera reacción es la hidroxilación del anillo fenólico del aminoácido tirosina, proceso mediado por la enzima tirosina hidroxilasa (TH), lo que da como primer producto a la dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Se han identificado otras enzimas que actúan como cofactores que regulan la actividad enzimática de la TH y estos son la tetrahidrobiopterina y la guanina trifosfato ciclohidrolasa (Meiser *et al.*, 2016).

La segunda reacción es la descarboxilación de la L-DOPA por acción de la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), lo que produce a la dopamina (Figura 9) (Peaston y Weinkove, 2004; Lawlor y During, 2004). Una vez sintetizada, el transportador vesicular de monoaminas del tipo 2 (VMAT-2) empaqueta al neurotransmisor en vesículas sinápticas en las que la dopamina es procesada para evitar su oxidación y transportada a las terminales nerviosas. Posteriormente, cuando la célula presináptica recibe un estímulo que la despolariza, la dopamina es liberada hacia el espacio sináptico en donde puede catabolizarse o ejercer su acción en células postsinápticas y, finalmente, estimular una respuesta biológica (Chen *et al.*, 2003; Lawlor y During, 2004).

El catabolismo de la dopamina puede suceder por dos vías diferentes en las que convergen algunas enzimas y metabolitos, a pesar de esto, el orden de acción de las enzimas y de producción de los metabolitos es distinto. En el primer caso, la dopamina es recapturada por el transportador de membrana de dopamina (DAT), el cual internaliza al neurotransmisor

a la célula, en donde es procesado por la monoamino oxidasa (MAO) dando lugar al peróxido de hidrógeno y al 3,4-dihidroxifenil acetaldehído (DOPAL). Este último producto es catabolizado por la enzima alcohol deshidrogenasa (AD), reacción que da como producto al ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). El DOPAC es procesado por la catecol-o-metil transferasa (COMT), que lo convierte en ácido homovanílico (HVA). En la segunda vía la dopamina no es recapturada por el DAT, sino que es metabolizada directamente por la COMT, lo que produce a la 3-metoxitiramina (3-MT). A continuación, ésta es convertida en 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehído (MHPA) por acción de la MAO y, finalmente, es catabolizada por la AD dando lugar al HVA (Figura 9) (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000; Peaston y Weinkove, 2004; Meiser *et al.*, 2016). La MAO tiene dos isoformas, la A y B. Ambas son bioquímicamente semejantes y su diferencia radica en que la MAO-A es la que tiene mayor actividad catabólica en humanos mientras que la B, en roedores (Chen *et al.*, 2003).

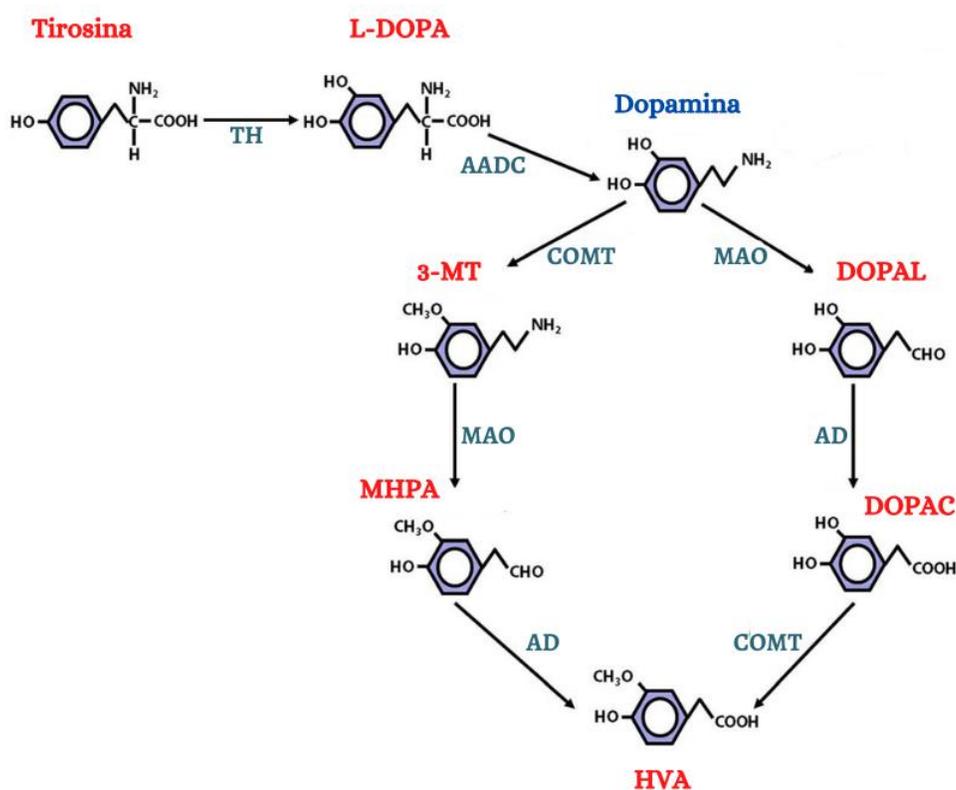


Figura 9. Vía clásica del metabolismo de la dopamina en el sistema nervioso central. Las enzimas implicadas en la síntesis y catabolismo (color azul) son la tirosina hidroxilasa (TH), descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), catecol-o-metil transferasa (COMT), monoamino oxidasa (MAO) y alcohol deshidrogenasa (AD). La dopamina se sintetiza a partir de la tirosina y de la dihidroxifenilalanina (L-DOPA). En su catabolismo se obtienen diferentes productos como la 3-metoxitiramina (3-MT), la 3,4-dihidroxifenil acetaldehído (DOPAL), 3metoxi-4-hidroxifenil acetaldehído (MHPA), 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA). Modificado de Laatikainen *et al.*, 2013.

Este neurotransmisor se sintetiza y actúa a nivel periférico y central, en este último es donde se produce en mayor cantidad y en donde regula diversas de funciones entre las que destacan la motricidad, la cognición y la conducta. Se ha mostrado que la participación de la dopamina en la regulación de estos procesos está estrechamente vinculada con su distribución anatómica. Debido a lo anterior existen diversos estudios que han tenido por objetivo determinar lo sitios del encéfalo en los que se encuentran las neuronas dopaminérgicas y sus terminales nerviosas (Björklund y Dunnet, 2007; Pivonello *et al.*, 2007).

IV.II LA DISTRIBUCIÓN DE LAS NEURONAS DE DOPAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SUS EFERENCIAS AL POA

Las neuronas que sintetizan dopamina se originan en la estructura que une al prosencéfalo con el mesencéfalo durante las primeras semanas de gestación. Su diferenciación es mediada por la expresión de PITX2, TGF β , FGF8, hedgehog, entre otras (Prakash y Wurst, 2006; Bissonette y Roesch, 2016). Al igual que en otros tipos celulares, la diferenciación y proliferación de las neuronas dopaminérgicas ocurre a la par de una migración a su posición final. Este proceso se da en dos sentidos que dependen de la etapa del desarrollo de los animales. La primera migración se da durante etapas embrionarias en un sentido rostral y lateral, mientras que la segunda ocurre en etapas postnatales, en sentido caudal y medial. El establecimiento de estas neuronas se da en días posteriores al nacimiento, momento en el que el sistema dopaminérgico obtiene su especificidad funcional (a *et al.*, 1995; Smits *et al.*, 2006).

Diversos estudios de inmunohistoquímica con anticuerpos contra la TH o la AADC han descrito que las neuronas de dopamina se distribuyen ampliamente en el sistema nervioso central. Se ha reportado su presencia en los núcleos del tracto solitario, el motor dorsal del nervio vago, el área postrema, el núcleo parabraquial, la sustancia negra, el área tegmental ventral, el núcleo accumbens, la corteza prefrontal, la estría terminal, la zona incerta, el hipotálamo y los bulbos olfatorios (Albanese *et al.*, 1986; Kawano *et al.*, 1995). A pesar de su amplia distribución en el sistema nervioso central, estas neuronas se encuentran bien organizadas dentro del encéfalo. Lo anterior permitió que fueran clasificadas en grupos celulares en los que la ubicación anatómica de sus somas es el criterio de agrupación (Smits *et al.*, 2006). Los conjuntos celulares de la dopamina están dentro de la clasificación general establecida para las catecolaminas, la cual corresponde a los grupos celulares del A1 al A-17. De éstos, los grupos del A8 al A15 son exclusivos de la dopamina, los cuales se dividen en cuatro vías o sistemas cuya clasificación depende, además de la ubicación de sus somas, del alcance de sus terminales nerviosas y de los procesos en los que participan. Esta organización esta conservada en mamíferos como las ratas, las ovejas, los cerdos y los primates, lo que ha facilitado el estudio de la fisiología del sistema dopaminérgico (Chinta y Andersen, 2005; Hong, 2013).

Los grupos del A8 al A10 son aquellos que se encuentran en la región retrorubral y el área tegmental ventral. A partir de éstos se originan la vía nigroestriada, la mesolímbica y la mesocortical (Figura 10). Las terminales nerviosas de la vía nigroestriada, que se origina en la sustancia negra, se encuentran en el cuerpo estriado dorsal que se compone por el accumbens y el putamen. Esta vía está implicada en la regulación de los procesos voluntarios como la motricidad. La lesión de ésta, así como la administración de fármacos que inhiben la síntesis de dopamina en sus neuronas, resulta en la aparición de espasmos y contracciones musculares incontroladas. Adicionalmente, su alteración o disfunción se ha asociado con patologías como el Parkinson (Wise, 2004; Luo y Huang, 2016). Por otro lado, la vía mesocortical y la mesolímbica se originan en el área tegmental ventral. La primera envía sus fibras hacia el núcleo accumbens y a estructuras del sistema límbico como la amígdala y el hipocampo, mientras que la segunda proyecta hacia regiones de la corteza prefrontal. Ambas vías regulan funciones como la conducta, las emociones, el sistema de placer y recompensa, así como la cognición. Estas estructuras han sido imprescindibles para estudiar la fisiología del abuso de sustancias adictivas, así como de condiciones como el déficit de atención e hiperactividad (Wise, 2004; Chinta y Andersen, 2005).

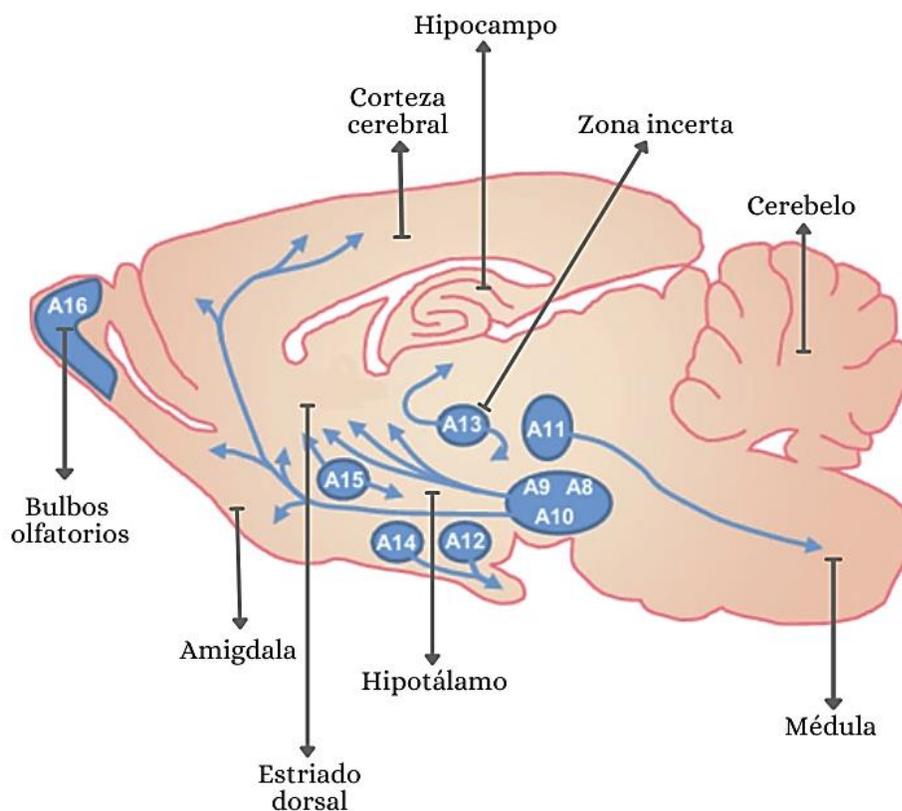


Figura 10. Distribución de los grupos neuronales de la dopamina y sus proyecciones en el encéfalo de roedores. Modificado de Björklund y Dunnet, 2007.

El siguiente grupo corresponde al A11, el cual tiene sus somas en estructuras del hipotálamo posterior y dorsal que envían sus terminales hacia la médula espinal. Se ha observado que este grupo está implicado en la regulación del dolor y en la integración de información motora que es independiente de la vía nigroestriada. La alteración de estas neuronas resulta en afecciones como la migraña o la cataplejía (Zeiss, 2005; Koblinger *et al.*, 2014). El grupo A12 también se origina dentro del hipotálamo, en el ARC y el núcleo periventricular, los cuales tienen eferencias hacia la eminencia media y la hipófisis. El grupo A13 envía proyecciones hacia el hipotálamo y el septum lateral desde la zona incerta. Finalmente, los grupos A14 y A15 corresponden a neuronas que se originan en el hipotálamo rostral, particularmente en el núcleo anteroventral periventricular y en el POA. Estas neuronas tienen algunas de sus terminales nerviosas en el mismo POA o bien, en los núcleos supraóptico, supraquiasmático y lateral septal (Björklund *et al.*, 1975; Albanese *et al.*, 1986; Goldsmith *et al.*, 1990). Estos grupos celulares, a excepción del A13, forman parte de la vía tuberoinfundibular cuya función principal es regular la secreción de prolactina, sin embargo, también se ha asociado con otros procesos neuroendocrinos como la secreción de la hormona del crecimiento y de la adrenocorticotropina. Por otro lado, el grupo A16 corresponde a neuronas dopaminérgicas que se concentran en los bulbos olfatorios, pero cabe mencionar que algunos autores lo excluyen del sistema dopaminérgico y lo incluyen en el de la noradrenalina (Figura 10) (Chinta y Andersern, 2005; Zeiss, 2005; Smits *et al.*, 2006; Björklund y Dunnet, 2007).

Si bien la regulación de estos procesos o de cualquier otro en el que la dopamina participa está estrechamente relacionada con su distribución anatómica, también existen otros factores que son imprescindibles en su fisiología. Dichos factores son la concentración de dopamina liberada en el espacio sináptico y el tiempo que se encuentra en éste, así como el tipo y la cantidad de receptores a los que se acopla en la sinapsis (Best *et al.*, 2009; Beaulieu y Gainetdinov, 2011).

IV.III LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS Y SU FARMACOLOGÍA

Una vez que la dopamina es liberada en el espacio sináptico puede estimular o inhibir diferentes procesos al unirse a diferentes receptores, que pueden estar en otras células o en la misma neurona presináptica. Los tipos de receptores son los α y β adrenérgicos, así como sus cinco receptores específicos, los receptores dopaminérgicos (RDA). Éstos se encuentran agrupados en dos familias: la familia uno (RDA-1), que incluye a los receptores uno y cinco, y la familia dos (RDA-2), que incluye a los receptores dos, tres y cuatro. En humanos, se ha identificado que el gen que codifica al receptor uno se encuentra en el cromosoma 5, los receptores dos y cuatro en el cromosoma 11, mientras que los genes de los receptores tres y cinco se localizan en los cromosomas 3 y 4, respectivamente. En el caso de los roedores estos

genes se encuentran, en orden del receptor uno al cinco, en los cromosomas 13, 9, 16, 7 y 5, respectivamente (Kebabian y Calne, 1979; Chiodo, 1988; Schwartz *et al.*, 1992).

Los receptores dopaminérgicos pertenecen a la familia de los metabotrópicos acoplados a proteínas G, están compuestos por una cadena polipeptídica de alrededor de 400 aminoácidos, la cual atraviesa siete veces la membrana celular. Estos dominios transmembranales se dividen en tres extracelulares aunados a un extremo amino terminal y tres intracelulares unidos a un carboxilo terminal, este último es la región en la que el neurotransmisor se acopla al receptor. Una característica importante de la estructura de ambas familias es que en el segundo dominio transmembranal se encuentra un residuo de aspartato que es imprescindible en la activación del receptor y en la unión de éste con el ligando. A pesar de que ambas familias de receptores son similares en su estructura, pueden diferenciarse debido a que en la RDA-1 el tercer dominio intracelular es más corto y el extremo carboxilo más largo (Figura 11). Debido a lo anterior, entre otras características, se ha mostrado que la familia uno presenta el 80% de homología entre sus receptores, mientras que en la familia dos este porcentaje tiene una mayor variación. El receptor dos es 75% homólogo con el tres y 56% con el receptor cuatro. La variación entre los RDA-2 se ha atribuido a la presencia de intrones en la secuencia génica de estos receptores (Sibley y Monsma, 1992; Missale *et al.*, 1998; Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

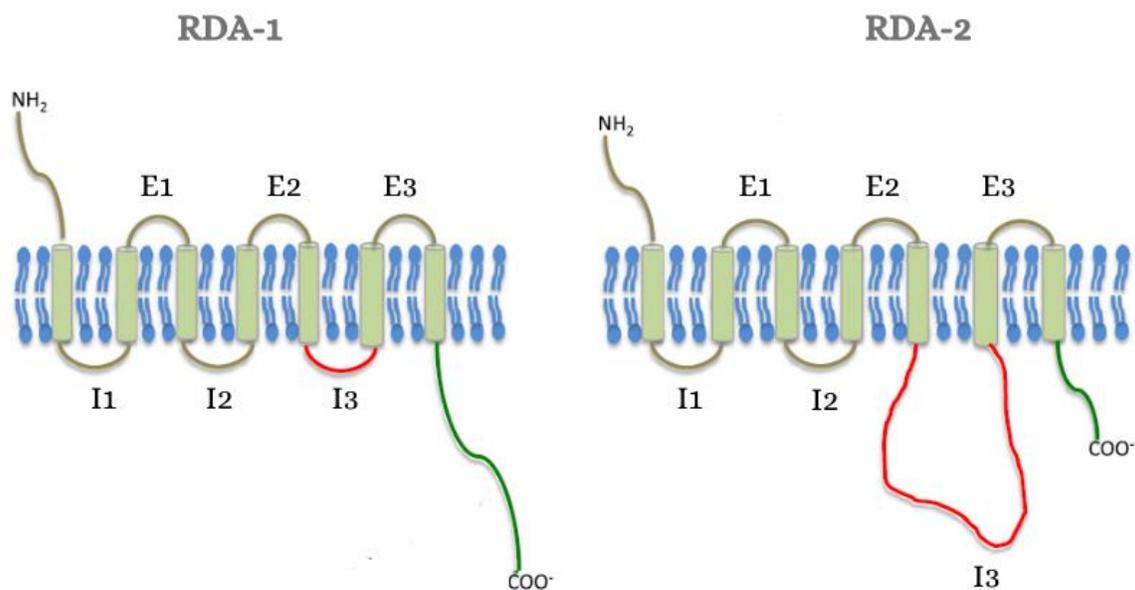


Figura 11. Estructura y diferencias entre los receptores dopaminérgicos de la familia RDA-1 y RDA-2. En color rojo se resalta el tercer dominio intracelular, que es más corto en la primera familia. En color verde se resalta la región carboxilo terminal, que es más corta en la segunda familia. Modificado de Pandey *et al.*, 2013.

Si bien ambas familias de receptores presentan diferencias estructurales, su clasificación depende de la proteína G a la que se acoplan, la vía de señalización que activan y de la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) (Pandey *et al.*, 2013). Los RDA-1

se acoplan a proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_{olf}$, que inducen la activación de la enzima adenilato ciclasa, que estimula la síntesis del cAMP a partir de adenosín trifosfato. A su vez, el incremento del cAMP intracelular da lugar a la activación de la proteína cinasa A (PKA), quien estimula o inhibe la síntesis de otras proteínas que actúan como segundos mensajeros y regula el flujo de iones en la neurona. Esta vía de señalización resulta en la expresión de fosfoproteínas, principalmente DARP-32, que inhiben a las fosfatasa como la PP1, encargadas de inactivar a la PKA y los productos de su señalización. De igual manera, la PKA estimula la expresión de otras proteínas como CREB y ERK, quienes a su vez inducen la expresión de factores como *c-fos*. En cuanto al intercambio de iones, se ha mostrado que esta señalización incrementa el flujo de calcio y potasio e inhibe el de sodio (Jaber *et al.*, 1996; Pivonello *et al.*, 2007; Ledonne y Mercuri, 2017).

En el caso de los RDA-2, se acoplan a proteínas $G_{i/o}$ que inhiben a la adenilato ciclasa y su acción para producir cAMP. Esta señalización activa los canales de potasio y disminuye el flujo de calcio a partir de la inhibición de sus canales dependientes de voltaje. Por otro lado, se ha descrito otra vía de señalización en la que los receptores de la familia 1 y 2 forman dímeros. En esta variante se ha señalado que los receptores se acoplan a proteínas G_q las cuales activan a la fosfolipasa C. Esto promueve la síntesis de DAG quien a su vez activa a la proteína cinasa C. Por otro lado, la fosfolipasa C también activa al IP_3 que estimula la liberación intracelular de calcio desde el retículo endoplasmático, lo que desencadena otra señalización y respuestas como la liberación del neurotransmisor (Figura 12) (Schwartz *et al.*, 1992; Jaber *et al.*, 1996; Pivonello *et al.*, 2007).

De forma general, se ha mostrado que los RDA-1 promueven la excitabilidad de las neuronas y regulan de forma estimulante diversos procesos y que los RDA-2 los inhiben disminuyendo la secreción del neurotransmisor y la excitabilidad de las neuronas. A pesar de lo anterior, diversos autores han propuesto que la función de estos receptores depende del área del encéfalo y del tipo de neurona en la que se encuentren, además de la afinidad de la dopamina con estos (Boyd y Mailman, 2012; Savica y Benarroch, 2014). Para determinar cuál es el papel de estos receptores en la fisiología del organismo se han llevado a cabo estudios en los que se emplean agonistas o antagonistas. Los agonistas son aquellos que pueden mimetizar la acción de la dopamina al unirse a sus receptores, mientras que los antagonistas se unen al receptor sin permitir la acción biológica de este (Schmidt *et al.*, 2010; Currie, 2018). En el caso de la dopamina, se han identificado una variedad de sustancias que presentan diferente afinidad y especificidad por sus receptores (Cuadro 1).

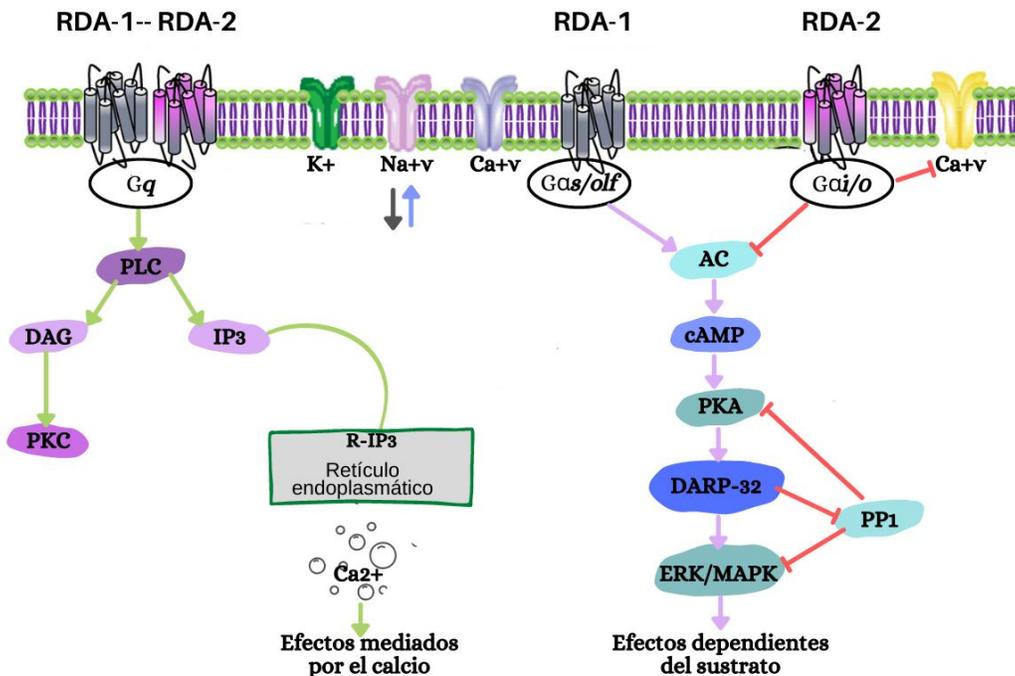


Figura 12. Vías de señalización de las dos familias de receptores dopaminérgicos. Las líneas rojas representan los procesos de inhibición o desactivación dependientes de los RDA-2, las líneas lila los de estimulación o activación que dependen de los RDA-1 y las líneas verdes aquellos en los que ambas familias forman dímeros. (PLC) fosfolipasa C, (DAG) diacilglicerol, (PKC) proteína cinasa C, (IP3) inositol trifosfato y su receptor, (AC) adenilato ciclasa, cAMP adenosín monofosfato cíclico, (PKA) proteína cinasa A, DARP-32 fosfoproteína, PP1 fosfatasa, (MAPK) proteína cinasa activadora de mitógenos, (K) potasio, (Ca) calcio, (Na) sodio. Modificado de Ledonne y Mercuri, 2017.

Existen agonistas generales, es decir, que se acoplan a ambas familias mimetizando o potenciado la acción de la dopamina como la apomorfina, la bromocriptina, el quinperole y el SKF-38393. Los antagonistas de ambas familias son el haloperidol, la clorpromazina, la pimozida y la clozapina. Adicionalmente, se han identificado sustancias que son específicas para cada familia de receptores, lo que permite estudiar su función particular. Los agonistas de los RDA-1 son el fenoldopam y el SKF-38393 mientras que sus antagonistas son el SCH-23390 y el butaclamol. Para los RDA-2 sus agonistas son la apomorfina y la bromocriptina y sus antagonistas la sulpiride, el Raclopride, la espiperona y la risperidona (Schwartz *et al.*, 1992; Seeman y Van Tol, 1994; Missale *et al.*, 1998). Cuando los fármacos no presentan una especificidad definitiva por ambas familias, como el caso de la apomorfina, la bromocriptina y el SKF-38393, la afinidad entonces depende de otros factores como la concentración, dosis y vía de administración, así como de la tasa de expresión de cada familia de receptores. Con respecto a lo anterior, se sabe que los receptores dopaminérgicos no se expresan de forma homogénea, es decir, en algunas estructuras predomina la expresión de los RDA-1 mientras que en otras los RDA-2. Por otro lado, se ha confirmado una amplia distribución de estos a nivel central y periférico (Seeman y Van Tol, 1994; Currie, 2018).

Cuadro 1. Agonistas y antagonistas de ambas familias de receptores dopaminérgicos.

<i>FAMILIAS DE RECEPTORES</i>	<i>AGONISTAS</i>	<i>ANTAGONISTAS</i>
<i>RDA-1 y 2</i>	Apomorfina Bromocriptina SKF-38393 Quinperole Pergolide	Haloperidol Clorpromazina Pimozida Clozapina
<i>RDA-1</i>	Fenoldopan SKF-38393	SCH-23390 Butaclamol
<i>RDA-2</i>	Apomorfina Bromocriptina 7-OH-DPAT	Raclopride Sulpiride Espiperona Risperidona

Modificado de Seeman y Van Tol, 1994; Missale *et al.*, 1998.

A partir de estudios farmacológicos de los receptores del sistema dopaminérgico se ha podido estudiar la fisiología de diversas afecciones y establecer tratamientos que las disminuyan. Por ejemplo, se ha identificado que con la administración de antagonistas de ambas familias se pueden disminuir los efectos psicóticos de la esquizofrenia, sin embargo, estos estudios también han permitido conocer que el uso crónico y en dosis inadecuadas puede resultar en el aumento de efectos secundarios que afecten la motricidad y la cognición. Por otro lado, los tratamientos con agonistas generales o específicos de los RDA-1 han resultado ser eficaces para disminuir los síntomas de la enfermedad de Parkinson. En el caso de los RDA-2, se ha mostrado que la administración de sus agonistas controla patologías neuroendocrinas como la hiperprolactinemia, una afección que se caracteriza por la secreción descontrolada de prolactina, lo que además provoca infertilidad en las mujeres (Kebabian y Calne, 1979; Jaber *et al.*, 1996; Missale *et al.*, 1998). A pesar del éxito en los tratamientos de diferentes patologías o trastornos, existen estudios que han mostrado que la exposición crónica a estos fármacos induce en primera instancia un aumento de la respuesta del receptor al ligando, sin embargo, la consecuencia final es una desensibilización de estos y la inhibición de su respuesta fisiológica (Schwartz *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 2010).

El entendimiento de la dinámica entre la dopamina y sus receptores es imprescindible para elucidar el papel que este neurotransmisor desempeña en cada uno de los procesos que regula. Aunque no se conoce completamente el mecanismo de acción, se sabe que la dopamina regula procesos reproductivos como el comportamiento sexual, la secreción de prolactina y la ovulación. Lo anterior ha sido sustentado por evidencia anatómica que señala que algunas de las neuronas de la vía tuberoinfundibular envían proyecciones que establecen aposiciones con las neuronas GnRHérgicas, ya sea a nivel de la eminencia media o del POA. (Hoffman y Wray, 1982; Mons *et al.*, 1990; Horvath *et al.*, 1993; Zoli *et al.*, 1993). Además

de lo anterior, también se ha descrito la presencia de ambas familias de receptores en estas estructuras hipotalámicas (Miller y Lonstein, 2009; Nutsch *et al.*, 2016).

IV.IV LA DOPAMINA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN

Previamente se mencionó que la dopamina está implicada en la reproducción de los mamíferos, regulando la secreción de prolactina, el comportamiento sexual y materno, así como la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación. Para su estudio, el comportamiento sexual se ha dividido en dos tipos de conductas, las motivacionales o anticipatorias y las consumatorias. Las motivacionales se refieren al inicio o incremento de conductas como la actividad locomotora, la búsqueda e interés, el cortejo y el acicalamiento. Por otro lado, las conductas consumatorias en el macho son la monta, la intromisión y la eyaculación, mientras que en la hembra es el comportamiento de receptividad, caracterizado por la postura de lordosis (Melis y Argiolas, 1995).

El papel de la dopamina en la regulación de estas conductas se ha mostrado mediante estudios en los que se inyectó vía intraperitoneal apomorfina, SKF-38393, quinperole y SCH-23390 de forma individual o combinada. Los resultados de este experimento muestran que el agonista de ambas familias de los RDA incrementa de forma significativa ambos tipos de conductas en comparación con el grupo control. Este incremento se mantiene en el grupo tratado con el agonista con mayor afinidad por la familia RDA-1, mientras que en el grupo tratado con el agonista de los RDA-2 no hay ningún cambio significativo. Adicionalmente, cuando se administra apomorfina y sólo se evalúa el porcentaje de eyaculación y de cópula se observa un incremento significativo de estas variables en comparación con el grupo control. Por otro lado, cuando se administra el antagonista de los RDA-1 enseguida de la apomorfina, el porcentaje de eyaculación y de cópula disminuye significativamente siendo similar al del grupo control (Guadarrama-Bazante *et al.*, 2014).

La administración de antagonistas de los RDA-1 o RDA-2, directamente en el POA, resulta en una disminución significativa del porcentaje de búsqueda de la hembra por el macho. Por otro lado, cuando los machos son tratados con un agonista específico de la familia RDA-2, el número de intromisiones aumenta de forma significativa en comparación con el grupo control y los otros tratamientos (Moses *et al.*, 1995). Otra evidencia en la que se implementó este modelo, tanto en machos como en hembras, muestra que la administración de apomorfina en el POA resulta en un incremento de las conductas motivacionales. Contario a esto, cuando se administra un agonista específico de la familia RDA-1 ambos tipos de conductas disminuyen, específicamente el número de solicitudes y de eyaculaciones en el macho, así como la actividad locomotora en las hembras. Por otro lado, estas mismas variables presentan un incremento significativo en los grupos tratados con el agonista de los RDA-2 (Graham y Pfaus, 2010). Con el propósito de evaluar el efecto de la ausencia de la

dopamina sobre las mismas variables, se realizaron inyecciones de antagonistas selectivos a ambas familias de receptores dopaminérgicos. Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran un comportamiento inverso a los obtenidos en los grupos tratados con los agonistas (Graham y Pfaus, 2012). En conjunto, todos los resultados descritos anteriormente muestran que la dopamina estimula diferentes conductas del comportamiento sexual y que para ello requiere de la activación sinérgica de ambas familias de receptores.

También se ha vinculado a la dopamina con el comportamiento parental, en el que se incluyen conductas como la construcción del nido, la alimentación, el acicalamiento, los cuidados y el agrupamiento de las crías. La relación del POA con los cuidados parentales se ha expuesto mediante estudios en los que la lesión o interrupción de las vías eferentes de dicha estructura, resulta en la inhibición de las conductas mencionadas (Numan y Stolzenberg, 2009). Por otro lado, los estudios farmacológicos muestran una diferencia funcional en la regulación del comportamiento materno que depende de la activación de los receptores dopaminérgicos. Evidencia de lo anterior se mostró al realizar inyecciones de SKF-38393 en el POA de ratas en estado post parto. Se evaluó la latencia del reconocimiento de las crías después de su remoción del nido, así como la duración del acicalamiento y el tiempo de acurrucamiento. Los resultados de este experimento mostraron una disminución del tiempo de reconocimiento por parte de las madres, así como un incremento de la duración del cuidado materno en el grupo tratado con el agonista de los RDA-1 en comparación con el grupo control (Stolzenberg *et al.*, 2007). Por otro lado, la administración de SCH-23390 en el POA de ratas post parto resulta en la disminución de la duración de los cuidados parentales y la lactancia. En contraste, la administración de Raclopride incrementa el tiempo en el que la madre cuida y alimenta a sus crías (Miller y Lonstein, 2005). A partir de estos resultados, los investigadores han mostrado que la dopamina en el POA de ratas lactantes estimula los cuidados parentales, lo cual es mediado por la activación de los RDA-1. En el caso de los RDA-2, se ha sugerido que se activan para controlar la respuesta de la otra familia para modular el comportamiento materno (Numan y Stolzenberg, 2009).

En el caso de la secreción de la prolactina, se ha mostrado que la administración sistémica de dopamina decrece la concentración plasmática de la hormona. Para determinar que esto se debe a dicho neurotransmisor y no a otro factor, se administró α -metil- p -tirosina, un fármaco que inhibe la síntesis de dopamina. En estos animales, la ausencia de la dopamina reestablece la concentración de la prolactina (Arita y Porter, 1984). La dopamina inhibe la secreción de la prolactina actuando sobre el RDA-3. Esto se mostró al administrar un agonista o un antagonista específico en el ventrículo lateral y posteriormente cuantificar la concentración plasmática de la prolactina en diferentes horarios. El agonista induce un incremento de la concentración por un tiempo breve, después de lo cual vuelve a su estado basal. Por otro lado, el antagonista también resulta en un incremento, pero éste se mantiene durante todo el experimento. La inyección de un antagonista de los RDA-2, inmediatamente después de la administración del agonista de los RDA-3, revierte el incremento en la

concentración de prolactina, lo que sugiere que la secreción de prolactina depende de un sistema complejo que involucra a más de un receptor dopaminérgico (Liang y Pan, 2012).

Otra evidencia de la relación entre la dopamina y la secreción de prolactina es la descripción de la concentración de la dopamina y del DOPAC en estructuras del hipotálamo de ratonas intactas en la etapa de diestro y en ratonas lactantes. La cuantificación mostró un decremento en la concentración de la dopamina y un incremento en la del DOPAC en la banda diagonal de broca y el POA del grupo lactante en comparación con el grupo en diestro (Brown *et al.*, 2015). Estas evidencias, junto con otros estudios, indican que la dopamina es un potente inhibidor de la prolactina. Además de lo anterior, se sugiere que dicha regulación es mediada a través de la familia RDA-2 de las neuronas presentes en el POA (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001).

Por otro lado, la relación entre la dopamina y la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación se ha estudiado desde la década de los 50's, en la que se identificó la regulación nerviosa de estos procesos (Everett y Sawyer, 1950). Una forma de mostrar esta relación es la administración de fármacos como la reserpina y la clorpromazina en ratas adultas y cíclicas. Cabe mencionar que la reserpina es un inhibidor del VMAT-2, por lo que su administración inhibe el almacenamiento y transporte del neurotransmisor a las vesículas presinápticas. Debido a lo anterior, la dopamina queda libre en el citoplasma de la neurona, donde es catabolizado hasta el punto de agotar su existencia en el sistema nervioso por un tiempo determinado. La administración de estos fármacos, vía intravenosa o subcutánea, durante la etapa del proestro, bloquea la ovulación, lo que sugiere que la dopamina juega un papel estimulante en la regulación del proceso (Barraclough y Sawyer, 1957).

Existen otros métodos en los que se emplean ratas ovariectomizadas con reemplazo de progesterona y estradiol, lo que permite simular las condiciones endocrinas preovulatorias. En este modelo experimental, la administración intravenosa de dopamina o intraperitoneal de apomorfina resulta en un incremento significativo en la concentración plasmática de la LH (Vijayan y McCann, 1978). Otra evidencia es el estudio en el que a ratas adultas y cíclicas se les administró, vía intramuscular, haloperidol en cada una de las etapas del ciclo estral y se evaluó la tasa de ovulación y la concentración de gonadotropinas. El haloperidol disminuye la tasa de ovulación sin importar la etapa en la que es administrado, sin embargo, cuando el tratamiento se hace en el metaestro se da una inhibición total. Además, el tratamiento en metaestro y estro resulta en un decremento significativo de la concentración de la FSH y, en la etapa de estro, el peso de los ovarios disminuyó. Posteriormente, se llevó a cabo el reemplazo hormonal de todas las hormonas involucradas en desencadenar la ovulación con el objetivo de identificar qué señal se inhibió con los tratamientos. Únicamente la administración de GnRH y LH en la etapa de proestro reestableció la ovulación, lo que indica que la dopamina estimula la secreción de la GnRH (Domínguez *et al.*, 1987).

Contrario a estas evidencias, en mujeres se ha mostrado que la dopamina regula de forma inhibitoria la secreción de las gonadotropinas. Lo anterior se observó a partir de la cuantificación de la FSH y la LH después de administrar dopamina o glucosa, como solución vehículo, en dos momentos diferentes del ciclo menstrual. La infusión de dopamina disminuye la concentración de ambas gonadotropinas en comparación con el grupo control sin importar el momento de administración (Andersen *et al.*, 1987). Las diferencias entre este estudio y los reportados en párrafos anteriores podrían atribuirse a las diferencias anatómicas y fisiológicas que existen en los circuitos nerviosos que regulan la ovulación en los primates y los roedores.

Los modelos sistémicos mencionados anteriormente no permiten determinar el sitio de acción de la dopamina en la regulación de la ovulación. A pesar de lo anterior, los resultados obtenidos a partir de los tratamientos de reemplazo hormonal en ratas sugieren que la dopamina regula la secreción de la GnRH. La idea anterior se ha reforzado a partir de diferentes estudios *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, se ha mostrado que la concentración de la GnRH y la LH en cultivos de hipotálamo-hipófisis disminuye en presencia de dopamina. Adicionalmente, cuando a un cultivo similar se le añade haloperidol, la concentración de la LH aumenta de forma significativa. Por otro lado, la adición de dopamina no afecta la concentración de la gonadotropina en cultivos que contienen únicamente tejido de la hipófisis, lo que sugiere que el transmisor actúa en el hipotálamo inhibiendo la secreción de la GnRH (Tasaka *et al.*, 1985).

Resultados semejantes se han obtenido en modelos *in vivo*, por ejemplo, en ratas tratadas con pentobarbital sódico por la tarde del proestro, la infusión intracerebroventricular de dopamina no es capaz de reestablecer la ovulación. Además, en este estudio se reportó que la administración de dopamina por la tarde del proestro bloquea la ovulación (Craven y McDonald, 1971). Otros estudios *in vivo*, en contraste, han concluido que la dopamina estimula la secreción de las gonadotropinas. Rubinstein y Sawyer (1970) mostraron que la administración intracerebroventricular de dopamina en ratas tratadas con pentobarbital sí restablece la ovulación. Por otro lado, en ratas ovariectomizadas la infusión intraventricular de dopamina induce la secreción de LH de forma similar al pico preovulatorio del proestro, lo que no ocurre si se inyecta solución salina (Schneider y McCann, 1970).

En otro experimento se llevó a cabo la administración sistémica de reserpina durante el proestro, lo que resultó en la anovulación. La infusión de dopamina en el tercer ventrículo de estos animales revierte el efecto inhibitorio de la reserpina (Craven y McDonald, 1973). También se ha mostrado que la estimulación eléctrica de las estructuras hipotalámicas que contienen a los somas y las terminales GnRHérgicas como el POA y la eminencia media-ARC, respectivamente revierte el efecto de la reserpina. Al comparar los resultados de la estimulación eléctrica de la eminencia media-ARC con los del POA, se observa que en esta última estructura la corriente necesaria para restaurar la ovulación es menor que en las otras dos (Rubinstein y Sawyer, 1970). En conjunto, estos resultados muestran que la dopamina

en el hipotálamo regula la secreción de la GnRH y, en consecuencia, la de las gonadotropinas y la ovulación. Cabe mencionar que dicha regulación, estimulante o inhibitoria, depende del modelo experimental, sin embargo, la mayoría de estas evidencias concuerda con una regulación de tipo estimulante.

Es importante denotar que, en estos estudios, los fármacos se administraron en el tercer ventrículo, por lo que la dopamina pudo difundir a diversas áreas del cerebro modulando la secreción de la GnRH de manera indirecta, actuando sobre interneuronas. A pesar de ello, existe evidencia que permite sugerir que la dopamina actúa directamente en el POA. Por ejemplo, la administración sistémica de α -metil- p -tirosina en ratas durante el proestro inhibe la secreción preovulatoria de la LH, lo que no se revierte tras la administración de L-DOPA. A pesar de ello, la estimulación eléctrica del POA después de los tratamientos estimula la secreción de la LH (Kalra y McCann, 1973). En concordancia, la concentración de la dopamina en el POA de ratas cíclicas incrementa durante la etapa de diestro y alcanza su pico en el metaestro. Posteriormente, la concentración del neurotransmisor comienza a decrecer y alcanza su nadir por la tarde del proestro y el estro (Crowley *et al.*, 1978). También se observó que la concentración de DOPAC en el POA presenta dos picos, uno en la tarde del metaestro y otro en la mañana del estro (Cruz *et al.*, 2001).

En otros estudios se mostró que, en proestro, el trasplante de tejidos que contienen una alta concentración de dopamina en el POA de ratas incrementa la concentración de la FSH, pero no de la LH (Hashimoto y Kimura, 1986). Adicionalmente, el implante de dopamina en el POA de ratas ovariectomizadas estimula la secreción preovulatoria de la LH, lo que no ocurre si el implante se localiza en otras estructuras del hipotálamo (Kawakami *et al.*, 1979). Hashimoto y Kimura (1986) también reportaron que el implante de dopamina en el POA de ratas ovariectomizadas, estimula la secreción fásica de la LH y de la FSH. Por otro lado, la administración sistémica de pimozida antes de los implantes inhibe la secreción de las gonadotropinas (Hashimoto y Kimura, 1986). Finalmente, se ha observado que, en ratas senescentes que han perdido la ciclicidad estral, la inyección de L-DOPA en el POA cuando se presenta cornificación del epitelio vaginal reestablece los ciclos y, además, induce la ovulación en el estro esperado inmediato al tratamiento. Estos resultados muestran que la dopamina no solo es importante en la secreción de las hormonas que inducen la ovulación sino también en el mantenimiento de la ciclicidad y en cada uno de los procesos que permiten la reproducción en las hembras (Cooper *et al.*, 1979).

Otra forma de esclarecer la participación de la dopamina que actúa en el POA sobre la regulación de la ovulación es a través del estudio particular de su función a través de sus receptores. Ejemplo de lo anterior se mostró en ratas cíclicas a las que se les implantaron cánulas dirigidas al POA, a través de las cuales se les implantaron cristales de haloperidol en cada una de las etapas del ciclo estral. El tratamiento inhibe la ovulación y afecta la masa del útero cuando se realiza en las etapas de estro, metaestro y diestro, pero no en el proestro

(Morán y Domínguez, 1995). Esto muestra que la dopamina actúa en el POA únicamente durante algunas etapas del ciclo estral, durante las que estimula la secreción de la GnRH y, por tanto, la ovulación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La regulación de la secreción de la GnRH es mediada por diversos sistemas de neurotransmisión que actúan sobre las neuronas del POA. Dentro de éstos se han identificado a la sustancia P, la neuroquinina, la β -endorfina, así como a la serotonina, el GABA, la dopamina, entre otros. El estudio de la dopamina ha mostrado que este neurotransmisor puede estimular o inhibir la secreción de la GnRH y, en consecuencia, inhibir o estimular indirectamente a los otros componentes del sistema neuroendocrino que participan en la regulación de la ovulación. Se ha sugerido que estas diferencias son resultado del estado fisiológico de los organismos y de los modelos experimentales. Por ejemplo, en estudios *in vitro* la dopamina inhibe la secreción de la GnRH y de la LH (Tasaka *et al.*, 1985). Contrario a lo anterior, cuando se administra dopamina en ratas ovariectomizadas, la concentración sérica de la LH incrementa de forma similar al pico preovulatorio del proestro (Schneider y McCann, 1970).

Se ha mostrado que la estimulación o la inhibición que ejerce la dopamina depende de la activación de sus diferentes receptores. Lo anterior se observó en conejos en los que el bloqueo sistémico de los RDA-2 resultó en la inhibición de la ovulación, de la síntesis de hormonas esteroides y en un incremento suprafisiológico de la concentración de prolactina (Lin *et al.*, 1988). Por el contrario, en ovejas en estado de anestro estacional, el bloqueo de los mismos receptores deriva en la restauración de la ciclicidad estral y en la estimulación de la ovulación (Saxena *et al.*, 2015). Por otro lado, el bloqueo de ambos receptores en los ovarios de roedores resulta en un decremento en la tasa de animales ovulantes en las etapas de estro, metaestro y diestro (Venegas-Meneses *et al.*, 2015). En el POA, el bloqueo unilateral de ambas familias de receptores en las diferentes etapas del ciclo estral resulta en la inhibición de la ovulación (Morán y Domínguez, 1995). En contraste, la infusión unilateral del antagonista específico de los RDA-1, en cada una de las etapas del ciclo estral no modifica la tasa de ovulación, pero sí el número de ovocitos liberados. Lo anterior se observó en la etapa de proestro en donde los animales presentaron un incremento significativo en el número de ovocitos liberados (Cortés, 2019).

Estas evidencias sustentan que la dopamina participa en la regulación de la ovulación. De forma particular, en el POA, estimula la secreción de la GnRH, sin embargo, cuando se estudia su función a través de los RDA-1, su papel parece ser inhibitorio al menos en la etapa de proestro. Estos resultados nos indican que la dopamina ejerce un papel diferente en la regulación de la ovulación dependiendo del receptor al que se une y de la fisiología de la hembra en cada etapa del ciclo. Además, estos estudios farmacológicos en el POA se realizaron de forma unilateral lo que no permite estudiar de forma íntegra la función del sistema dopaminérgico en dicha estructura. Debido a lo anterior, este estudio permitirá conocer el papel que desempeñan los RDA-2 del POA en cada etapa del ciclo estral sobre la regulación de la ovulación de la rata.

HIPÓTESIS

El bloqueo unilateral de los receptores dopaminérgicos en el POA inhibe la ovulación cuando se realiza por la mañana del estro, metaestro y diestro, pero no en el proestro. Por otro lado, el bloqueo específico de los receptores de la familia RDA-1 no altera la tasa de animales ovulantes en ninguna etapa del ciclo, pero incrementa el número de ovocitos liberados cuando se realiza en proestro. Con base en ello, proponemos que los receptores de la familia RDA-2 tienen un papel estimulante sobre la regulación de este proceso, por lo que la administración de un antagonista selectivo en la misma estructura resultará en el bloqueo de la ovulación. Por otro lado, es posible que los receptores dopaminérgicos de ambas familias estimulen de manera redundante, por lo que la administración del antagonista selectivo a los RDA-2 no tendrá efecto.

OBJETIVOS

GENERAL:

Analizar la participación de los receptores dopaminérgicos de la familia RDA-2 en el POA a las 09:00 h de cada una de las etapas del ciclo estral sobre el proceso ovulatorio de la rata adulta.

PARTICULARES:

- Analizar el efecto del bloqueo de la familia RDA-2 en el POA 09:00 horas de cada una de las etapas del ciclo estral sobre la ciclicidad estral en la rata adulta.
- Analizar el efecto del bloqueo de la familia RDA-2 en el POA 09:00 horas de cada una de las etapas del ciclo estral sobre la masa de los ovarios, útero y adrenales en la rata adulta.
- Analizar el efecto del bloqueo de la familia RDA-2 en el POA 09:00 horas de cada una de las etapas del ciclo estral sobre la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados en la rata adulta.

MATERIALES Y MÉTODOS

El cuidado y manejo de los animales se realizó conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Para este experimento se usaron ratas hembra adultas y vírgenes de la cepa CIIZ-V alojadas en grupos de cinco individuos en jaulas de polipropileno claro. Los animales se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 14 horas con luz y 10 en oscuridad, con libre acceso a la comida y al agua. Entre las 09:00 y las 11:00 horas se les tomó frotis vaginal para el análisis citológico del ciclo estral y una vez que presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración se dividieron aleatoriamente en dos grupos experimentales. El primero estuvo compuesto por animales intactos sacrificados a las 09:00 horas del día del estro vaginal, este grupo correspondió al control absoluto (n=7). El otro consistió en animales a los que se les realizó una cirugía estereotáxica en la que se implantaron cánulas directrices bilaterales dirigidas hacia el POA (n= 121). Esto se realizó en la etapa de diestro del cuarto ciclo, ya que se ha observado que los animales operados en esta etapa recuperan el ciclo estral más rápido.

Fabricación de las cánulas directrices

Las cánulas se fabricaron a partir de agujas de acero inoxidable BD Precision Glide calibre 23G con un diámetro interno de 0.6 milímetros. De éstas sólo se usó la estructura metálica, la cual se cortó para obtener un segmento de 1.6 cm. Posteriormente, éste se limó hasta obtener un tamaño de 1.4 cm, medida estándar para la cirugía. Se posicionaron dos cánulas sobre un portaobjetos con cortes histológicos del POA, una en cada hemisferio, de forma que quedaran dentro de la estructura y se soldaron evitando su obstrucción. Después se les añadió un segmento metálico como soporte para colocarlas en el marco estereotáxico. Finalmente, se limpiaron con alcohol y agua destilada, por dentro y por fuera y se esterilizaron por calor seco.

Implantación de las cánulas

La cirugía estereotáxica para implantar las cánulas en el POA se realizó bajo técnicas asépticas. Las hembras se anestesiaron intraperitonealmente con una mezcla de ketamina/xilazina 91/9.1 mg/kg por cada 250g de masa corporal (Anesket y Procin, respectivamente. PiSA Agropecuaria, México). Posterior a la anestesia, se realizó la preparación de los animales. Con una rasuradora eléctrica se afeitó la cabeza, desde la parte posterior de los ojos hasta la parte anterior de las orejas y se eliminó cualquier residuo de pelo con un rodillo adhesivo. Después, se les administró, de forma subcutánea, 0.1 mL de meloxicam, un analgésico y antiinflamatorio no esteroideo (2mg/kg; Laboratorio Aranda, México) y 0.1 mL de enrofloxacin como antibiótico (5mg/kg; Laboratorio Senosiain,

México). Adicionalmente, se les aplico una gota de hipromelosa (Laboratorios Sophia, México) en cada ojo para evitar la desecación.

Una vez que los animales recibieron los cuidados preoperatorios se montaron en un marco estereotáxico David Kopf modelo 900 (KOPF Instruments, E.U.A.). La zona quirúrgica se limpió con yodopovidona jabonosa seguida de alcohol al 70% y después, se realizaron dos lavados con yodopovidona neutra seguida de alcohol al 70%. Se realizó una incisión de aproximadamente 1.5 cm en la piel y el músculo, se removió el periostio y se eliminó el exceso de sangre del cráneo para poder ubicar a bregma como punto de referencia. A partir de este se calcularon las coordenadas del POA, que se modificaron de aquellas reportadas en el atlas de Paxinos y Watson (2014) para coincidir con la cepa de ratas utilizada. Las coordenadas establecidas fueron anteroposterior +0.1, mediolateral ± 0.6 y dorsoventral -8.6. Para la inserción, se realizó un trepano en el cráneo con un motor manual Dremel modelo 3000 (Bosch Power Tools, España). Posteriormente, se realizaron tres puntos equidistantes al trepano y en éstos se insertaron tornillos de acero inoxidable con un tamaño de 1 x 0.5 milímetros. Finalmente, cuando se insertaron la cánula y los tornillos, se agregó una mezcla de polímero y monómero dental que fijó la cánula al cráneo y cubrió la incisión en la piel, lo que formó un implante seguro e inmóvil. Cuando el implante quedó completamente seco, se insertaron obturadores de calibre 30G para preservar la patencia de las cánulas.

Después de la cirugía, los animales se alojaron de forma individual y recibieron un tratamiento postoperatorio cada 24 horas por dos días. Éste consistió en la misma dosis de antiinflamatorio y analgésico, así como de antibiótico reportada para la cirugía. Finalmente, se reanudó la toma de frotis vaginal en el horario antes mencionado en el tercer día después de la cirugía.

Microinyección

Cuando los animales presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración se distribuyeron al azar en dos grupos experimentales: vehículo y fármaco. Entre las 08:45 y las 09:00 horas del diestro, proestro, estro o metaestro los animales fueron microinyectados (n=60) con líquido cefalorraquídeo artificial (BASi, USA) como solución vehículo o (n=61) con 12.5 mg/mL de S(-)-Raclopride (+)-tartrate salt (Sigma-Aldrich Inc., Alemania). Para ello, los animales, en libre movimiento, fueron conectados a una bomba de infusión Kd scientific de dos canales modelo Legato 100 (KD Scientific, E.U.A.) a través de agujas de microinyección 30G que sobresalían 0.2 mm por fuera de las cánulas guía. Dichas agujas se conectaron a jeringas Hamilton de 10 μ l mediante un tubo de teflón MF-5164 con un diámetro interno de 0.12 mm y uno externo de 0.65 mm (BASi Instruments, E.U.A.). Se infundió un volumen total de 0.4 μ l de solución a una tasa de infusión de 0.1 μ l/min durante 4 minutos. Una vez terminada la microinyección, las agujas permanecieron en posición por

un minuto extra con el fin de evitar el reflujo de la solución. Posteriormente, cuando los animales se desconectaron del sistema de microinyección, se les colocaron los obturadores y se regresaron a sus jaulas, la toma de frotis vaginal continuó en los días siguientes.

Eutanasia

Los animales microinyectados se sometieron a un protocolo de eutanasia a las 09:00 horas del estro esperado inmediato al tratamiento. Para ello, las hembras se inyectaron intraperitonealmente con una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg. PiSA Agropecuaria, México) y se decapitaron. Se disecaron los ovarios, el útero y las adrenales, los cuales se pesaron en una balanza analítica Mettler AT261 Delta Range (Marshall Scientific, E.U.A.). Adicionalmente, los oviductos se disecaron de los ovarios para la extracción de los ovocitos. Éstos se contaron posterior a su tinción mediante la técnica de hematoxilina-eosina.

Además de los órganos antes mencionados, también se disecaron los cerebros, que se preservaron a -20°C y posteriormente se seccionaron en un criostato modelo CM1520 (Leica Biosystems, Alemania). Dichas secciones se realizaron cada $50\ \mu\text{m}$ en el plano coronal a lo largo del hipotálamo, principalmente en el POA. Las rebanadas se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L lisina (Sigma-Aldrich, Alemania). Finalmente, se tiñeron con la técnica de Nissl y se observaron en un microscopio Nikon Optiphot-2 (Nikon Corporation, Japón) para visualizar si las cánulas llegaron al área deseada y también para observar la dispersión de la solución en el tejido.

Análisis estadístico

Sólo se tomaron en cuenta aquellos animales ($n=46$) en los que el análisis histológico de los cortes de cerebro confirmó la posición de las cánulas y la dispersión de la solución en el POA (Figura 13). Se calculó la media (\bar{x}) y el error estándar de la media (e.e.m.) de la masa relativa a 100g de masa corporal de los órganos disecados y se analizó mediante la prueba de ANOVA, seguida de Tukey, después de verificar que los datos presentaron homocedasticidad y una distribución normal, lo cual se realizó con las pruebas de Saphiro-Wilk y D'Agostino-Pearson. En aquellos casos en los que no se cumplieron estas condiciones, los datos se transformaron logarítmicamente ($Y=\log_{(y)}$). La tasa de animales ovulantes se expresó como el número de animales que ovularon/n y se analizó con la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Por otro lado, el número de ovocitos liberados se expresó como la mediana (M) y el rango intercuartil (RI) y se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. En todos los casos, se aceptaron como significativas las diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor a 0.05.

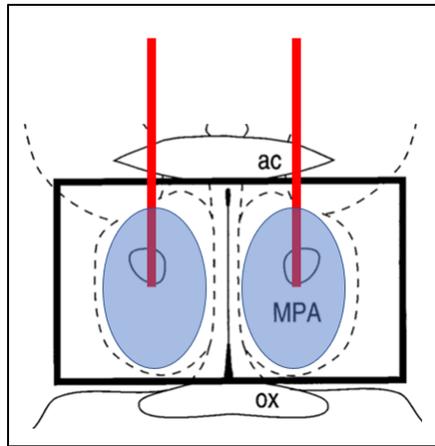


Figura 13. Posición de las cánulas (rojo) y dispersión de la solución vehículo o del fármaco (azul) en el POA de aquellos animales considerados para el análisis estadístico. Modificado de [Paxinos y Watson, 2014](#).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Efecto de los tratamientos sin considerar la etapa del ciclo estral

En la figura 14 se observa el primer análisis que corresponde a la comparación de los dos grupos experimentales, sin considerar la etapa del ciclo en la que se realizó el tratamiento, contra el grupo intacto. En el caso del ciclo estral, éste no se alteró tras la administración de la solución vehículo o del fármaco (Figura 14A). El análisis de la tasa de animales ovulantes no mostró diferencias significativas, sin embargo, en el grupo tratado con Raclopride sólo el 90.9% de los animales ovuló (Intacto: 7/7 vs. aCSF: 24/24 o Raclopride: 20/22; $P > 0.9999$, aCSF vs. Raclopride; $P = 0.2232$, prueba de probabilidad exacta de Fisher, Figura 14B). De igual manera, el análisis del número de ovocitos liberados no mostró cambios significativos (Intacto: $M = 14$, $RI = 13-14$ vs. aCSF: $M = 12.5$, $RI = 10.25-14$ vs. Raclopride: $M = 14$, $RI = 11.25-15.75$; $P = 0.2786$, prueba de Kruskal-Wallis, Figura 14C).

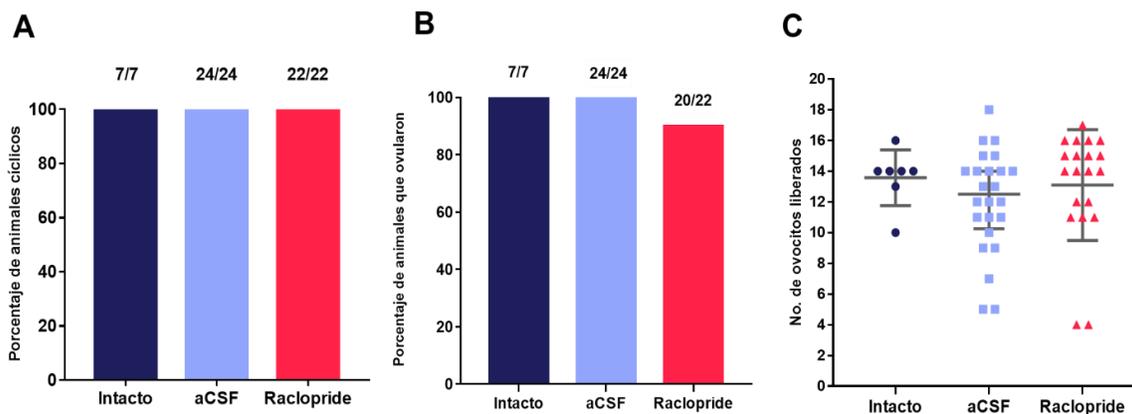


Figura 14. (A) Porcentaje de animales cíclicos, (B) de animales que ovularon y (C) la mediana y el rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral. Los números sobre las barras representan la fracción de animales que se mantuvieron cíclicos y que ovularon, respectivamente.

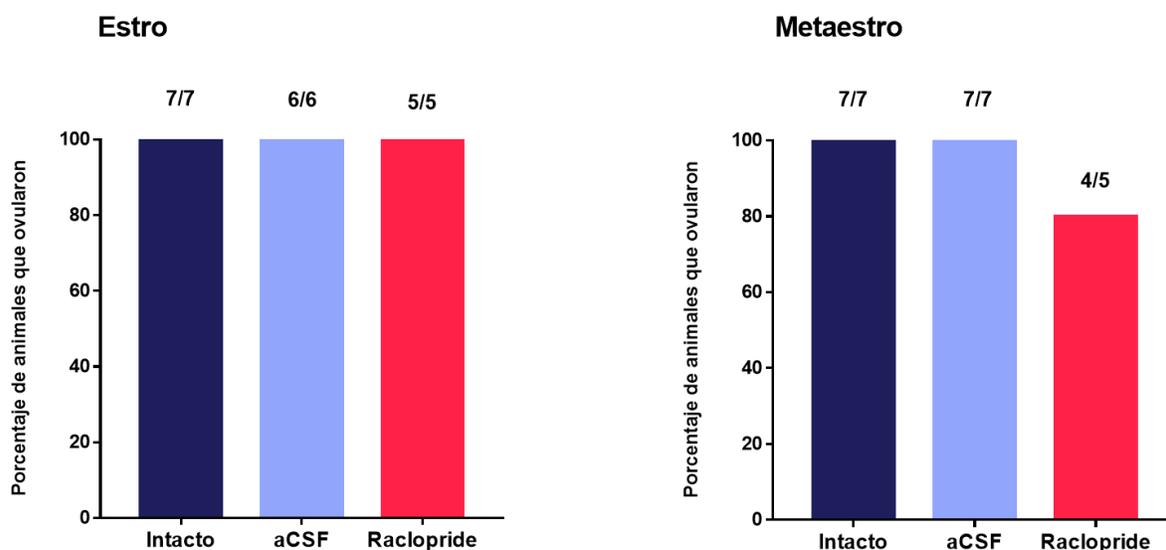
El análisis de la masa relativa de las adrenales y el útero (Cuadro 2) no mostró ninguna diferencia significativa entre los tres grupos experimentales, por el contrario, la masa relativa de los ovarios sí fue distinta ($P = 0.01$, ANOVA). La prueba post hoc determinó que dicha diferencia se debe a que el grupo tratado con Raclopride presentó un incremento significativo en comparación con el grupo tratado con aCSF (Intacto vs. aCSF: $P = 0.9957$, Intacto vs. Raclopride: $P = 0.1288$ y aCSF vs. Raclopride: $P = 0.0105$, prueba de múltiples comparaciones de Tukey).

	Intacto	aCSF	Raclopride
Adrenales	21.01 ± 0.4094	21.09 ± 0.6693	21.46 ± 0.6655
Útero	184 ± 8.366	155 ± 4.253	175.5 ± 8.102
Ovarios	22.68 ± 1.109	22.16 ± 0.7868	34.42 ± 4.409*

Cuadro 2. La media y el error estándar de la masa relativa de los órganos de los animales intactos o de aquellos microinyectados con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride. En este análisis no se consideró la etapa del ciclo estral en la que se realizaron los tratamientos. *p= 0.0105 vs. aCSF, prueba de múltiples comparaciones de Tukey.

Análisis de resultados considerando la etapa del ciclo estral en la que se realizó cada tratamiento.

En el presente estudio no se alteró la ciclicidad de ningunos de los animales tratados, por lo que todos presentaron células cornificadas en el frotis vaginal en el día del estro predicho. El análisis por etapa tampoco mostró diferencias significativas en la tasa de animales que ovularon (Figura 15). En la etapa de estro todos los animales, sin importar el grupo experimental, ovularon (P > 0.9999, prueba de probabilidad exacta de Fisher). Por otro lado, en las etapas de metaestro y diestro el tratamiento con Raclopride bloqueó la ovulación en el 20% de los animales (Metaestro, Intacto: 7/7, aCSF: 7/7 vs. Raclopride: 4/5; P= 0.4167; Diestro, Intacto: 7/7 vs. Raclopride: 5/6 P= 0.4615, aCSF: 5/5; vs. Raclopride: 5/6 P > 0.9999, prueba de probabilidad exacta de Fisher). Finalmente, en la etapa de proestro no se mostró ningún cambio en la tasa de animales que ovularon (P > 0.9999, prueba de probabilidad exacta de Fisher).



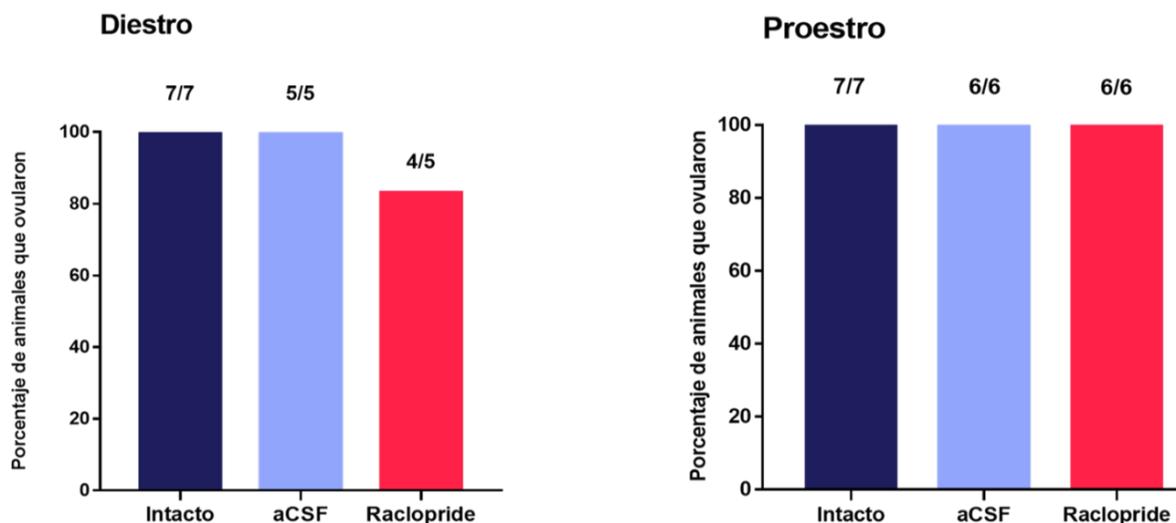


Figura 15. Porcentaje de animales que ovularon en el grupo intacto, microinyectado con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o con Raclopride a las 09:00 h del día del estro, metaestro, diestro o proestro. Los números sobre las barras representan la fracción de animales que ovularon.

El análisis del número de ovocitos liberados (Figura 16) no mostró cambios significativos entre los grupos tratados en las etapas de estro, metaestro y diestro, sin embargo, en la etapa de metaestro es evidente un incremento en la dispersión de los datos, probablemente debido a diferencias en la sensibilidad de los animales al tratamiento. Estro (Intacto: $M=14$, $RI=13-14$ vs. aCSF: $M=12$, $RI=10.5-13.5$ vs. Raclopride: $M=12$, $RI=11.5-15$; $P=0.3338$, prueba de Kruskal-Wallis), metaestro (Intacto: $M=14$, $RI=13-14$ vs. aCSF: $M=13$, $RI=10-15$ vs. Raclopride: $M=9.5$, $RI=4-15.75$; $P=0.8432$, prueba de Kruskal-Wallis) y diestro (Intacto: $M=14$, $RI=13-14$ vs. aCSF: $M=14$, $RI=11.5-17$ vs. Raclopride: $M=14$, $RI=11-15.5$; $P=0.8163$, prueba de Kruskal-Wallis). Por el contrario, en la etapa de proestro se observó un incremento significativo del número de ovocitos liberados en el grupo tratado con Raclopride en comparación con el grupo microinyectado con aCSF (Intacto: $M=14$, $RI=13-14$ vs. aCSF: $M=11.25$, $RI=6.5-14$ vs. Raclopride: $M=15$, $RI=14-16.25$; $P=0.0057$ prueba de Kruskal-Wallis y $P=0.0092$ prueba de Dunn).

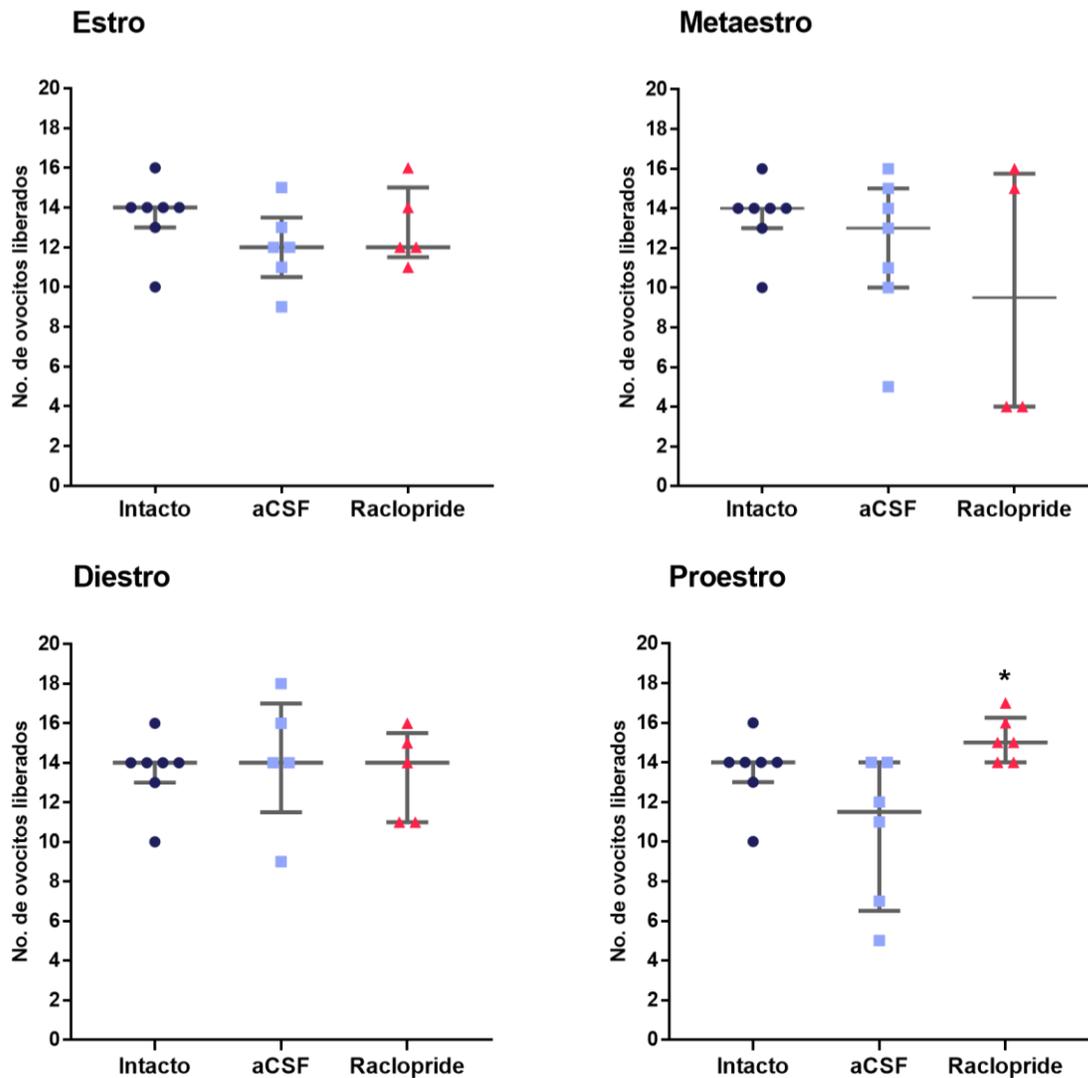


Figura 16. Mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por el grupo intacto y los grupos tratados con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) y Raclopride a las 09:00 h del estro, metaestro, diestro o proestro. *aCSF vs. Raclopride $P=0.0057$, prueba de Kruskal-Wallis seguida de Dunn.

El análisis de la masa relativa de los órganos, considerando a la etapa del ciclo estral en la que se realizó el tratamiento como variable (Cuadro 3), no mostró diferencias significativas entre los tratamientos para la etapa de estro. En la etapa de metaestro se observaron un decremento significativo en la masa relativa del útero al comparar al grupo intacto con el grupo tratado con aCSF (Intacto vs. aCSF: $P=0.0463a$, Intacto vs. Raclopride: $P=0.0709$ y aCSF vs. Raclopride: $P>0.9999$; ANOVA seguida de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey) y en la masa relativa de los ovarios entre el grupo inyectado con aCSF y el inyectado con Raclopride (Intacto vs. aCSF: $P=0.7318$, Intacto vs. Raclopride: $P=0.1438$ y aCSF vs. Raclopride: $P=0.0399b$; ANOVA seguida de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey). En la etapa de diestro no se observaron diferencias significativas

en la masa relativa de las adrenales y de los ovarios, sin embargo, en la masa relativa del útero si se mostró un incremento al comparar al grupo tratado con aCSF con el tratado con Raclopride (Intacto vs. aCSF: P= 0.2915, Intacto vs. Raclopride: P= 0.2901 y aCSF vs. Raclopride: P= 0.0254c; ANOVA seguida de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey). Finalmente, en la etapa de proestro sólo se observó un decremento significativo en la masa relativa del útero del grupo tratado con la solución vehículo en comparación con el grupo intacto (Intacto vs. aCSF: P= 0.0465d, Intacto vs. Raclopride: P= 0.6752 y aCSF vs. Raclopride: P= 2362; ANOVA seguida de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey).

ESTRO	Intacto	aCSF	Raclopride
Adrenales	21.01 ± 0.4094	22.91 ± 1.359	57.06 ± 34.85
Útero	184.2 ± 8.366	159.6 ± 10.89	156.2 ± 10.92
Ovarios	22.68 ± 1.109	23.76 ± 1.787	23.54 ± 1.279
METAESTRO	Intacto	aCSF	Raclopride
Adrenales	21.01 ± 0.4094	19.35 ± 1.122	21.07 ± 0.8654
Útero	184.2 ± 8.366	153.4 ± 7.103a	153.3 ± 11.55
Ovarios	22.68 ± 1.109	21.05 ± 1.669	27.38 ± 2.106b
DIESTRO	Intacto	aCSF	Raclopride
Adrenales	21.01 ± 0.4094	21.99 ± 1.111	21.13 ± 1.132
Útero	184.2 ± 8.366	155 ± 12.79	211.9 ± 17.32c
Ovarios	22.68 ± 1.109	22.01 ± 1.438	21.68 ± 1.287
PROESTRO	Intacto	aCSF	Raclopride
Adrenales	21.01 ± 0.4094	20.57 ± 1.503	21.89 ± 1.362
Útero	184.2 ± 8.366	152.1 ± 5.28d	173.7 ± 11.53
Ovarios	22.68 ± 1.109	21.98 ± 1.453	22.7 ± 1.701

Cuadro 3. La media y el error estándar de la masa relativa de los órganos de los animales intactos o de aquellos microinyectados con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h del estro, metaestro, diestro o proestro. **a** p=0.0463 vs Intacto, **b** p= 0.0399 vs aCSF, **c** p=0.0254 vs aCSF y **d** p=0.0465 vs. Intacto; ANOVA seguida de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey.

Resultados de los animales microinyectados fuera del POA.

En el análisis histológico de los cerebros se observó que, en algunos animales, la posición de las cánulas y la dispersión de las sustancias se hallaban en el tercer ventrículo, el OCH, el SCN o el área retroquiasmática. Los datos de estos animales se agruparon por área y se analizaron sin importar la etapa del ciclo estral en la que se realizó el tratamiento, ya que el número de observaciones por grupo era pequeño.

Cuando la posición de las cánulas se observó en el tercer ventrículo, el porcentaje de ciclicidad (Figura 17A) mostró una tendencia a la baja en aquellos animales tratados con aCSF en comparación con el grupo intacto o el tratado con Raclopride. De acuerdo con lo anterior, en el grupo tratado con aCSF la tasa de animales ovulantes (Figura 17B) también disminuyó en un 50%, lo que es estadísticamente significativo (Intacto: 7/7, Raclopride: 7/7 vs. aCSF: 6/12; $P= 0.0436$, prueba de probabilidad exacta de Fisher). De igual manera el número de ovocitos liberados (Figura 17C) en este grupo vehículo mostró una tendencia a la baja que no alcanza a ser significativa.

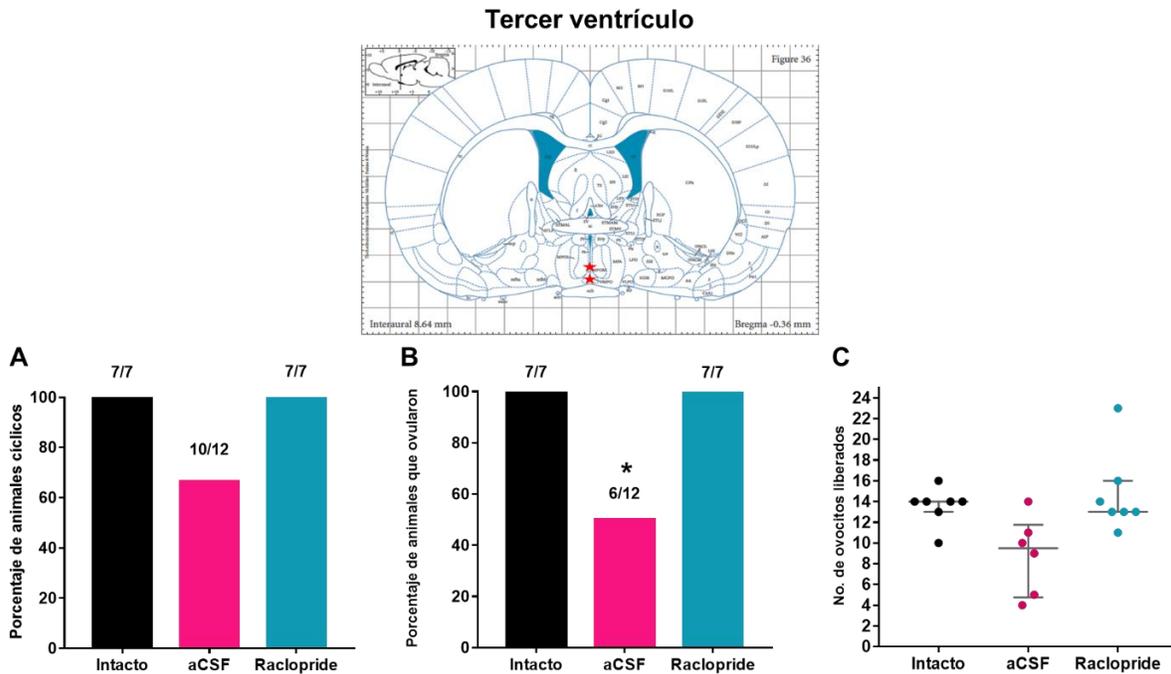


Figura 17. (A) Porcentaje de animales cíclicos, (B) de animales que ovularon y (C) mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados en el 3V con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral. * $P= 0.0436$, prueba de probabilidad exacta de Fisher. Las estrellas rojas indican el sitio de inyección.

En los animales en los que las cánulas alcanzaron el OCH se observaron diferencias significativas en cada una de las variables analizadas. El porcentaje de animales cíclicos (Figura 18A) disminuyó después de que se llevara a cabo la microinyección de la solución vehículo y del fármaco. En el caso de los animales tratados con aCSF, el 75% cicló mientras que en el grupo microinyectado con Raclopride sólo el 50% lo hizo, lo que es estadísticamente significativo al compararse contra el grupo intacto (Intacto: 7/7 vs. Raclopride: 5/10; $P= 0.0441$, prueba de probabilidad exacta de Fisher). De igual forma, el porcentaje de animales que ovularon (Figura 18B) disminuyó significativamente a 12.5% en los animales tratados con aCSF (Intacto: 7/7 vs. aCSF: 1/8; $P= 0.0014$, prueba de probabilidad exacta de Fisher) y a 10% con Raclopride (Intacto: 7/7 vs. Raclopride: 1/10; $P=0.0004$, prueba de probabilidad exacta de Fisher). Finalmente, el número de ovocitos liberados (Figura 18C) también mostró un decremento significativo en ambos grupos (Intacto: $M= 14$,

RI= 13-14 vs. aCSF: M= 0, RI= 0-0; P= 0.0004, Intacto vs. Raclopride: M= 12, RI= 11.5-15; P= 0.0002, prueba de Kruskal-Wallis seguida de Dunn).

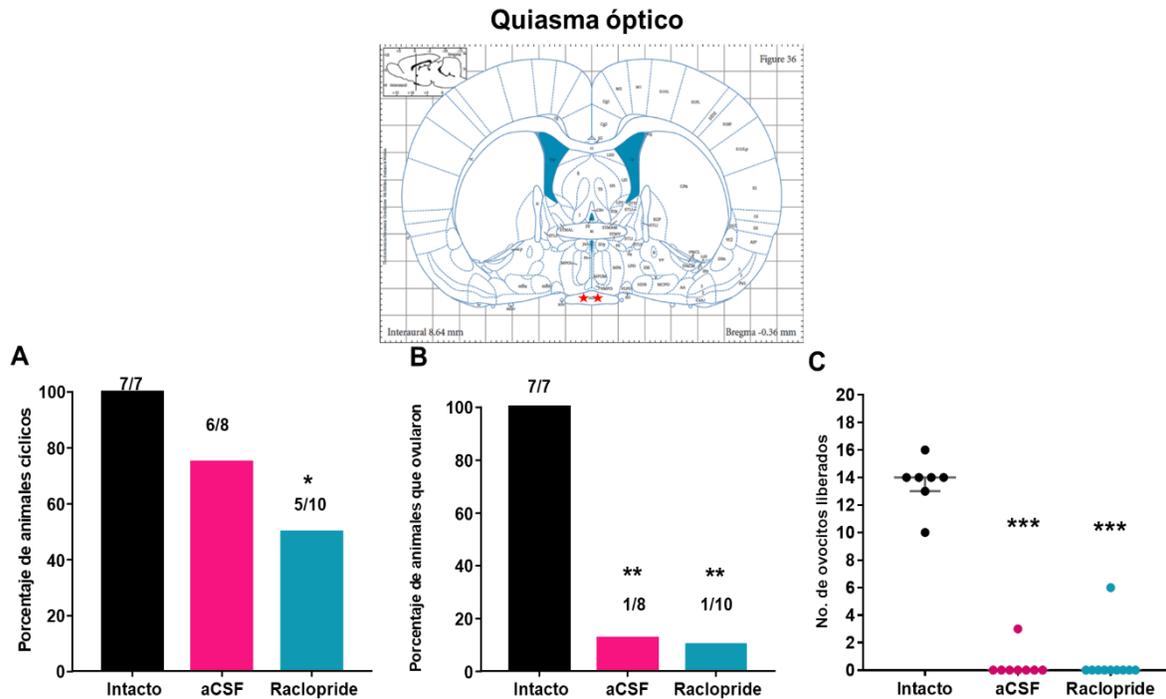


Figura 18. (A) Porcentaje de animales cíclicos, (B) de animales que ovularon y (C) mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados en el OCH con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral. *P= 0.0441 vs. Intacto, prueba de probabilidad exacta de Fisher; **P=0.0014 y 0.0004 vs. Intacto, prueba de probabilidad exacta de Fisher, ***P= 0.0004 y 0.0002 vs. Intacto, prueba de Dunn. Las estrellas rojas indican el sitio de inyección.

En los animales en los que la inyección se realizó en el SCN no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas. A pesar de lo anterior, en el grupo tratado con aCSF se observó una ligera tendencia a la baja en el porcentaje de animales que ciclaron (Figura 19A), en el porcentaje de animales que ovularon (Figura 19B) y en el número de ovocitos liberados (Figura 19C) en comparación con el grupo intacto o con el grupo tratado con Raclopride. El comportamiento de los datos del grupo microinyectado en el área retroquiasmática fue semejante al antes descrito para el grupo inyectado en el SCN (Figura 20).

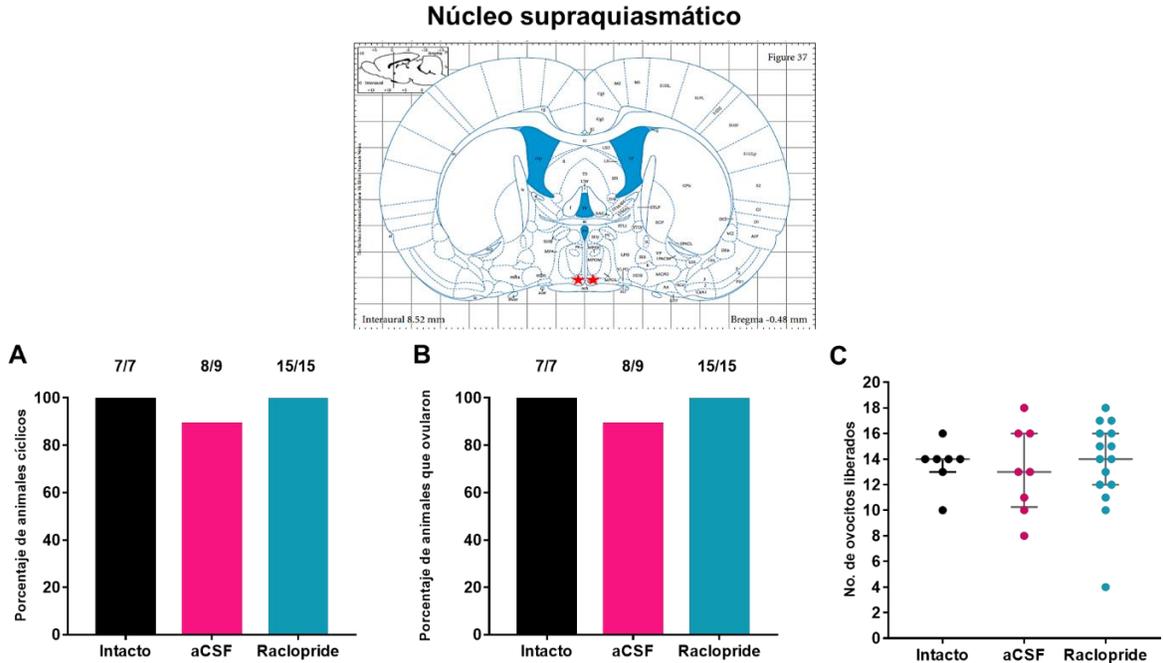


Figura 19. (A) Porcentaje de animales cíclicos, (B) de animales que ovularon y (C) mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados en el SCN con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral. Las estrellas rojas indican el sitio de inyección.

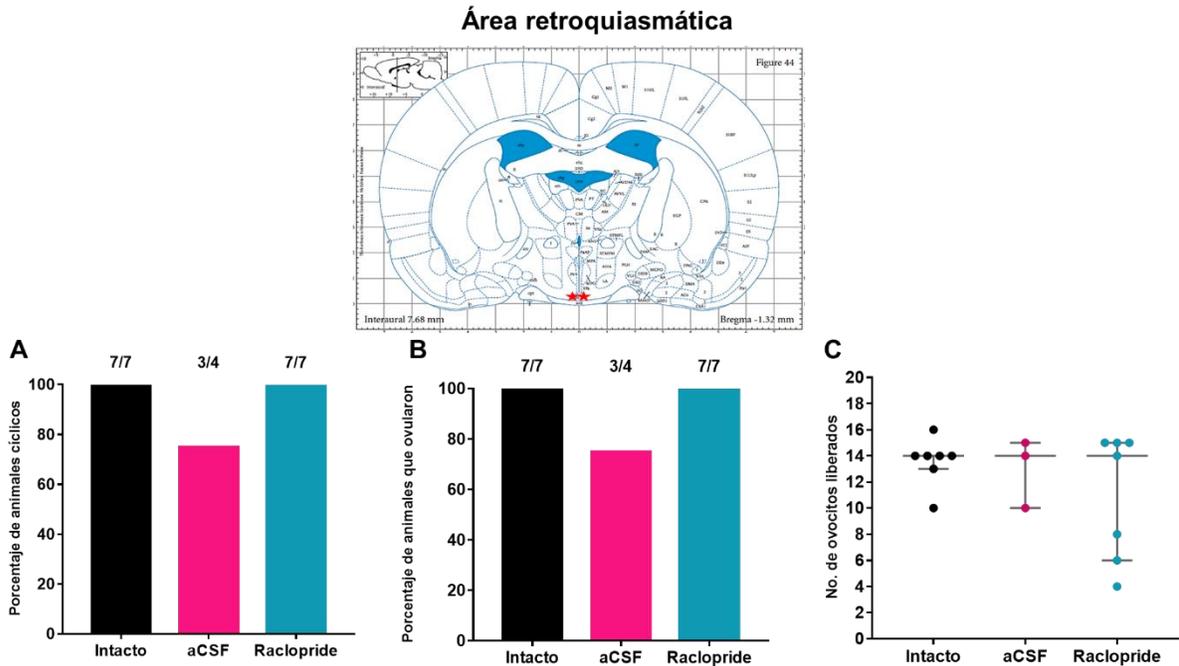


Figura 20. (A) Porcentaje de animales cíclicos, (B) de animales que ovularon y (C) mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados por animales intactos o microinyectados en el Área retroquiasmática con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) o Raclopride a las 09:00 h de las distintas etapas del ciclo estral. Las estrellas rojas indican el sitio de inyección.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El efecto del bloqueo de los RDA-2 en el POA sobre:

A. La ciclicidad estral

La dopamina regula la ovulación de los mamíferos de manera estimulante en los modelos *in vivo*. Por ejemplo, la inhibición de la secreción de la dopamina, en el día del proestro o el bloqueo de sus receptores, en cada una de las etapas del ciclo estral, resulta en la inhibición de la secreción de las gonadotropinas y de la ovulación (Barracough y Sawyer, 1957; Domínguez *et al.*, 1987). En el POA, el bloqueo unilateral de ambas familias de receptores dopaminérgicos en las etapas de estro, metaestro y diestro resulta en la inhibición de la ovulación (Morán y Domínguez, 1995). La mayoría de estos resultados señalan que la dopamina estimula la secreción de la GnRH, por lo que modula la progresión del ciclo estral y la ovulación, por otro lado, el bloqueo unilateral de los RDA-1 del POA no modifica ninguno de estos parámetros (Cortés, 2019). A partir de estas evidencias, nosotros hipotetizamos que la regulación estimulante de la dopamina es mediada por los receptores RDA-2 del POA, por lo que el bloqueo de éstos en la mañana de cada una de las etapas del ciclo estral inhibiría la ovulación. A pesar de nuestras expectativas, los resultados muestran que la inyección de Raclopride en la mañana de cada una de las etapas tampoco altera la ciclicidad estral ni bloquea la ovulación.

En este estudio esperábamos que el bloqueo de los RDA-2 afectara el ciclo estral ya que existen evidencias que muestran que la administración sistémica de un agonista selectivo de los RDA-2 en caninas en anestro resulta en la inducción del ciclo estral (Verstegen *et al.*, 1999). En el caso de los roedores, se ha mostrado que la administración de L-DOPA en el POA de ratas senescentes que han perdido la ciclicidad estral resulta en el restablecimiento de ésta (Cooper *et al.*, 1979). Con base en nuestros resultados, podemos concluir que la actividad de los RDA-2 del POA no es indispensable para modular la progresión del ciclo estral. La diferencia entre nuestros resultados y los estudios mencionados puede deberse a la diferencia de la fisiología reproductiva entre especies ya que nuestras hembras son poliéstricas no estacionales y los cánidos son animales monoéstricos estacionales. En cuanto al estudio realizado en roedores, las diferencias podrían deberse a la edad de los individuos, en nuestro estudio se usaron ratas adultas y cíclicas mientras que en el de Cooper y colaboradores (1979) fueron animales senescentes en los que el eje neuroendocrino y su regulación dopaminérgica están alterados.

Otros autores reportan que la inyección de haloperidol en el POA unilateral o bilateral alarga la duración del ciclo estral de la rata y, en algunos individuos, la continuidad de éste se pierde permanentemente. En este caso, los autores señalan la presencia de leucocitos en todas las muestras del epitelio vaginal (Morán-Perales *et al.*, 2019). Se ha observado que la persistencia de estas células se debe a la desregulación en la secreción de las diferentes

hormonas del eje neuroendocrino, resultado de la activación de procesos asociados al estrés (Weesner y Pfaf, 1994). Considerando lo anterior, sugerimos que los resultados de Morán-Perales y colaboradores se deben a una alteración en las condiciones neuroendocrinas de los animales en respuesta a la manipulación experimental y no al tratamiento, ya que se evaluó el efecto de manera aguda. De acuerdo con lo anterior, el hecho de que todos los animales de nuestro estudio hayan mostrado ciclos estrales normales, independientemente de si se administró aCSF o Raclopride, indica que la técnica quirúrgica y la manipulación durante la microinyección se realizaron de forma óptima. Lo anterior evitó que se generaran respuestas agudas al estrés, mismas que podrían alterar el funcionamiento del eje neuroendocrino y, en consecuencia, inhibir el ciclo estral y la ovulación (Kalantaridou *et al.*, 2004a).

B. La tasa de animales que ovularon

En cuanto a la ovulación, la inyección de Raclopride en estro y proestro no modificó esta variable, mientras que en las etapas de metaestro y diestro únicamente se presentó un decremento del 10%. Estos resultados nos permiten concluir que la activación de los RDA-2 del POA no es necesaria a las 09:00 h para regular la ovulación. Es posible que el sistema dopaminérgico del POA regule la ovulación en un horario diferente al que nosotros estudiamos. Por ejemplo, Kordon y Glowinski (1969) administraron α -metil- p -tirosina, un fármaco que inhibe la síntesis de dopamina, de forma sistémica a las 08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 15:00, 16:00 y 17:00 horas del día del proestro. Mostraron que la falta de dopamina únicamente inhibe la ovulación de las ratas entre las 14:00 y las 16:00 horas, por lo que concluyen que la señal dopaminérgica actúa en un intervalo corto de tiempo (Kordon y Glowinski, 1969; 1972). La inyección unilateral de pimozida en el POA a las 12:00 h del proestro resulta en la inhibición de la secreción fásica de la LH (Hashimoto y Kimura, 1986). Adicionalmente, la administración unilateral de haloperidol en la misma región a las 13:00 horas del metaestro resulta en el bloqueo de la ovulación, mientras que en estro y diestro el bloqueo es parcial y en el proestro no tiene efecto (Morán y Domínguez, 1995). De aceptarse la idea de que a las 09:00 h no se requiere del sistema dopaminérgico para regular la ovulación se debe analizar el efecto del bloqueo de los RDA-2 en el POA en otros horarios, en particular en aquellos cercanos al periodo crítico.

A pesar de lo anterior, existe evidencia de que el sistema dopaminérgico sí regula la ovulación a las 09:00 horas de algunas etapas del ciclo estral, misma en la que nos basamos durante el diseño de este estudio. Por ejemplo, la inyección intramuscular de haloperidol a las 13:00 horas de cada una de las etapas bloquea la ovulación como se reportó en los estudios del párrafo anterior, sin embargo, un efecto similar se apreció cuando la inyección se realizó a las 09:00 horas del estro, metaestro y diestro, pero no del proestro (Domínguez *et al.*, 1987). Estos resultados indican que el sistema dopaminérgico participa en la regulación de la ovulación en las etapas y en el horario analizados en el presente estudio. A pesar de esto, el bloqueo de los RDA-2 no fue suficiente para bloquear la ovulación, por lo que es posible que

la dopamina actúe sobre los RDA-1, o bien, que la función de ambas familias de receptores sea redundante. En los sistemas biológicos se ha observado que la redundancia funcional se presenta cuando dos elementos tienen funciones similares lo que permite que si alguno está ausente el otro lleve a cabo la función esperada (Joyner, 2013). En ambos casos la señal dopaminérgica podría interpretarse en los animales tratados con Raclopride y por lo tanto se obtendrían los resultados que observamos.

Por otro lado, debe tomarse en cuenta que en los experimentos realizados por Morán (1995), la administración de haloperidol no fue sólo en el POA, también incluyó al AHA. Esta estructura contiene somas de neuronas GnRHérgicas que proyectan hacia la eminencia media y que tienen actividad trófica sobre las gonadotropinas (Whitlock, 2005; Castañeyra-Ruiz *et al.*, 2013). Esta diferencia metodológica podría explicar el contraste con nuestros resultados ya que, en la evidencia antes mencionada, el bloqueo de los receptores dopaminérgicos se realiza en dos áreas. Lo anterior implicaría que el sistema dopaminérgico que participa en la regulación de la ovulación no está dentro del POA sino en el AHA o bien, que la unión de la dopamina a sus receptores en las neuronas de GnRH de cualquiera de estas estructuras es suficiente para estimular la ovulación. Esta idea podría confirmarse al evaluar el efecto del bloqueo de los RDA-1 o RDA-2 del AHA sobre la ovulación.

Existen otras evidencias de modelos *in vitro* que podrían explicar la diferencia entre la hipótesis y los resultados del presente estudio. Martínez y colaboradores (1992) reportaron que la dopamina tiene un efecto estimulante sobre las neuronas de GnRH. Lo anterior se mostró en medios de cultivo que contenían neuronas de GnRH inmortalizadas de ratón y a los cuales se les añadieron diferentes fármacos para analizar la actividad de las neuronas antes mencionadas. Observaron que la adición de dopamina estimuló un incremento en la síntesis de cAMP, en la amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH y de la concentración del decapeptido. Posteriormente, se analizó el papel de ambas familias de receptores dopaminérgicos, por lo que se adicionaron agonistas selectivos a cada familia. En el caso de los RDA-1, la adición de su agonista SKF38393 resultó en el incremento de los parámetros evaluados, mientras que la adición de bromocriptina, agonista de los RDA-2, no los modificó. En cultivos tratados con dopamina en presencia de los antagonistas selectivos de cada familia se mostró que el bloqueo de los RDA-2, pero no de los RDA-1, resulta en un incremento de la concentración del cAMP y de la GnRH (Martínez *et al.*, 1992). Esta serie de experimentos sugieren que, en esta línea celular, la dopamina estimula la actividad de las neuronas GnRHérgicas y la secreción del decapeptido a través de los RDA-1. Esta evidencia también coincide con nuestros resultados ya que al estar inactivos los RDA-2, la unión del neurotransmisor con los RDA-1 activaría las vías de señalización intracelular que estimulan la síntesis del cAMP y la secreción de la GnRH.

A pesar de que las evidencias anteriores y nuestros propios resultados apoyan la idea de que la dopamina actúa a través de la familia RDA-1 para estimular la ovulación, Cortés (2019) reportó que el bloqueo unilateral de los RDA-1 del POA a las 09:00 de cada etapa del

ciclo estral no modifica el porcentaje de animales que ovulan. Esto sugiere que se requiere de ambas familias de receptores en cada una de las etapas del ciclo estral para regular la ovulación. Una hipótesis alternativa es que la dopamina inhibe la actividad de las neuronas GnRHérgicas *in vivo*. La idea anterior se sustenta con los resultados obtenidos por Liu y Herbison (2013), que analizaron la actividad eléctrica de las neuronas de GnRH de ratonas en estro, metaestro y proestro y el efecto de la adición de dopamina o de los antagonistas selectivos de los RDA-1 y 2, SCH23390 y Raclopride, respectivamente. Los resultados mostraron que, sin importar la etapa del ciclo estral, la dopamina disminuye la frecuencia de disparo, hiperpolarizando a las neuronas de GnRH. Por otro lado, los antagonistas de ambas familias de receptores dopaminérgicos eliminan la acción inhibitoria de la dopamina, lo que señala que dicha acción es mediada a través de ambos receptores (Liu y Herbison, 2013). En concordancia, se ha observado que la adición de dopamina al medio de cultivo de explantes de hipotálamo-hipófisis resulta en la inhibición de la secreción de la GnRH y la LH (Tasaka *et al.*, 1985).

Ambas evidencias explicarían entonces que la acción inhibitoria de la dopamina sobre la actividad de las neuronas GnRHérgicas resulta en la inhibición de la secreción de su decapéptido (Liu y Herbison, 2013; Tasaka *et al.*, 1985). En consecuencia, nosotros sugerimos dos posibilidades; que se requiere de la actividad sinérgica de ambos receptores para regular la ovulación, o bien que el bloqueo de los RDA-2 es suficiente para eliminar la señal inhibitoria de la dopamina y que esto permitiera la secreción de la GnRH y la ovulación. La primera idea se menciona de acuerdo con las evidencias de estudios en los que se analizó el comportamiento sexual (Graham y Pfaus, 2010) o los cuidados parentales (Numan y Stolzenberg, 2009). En éstos, la activación de los RDA-1 en el POA, a través de un agonista selectivo, resulta en el aumento de ambos comportamientos, mientras que la administración del agonista selectivo de los RDA-2 disminuye el efecto de la activación de la familia 1, lo que reestablece el comportamiento al estado basal (Numan y Stolzenberg, 2009; Graham y Pfaus, 2010).

Otros autores han apoyado la idea del papel inhibitorio de la dopamina, sin embargo, señalan que éste se efectúa a través de una de las familias de receptores. Esto se observó en tejido hipotalámico de peces, en donde la adición de dopamina al medio de cultivo resulta en la hiperpolarización de las neuronas de GnRH. La adición de SKF81297, un agonista selectivo de los RDA-1, no modificó la actividad eléctrica, mientras que la adición de quinperole, agonista de los RDA-2, resulta en la inhibición de la actividad eléctrica (Bryant *et al.*, 2016). Si este mecanismo también opera en otros vertebrados, como las ratas utilizadas en el presente estudio, nuestros resultados se explicarían ya que al no permitir que la dopamina ejerza su acción a través de los RDA-2, no se inhibiría la actividad de las neuronas GnRHérgicas y su secreción, razón por la que los animales ovularon.

Adicionalmente, se han identificado otros mecanismos a través de los cuales la dopamina regula de forma inhibitoria a las neuronas del POA. Uno de estos es a través de los

receptores α -adrenérgicos, con los que se ha confirmado que la dopamina puede acoplarse. Cornil y Ball (2008) mostraron que la dopamina tiene la capacidad de desplazar a un ligando selectivo de los receptores adrenérgicos y acoplarse a dichos receptores, además de que posee una mayor afinidad a los $\alpha 2$. Esta información sugiere que la acción de la dopamina no es mediada a través de los RDA-1 y RDA-2, sino que existe una mayor complejidad en su señalización. De acuerdo con lo anterior, en otro estudio se observó que la adición de dopamina a un medio de cultivo de tejido del POA resulta en la inhibición de la actividad eléctrica de las neuronas, donde el 80% de las células son hiperpolarizadas. Posteriormente, se mostró que este efecto no se debe a la unión de este neurotransmisor con sus receptores, ya que al añadir los antagonistas SCH-23390 o sulpiride, no se revirtió la acción inhibitoria de la dopamina. Por otro lado, cuando al medio de cultivo se le adicionó prazosina o yohimbina, antagonistas selectivos de los receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$ -adrenérgicos, respectivamente, la acción de la dopamina se modificó. La adición de prazosina al medio de cultivo no tuvo efecto, mientras que la yohimbina estimuló la despolarización de las neuronas y su frecuencia de disparo aumentó. En otro experimento se mostró que la dopamina no se estaba catabolizando en noradrenalina, en cuyo caso el resultado obtenido se explicaría por el acoplamiento de ésta con sus receptores. En este caso, a los medios de cultivo se les añadió dopamina y ácido fusárico o cisteína, fármacos que inhiben a la enzima dopamina β -hidroxilasa la cual cataliza la conversión de dopamina a noradrenalina. Los resultados obtenidos de este tratamiento fueron similares a aquellos en los que sólo se añadió dopamina al medio, lo que confirma que esta respuesta inhibitoria es mediada sólo por la dopamina (Cornil *et al.*, 2002).

De acuerdo con lo anterior, estos autores sugieren que la dopamina tiene un efecto inhibitorio cuando se acopla a los receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos (Cornil *et al.*, 2002; Cornil y Ball, 2008). Si comparamos estas evidencias con los resultados obtenidos por Moran y Domínguez (1995), en los que el bloqueo de ambas familias de receptores en el POA resulta en la inhibición de la ovulación, podemos proponer que al no estar libres sus receptores, la dopamina podría acoplarse a los $\alpha 2$ -adrenérgicos, lo que resultaría en la inhibición del proceso en cuestión. Cabe mencionar que comprobar esta idea sería difícil, ya que se necesitaría bloquear en todas las combinaciones posibles a los receptores dopaminérgicos y adrenérgicos, lo cual implicaría una menor sensibilidad y especificidad al determinar la función de la dopamina en la regulación de la ovulación.

La otra forma en la que la dopamina regula de forma inhibitoria a las neuronas GnRHérgicas del POA es a través de interneuronas. Se ha observado que, además de presentar aposiciones con las neuronas de GnRH, las neuronas de dopamina del POA tienen aposiciones con neuronas que son inmunorreactivas al NPY, el GABA, la acetilcolina y otros neurotransmisores (Bogus-Nowakowska *et al.*, 2016). En el caso del NPY, existe evidencia anatómica de que las neuronas de GnRH expresan receptores al NPY y que las neuronas de este neuropéptido expresan ambos receptores dopaminérgicos (Li *et al.*, 1999). Aunado a lo anterior, en estudios *in vitro* se ha observado que al añadir NPY al medio de cultivo que

contiene neuronas de GnRH de ratones hembra, la actividad eléctrica de éstas disminuye. Lo anterior se confirmó tras la adición de un agonista y antagonista del neuropéptido, el primero indujo la hiperpolarización de las neuronas mientras que el segundo no tuvo efecto. Posteriormente, se identificaron a sus receptores Y1R, Y2R y Y5R en las neuronas de GnRH y se determinó que el efecto inhibitorio de éste se efectúa a través de los Y1R (Klenke *et al.*, 2010). En este caso particular, se podría sugerir que, en nuestro estudio, el bloqueo de los RDA-2 tuvo efecto en las neuronas del NPY lo cual resultó en la interrupción de la acción inhibitoria del neuropéptido sobre las neuronas GnRHérgicas y, por lo tanto, nuestros animales ovularon. A pesar de esto, no debe descartarse la idea de que la dopamina puede actuar sobre otras interneuronas para regular la ovulación. Esta idea, al igual que la de estudiar el papel de diferentes receptores de forma simultánea en la regulación de las neuronas GnRHérgicas, haría más difícil elucidar el papel de la dopamina. Lo anterior implicaría el uso de métodos y técnicas muy finas que permitan explorar la interacción de la dopamina con los diversos sistemas de neurotransmisión que regulan la ovulación.

C. El número de ovocitos liberados

En la etapa de proestro nuestro tratamiento resultó en un incremento significativo del número de ovocitos liberados en comparación con el grupo control. Estos resultados no concuerdan con la hipótesis propuesta, ya que nosotros planteamos un bloqueo de la ovulación y, por tanto, cero ovocitos liberados después del tratamiento en cada una de las etapas. Esta contrariedad en estro, metaestro y diestro está relacionada con las evidencias y sugerencias del apartado anterior, es decir, que el sistema dopaminérgico no participa en el horario estudiado, que los RDA-1 y los RDA-2 juegan un papel redundante y que los primeros compensaron la ausencia de los segundos. Otra idea es la dopamina actuó sobre los receptores adrenérgicos o sobre interneuronas ejerciendo una respuesta diferente a las que se ha observado sobre las neuronas de GnRH y que soportaban nuestra hipótesis.

En el caso de la etapa de proestro, el hecho de que no se haya bloqueado la ovulación concuerda con aquellos estudios en los que la administración de haloperidol, sistémica (Domínguez *et al.*, 1987) o en el POA (Morán y Domínguez, 1995), en esta etapa no bloquea la ovulación y los animales, al menos los del tratamiento en el POA, liberan una cuota normal de ovocitos. Asimismo, al evaluar la concentración de gonadotropinas tras el tratamiento, estos autores no reportan cambios significativos en ambas hormonas. Lo anterior implicaría que la dopamina, en esta etapa y horario, no participa en la regulación de la ovulación. Contrario a lo anterior, el incremento del número de ovocitos liberados observados en nuestro experimento concuerda con los resultados del bloqueo unilateral de los RDA-1 en el POA (Cortés, 2019). En el experimento antes mencionado se cuantificó la concentración sérica de ambas gonadotropinas en el día de la eutanasia y los resultados mostraron un decremento significativo de la FSH. La autora sugiere que el incremento del número de ovocitos en la etapa de proestro fue independiente al cambio observado en la concentración de la FSH y

que este resultado se debió a una disminución del proceso de atresia en los folículos que atravesaban los estadios antral y preovulatorio (Cortés, 2019).

En nuestro estudio no se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de las gonadotropinas, por lo que no podemos confirmar que el bloqueo de los RDA-2 en el POA modificó la concentración de ambas o de alguna de estas hormonas y que por ende se incrementó la cuota de ovocitos liberados. A pesar de lo anterior, sabemos que la FSH tiene un papel fundamental en la regulación del reclutamiento, la maduración y la selección de los folículos ováricos y que la LH es imprescindible para completar la maduración y estimular la ruptura de los folículos preovulatorios (Wang *et al.*, 2014; Kaiser, 2017; Das y Kumar, 2018). Considerando esto, es posible que nuestro tratamiento haya propiciado el incremento de la secreción de la FSH, lo que, a su vez, aumentó el número de folículos maduros sensibles a la LH y que tras la secreción fásica esto resultó en un número mayor de ovocitos liberados en la mañana del estro. La idea anterior ha sido sustentada por diversos estudios en los que la administración exógena de la FSH o de sus agonistas, en una concentración mayor que la fisiológica, resulta en la superovulación. Ejemplo de lo anterior se mostró al administrar diferentes dosis de FSH sola, junto con LH o gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG), a ratas puberales (Armstrong y Opavsky, 1988). Para evaluar el efecto de ambas gonadotropinas o de la PMSG sobre la ovulación, se inyectaron tres concentraciones en la mañana del metaestro. Este tratamiento mostró que, sin importar la concentración de la FSH, se estimuló la liberación de un mayor número de ovocitos en comparación de los animales que recibieron las tres concentraciones de FSH más LH (Armstrong y Opavsky, 1988; Opavsky y Armstrong, 1989).

A partir de los resultados anteriores, se comparó el efecto de las tres concentraciones de FSH contra las tres de PMSG, que simula la acción de ambas gonadotropinas. Los resultados de este experimento mostraron que, si bien ambas hormonas son capaces de inducir la ovulación, la FSH estimula la liberación de una cuota mayor de ovocitos. Finalmente, se evaluó el efecto de la periodicidad de la administración de la FSH: una sola inyección, cinco inyecciones o infusiones continuas durante 60 horas que concluyeron a las 20:00 horas del día establecido como proestro. Esto mostró que la tasa de animales que ovularon y el número de ovocitos liberados aumentó en proporción con el número de dosis administradas. Estos resultados muestran la potente regulación estimulante que la FSH, por sí sola, ejerce sobre la ovulación (Armstrong y Opavsky, 1988; Opavsky y Armstrong, 1989).

Adicionalmente, existen evidencias en las que se muestra la relación entre la dopamina y la secreción de la FSH, sin embargo, éstas también muestran una ambigüedad en el papel que la dopamina desempeña. En estudios *in vitro*, se ha observado que la incubación de explantes de tejido hipotalámico e hipofisario con diferentes concentraciones de dopamina resulta en un incremento (Kamberi *et al.*, 1970) o en un decremento (Van Loon y Kragt, 1970) de la concentración de la FSH en el medio. Por otro lado, los estudios *in vivo* muestran que la infusión intravenosa de dopamina o metoclopramida en la fase folicular de mujeres adultas

y fértiles resulta a un cambio en la concentración sérica de dicha gonadotropina. La infusión de dopamina induce un decremento de la FSH, mientras que el bloqueo de los RDA-2 con metoclopramida la incrementa (De Leo *et al.*, 1989). A pesar de que en estos estudios no se evalúa el efecto de la dopamina en el POA, muestran que el neurotransmisor regula la secreción de la FSH, por lo que también estaría modulando a la GnRH, aunque no se descarta un papel directo sobre los gonadotropos (Mori *et al.*, 1994). A partir de lo anterior, sugerimos que, en el proestro, la dopamina, a través de los RDA-2, regula de forma inhibitoria o disminuye la actividad estimulante de los RDA-1 en la regulación de la GnRH/FSH. A su vez esta idea sería apoyada por aquellas que muestran el efecto inhibitorio de la dopamina sobre las neuronas del POA y, en particular, sobre las de la GnRH (Ignatkov y Babichev, 1984; Tasaka *et al.*, 1985; Liu y Herbison, 2018).

D. La masa de los órganos

El análisis de la masa de los órganos mostró que la inyección de Raclopride en metaestro incrementó la masa de los ovarios. En nuestro estudio no se realizó el análisis histológico de los ovarios, a pesar de esto, sugerimos que este incremento se relaciona con el decremento del porcentaje de animales que ovularon y el número de ovocitos que éstos liberaron. De los cinco animales tratados, libero una cuota baja ovocitos, por lo cual proponemos que el bloqueo de los RDA-2 en esta etapa afectó el desarrollo folicular e incrementó el número de folículos atrésicos de gran tamaño. La atresia es un proceso de degradación que incluye la activación de las vías que regulan la muerte programada de cada una de las células foliculares. Se ha observado que este proceso está relacionado con la desregulación en la secreción de la GnRH, las gonadotropinas, la expresión de sus receptores en los folículos ováricos, la expresión de factores de proliferación y mantenimiento celular en los folículos, así como la inhibición de la esteroidogénesis (Asselin *et al.*, 2000; Flores-Pérez *et al.*, 2005). Una de las características de los folículos atrésicos es que, generalmente, poseen un diámetro de entre 350 y 1000 μm (Hirshfield, 1988). Con base en lo anterior, proponemos que la inhibición de los RDA-2 altero la secreción de la GnRH y las gonadotropinas, lo que derivó en el incremento del número de folículos atrésicos y, por ende, de la masa ovárica.

En el caso de la secreción de la GnRH, se ha observado que la inyección subcutánea de su antagonista en la mañana del metaestro resulta en la disminución en la amplitud y frecuencia de los pulsos de secreción de la LH y de su concentración sérica. En el caso de la FSH, esta no presenta cambios en la concentración plasmática, por otro lado, se observa un incremento del 70% de folículos atrésicos con un diámetro mayor a 550 μm (Devorshak-Harvey *et al.*, 1985). Los autores sugieren que la FSH, al no resultar afectada, pudo estimular el crecimiento de la cohorte de folículos seleccionados hasta el estadio preovulatorio, sin embargo, el decremento de la LH inhibió la ruptura del folículo y la liberación de los ovocitos dando lugar a la atresia. Por otro lado, se ha mostrado que un desbalance en la concentración de la LH inhibe la proliferación de las células de la granulosa en los primeros estadios

foliculares. La interrupción del ciclo celular da lugar a la activación de vías de muerte celular lo que a su vez resulta en la atresia de estos folículos (Kumar y Sait, 2011).

Otros autores han sugerido que la FSH es primordial en la determinación del destino de los folículos preovulatorios y que tiene la capacidad de salvaguardarlos de la atresia. Ejemplo de lo anterior es el hecho de que la fragmentación del DNA y la expresión de proteínas proapoptóticas en células de folículos dominantes de ratón se retrasa si se administra FSH (Zhou *et al.*, 2013). Adicionalmente, la FSH protege a las células de la granulosa de agentes que generan estrés oxidativo, mismo que también estimula las vías apoptóticas (Shen *et al.*, 2016). Considerando nuestros resultados, sugerimos que en el metaestro la dopamina tiene un papel estimulante sobre la secreción de la GnRH y las gonadotropinas, por lo que el bloqueo de los RDA-2 resulta en un incremento en la atresia folicular. Cabe mencionar que dos animales de este grupo ovularon una cuota normal de ovocitos y dos una cuota una baja, este resultado puede deberse a que los RDA-1 son capaces de interpretar la señal estimulante de la dopamina e inducir la ovulación. A pesar de esto, la variación del número de ovocitos que ovularon puede atribuirse a diferencias en la sensibilidad a los tratamientos que cada animal presenta. Debido a lo anterior sería necesario incrementar la n en esta etapa para obtener una conclusión más completa acerca del papel que la dopamina desempeña en la mañana del metaestro.

La masa relativa del útero también presentó un incremento significativo tras la inyección de Raclopride en la etapa de diestro. En este caso proponemos que la dopamina, al unirse a los RDA-2, regula de forma inhibitoria la secreción de la GnRH y las gonadotropinas. En la etapa de diestro, el útero se caracteriza por poseer un menor volumen en comparación con otras etapas. El tamaño de éste está determinado por la disminución en la concentración del E₂ y el aumento de la P₄ en esta etapa. Se ha señalado que el E₂ tiene un efecto mitogénico y protector sobre las células del epitelio uterino, mientras que la P₄ contrarresta estos efectos e incluso estimula vías de muerte celular (Marcus, 1974; Wood *et al.*, 2007). Con estas evidencias retomamos la idea de que el bloqueo de los RDA-2 indujo un incremento en la secreción de las gonadotropinas, las cuales estimularon un cambio en la proporción del E₂ y la P₄, lo cual resultó en el incremento de la masa del útero. La idea anterior es similar a lo que Hashimoto y Kimura (1987) observaron tras administrar dopamina en el POA, lo que resultó en el incremento de la secreción de FSH y de la masa del útero. De acuerdo con lo anterior, propusieron que el aumento de esta hormona estimuló la síntesis del E₂ y, por lo tanto, el incremento de su concentración, lo que indujo un mayor efecto mitogénico en las células del útero incrementando su masa (Hashimoto y Kimura, 1987).

Tomando en cuenta la evidencia anterior, y nuestros resultados, sugerimos que la dopamina, en la etapa de diestro, regula de forma estimulante al eje neuroendocrino. En cuanto a nuestros resultados, estos muestran la diferencia funcional de ambas familias de receptores, los RDA-1 estimulan y los RDA-2 inhiben, por lo que el Raclopride eliminó la acción inhibitoria de los RDA-2. En consecuencia, la dopamina se unió a los RDA-1 y

estimuló la secreción de la GnRH, la FSH y el E₂. Las evidencias mostradas a lo largo de la discusión del efecto del bloqueo de los RDA-2 en el POA sobre las variables analizadas muestran que la dopamina puede regular de manera estimulante e inhibitoria la función del eje neuroendocrino que regula la ovulación, lo que depende de la etapa del ciclo estral.

El efecto de la inyección de aCSF en el POA sobre la masa del útero

A partir del análisis de nuestros resultados observamos que en el metaestro y el proestro, la inyección de aCSF en el POA resulta en el decremento de la masa del útero. Debido a que esto no ocurrió en los animales tratados con Raclopride, sugerimos que, en estas etapas, el POA presenta una mayor sensibilidad a los cambios en su microambiente y que la adición de aCSF perturbó su homeostasis, lo que afectó la masa del útero. La ubicación del POA a lo largo del tercer ventrículo hace de esta área un lugar importante para la detección de cambios en el medio extracelular. Se ha observado que más del 60% de las neuronas de esta área poseen la capacidad de censar cambios en la osmolaridad y de responder a éstos, ya que, de lo contrario, pueden producirse cambios en la actividad eléctrica de las neuronas (Tremblay *et al.*, 2011; Noda y Hiyama, 2014).

Por otro lado, la fluctuación de la concentración de las hormonas sexuales durante el ciclo estral, principalmente los estrógenos, genera cambios en el volumen, la actividad y la conectividad en algunas regiones del cerebro como el hipotálamo. Esto se debe, a su vez, a la remodelación sináptica y estructural de las células nerviosas, las cuales influyen en la regulación de diversos procesos (Foy *et al.*, 2000; Inoue, 2021). El papel de los estrógenos en la remodelación de las redes neuronales se ha observado en hembras ovariectomizadas. La falta de hormonas ováricas resulta en la disminución de las sinapsis en neuronas del ARC, por el contrario, la administración de E₂ incrementa de forma significativa la comunicación nerviosa (Parducz *et al.*, 2006). En el POA, se ha identificado que durante el estro hay un mayor porcentaje de neuronas que expresan receptores a estrógenos en comparación con el metaestro y el proestro. De igual manera, en el estro y el proestro se observó una mayor comunicación sináptica en comparación con el metaestro. Adicionalmente, se observó un tamaño mayor del soma de las neuronas durante el proestro, lo que sugiere una mayor actividad de síntesis (Langub *et al.*, 1994). Otro estudio mostro que las neuronas de GnRH también presentan cambios que dependen de la etapa del ciclo. En la etapa de proestro se identificó un mayor número de sinapsis a nivel del soma mientras que, a nivel de las terminales nerviosas se observó una mayor arborización que inervó la capa externa de la ME (Kaur *et al.*, 2002).

Estas evidencias muestran que, en la etapa de proestro, en la que se observa la mayor concentración del E₂, hay una mayor cantidad de comunicación neuronal entre las neuronas GnRHérgicas y las demás del POA. Lo anterior sugiere que esta plasticidad neuronal está relacionada con la regulación de la señal nerviosa que estimula en las neuronas de GnRH la

secreción fásica del decapeptido. De igual forma, la remodelación de las terminales nerviosas está implicada en que la secreción de la GnRH en el sistema portal sea óptima para estimular la síntesis y secreción de las gonadotropinas. Por otro lado, en la etapa de metaestro parece haber una disminución de la complejidad en las redes neuronales, lo que sugiere una menor actividad nerviosa. Junto con la capacidad de osmorregulación del POA, esto sugiere que nuestros resultados se deben a que la administración de aCSF en proestro inhibió o alteró la actividad de las neuronas de GnRH. Por otro lado, en metaestro, donde se presume una baja actividad neuronal, el cambio de la osmolaridad disminuyó aún más dicha actividad. En consecuencia, en ambas etapas hubo una modificación en los eventos endocrinos posteriores que, si bien no afectó la tasa de animales que ovularon, resultó en la alteración de la secreción de las hormonas ováricas que modulan la mitosis en el útero.

La idea anterior concuerda con otros experimentos en los que el uso de soluciones vehículo como el agua y el etanol, inducen alteraciones en diversos procesos como la reproducción. Por ejemplo, la inyección de agua o etanol en el POA a las 09:00 horas del metaestro modifica la tasa de animales que ovulan, la concentración de gonadotropinas o de las hormonas ováricas. En los animales a los que se les inyectó agua, el porcentaje de animales que ovularon no se vio afectado, sin embargo, la concentración de la FSH y del E₂ disminuyeron, mientras que la de la LH y la progesterona aumentaron de forma significativa. Por otro lado, la inyección de alcohol resulta en el bloqueo de la ovulación, el incremento de la P₄ y el decremento de la concentración de la FSH, la LH y el E₂ (Cruz *et al.*, 2014). Si bien el aCSF se asemeja más al medio extracelular de las neuronas que las soluciones antes mencionadas, parece inducir alteraciones en la actividad neuronal del POA. Con base en lo anterior, proponemos que la inyección de aCSF en el proestro y metaestro disminuyó la concentración de las gonadotropinas. En consecuencia, la concentración del E₂ disminuyó inhibiendo su efecto proliferativo en el epitelio uterino y la de la P₄ aumentó junto con su efecto proapoptótico (Wood *et al.*, 2007), dando lugar al decremento de la masa del útero.

El efecto de la inyección de aCSF o Raclopride fuera del POA

Además del análisis de la inyección de aCSF o Raclopride en el POA, se analizó el efecto de ambas soluciones en el tercer ventrículo, el OCH, el SCN y el área retroquiasmática, esto sin considerar la etapa del ciclo. En el grupo del tercer ventrículo la inyección de aCSF resultó en una disminución del porcentaje de animales cíclicos y un decremento del 50% en la tasa de animales que ovularon, los cuales liberaron una cuota normal de ovocitos. Previamente mostramos que la inyección de aCSF en proestro y diestro modificó la masa del útero y sugerimos que esto se debió a cambios en la osmolaridad del medio extracelular de las neuronas de GnRH, lo que desencadenó alteraciones en su actividad. En este caso sugerimos algo similar, ya que el tercer ventrículo pertenece al sistema ventricular en donde se sintetiza

líquido cefalorraquídeo y a partir del cual se transportan nutrientes, iones y otras moléculas a todo el cerebro y a la médula espinal. La parte ventral del tercer ventrículo está rodeada por el hipotálamo; el cual contiene a diferentes núcleos y áreas, como el ARC, el POA o el SCN, que son imprescindibles en la regulación de la ovulación (Purves *et al.*, 2001; Eichele *et al.*, 2019).

Con base en lo anterior y con el estudio de Cruz y colaboradores (2014), proponemos que el aCSF modificó la composición del microambiente en estructuras aledañas al tercer ventrículo lo que resultó en la alteración del eje neuroendocrino. A pesar de que no se realizó un análisis por etapa, los datos muestran que la mayoría de los animales que no ovularon fueron inyectados en el metaestro en donde las condiciones hormonales hacen que las redes neuronales sean más sensibles y susceptibles a cualquier perturbación en su homeostasis (Langub *et al.*, 1994; Kaur *et al.*, 2002). Esta línea de pensamiento la proponemos también para los resultados obtenidos de aquellos animales que se inyectaron con aCSF en el SCN y el área retroquiasmática, en los que se observó una tendencia a la baja en el porcentaje de animales cíclicos y en la tasa de animales que ovularon.

El tratamiento con Raclopride no tuvo efecto sobre las variables evaluadas, lo que puede explicarse de tres maneras. La primera es que el fármaco haya sido diluido por el líquido cefalorraquídeo del tercer ventrículo hasta el punto de inhibir su acción fisiológica. La segunda es que en este horario la dopamina, al unirse con los RDA-2, inhibe la ovulación en las estructuras a las que el fármaco pudo difundir y, por lo tanto, el bloqueo de los RDA-2 no modificó este proceso. La última es que en las estructuras a las que el fármaco difundió no se necesita de un estímulo dopaminérgico para la regulación de la ovulación, en caso de que participen en ella. La última idea concuerda con lo que se observó en ratas a las que se les cuantificó la concentración de LH en el plasma sanguíneo después de la implantación de cristales de dopamina en el POA, la estría terminal, el septum medial o la amígdala. Los resultados mostraron que sólo la implantación en el POA incrementó de forma significativa la concentración sérica de la LH, lo que sugiere que, de estas estructuras, la dopamina sólo actúa en el POA para regular la ovulación (Kawakami *et al.*, 1979).

En el caso del OCH, la inyección de aCSF o Raclopride resultaron en la disminución del porcentaje de animales cíclicos y en el bloqueo de la ovulación. Cabe mencionar que el análisis histológico de los cerebros de estos animales mostró que la dispersión de ambas sustancias dañó el tejido y, en algunos casos, hubo destrucción total de esta estructura. Debido a lo anterior, nosotros sugerimos que los resultados obtenidos no se deben a la perturbación de la homeostasis tras la adición del aCSF ni al bloqueo de los RDA-2 del OCH, sino a la disrupción de las fibras nerviosas de la vía visual. Se ha observado que las lesiones de esta estructura resultan en la pérdida de la agudeza o del campo visual (Hannibal, 2002; Midi, 2014), lo que podría resultar en la activación de respuestas al estrés en nuestros animales, lo que estimularía la síntesis de corticosteroides o interleucinas que inhibirían la secreción de la GnRH y la ovulación (Kalantaridou *et al.*, 2004a; 2004b).

Por otro lado, el OCH se comunica con el SCN a través del tracto retino hipotalámico. El SCN es el oscilador biológico central de los mamíferos, regula los ritmos biológicos y tiene un papel fundamental en la regulación de la ovulación (Silva y Domínguez, 2019). El equipo de Kaasjager (1971) mostró que la desaferentación del OCH en la etapa de proestro o diestro resulta en el bloqueo de la ovulación y la pérdida de la ciclicidad estral. La alteración en la ciclicidad estral también se observó en nuestros tratamientos, las hembras mostraron de forma persistente células características de diestro o estro. Estos resultados sugieren que la pérdida de información que el OCH envía al hipotálamo inhibe la regulación del SCN sobre la ovulación. De acuerdo con esta idea, proponemos que el daño al OCH observado en nuestro estudio afectó las vías eferentes hacia el SCN y, por lo tanto, nuestros animales no ovularon.

Previamente discutimos el efecto de la administración de aCSF en el SCN sobre el porcentaje de animales cíclicos y que ovularon, el cual corresponde al 88% en ambos casos. Por otro lado, la inyección de Raclopride no modificó ninguna de las variables. Estos resultados indicarían que la dopamina no regula la ovulación al actuar en esta estructura o bien, que en este núcleo no hay receptores dopaminérgicos. Esta última idea puede descartarse considerando que se han identificado aferencias dopaminérgicas que provienen del área tegmental ventral y que se ha observado que dentro del núcleo se expresan los RDA-1 en mayor proporción que los RDA-2 (Grippe *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha mostrado que la dopamina inhibe la actividad eléctrica de las neuronas del SCN y su periferia, lo que es mediado por los RDA-2 (Luo *et al.*, 2017). Considerando que nuestros animales ovularon, sugerimos que el bloqueo de los RDA-2 resultó en la remoción de un estímulo inhibitorio ejercido por la dopamina, por lo que los animales ovularon normalmente. También es posible que la dopamina actúe a través de los RDA-1 en esta estructura para regular la ovulación. En consecuencia, proponemos que para determinar si la dopamina participa en la regulación de la ovulación dentro del SCN, se debe realizar el bloqueo de ambas familias de receptores o de los RDA-1 en cada una de las etapas del ciclo estral.

Finalmente, la inyección de aCSF en el área retroquiasmática resultó en un porcentaje de ciclicidad y de animales que ovularon del 75%, los animales que ovularon liberaron una cuota normal de ovocitos. Esta disminución en la ciclicidad y en la ovulación fue explicada previamente en función de un posible cambio en la osmolaridad inducido por el aCSF, junto con las diferencias en la sensibilidad de los animales a los tratamientos. La inyección con Raclopride tampoco tuvo efecto sobre las variables analizadas. La discusión de estos resultados es compleja debido a la falta de evidencias que muestren la relación entre el sistema dopaminérgico y la regulación de la ovulación en el área retroquiasmática de los roedores. En éstos se ha identificado la expresión de receptor dopaminérgico 4 en el área retroquiasmática, lo que sugiere la participación de la dopamina en la regulación de algún proceso (Defagot *et al.*, 1997). Suponiendo que esta área regule la ovulación, o que contenga axones que envían información relevante hacia regiones posteriores del hipotálamo, como el

ARC, entonces sugerimos que nuestro tratamiento suprimió la acción inhibitoria de la dopamina en esta área, lo que estimuló la ovulación.

En contraste, en el área retroquiasmática de ovejas se han identificado una gran cantidad de neuronas inmunorreactivas a la TH, así como la expresión de ambas familias de receptores dopaminérgicos (Tillet *et al.*, 2000). En estos animales se ha mostrado que, en esta estructura, la dopamina regula la secreción de las gonadotropinas. En ovejas ovariectomizadas con reemplazo de E₂, la lesión del área retroquiasmática resulta en una disminución de la amplitud y la frecuencia de los pulsos de secreción de la LH, así como de su concentración. La administración de un agonista de la dopamina resulta en un decremento de la concentración de la hormona, así como la frecuencia de secreción, pero no la amplitud (Havern *et al.*, 1994). Estos resultados sugieren que la dopamina actúa en el área retroquiasmática y regula de forma inhibitoria la secreción de la GnRH y la LH. La idea anterior es coherente con nuestros resultados, pues al bloquear los RDA-2 no se inhibió la secreción de las gonadotropinas y por lo tanto los animales ovularon. Cabe mencionar que esta sugerencia debe comprobarse en nuestro modelo, ya que las ovejas, al ser animales poliéstricos estacionales, tienen una fisiología reproductiva diferente al de nuestras ratas. Adicionalmente, la anatomía del sistema GnRHérgico es distinta.

En conjunto, los resultados de las microinyecciones de aCSF en estas estructuras muestran la sensibilidad del hipotálamo a los cambios en su homeostasis y que esta sensibilidad es diferente en cada organismo. Por otro lado, la falta de evidencia anatómica y funcional que muestre que la dopamina regula la ovulación al actuar en el OCH, el SCN y el área retroquiasmática, junto con nuestros resultados, nos permite utilizar a estos animales como un grupo de control extra que recalca el papel de la dopamina en el POA sobre la regulación de la ovulación.

CONCLUSIONES

A partir del bloqueo de los RDA-2 a las 09:00 h de cada una de las etapas del ciclo estral proponemos que:

1. La dopamina no regula la ovulación al actuar solo sobre los RDA-2 del POA a las 09:00 horas del estro, metaestro y diestro.
2. A las 09:00 horas del proestro, la dopamina regula de forma inhibitoria el número de ovocitos que son liberados, aparentemente a través de cualquiera de las familias de receptores dopaminérgicos, por lo que su función parece ser redundante.
3. A las 09:00 del metaestro, el bloqueo de los RDA-2 resulta en el incremento de la masa ovárica, probablemente porque la dopamina regula de forma inhibitoria la secreción de la FSH.
4. A las 09:00 del diestro, el bloqueo de los RDA-2 resulta en el incremento de la masa del útero, por lo que probablemente la dopamina regula de manera estimulante la secreción de las gonadotropinas.

En conjunto, sugerimos que la regulación dopaminérgica en el POA depende de la etapa del ciclo estral.

PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados y conclusiones obtenidos del presente estudio, nosotros nos planteamos las siguientes preguntas:

- ¿El bloqueo de los RDA-2 en las etapas de metaestro, diestro y proestro modifica la secreción de las gonadotropinas? Para lo cual proponemos analizar la concentración sérica de la LH y la FSH de los animales tratados en dichas etapas.
- ¿El bloqueo de los RDA-2 en metaestro y proestro resulta en un incremento del número de folículos preovulatorios atrésicos o dominantes, respectivamente? Para resolver esta pregunta debemos analizar la población folicular de los grupos tratados en las etapas antes mencionadas.
- ¿La participación de la dopamina del POA en la regulación de la ovulación se modifica en función de la hora como lo sugieren los experimentos sistémicos? Para esta incógnita proponemos replicar el experimento en un horario diferente a las 09:00 horas, preferentemente en un horario cercano al periodo crítico.
- ¿Los resultados obtenidos del bloqueo unilateral de ambos receptores o de los RDA-1 en el POA son efectos del fármaco o son resultado de la compensación en la función mediada por la otra familia de receptores, o bien, por asimetrías funcionales? Para ello proponemos analizar el bloqueo bilateral de ambas familias de receptores o de los RDA-1 en cada una de las etapas del ciclo estral.

REFERENCIAS

- Abel MH**, Widen A, Wang X, Huhtaniemi I, Pakarinen P, Kumar TR, Christian HC. 2014. Pituitary gonadotrophic hormone synthesis, secretion, subunit gene expression and cell structure in normal and follicle-stimulating hormone β knockout, follicle-stimulating hormone receptor knockout, luteinising hormone receptor knockout, hypogonadal and ovariectomised female mice. *Journal of Neuroendocrinology* 26(11): 785-795.
- Adashi EY**. 1994. Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction* 9(5): 815-827.
- Alak BM**, Coskun S, Friedman CI, Kennard EA, Kim MH, Seifer DB. 1998. Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Fertility and Sterility* 70(6): 1126-1130.
- Al-Asmakh M**. 2007. Reproductive functions of progesterone. *Middle East Fertility Society Journal* 12(3): 147-152.
- Albanese A**, Altavista MC, Rossi P. 1986. Organization of central nervous system dopaminergic pathways. *Journal of Neural Transmission: Supplement* 2(1)2: 3-17.
- Amar AP**, Weiss MH. 2003. Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurgery clinics of North America* 14(1): 11-23.
- Andersen AN**, Hagen C, Lange P, Boesgaard S, Djursing H, Eldrup E, Micic S. 1987. Dopaminergic regulation of gonadotropin levels and pulsatility in normal women. *Fertility and Sterility* 47(3): 391-397.
- Andersen CY**, Ezcurra D. 2014. Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12:128. doi: 10.1186/1477-7827-12-128.
- Arita J**, Porter JC. 1984. Relationship between dopamine release into hypophysial portal blood and prolactin release after morphine treatment in rats. *Neuroendocrinology* 38(1): 62-67.
- Armstrong DT**, Opavsky MA. 1988. Superovulation of immature rats by continuous infusion of follicle-stimulating hormone. *Biology of reproduction* 39(3): 511-518.
- Asselin E**, Xiao CW, Wang YF, Tsang BK. 2000. Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis. *Biological Signals and Receptors* 9(2): 87-95.
- Auersperg N**, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. 2001. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews* 22(2): 255-288.
- Bahena-Trujillo R**, Flores G, Arias-Montaña J. 2000. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica* 11(1): 39-61.
- Bakker J**, Baum MJ. 2000. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Frontiers in Neuroendocrinology* 21(1): 220-262.
- Barraclough CA**, Sawyer CH. 1957. Blockade of the release of pituitary ovulating hormone in the rat by chlorpromazine and reserpine: possible mechanisms of action. *Endocrinology* 61(4): 341-351.
- Barraclough CA**, Wise PM. 1982. The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocrine Reviews* 3(1):91-119.

- Beaulieu JM, Gainetdinov RR.** 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews* 63(1):182-217.
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E.** 1978. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophyseal gonadotropin-releasing hormone. *Science*. Nov 10;202(4368):631-3.
- Bengtsson BO.** 2003. Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. *Journal of Evolutionary Biology* 16(2): 189-99.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R.** 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews* 22(6): 724-763.
- Berga SL, Naftolin F.** 2012. Neuroendocrine control of ovulation. *Gynecological Endocrinology* 28(1): 9-13.
- Berk ML, Finkelstein JA.** 1981. Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. *Neuroscience* 6(8): 1601-1624.
- Best JA, Nijhout HF, Reed MC.** 2009. Homeostatic mechanisms in dopamine synthesis and release: a mathematical model. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 6: 21. doi: 10.1186/1742-4682-6-21.
- Bissonette GB, Roesch MR.** 2016. Development and function of the midbrain dopamine system: what we know and what we need to. *Genes Brain and Behavior* 15(1): 62-73.
- Björklund A, Dunnett SB.** 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neuroscience* 30(5):194-202.
- Blaustein A.** 1977. Anatomy and histology of the human ovary. p.365-379. En *Pathology of the Female Genital Tract*. Springer. New York.
- Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS.** 2010. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31(3):322-340.
- Bogus-Nowakowska K, Równiak M, Hermanowicz-Sobieraj B, Wasilewska B, Najdzion J, Robak A.** 2016. Tyrosine hydroxylase-immunoreactivity and its relations with gonadotropin-releasing hormone and neuropeptide Y in the preoptic area of the guinea pig. *Journal of chemical neuroanatomy* 78: 131–139.
- Boyd KN, Mailman RB.**2012. Dopamine receptor signaling and current and future antipsychotic drugs. *Handbook of Experimental Pharmacology* (212):53-86.
- Brauer MM, Smith PG.** 2015. Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 187: 1-17.
- Britt KL, Findlay JK.** 2002. Estrogen action in the ovary revisited. *The Journal of Endocrinology* 175(2): 269-276.
- Brown RS, Herbison AE, Grattan DR.** 2015. Effects of prolactin and lactation on A15 dopamine neurones in the rostral preoptic area of female mice. *Journal of Neuroendocrinology* 27(9): 708-717.
- Bryant AS, Greenwood AK, Juntti SA, Byrne AE, Fernald RD.** 2016. Dopaminergic inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons in the cichlid fish *Astatotilapia burtoni*. *The Journal of experimental biology* 219(Pt 24): 3861–3865.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. 2012. Mouse estrous cycle identification tool and images. PLoS ONE 7(4): e35538. doi:10.1371/journal.pone.0035538.

Caraty A, Evans NP, Fabre-Nys CJ, Karsch FJ. 1995. The preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge: a neuroendocrine signal for ovulation. Journal of Reproduction and Fertility 49: 245-255.

Caraty A, Martin GB, Montgomery G. 1984. A new method for studying pituitary responsiveness in vivo using pulses of LH-RH analogue in ewes passively immunized against native LH-RH. Reproduction, Nutrition, Development 24(4):439-448.

Caraty A, Franceschini I. 2008. Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: potential applications for better control of fertility in females. Reproduction in domestic animals 43(2):172-178.

Cariboni A, Maggi R, Parnavelas JG. 2007. From nose to fertility: the long migratory journey of gonadotropin-releasing hormone neurons. Trends in Neuroscience 30(12): 638-644.

Carroll RS, Corrigan AZ, Gharib SD, Vale W, Chin WW. 1989. Inhibin, activin, and follistatin: regulation of follicle-stimulating hormone messenger ribonucleic acid levels.. Molecular Endocrinology 3(12):1969-76.

Carroll RS, Kowash PM, Lofgren JA, Schwall RH, Chin WW. 1991. In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. Endocrinology 129(6):3299-3304.

Castañeyra-Perdomo A, Pérez-Delgado MM, Montagnese C, Coen CW. 1992. Brainstem projections to the medial preoptic region containing the luteinizing hormone-releasing hormone perikarya in the rat. An immunohistochemical and retrograde transport study. Neuroscience Letters 139(1): 135-139.

Castañeyra-Ruiz L, González-Marrero I, Castañeyra-Ruiz A, González-Toledo JM, Castañeyra-Ruiz M, de Paz-Carmona H, Castañeyra-Perdomo A, Carmona-Calero EM. 2013. Luteinizing hormone-releasing hormone distribution in the anterior hypothalamus of the female rats. ISRN Anatomy doi: 10.5402/2013/870721. eCollection 2013.

Chaffin CL, Stouffer RL. 2002. Local role of progesterone in the ovary during the periovulatory interval. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders 3: 65-72.

Chedrese J. 2003. Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: efecto de los esteroides. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 16(2): 171-182.

Chen R, Wei J, Fowler SC, Wu JY. 2003. Demonstration of functional coupling between dopamine synthesis and its packaging into synaptic vesicles. Journal of Biomedical Science 10(6 Pt 2):774-781.

Chiba T, Murata Y. 1985. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. Brain Research Bulletin 14(3): 261-272.

Childs GV. 1997. Cytochemical studies of multifunctional gonadotropes. Microscopy Research and Techniques 39(2):114-30.

Chinta SJ, Andersen JK. 2005. Dopaminergic neurons. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 37(5): 942-946.

Chiodo LA. 1988. Dopamine-containing neurons in the mammalian central nervous system: electrophysiology and pharmacology. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 12(1):49-91.

- Choh HL.** 1972. Hormones of the adenohipophysis. *Proceedings of the American Philosophical Society* 116(5): 365-382.
- Christensen LW, Nance DM, Gorski RA.** 1977. Effects of hypothalamic and preoptic lesions on reproductive behavior in male rats. *Brain Research Bulletin* 2(2): 137-141.
- Christy NP.** 1963. The adenohipophysis. *American Journal of Medicine* 43(1): 365-378.
- Ciccone NA, Kaiser UB.** 2009. The biology of gonadotroph regulation. *Current opinion in endocrinology, diabetes and obesity* 16(4): 321-327.
- Ciechanowska M, Lapot M, Mateusiak K.** 2010. Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. *Reproductive Biology* 10(2): 84-110.
- Clarke IJ, Pompolo S.** 2005. Synthesis and secretion of GnRH. *Animal Reproduction Science* 88(1-2): 29-55.
- Clemens JA, Shaar CJ, Kleber JW, Tandy WA.** 1971. Reciprocal control by the preoptic area of LH and prolactin. *Experimental Brain Research* 12(3): 250-253.
- Colledge WH.** 2009. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 20(3):115-121.
- Cooper RL, Brandt SJ, Linnoila M, Walker RF.** 1979. Induced ovulation in aged female rats by L-dopa implants into the medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 28(4): 234-240.
- Cornil CA, Ball GF.** 2008. Interplay among catecholamine systems: dopamine binds to alpha2-adrenergic receptors in birds and mammals. *The Journal of comparative neurology* 511(5): 610-627.
- Cornil CA, Balthazart J, Motte P, Massotte L, Seutin V.** 2002. Dopamine activates noradrenergic receptors in the preoptic area. *The Journal of neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22(21): 9320-9330.
- Cortés GD.** 2019. Efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos de tipo 1, en el Área Preóptica del hipotálamo, sobre la regulación de la ovulación. (Tesis de Maestría) Universidad Autónoma Metropolitana. UAM-I, México.
- Cottrell EC, Campbell RE, Han SK, Herbison AE.** 2006. Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147(8): 3652-3661.
- Cramer OM, Barraclough C.** 1971. Effect of electrical stimulation of the preoptic area on plasma LH concentrations in proestrous rats. *Endocrinology* 88(5): 1175-1183.
- Craven RP, McDonald PG.** 1971. The effect of intrahypothalamic infusions of dopamine noradrenaline on ovulation in the adult rat. *Life Sciences Part I: Physiology and Pharmacology* 10(24): 1409-1415.
- Craven RP, McDonald PG.** 1973. The effect of intrahypothalamic infusions of dopamine and noradrenaline on ovulation in reserpine-treated female rats. *The Journal of Endocrinology* 58(2): 319-326.
- Crowley WR, O'Donohue TL, Jacobowitz DM.** 1978. Changes in catecholamine content in discrete brain nuclei during the estrous cycle of the rat. *Brain Research* 147(2): 315-326.

- Cruz ME, Olvera E, Pérez MJ, Min EI, Flores A, Cárdenas M, Chavira R, Domínguez R.** 2014. Effects of unilaterally microinjecting ethanol in the preoptic-anterior hypothalamic areas of rats on ovulation. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 38(6): 1611-1621.
- Cruz ME, Villegas G, Domínguez-González A, Chavira R, Domínguez R.** 2001. Ovulation delay induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior-hypothalamic area of the rat. *Brain Research Bulletin* 54(4): 339-344.
- Currie GM.** 2018. Pharmacology, part 1: Introduction to pharmacology and pharmacodynamics. *Journal of Nuclear Medicine Technology* 46(2): 81-86.
- D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Dees WL, Ojeda SR.** 2002. Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microscopy research and technique* 59(6): 484-489.
- D'Albora H, Barcia JJ.** 1996. Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neuroscience Letters* 205(1): 65-67.
- D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR.** 2000. Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell and Tissue Research* 300(1): 47-56.
- Daniel PM.** 1976. Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. *Journal of Clinical Pathology. Supplement (30)7:* 1-7.
- Das N, Kumar TR.** 2018. Molecular regulation of follicle-stimulating hormone synthesis, secretion, and action. *Journal of Molecular Endocrinology* 60(3): R131–R155.
- De Felici M.** 2010. Germ stem cells in the mammalian adult ovary: considerations by a fan of the primordial germ cells. *Molecular Human Reproduction* 16(9): 632-636.
- De Kretser DM, Hedger MP, Loveland KL, Phillips DJ.** 2002. Inhibins, activins and follistatins in reproduction. *Human Reproduction Update* 8(6): 529-541.
- De la Iglesia HO, Schwartz WJ.** 2006. Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 147(3): 1148-1153.
- De Leo V, Petraglia F, Bruno MG, Lanzetta D, Inaudi P, D'Antona N.** 1989. Different dopaminergic control of plasma luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin in ovulatory and postmenopausal women: effect of ovariectomy. *Gynecologic and obstetric investigation* 27(2): 94–98.
- De Moraes DC, Vaisman M, Conceição FL, Ortiga-Carvalho TM.** 2012. Pituitary development: a complex, temporal regulated process dependent on specific transcriptional factors. *The Journal of Endocrinology* 215(2): 239-245.
- Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC.** 1997. Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Brain Research. Molecular Brain Research* 45(1): 1–12.
- Desai NL.** 2013. Gametogenesis. p. 43-62. En Falcone T, Hurd WW (eds.) *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*. Springer. New York.
- Desaulniers AT, Cederberg RA, Lents CA, White BR.** 2017. Expression and Role of Gonadotropin-Releasing Hormone 2 and Its Receptor in Mammals. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 8:269. doi: 10.3389/fendo.2017.00269.

Devorshak-Harvey E, Peluso JJ, Bona-Gallo A, Gallo RV. 1985. Effect of alterations in pulsatile luteinizing hormone release on ovarian follicular atresia and steroid secretion on diestrus 1 in the rat estrous cycle. *Biology of Reproduction* 33(1): 103–111.

Díaz-Hernández V, Merchant-Larios H. 2017. Consideraciones generales en el establecimiento del sexo en mamíferos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 20(1): 27-39.

Dobson H, Routly JE, Smith RF. 2020. Understanding the trade-off between the environment and fertility in cows and ewes. *Animal Reproduction* 17(3): e20200017. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0017>

Domínguez R, Cruz-Morales SE. 2011. The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinology and Metabolic Syndromes S4*: doi:10.4172/2161-1017.S4-001.

Domínguez R, Gaitán CM, Méndez SA, Aguirre AU. 1987. Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *Journal of Endocrinology* 113 (1): 37-44.

Domínguez R. 1997. Endocrinología de las gónadas. p. 271-280. En *Curso Internacional Precongreso, Actualización en fisiología*. SMCF y PUIS-UNAM, México.

Dorton AM, 2000. The pituitary gland: embryology, physiology, and pathophysiology. *Neonatal Network: NN* 19(2): 9-17.

Dubois EA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJ. 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Research Bulletin* 57(3-4): 413-418.

Dubois PM, ElAmraoui A. 1995. Embriology of the pituitary gland. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 6(1): 1-7.

Dudas B, Merchenthaler I. 2006. Three-dimensional representation of the neurotransmitter systems of the human hypothalamus: inputs of the gonadotrophin hormone-releasing hormone neuronal system. *The Journal of Neuroendocrinology* 18(2):79-95.

Duffy DM, Ko C, Jo M, Brannstrom M, Curry TE. 2019. Ovulation; parallels with inflammatory processes. *Endocrine Reviews* 40(2): 369-416.

Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews* 30(6): 624-712.

Eichele G, Bodenschatz E, Ditte Z, Günther AK, Kapoor S, Wang Y, Westendorf C. 2019. Cilia-driven flows in the brain third ventricle. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 375(1792): 20190154. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0154>

Erickson GF, Chang RJ. 2007. Basic biology: ovarian anatomy and physiology. P. 49-66. En Lobo RA (ed.) *Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinic Aspects*. Elsevier Academic Press. USA.

Everett JW, Sawyer CH. 1950. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 47(3): 198-218.

Filicori M, Crowley WF. 1984. The study of GnRH control of reproductive function. *Upsala Journal of Medical Sciences* 89(1):13-18.

Findlay JK. 1994. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. *Reproduction, Fertility and Development* 6(2): 127-139.

Finn CA. 2001. Reproduction in vertebrates: overview. Encyclopedia of Life Sciences. doi:10.1038/npg.els.0001851.

Fisher CR, Graves KH, Parlow AF, Simpson ER. 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. Proceedings of The National Academy of Sciences 95(12): 6965-6970.

Flores-Pérez FI, Rosas-Velasco C, Romano MC, Pérez-Martínez M. 2005. Apoptosis y atresia folicular: Un binomio esencial en el desarrollo ovárico. Veterinaria México 36(1): 87-103.

Fortune JE. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. Biology of Reproduction 50(2): 225-232.

Foy MR, Henderson VW, Berger TW, Thompson RF. 2000. Estrogen and neural plasticity. Current Directions in Psychological Science 9: 148–152.

Franks S, Hardy K. 2018. Androgen action in the ovary. Frontiers in Endocrinology 9: 452. doi: 10.3389/fendo.2018.00452.

Funabashi T, Mitsushima D, Nakamura TJ, Uemura T, Hirahara F, Shinohara K, Suyama K, Kimura F. 2002. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. Progress in Brain Research 141:165-173.

Garg D, Berga SL. 2020. Neuroendocrine mechanisms of reproduction. p. 3-23. En Steegers EA, Cipolla MJ, Miller EC (eds.) Handbook of Clinical Neurology. Elsevier. USA.

Gay VL, Sheth NA. 1972. Evidence for a periodic release of LH in castrated male and female rats. Endocrinology 90(1):158-162.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW. 1990. Molecular biology of the pituitary gonadotropins. Endocrine reviews 11(1): 177–199.

Gibson MJ. 1986. Role of the preoptic area in the neuroendocrine regulation of reproduction: an analysis of functional preoptic homografts. Annals of The New York Academy of Sciences 474:53-63.

Goldsmith PC, Thind KK, Song T, Kim EJ, Boggant JE. 1990. Location of the neuroendocrine dopamine neurons in the monkey hypothalamus by retrograde tracing and immunostaining. Journal of neuroendocrinology 2(2): 169–179.

Goodman HM. 2009. Pituitary. p. 29-41. En Basic Medical Endocrinology. Elsevier Academic Press. USA.

Gore AC, Roberts JL, Gibson MJ. 1999. Mechanisms for the regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the developing mouse. Endocrinology 140(5): 2280–2287.

Gore AC. 2002. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons: gene expression and neuroanatomical studies. Progress in Brain Research 141:193-208.

Gougeon A. 2004. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic and functional aspects. p. 25-42. En Leung PK, Addashi EY (eds.) The Ovary. Elsevier Academic Press. San Diego.

Graham JD, Clarke CL. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. Endocrine Reviews 18(4): 502-519.

Graham MD, Pfaus JG. 2010. Differential regulation of female sexual behaviour by dopamine agonists in the medial preoptic area. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 97(2): 284-292.

- Graham MD**, Pfaus JG. 2012. Differential effects of dopamine antagonists infused to the medial preoptic area on the sexual behavior of female rats primed with estrogen and progesterone. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 102(4): 532-539.
- Gregory SJ**, Kaiser UB. 2004. Regulation of gonadotropins by inhibin and activin. *Seminars in Reproductive Medicine* 22(3): 253-267.
- Grippe RM**, Purohit AM, Zhang Q, Zweifel LS, Güler AD. 2017. Direct Midbrain Dopamine Input to the Suprachiasmatic Nucleus Accelerates Circadian Entrainment. *Current Biology: CB* 27(16): 2465–2475.
- Grive KJ**, Freiman RN. 2015. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development* 142(15): 2554-2563.
- Guadarrama-Bazante IL**, Canseco-Alba A, Rodríguez-Manzo G. 2014. Dopamine receptors play distinct roles in sexual behavior expression of rats with a different sexual motivational tone. *Behavioural Pharmacology* 25(7): 684-694.
- Gupta MK**, Chia SY. 2013. Ovarian hormones: structure, biosynthesis, function, mechanism of action, and laboratory diagnosis. p. 1-30. En Falcone T, Hurd WW (eds.) *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*. Springer. New York.
- Hahn JD**, Sporns O, Watts AG, Swanson LW. 2019. Macroscale intrinsic network architecture of the hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 116(16): 8018-8027.
- Halász B**, Gorski RA. 1967. Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus. *Endocrinology* 80(4): 608-622.
- Halász B**, Kiss J, Molnár J. 1989. Regulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: morphological aspects. *Journal of Steroid Biochemistry* 33(4B):663-668.
- Halász B**, Köves K, Molnár J. 1988. Neural control of ovulation. *Human Reproduction* 3(1): 33-38.
- Halász B**. 2004. Pituitary gland anatomy and embryology. p. 636-643. En Martini L (ed.) *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Elsevier Academic Press. USA.
- Halvorson LM**, DeCherney AH. 1996. Inhibin, activin, and follistatin in the reproductive medicine. *Fertility and Sterility* 65(3): 459-470.
- Hamid HY**, Zakaria Z. 2013. Reproductive characteristics of the female laboratory rat. *African Journal of Biotechnology* 12(19): 2510-2514.
- Hammond JM**. 1981. Peptide regulators in the ovarian follicle. *Australian Journal of Biological Sciences* 34(5-6): 491-504.
- Hannibal J**. 2002. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell and Tissue Research* 309(1): 73–88.
- Harrison RM**. 2001. Reproduction in mammals: general overview. *Encyclopedia of Life Sciences* 1(1):1-5.
- Hashimoto R**, Kimura F. 1986. Inhibition of gonadotropin secretion induced by cholecystokinin implants in the medial preoptic area by the dopamine receptor blocker, pimozide, in the rat. *Neuroendocrinology* 42(1): 32-37.

Hashimoto R, Kimura F. 1987. Roles of catecholamine at the preoptic region in the regulation of cyclic ovulation and gonadotropin. *Acta Endocrinológica* 116(3): 357-363.

Havern RL, Whisnant CS, Goodman RL. 1994. Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrous ewes. *Endocrinology* 134(4): 1905–1914.

Herbison AE. 2015. Physiology of the adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. En Plant TM, Zeleznik AJ (eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Vol. 1*. Academic Press. USA.

Herring PT. 1908. The histological appearances of the mammalian pituitary body. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 1(2): 121-159.

Hirshfield AN. 1988. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biology of Reproduction* 38(5): 1181–1188.

Hobeika E, Armouti M, Kala HS, Stocco C. 2020. Ovarian Hormones, p. 565-583. En Litwack G (ed.) *Hormonal Signaling in Biology and Medicine*. Elsevier Academic Press. USA.

Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. 1993. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 14(3): 173-213.

Hoffman GE, Wray S, Goldstein M. 1982. Relationship of catecholamines and LHRH: light microscopic study. *Brain Research Bulletin* 9(1-6): 417-430.

Hong S. 2013. Dopamine system: manager of neural pathways. *Frontiers in human neuroscience* 7: 854. doi.org/10.3389/fnhum.2013.00854

Horvath TL, Naftolin F, Leranth C. 1993. Luteinizing hormone-releasing hormone and gamma-aminobutyric acid neurons in the medial preoptic area are synaptic targets of dopamine axons originating in anterior periventricular areas. *Journal of Neuroendocrinology* 5(1): 71-79.

Hosotani M, Ichii O, Nakamura T, Namba T, Islam MR, Elewa YH, Watanabe T, Ueda H, Kon Y. 2020. Anatomy and histology of the foramen ovarian bursa opening to the peritoneal cavity and its changes in autoimmune disease-prone mice. *Journal of Anatomy* 238(1): 73-85.

Hossain MI, O'Shea JD. 1983. The vascular anatomy of the ovary and the relative contribution of the ovarian and uterine arteries to the blood supply of the ovary in the guinea-pig. *Journal of Anatomy* 137(3): 457-466.

Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR. 2005. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic and Histochemistry* 80(2): 79-87.

Ignatkov VY, Babichev VN. 1984. Changes in dopamine sensitivity in isolated neurons of the preoptic region during the estrous cycle. *Neuroscience and behavioral physiology* 14(5): 380–384.

Inoue S. 2021. Neural basis for estrous cycle-dependent control of female behaviors. *Neuroscience Research*: doi: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2021.07.001>

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG. 1996. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35(11):1503-1519.

Jasoni CL, Porteous RW, Herbison AE. 2009. Anatomical location of mature GnRH neurons corresponds with their birthdate in the developing mouse. *Developmental Dynamics* 238(3): 524-531.

Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428(6979): 145-150.

- Jones RE, López KH.** 2014. Human Reproductive Biology. Elsevier Academic Press. USA.
- Joyner MJ.** 2013. Physiology and redundancy. *Physiology (Bethesda, Md.)* 28(3): 136–137.
- Kaasjager WA, Woodbury DM, van Dieten JA, van Rees GP.** 1971. The role played by the preoptic region and the hypothalamus in spontaneous ovulation and ovulation induced by progesterone. *Neuroendocrinology* 7(1): 54-64.
- Kahnnamouyi S, Nouri M, Farzadi L, Darabi M, Hosseini V, Mehdizadeh A.** 2018. The role of mitogen-activated protein kinase-extracellular receptor kinase pathway in female fertility outcomes: a focus on pituitary gonadotropins regulation. *Therapeutics Advances in Endocrinology and Metabolism* 9(7):209-215.
- Kaiser UB.** 2017. Gonadotrophin hormones. p. 203-250. EnMelmed S (ed.) *The pituitary*. Academic Press. USA doi:10.1016/b978-0-12-804169-7.00007-6
- Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos G.** 2004a. Stress and the female reproductive system. *Journal of Reproductive Immunology* 62(1-2): 61–68.
- Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP.** 2004b. Reproductive functions of corticotropin-releasing hormone. Research and potential clinical utility of antalarmins (CRH receptor type 1 antagonists). *American Journal of Reproductive Immunology* 51(4): 269–274.
- Kalra SP, McCann SM.** 1973. Effect of drugs modifying catecholamine synthesis on LH release induced by preoptic stimulation in the rat. *Endocrinology* 93(2); 356–362.
- Kalra SP, McCann SM.** 1974. Effects of drugs modifying catecholamine synthesis on plasma LH and ovulation in the rat. *Neuroendocrinology* 15(2): 79-91.
- Kamberi IA, Schneider HP, McCann SM.** 1970. Action of dopamine to induce release of FSH-releasing factor (FRF) from hypothalamic tissue in vitro. *Endocrinology* 86(2): 278-284.
- Kanasaki H, Oride A, Mijjidorj T, Sukhbaatar U, Kyo S.** 2017. How is GnRH regulated in GnRH-producing neurons? Studies using GT1-7 cells as a GnRH-producing cell model. *General and Comparative Endocrinology* 247: 138-142.
- Kaur G, Heera PK, Srivastava LK.** 2002. Neuroendocrine plasticity in GnRH release during rat estrous cycle: correlation with molecular markers of synaptic remodeling. *Brain Research* 954(1): 21–31.
- Kawakami M, Arita J, Kimura F, Hayashi R.** 1979. The stimulatory roles of catecholamines and acetylcholine in the regulation of gonadotropin release in ovariectomized estrogen-primed rats. *Endocrinología Japónica* 26(2): 275-284.
- Kawano H, Ohyama K, Kawamura K, Nagatsu I.** 1995. Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain research. Developmental brain research* 86(1-2): 101–113.
- Kebabian JW, Calne DB.** 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277(5692):93-96.
- Kim HH, Mui KL, Nikrodhanond AA, Tamayo NC.** 2007. Regulation of gonadotropin-releasing hormone in nonhypothalamic tissues. *Seminars in Reproductive Medicine* 25(5):326-336.
- King JC, Anthony EL.** 1984. LHRH neurons and their projections in humans and other mammals: species comparisons. *Peptides* 5(1): 195–207.

- Klenke U**, Constantin S, Wray S. 2010. Neuropeptide Y directly inhibits neuronal activity in a subpopulation of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons via Y1 receptors. *Endocrinology* 151(6): 2736–2746.
- Knight PG**, Glister C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 121(4): 503-512.
- Knight PG**. 1996. Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Frontiers in neuroendocrinology* 17(4): 476-509.
- Ko CM**, Gieske MC, Al-Alem L, Hahn YK, Su W, Gong MC, Iglarz M, Koo Y. 2006. Endothelin-2 in ovarian follicle rupture. *Endocrinology* 147(4): 1770-1779..
- Koblinger K**, Füzesi T, Ejdrygiewicz J, Krajacic A, Bains JS, Whelan PJ. 2014. Characterization of A11 neurons projecting to the spinal cord of mice. *PLoS One* 9(10): e109636 doi: 10.1371/journal.pone.0109636.
- Kollar EJ**. 1953. Reproduction in the female rat after pelvic nerve neurectomy. *Anatomical Record* 115(1): 641–658.
- Konishi I**, Okamura H, Fujii S, Parmley T, Mori T. 1986. Development of interstitial cells and ovigerous cords in the human fetal ovary: an ultrastructural study. *Journal of Anatomy* 148: 121-135.
- Kontogeorgos G**, Stefaneanu L, Kovacs K, Horvath E. 2012. Hypophysis. p. 584-593. En Mail JK, Paxinos G (eds.) *The Human Nervous System*. Elsevier Academic Press. USA.
- Kordon C**, Glowinski J. 1969. Selective inhibition of superovulation by blockade of dopamine synthesis during the "critical period" in the immature rat. *Endocrinology* 85(5): 924–931.
- Kordon C**, Glowinski J. 1972. Role of hypothalamic monoaminergic neurones in the gonadotrophin release-regulating mechanisms. *Neuropharmacology* 11(2): 153–162.
- Kornbluth S**, Fissore R. 2015. Vertebrate reproduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(10): doi: 10.1101/cshperspect.a006064.
- Kumar P**, Sait SF. 2011. Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *Journal of human reproductive sciences* 4(1): 2–7.
- Laatikainen LM**, Sharp T, Harrison PJ, Tunbridge EM. 2013. Sexually dimorphic effects of catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibition on dopamine metabolism in multiple brain regions. *PLoS One* 8(4): e61839. doi: 10.1371/journal.pone.0061839.
- Langub MC Jr**, Maley BE, Watson RE Jr. 1994. Estrous cycle-associated axosomatic synaptic plasticity upon estrogen receptive neurons in the rat preoptic area. *Brain Research* 641(2): 303-310.
- Larsen PJ**, Hay-Schmidt A, Mikkelsen JD. 1994. Efferent connections from the lateral hypothalamic region and the lateral preoptic area to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *The Journal of comparative neurology* 342(2): 299–319.
- Lawlor P**, During M. 2004. Gene therapy for Parkinson's disease. *Expert reviews in molecular medicine*. 6(1): 1-18. doi: 10.1017/S146239940400746X.
- Ledonne A**, Mercuri NB. 2017. Current Concepts on the Physiopathological Relevance of Dopaminergic Receptors. *Frontiers in Cell Neuroscience* 11:27. doi: 10.3389/fncel.2017.00027.
- Lee AW**, Brown RE. 2002. Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*). *Behavioral Neuroscience* 116(6): 968-975.

- LeMaire** WJ. 1989. Mechanism of mammalian ovulation. *Steroids* 54(5): 455-469.
- Levine** JE. 2012. An Introduction to Neuroendocrine Systems p. 21-46. In Fink G, Levine JE, Pfaff DW (eds.) *Handbook of Neuroendocrinology*. Academic Press. San Diego.
- Li** C, Chen P, Smith MS. 1999. Neuropeptide Y and tuberoinfundibular dopamine activities are altered during lactation: role of prolactin. *Endocrinology* 140(1): 118-123.
- Li** S, Takumi K, Iijima N, Ozawa H. 2016. The increase in the number of spines on the gonadotropin-releasing hormone neuron across pubertal development in rats. *Cell and Tissue Research* 364(2): 405-414.
- Liang** SL, Pan JT. 2012. An endogenous dopaminergic tone acting on dopamine D3 receptors may be involved in diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity and prolactin secretion in estrogen-primed ovariectomized rats. *Brain Research Bulletin* 87(2-3): 334-339.
- Limonta** P, Marelli MM, Moretti R, Marzagalli M, Fontana F, Maggi R. 2018. GnRH in the Human Female Reproductive Axis. *Vitamins and Hormones* 107:27-66.
- Lin** KC, Kawamura N, Okamura H, Mori T. 1988. Inhibition of ovulation, steroidogenesis and collagenolytic activity in rabbits by sulpiride-induced hyperprolactinaemia. *Journal of reproduction and fertility* 83(2): 611–618.
- Linher** K, Li J. 2011. From stem cell to gamete. p. 407-416. En Moo-Young M (ed.) *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier B.V. Canada.
- Liu** CF, Liu C, Yao HH. 2010. Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. *Currents Topics of Developmental Biology* 90: 263-290.
- Liu** F, Usui I, Evans LG, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, Webster NJ. 2002. Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277(35):32099-32108.
- Liu** X, Herbison AE. 2013. Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology* 154(1): 340–350.
- Logothetopoulos** J, Dorrington J, Bailey D, Stratis M. 1995. Dynamics of follicular growth and atresia of large follicles during the ovarian cycle of the guinea pig: fate of the degenerating follicles, a quantitative study. *The Anatomical Record* 243(1): 37-48.
- Lohmiller** JL, Swing SP. 2006. Reproduction and Breeding. p. 148-159. En Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL (eds.) *The Laboratory Rat*. Elsevier. Amsterdam.
- Luo** S, Zhang Y, Ezrokhi M, Li Y, Tsai TH, Cincotta AH. 2017. Circadian peak dopaminergic activity response at the biological clock pacemaker (suprachiasmatic nucleus) area mediates the metabolic responsiveness to a high-fat diet. *Journal of Neuroendocrinology* 30(1): e12563. <https://doi.org/10.1111/jne.12563>
- Luo** SX, Huang EJ. 2016. Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways: From Neurogenesis to Circuit Assembly. *American Journal of Pathology* 186(3): 478-488.
- Ma** Y, Kelly M, Rönneklei O. 1990. Pro-gonadotropin-releasing hormone (ProGnRH) and GnRH content in the preoptic area and the basal hypothalamus of anterior medial preoptic nucleus/suprachiasmatic nucleus-lesioned persistent estrous rats. *Endocrinology* 127(1): 2654-2664.

- Maeda K**, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, Tsukamura H, Okamura H. 2010. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Research* 1364:103-115.
- Mahesh VB**. 1985. The dynamic interaction between steroids and gonadotropins in the mammalian ovulatory cycle. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 9(2): 245-260.
- Malik KF**, Silverman AJ, Morrell JI. 1991. Gonadotropin-releasing hormone mRNA in the rat: distribution and neuronal content over the estrous cycle and after castration of males. *The Anatomical Record* 231(4):457-466.
- Marcondes FK**, Bianchi FJ, Tanno AP. 2002. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* 62(4A): 609-614.
- Marcus GJ**. 1974. Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biology of Reproduction* 10(4): 447-452.
- Martin GG**, Sack M, Talbot P. 1981. The structure of bursae ovaricae surrounding the ovaries of the golden hamster. *The Anatomical Record* 201(3): 485-498.
- Martínez de la Escalera G**, Choi AL, Weiner RI. 1992. Generation and synchronization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses: intrinsic properties of the GT1-1 GnRH neuronal cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(5): 1852-1855.
- Matzuk MM**, Finegold MJ, Su JJ, Hsueh AJ, Bradley A. 1992. Inhibin is a tumor-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature* 360: 314-319.
- McLean AC**, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. 2012. Performing vaginal lavage, crystal violet staining and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments* (67): e4389. doi:10.3791/4389.
- Meiser J**, Weindl D, Hiller K. 2013. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signal* 11(1):34-53.
- Melis MR**, Argiolas A. 1995. Dopamine and sexual behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19(1): 19-38.
- Merchenthaler I**, Görcs T, Sétáló G, Petrusz P, Flerkó B. 1984. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell Tissue Research* 237(1): 15-29.
- Meyer MH**, Masken JF, Nett TM, Niswender GD. 1974. Serum levels of gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) during the estrous cycle and in pentobarbital-treated rats. *Neuroendocrinology* 15(1):32-37.
- Migone FF**, Cowan RG, Williams RM, Gorse KJ, Zipfel WR, Quirk SM. 2016. In vivo imaging reveals an essential role of vasoconstriction in rupture of the ovarian follicle at ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(8): 2294-2299.
- Miller BH**, Takahashi JS. 2014. Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology* 4(195) doi: 10.3389/fendo.2013.00195.
- Miller SM**, Lonstein JS. 2005. Dopamine D1 and D2 receptor antagonism in the preoptic area produces different effects on maternal behavior in lactating rats. *Behavioral Neuroscience* 119(4): 1072-1083.

Miller SM, Lonstein JS. 2009. Dopaminergic projections to the medial preoptic area of postpartum rats. *Neuroscience* 159(4): 1384-1396.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews* 78(1): 189-225.

Mitwally MF, Casper RF, Diamond MP. 2005. Oestrogen-selective modulation of FSH and LH secretion by pituitary gland. *British Journal of Cancer* 92(2): 416-417.

Mons N, Tison F, Geffard M. 1990. Existence of L-dopa immunoreactive neurons in the rat preoptic area and anterior hypothalamus. *Neuroendocrinology* 51(4): 425-428.

Montaner AD, Mongiat L, Lux-Lantos VA, Park MK, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lescheid D, Lovejoy D, Libertun C, Sherwood NM, Somoza GM. 2001. Structure and biological activity of gonadotropin-releasing hormone isoforms isolated from rat and hamster brains. *Neuroendocrinology* 74(3): 202-212.

Moore AM, Prescott M, Czielesky K, Desroziers E, Yip SH, Campbell RE, Herbison AE. 2018. Synaptic innervation of the GnRH neuron distal dendron in female mice. *Endocrinology* 159(9): 3200-3208.

Morán JL, Domínguez R. 1995. Effects of the unilateral implant of haloperidol at the preoptic-anterior hypothalamic area, on ovulation. *Endocrine* 3(6): 391-393.

Morán-Perales JL, Sánchez-García O, García-Suástegui WA, Handal-Silva A. 2019. Effects of stereotactic surgery on the anterior hypothalamus (HA) on the estrous cycle: role of the dopaminergic system in spontaneous ovulation in the rat. *ECORFAN Journal-Republic of Guatemala* (5-8): 27-50.

Mori H, Arakawa S, Ohkawa T, Ohkawa R, Takada S, Morita T, Okinaga S. 1994. The involvement of dopamine in the regulation of steroidogenesis in rat ovarian cells. *Hormone Research* 41(Suppl 1): 36-40.

Moses J, Loucks JA, Watson HL, Matuszewich L, Hull EM. 1995. Dopaminergic drugs in the medial preoptic area and nucleus accumbens: effects on motor activity, sexual motivation, and sexual performance. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 51(4): 681-686.

Nance DM, Christensen LW, Shryne JE, Gorski RA. 1977. Modifications in gonadotropin control and reproductive behavior in the female rat by hypothalamic and preoptic lesions. *Brain Research Bulletin* 2(4): 307-312.

Nett TM, Turzillo AM, Baratta M, Rispoli LA. 2002. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone.. *Domestic Animal Endocrinology* 23(1-2):33-42.

Nilson JH, Nejedlik MT, Virgin JB, Crowder ME, Nett TM. 1983. Expression of alpha subunit and luteinizing hormone beta genes in the ovine anterior pituitary. Estradiol suppresses accumulation of mRNAs for both alpha subunit and luteinizing hormone beta. *The Journal of Biological Chemistry* 258(20):12087-12090.

Numan M, Stolzenberg DS. 2009. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(1): 46-64.

Nutsch VL, Will RG, Robison CL, Martz JR, Tobiansky DJ, Dominguez JM. 2016. Colocalization of mating-induced fos and d2-like dopamine receptors in the medial preoptic area: influence of sexual experience. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10:75. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00075.

- Oakley** AE, Clifton DK, Steiner RA. 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocrinology Reviews* 30(6):713-743.
- Oktem** O, Oktay K. 2008. The ovary. Anatomy and function throughout human life. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1127(1): 1-9.
- Ooi** GT, Tawadros N, Escalona RM. 2004. Pituitary cell lines and their endocrine applications. *Molecular and Cellular Endocrinology* 228(1-2):1-21.
- Opavsky** MA, Armstrong DT. 1989. Effects of luteinizing hormone on superovulatory and steroidogenic responses of rat ovaries to infusion with follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction* 41(1): 15–25.
- Orsi** NM, Baskind NE, Cummings M. 2014. Anatomy, development, histology, and normal function of the ovary. p. 1-32. En Wilkinson N (ed.) *Pathology of the Ovary, Fallopian Tube and Peritoneum*. Springer. London.
- Paccola** CC, Resende CG, Stump T, Miraglia SM, Cipriano I. 2013. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal Reproduction* 10(4): 677-683.
- Pandey** P, Mersha MD, Dhillon HS. 2013. A synergistic approach towards understanding the functional significance of dopamine receptor interactions. *Journal of Molecular Signaling* 8(1): 13. doi: 10.1186/1750-2187-8-13.
- Parducz** A, Hajszan T, Maclusky NJ, Hoyk Z, Csakvari E, Kurunczi A, Prange-Kiel J, Leranth C. 2006. Synaptic remodeling induced by gonadal hormones: neuronal plasticity as a mediator of neuroendocrine and behavioral responses to steroids. *Neuroscience* 138(3): 977-985.
- Pastelín** CF, Rosas NH, Morales-Ledesma L, Linares R, Domínguez R, Morán C. 2017. Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. *Journal of Ovarian Research* 10(18): doi: 10.1186/s13048-017-0311-x.
- Paxinos** G, Watson C. 2014. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. Amsterdam.
- Peaston** RT, Weinkove C. 2004. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Annals of Clinical Biochemistry* 41(1):17-38.
- Phelps** CP, Krieg RJ, Sawyer CH. 1976. Spontaneous and electrochemically stimulated changes in plasma LH in the female rat following hypothalamic deafferentation. *Brain Research*. 101(2): 239-249.
- Picut** CA, Dixon D, Simons ML, Stump DG, Parker GA, Remick AK. 2015. Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicologic Pathology* 43(3): 343-353.
- Pivonello** R, Ferone D, Lombardi G, Colao A, Lamberts SWJ, Hofland LJ. 2007. Novel insights in dopamine receptor physiology. *European Journal of Endocrinology* 156(1):S13-S21.
- Pop** MG, Crivii C, Opinicari I. 2018. Anatomy and function of the hypothalamus. En Baloyannis S, Gordeladze J (eds.) *Hypothalamus in Health and Diseases*. IntechOpen. UK. doi: 10.5772/intechopen.80728.
- Pope** C, McNeilly JR, Coutts S, Millar M, Anderson RA, McNeilly AS. 2006. Gonadotrope and thyrotrope development in the human and mouse anterior pituitary gland. *Developmental Biology* 297(1):172-181.

- Prakash N**, Wurst W. 2006. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(2): 187-206.
- Prizant H**, Gleicher N, Sen A. 2014. Androgen actions in the ovary: balance is key. *The Journal of Endocrinology* 222(3): R141-R151.
- Purves D**, Augustine GJ, Fitzpatrick D (eds.). 2001. *The Ventricular System. Neuroscience*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11083/>
- Rangaraju NS**, Xu JF, Harris RB. 1991. Pro-gonadotropin-releasing hormone protein is processed within hypothalamic neurosecretory granules. *Neuroendocrinology* 53(1):20-28.
- Reich R**, Daphna-Iken D, Chun SY, Popliker M, Slager R, Adelman-Grill BC, Tsafiriri A. 1991. Preovulatory changes in ovarian expression of collagenases and tissue metalloproteinase inhibitor messenger ribonucleic acid: role of eicosanoids. *Endocrinology* 129(4): 1869-1875.
- Richards JS**, Pangas SA. 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of Clinical Investigation* 120(4): 963-972.
- Rinne UK**. 1966. Ultrastructure of the median eminence of the rat. *ZeitschriftZellforschung und Mikroskopische Anatomie* 74(1): 98-122.
- Risma KA**, Clay CM, Nett TM, Wagner T, Yun J, Nilson JH. 1995. Targeted overexpression of luteinizing hormone in transgenic mice leads to infertility, polycystic ovaries, and ovarian tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(5): 1322–1326.
- Rizzoti K**, Lovell-Badge R. 2005. Early development of the pituitary gland: induction and shaping of Rathke’s pouch. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 6(3): 161-172.
- Rojas M**, Prieto R. 2014. Embriología del Sistema genital femenino. *International Journal of Medical and Surgical Sciences* 1(2): 153-166.
- Rubinstein L**, Sawyer CH. 1970. Role of Catecholamines in Stimulating the Release of Pituitary Ovulating Hormone(s) in Rats. *Endocrinology* 86(5): 988-996.
- Russel DL**, Robker RL. 2007. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update* 13(3):289-312.
- Savica R**, Benarroch EE. 2014. Dopamine receptor signaling in the forebrain: recent insights and clinical implications. *Neurology* 83(8):758-767.
- Saxena V**, Kumar D, Khursheed SM, Krishnaswamy N, Kumar A. 2015. Induction of ovulation in anestrus ewes using dopamine receptor antagonist. *Theriogenology* 30: 1-5.
- Schmidt S**, Gonzalez D, Derendorf H. 2010. Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99(3): 1107-1122.
- Schneider HP**, McCann SM. 1970. Mono and indolamines and control of LH secretion. *Endocrinology* 86(5): 1127-1134.
- Schwartz J-C**, Giros B, Martres M-P, Sokoloff P. 1992. The dopamine receptor family: molecular biology and pharmacology. *Seminars in Neuroscience* 4(2): 99–108.
- Seeman P**, Van Tol HH. 1994. Dopamine receptor pharmacology. *Currents Opinions in Neurology and Neurosurgery* 6(4): 602-608.

Shen M, Jiang Y, Guan Z, Cao Y, Sun SC, Liu H. 2016. FSH protects mouse granulosa cells from oxidative damage by repressing mitophagy. *Scientific Reports* 38090(6): <https://doi.org/10.1038/srep38090>

Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe IR. 1993. Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinology Reviews* 14(2): 241-254.

Sibley DR, Monsma FJ Jr. 1992. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends in Pharmacology Science* 13(2): 61-69.

Silva C-C, Domínguez R. 2019. Clock control of mammalian reproductive cycles: looking beyond the pre-ovulatory surge of gonadotropins. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 21(1): 149-163.

Simard J, Labrie C, Hubert JF, Labrie F. 1988. Modulation by sex steroids and [D-Trp⁶, Des-Gly-NH₂(10)] luteinizing hormone (LH)-releasing hormone ethylamide of alpha-subunit and LH beta messenger ribonucleic acid levels in the rat anterior pituitary gland. *Molecular Endocrinology* 2(9):775-784.

Simmerly RB, Swanson LW. 1986. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 246(3): 312-342.

Skorupskaitė K, George JT, Anderson RA. 2014. The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human Reproduction Update* 20(4): 485-500.

Smith MF, Ricke WA, Bakke LJ, Dow MP, Smith GW. 2002. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 191(1): 45-56.

Smith P, Wilhelm D, Rodgers RJ. 2014. Development of mammalian ovary. *The Journal of Endocrinology* 221(3): R145-R161.

Smits SM, Burbach JP, Smidt MP. 2006. Developmental origin and fate of meso-diencephalic dopamine neurons. *Progress in Neurobiology* 78(1): 1-16.

Smyth CD, Miró F, Whitelaw PF, Howles CM, Hillier SG. 1993. Ovarian thecal/interstitial androgen synthesis is enhanced by a follicle-stimulating hormone-stimulated paracrine mechanism. *Endocrinology* 133(4): 1532-1538.

Somoza GM, Miranda LA, Strobl-Mazzulla P, Guilgur LG. 2002. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. *Cellular and Molecular Neurobiology* 22(5-6): 589-609.

Spergel DJ. 2019. Modulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and secretion in mice by non-peptide neurotransmitters, gasotransmitters, and gliotransmitters. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*10:329.doi: 10.3389/fendo.2019.00329

Stolzenberg DS, McKenna JB, Keough S, Hancock R, Numan MJ, Numan M. 2007. Dopamine D1 receptor stimulation of the nucleus accumbens or the medial preoptic area promotes the onset of maternal behavior in pregnancy-terminated rats. *Behavioral Neuroscience* 121(5): 907-919.

Suga H, Kadoshima T, Minaguchi M, Ohgushi M, Soen M, Nakano T, Takata N, Wataya T, Muguruma K, Miyoshi H, Yonemura S, Oiso Y, Sasai Y. 2011. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature* 480(7375):57-62.

Suzuki H, Kanai-Azuma M, Kanai Y. 2015. From sex determination to initial folliculogenesis in the mammalian ovaries: morphogenetic waves along the anteroposterior and dorsoventral axes. *Sexual*

Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation 9(4): 190–204.

Swanson LW. 1976. An autoradiographic study of the efferent connections of the preoptic region in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 167(2): 227-256.

Tasaka K, Miyake A, Sakumoto T, Aono T. 1985. Dopamine decreases release of luteinizing hormone releasing hormone from superfused rat mediobasal hypothalamus. *Journal of Endocrinological Investigation* 8(4): 373–376.

Tejasen T, Everett JW. 1967. Surgical analysis of the pre-optico-tuberal pathway controlling ovulatory release of gonadotropins in the rat. *Endocrinology* 81(6): 1387-1396.

Terasawa E, Keen KL, Mogi K, Claude P. 1999. Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. *Endocrinology* 140(3):1432-1441.

Themmen AP, Huhtaniemi IT. 2000. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine Reviews* 21(5): 551-583.

Thibault C, Levasseur MC, 1988. Ovulation. *Human Reproduction* 3(4): 513-523.

Tillet Y, Batailler M, Thiéry JC, Thibault J. 2000. Neuronal projections to the lateral retrochiasmatic area of sheep with special reference to catecholaminergic afferents: immunohistochemical and retrograde tract-tracing studies. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 19(1) :47-67.

Tokmakov AA, Stefanov VE, Sato K-I. 2020. Dissection of the ovulatory process using ex vivo approaches. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 605379. doi: 10.3389/fcell.2020.605379.

Tsafiriri A, Reich R. 1999. Molecular aspects of mammalian ovulation. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes: Official Journal* 107(1): 1-11.

Tsafiriri A. 1995. Ovulation as a tissue remodeling process. p. 121-135. En Mukjopadhyay AK, Raizada MK (eds.) *Tissue Renin-Angiotensin Systems: Current Concepts of Local Regulators in Reproductive and Endocrine Organs*. Springer. Boston.

Tsuneoka Y, Funato H. 2021. Cellular composition of the preoptic area regulating sleep, parental and sexual behavior. *Frontiers in neuroscience* 15: 649159. doi: 10.3389/fnins.2021.649159.

Tsutsumi R, Webster NJ. 2009. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocrine Journal* 56(6):729-737.

Uchida S, Kagitani F. 2015. Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation. *The Journal of Physiological Sciences: JPS* 65(1): 1-9.

Ulloa-Aguirre A, Timossi C. 1998. Structure-function relation of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reproduction Update* 4(3): 260-283.

Van Loon GR, Kragt CL. 1970. Effect of dopamine on the biological activity and in vitro release of ACTH and FSH. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 133(4): 1137–1141.

Venegas-Meneses B, Padilla JF, Juárez CE, Morán JL, Morán C, Rosas-Murrieta NH, Handal A, Domínguez R. 2015. Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine* 50(3): 783–796.

- Verstegen J**, Onclin K, Silva LD, Concannon P. 1999. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology* 51(3): 597–611.
- Vidal JD**, Dixon D. 2018. Ovary. p. 523-525. En Suttie AW, Leininger JR, Bradley AE (eds.) *Boorman's Pathology of The Rat: Reference and Atlas*. Elsevier Academic Press. San Diego, CA.
- Vijayan E**, McCann SM. 1978. The effect of systemic administration of dopamine and apomorphine on Plasma LH and prolactin concentrations in conscious rats. *Neuroendocrinology* 25(4): 221-235.
- Walters KA**, Handelsman DJ. 2018. Role of androgens in the ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 465: 36-47.
- Wang H**, Larson M, Jablonka-Shariff A, Pearl CA, Miller WL, Conn PM, Boime I, Kumar TR. 2014. Redirecting intracellular trafficking and the secretion pattern of FSH dramatically enhances ovarian function in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(15): 5735–5740.
- Wang L**, Guo W, Shen X, Yeo S, Long H, Wang Z, Lyu Q, Herbison AE, Kuang Y. 2020. Different dendritic domains of the GnRH neuron underlie the pulse and surge modes of GnRH secretion in female mice. *Elife*9: e53945. doi: 10.7554/eLife.53945.
- Ward DR**, Dear FM, Ward IA, Anderson SI, Spergel DJ, Smith PA, Ebling FJ. 2009. Innervation of gonadotropin-releasing hormone neurons by peptidergic neurons conveying circadian or energy balance information in the mouse. *PLoS One*4(4): e5322. doi: 10.1371/journal.pone.0005322.
- Weesner GD**, Pfaff DW. 1994. Disruption of estrous cyclicity following administration of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist to the preoptic area of the rat. *Biology of Reproduction* 50(5): 1178–1182.
- Weidner N**, Dabbs DJ, Peterson M. 2009. Ovaries. p. 1356-1358. En Weidner N, Suster S, Cote RJ, Weiss LM (eds.) *Modern Surgical Pathology*. Elsevier Saunders. USA.
- Weir BJ**, Rowlands IW. 1973. Reproductive strategies of mammals. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 4(1): 139-163.
- Wetsel WC**, Srinivasan S. 2002. Pro-GnRH processing. *Progress in Brain Research* 141:221-241.
- Whitlock KE**. 2005. Origin and development of GnRH neurons. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 16(4): 145-151.
- Wise RA**. 2004. Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews. Neuroscience* 5(6): 483-494.
- Wood GA**, Fata JE, Watson KL, Khokha R. 2007. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction (Cambridge, England)* 133(5): 1035–1044.
- Xie Y**, Dorsky RI. 2017. Development of the hypothalamus: conservation, modification, and innovation. *Development* 144(9): 1588-1599.
- Xue H**, Gai X, Sun W, Li C, Liu Q. 2014. Morphological changes of gonadotropin-releasing hormone neurons in the rat preoptic area across puberty. *Natural Regeneration Research* 9(13): 1303-1312.
- Yao HH**. 2005. The pathways to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 230(1-2): 87-93.
- Yeragani V**, Tancer M, Chokka P, Baker G.2010. Arvid Carlsson, and the story of dopamine. *Indian Journal of Psychiatry*52(1):87-88.

Yeung CM, Chan CB, Leung PS, Cheng CH. 2006. Cells of the anterior pituitary. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 38(9):1441-1449.

Yin W, Gore AC. 2006. Neuroendocrine control of reproductive aging: roles of GnRH neurons. *Reproduction (Cambridge, England)* 131(3): 403–414.

Yin W, Gore AC. 2010. The hypothalamic median eminence and its role in reproductive aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1204(1): 113-122.

Zackrisson U, Löfman CO, Janson PO, Wallin A, Mikuni M, Brännström M. 2011. Alterations of follicular microcirculation and apex structure during ovulation in the rat. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 157(2): 169-174.

Zeiss CJ. 2005. Neuroanatomical phenotyping in the mouse: the dopaminergic system. *Veterinary Pathology* 42(6): 753-773.

Zhang H, Zhang Y, Zhao H, Zhang Y, Chen Q, Peng H, Qiao J, Shi J, Cao Z, Duan E, Jin Y. 2013. Hormonal regulation of ovarian bursa fluid in mice and involvement of aquaporins. *PLoS One* 8(5): e63823. doi: 10.1371/journal.pone.0063823.

Zhou XL, Teng Y, Cao R, Fu H, Xiong K, Sun WX, Zhu CC, Huang XJ, Xiao P, Liu HL. 2013. Rescue from dominant follicle atresia by follicle-stimulating hormone in mice. *Genetics and Molecular Research: GMR* 12(3): 2945–2952.

Zoli M, Agnati LF, Tinner B, Steinbusch HW, Fuxe K. 1993. Distribution of dopamine-immunoreactive neurons and their relationships to transmitter and hypothalamic hormone-immunoreactive neuronal systems in the rat mediobasal hypothalamus. A morphometric and microdensitometric analysis. *The Journal of Chemical Neuroanatomy* 6(5): 293-310.