



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Efecto del Bloqueo Unilateral de los Receptores
Dopaminérgicos de la Familia RDA-2 en el Área
Preóptica Durante Estro o Metaestro Sobre la
Ovulación de la Rata Adulta**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTA:

CARLOS EDUARDO CONTRERAS MAYA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. CARLOS CAMILO SILVA MÉNDEZ



Ciudad de México, 9 de agosto del 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

**Efecto del Bloqueo Unilateral de los Receptores
Dopaminérgicos de la Familia RDA-2 en el Área
Preóptica Durante Estro o Metaestro Sobre la
Ovulación de la Rata Adulta**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTA:

Carlos Eduardo Contreras Maya

JURADO DEL EXAMEN:

Director: Dr. Carlos Camilo Silva Méndez

Asesor: Dr. Roberto Domínguez Casalá

Asesora: Mtra. En IBSH. Angélica Flores Ramírez

Sinodal: Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

Sinodal: Dra. Rosa Linares Culebro



Ciudad de México, 9 de agosto del 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: **CONTRERAS MAYA CARLOS EDUARDO** con número de cuenta **312285940** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **9 de Agosto 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.	LINARES CULEBRO ROSA	
SUPLENTE DRA.	VIEYRA VALDEZ ELIZABETH	

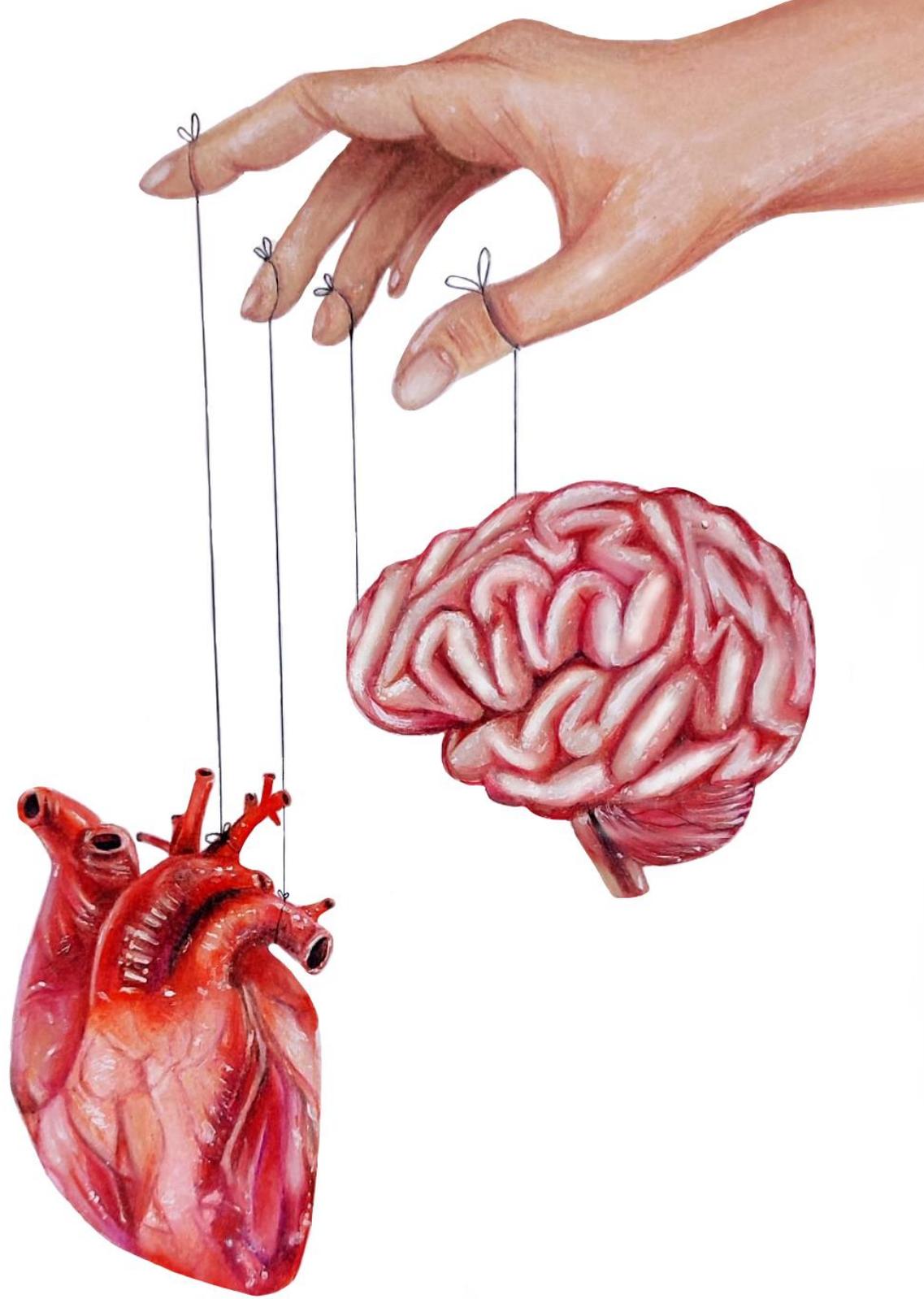
El título del trabajo escrito que se presenta es:

Efecto del bloqueo unilateral de los receptores dopaminérgicos de la familia RDA-2 en el área preóptica durante estro o metaestro sobre 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 21 de Junio de 2022

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA



Agradecimientos

A los apoyos recibidos para que se llevará a cabo este proyecto:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto número: 236908.

Al Sistema Nacional de Investigadores Ayudantes de Investigador Nacional Nivel III o Emérito. Expediente de investigador N-III: 938. N° de CVU del ayudante: 887217.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, proyecto: IN 216015.

A la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente a los laboratorios de Cronobiología de la Reproducción y Biología del Desarrollo por todo el apoyo proporcionado.

A la Dra. Adriana, al Dr. Román, a la Dra. Elizabeth y a los trabajadores del Bioterio de la FES Zaragoza, por el cuidado a los animales utilizados en este estudio.

A mis sinodales, Dr. Roberto, Dra. Elizabeth, Dra. Rosa y Mtra. Angelica, agradezco el tiempo que me dedicaron, por leer mi escrito, por sus sugerencias y su apoyo a lo largo de esta travesía, gracias por su disposición de enseñarme un poco de todo lo que ustedes saben. Muchas gracias.

Dedicatorias

A mi madre

Mamá, no tengo palabras suficientes para agradecerte todo lo que me has dado, eres un ejemplo tan grande de tenacidad, fortaleza y trabajo que admiro con toda mi alma. Me has enseñado como afrontar los problemas y ver el lado positivo de la vida. Gracias por tu cuidado y todo el amor que me has dado, gracias por creer en mí a pesar de mis fallos, gracias por tus palabras llenas de sabiduría y comprensión, gracias por tu apoyo incondicional, gracias por tu sacrificio para que saliera adelante. No hay manera de agradecerte todo lo que has hecho por mí. Hoy y siempre me sentiré infinitamente orgulloso de ser tu hijo.

Mamá este triunfo es más tuyo que mío ¡te amo infinitamente!

A mis tíos

Rafa, Silvia, Alfredo y Tarsicio, gracias por el apoyo que me han dado en cada etapa de mi vida, han sido un pilar fundamental en formar a quien soy el día hoy, agradezco la confianza que depositaron en mí y las palabras de aliento que siempre me dieron. ¡Los quiero!

A Miguel, eres una gran figura de tenacidad y perseverancia ante las adversidades a la cual admiro, sé que me has visto crecer a lo largo de todos estos años y para ti sigo siendo el niño pequeño que conociste. Te agradezco tu cuidado y el apoyo incondicional que me has dado durante todo este tiempo.

La familia también son las personas que nosotros elegimos y me siento agradecido de considerarte parte de la mía. Te quiero.

A Fabián, gracias por escucharme y darme consejos a lo largo de todo este tiempo, agradezco el apoyo que me has brindado en las buenas y en las malas.

A mi team Dopamina

Ilse, gracias por tu ayuda dentro y fuera del laboratorio, por ser tan amable encada instante, me enseñaste a ser paciente y ver una luz en cada persona que yo no solía ver, gracias. **A Linda**, gracias por tu apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio, me has impulsado a mejorar como estudiante y como persona. **A ambas**, gracias por su ayuda, cuidado, paciencia, preocupación y apoyo que me brindaron

en cada instante de esta travesía, aprendí bastante de ambas, no pude haber pedido un mejor equipo, siempre estaré para ustedes. ¡Las quiero!

A Camilo, gracias por creer en el chico temeroso que llego tocando a la puerta de tu laboratorio, gracias por el conocimiento que me brindaste, siempre voy a estar agradecido contigo por darme la oportunidad de pertenecer a ese gran equipo (LICR). Con el paso del tiempo aparte de ser mi tutor te he visto como un amigo y te agradezco el tiempo, los consejos y las herramientas que me has brindado para poder alcanzar mis aspiraciones. ¡Eres un gran tutor!

A Montse, te agradezco tu ayuda y apoyo a lo largo de todo este tiempo dentro y fuera del laboratorio, gracias por tu amistad y las palabras de aliento que me has dado, aprendí bastante de ti. Eres una persona muy resiliente y admiro eso de ti, siempre estaré para ayudarte en cualquier momento que lo necesites.

A Iliana, gracias por el apoyo dentro y fuera del laboratorio, gracias escucharme y los consejos que me brindaste, cualquier camino que hayas elegido estaré allí para apoyarte.

A Orión, gracias por hacerme sonreír día a día, a pesar de tener días grises tu compañía es un rayo de luz para mi mundo.

Índice

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	2
3. Introducción	4
4. Marco teórico	6
4.1 Formación de los folículos primordiales durante la vida fetal	6
4.2 El desarrollo de los folículos ováricos	8
4.3 La actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario y el ciclo estral	11
4.4 La hormona liberadora de las gonadotropinas y su receptor	17
4.5 La dopamina	26
4.6 Grupos dopaminérgicos y vías dopaminérgicas	28
4.7 Receptores dopaminérgicos (RDA)	33
4.8 El papel de la dopamina en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario	37
5. Planteamiento del problema	42
6. Pregunta de investigación	43
7. Hipótesis	44
8. Objetivos	45
9. Materiales y Métodos	46
9.1 Animales y condiciones experimentales	46
9.2 Implantación de las cánulas	46
9.3 Microinyección	47
9.4 Eutanasia y procesamiento de los tejidos	48
9.5 Análisis de los datos	48
10. Resultados	49
11. Discusión	60
12. Conclusiones	65
13. Perspectivas	66
14. Referencias	67

Abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica	Na⁺	Sodio
AMPc	Adenosín Monofosfato Cíclico	NMDA	N-metil-D-Aspartato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	OVLt	Órgano Vasculoso de la Lamina Terminal
BMP	Proteína morfogenética ósea	OVX	Ovariectomía
BSTpr	Núcleo del Lecho de la Estría Terminal	PGC	Células Primordiales Germinales
Cl⁻	Cloro	PGF2α	Prostaglandina F2 α
CRH	Hormona liberadora de corticotropina	PKC	Proteína quinasa C
FSH	Hormona Estimulante de los Folículos	POA	Área preóptica Anterior
FSH-β	Subunidad β de la Hormona Estimulante de los Foliculos	PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
GABA	Ácido Gamma-Aminobutírico	PVN	Núcleo Paraventricular
GDF9	Factor de diferenciación del crecimiento	RDA	Receptores Dopaminérgicos
GnRH	Hormona Liberadora de las Gonadotropinas	RDA1	Receptores Dopaminérgicos de la Familia 1
GnRH-R	Receptor de la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas	RDA2	Receptores Dopaminérgicos de la Familia 2
HHG	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada	SRDa1	Subtipo de receptores dopaminérgicos 1
IHDA	Tracto dopaminérgico incerto hipotalámico	SRDa2	Subtipo de receptores dopaminérgicos 2
IP₃	Inositol trifosfato	SRDa3	Subtipo de receptores dopaminérgicos 3
Ki	Constante de inhibición	SRDa4	Subtipo de receptores dopaminérgicos 4
L-DOPA	Levodopa	SRDa5	Subtipo de receptores dopaminérgicos 5
LH	Hormona Luteinizante	TH	Tirosina Hidroxilasa
LH-β	Subunidad β de la Hormona Luteinizante	THDA	Terminales Dopaminérgicas Infundíbulares
MAPK	Proteína cinasa de activación mitogénica	TH-IR	Tirosina Hidroxilasas Inmunorreactiva
MBH	Hipotálamo Medio Basal	VMAT2	Transportador de Monoaminas Vesicular
MEApd	Núcleo Amigdalal Medial Postero-Dorsal		

Resumen

En los mamíferos el eje hipotálamo-hipófisis-gónada es el encargado de regular la reproducción. En el hipotálamo se localizan a las neuronas de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), las cuáles proyectan sus axones hacia la eminencia media, donde secretan a éste decapeptido. Posteriormente, éste llega a los gonadótropos, donde estimula la síntesis y la secreción de las gonadotropinas que viaja a su órgano blanco, el ovario, donde estimulan el crecimiento folicular, la ovulación, la síntesis y la secreción de hormonas. La secreción de la GnRH es regulada por diferentes neurotransmisores como el ácido gamma aminobutírico, el péptido intestinal vaso activo, la β -endorfina, la kisspeptina, la serotonina, la neuroquinina B, la noradrenalina y la dopamina.

Se ha observado que la implantación bilateral de cristales de haloperidol, un antagonista de todos los receptores dopaminérgicos (RDA), en el área preóptica anterior (POA) de ratas hembra bloquea parcialmente la ovulación. En contraste, la microinyección de un antagonista de los receptores dopaminérgicos de la familia 1 (RDA-1) no modifica de manera significativa la ovulación, por lo que se descarta que los RDA-1 regulen este proceso. Con base en esto nos preguntamos si la dopamina que llega al POA regula la ovulación al actuar a través de los receptores dopaminérgicos de la familia 2 (RDA-2). El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto del bloqueo de los RDA-2 en el POA izquierda o derecha a las 09:00 horas en las etapas de estro o metaestro (diestro-1) sobre la ovulación de la rata adulta. Para ello se utilizaron ratas hembra de la cepa CIIZ-V, las cuales fueron mantenidas en condiciones estándar de bioterio. Los animales fueron divididos en 2 grupos experimentales, el primero fue el control absoluto y consistió en ratas intactas, sacrificadas en la mañana del estro vaginal. El segundo grupo fue sometido a una cirugía estereotáxica en la cual se implantó una cánula unilateral dirigida al POA izquierda o derecha. Posterior a la cirugía, se dejó recuperar a los animales y solamente aquellos que presentaron 3 ciclos consecutivos de 4 días de duración fueron microinyectados con 0.4 μ l de raclopride o de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF). Los animales microinyectados fueron sacrificados en el estro esperado y se determinó su ciclicidad, en la autopsia se verificó la trayectoria de la cánula, la presencia de ovocitos en los oviductos y la masa de los ovarios, útero y adrenales.

Al analizar los datos considerando la etapa del ciclo estral y el hemisferio cerebral en el que se realizaron los tratamientos, encontramos que la microinyección de ACSF o de raclopride no modificó la tasa de animales cíclicos, el número de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados con respecto al grupo control. Sin embargo, al analizar la masa ovárica se apreció un decremento en el grupo



de ACSF del diestro-1 en comparación al del estro. En el caso de la masa uterina, encontramos un decremento en el grupo tratado con ACSF en el POA izquierda a las 9:00 horas del diestro-1. Finalmente, en el caso de las glándulas adrenales, se observó una diferencia entre los grupos tratados con ACSF en el POA izquierda en la etapa de estro y en el POA derecha. También encontramos diferencias significativas tras la microinyección entre el grupo tratado con ACSF y el de raclopride en el POA izquierda en la etapa de estro. Con base en estos resultados concluimos que la dopamina no actúa a través de los RDA-2 en el POA izquierda o derecha a las 9:00 horas de las etapas de estro y diestro-1 para regular la ovulación de rata adulta. Considerando la disminución en la masa de los ovarios y el útero tras la microinyección de ACSF, sugerimos que la inyección de esta solución vehículo estimula la actividad del eje del estrés, lo que explica el incremento de la masa de las glándulas adrenales, lo que no ocurre tras la administración de raclopride, posiblemente porque su unión a los RDA-2 impide la secreción de la hormona liberadora de corticotropina mediada por la dopamina endógena.



Introducción

La reproducción es regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En el hipotálamo se ubica el área preóptica anterior (POA, por sus siglas en inglés), en la que se localizan las neuronas que secretan a la GnRH, éstas proyectan sus terminales axonales hacia la eminencia media, donde se vierte a dicho decapeptido. La GnRH es transportada por el sistema portal hipotalámico-hipofisiario hasta llegar a la adenohipófisis, donde se une a sus receptores y estimula la síntesis y la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de los folículos (FSH). Ambas hormonas son transportadas por la circulación general hasta llegar a la gónada, donde estimulan la síntesis y secreción de las hormonas esteroides (testosterona, estradiol y progesterona) y la producción de los gametos (Herbison, 2016).

Entre los diversos sistemas de neurotransmisión que participan en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, se encuentra el dopaminérgico (Li y Pelletier, 1992; Liu y Herbison, 2013; Spergel, 2019). A partir de los resultados obtenidos en diferentes estudios experimentales, se describe que este sistema tiene efectos estimulantes e inhibitorios con respecto a la secreción de las gonadotropinas (Beck y Wuttke, 1977; Drouva y Gallo, 1977; Negro-Vilar *et al.*, 1979; Schneider y McCann, 1969). Por ejemplo, se ha reportado que la inyección subcutánea de haloperidol, un antagonista a todos los RDA, en el día del proestro, inhibe la secreción preovulatoria de las gonadotropinas y, consecuentemente, la ovulación. Este efecto se inhibe si se administra previamente un agonista dopaminérgico (Bromocriptina), lo cual indica que este neurotransmisor tiene un efecto estimulante (Krieg y Cassidy, 1984). Contrario a ello, la administración sistémica de agonistas de los RDA en animales ovariectomizados, inhibe la secreción de las gonadotropinas. Esto se puede revertir si se administra de manera conjunta algún antagonista dopaminérgico como la pimozida o el D-butaclamol, lo que sugiere que la dopamina tiene un efecto inhibitorio o bien, que el efecto es diferente en función del estado hormonal del animal (Beck y Wuttke, 1977; Drouva y Gallo, 1977).

La administración sistémica de los fármacos en los estudios antes mencionados no permite discernir en cuál de los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónada actúa la dopamina para regular la secreción de las gonadotropinas, no obstante, estudios *in vitro* sugieren que la dopamina modula directamente al hipotálamo y no a la hipófisis. Por ejemplo, se ha observado que la adición de la dopamina al medio de cultivo de explantes hipotalámicos-hipofisarios, resulta en el incremento de la



secreción de ambas gonadotropinas, en contraste, esto no ocurre en cultivos que contienen únicamente fragmentos hipofisarios (De Quijada *et al.*, 1983; Negro-Vilar *et al.*, 1979; Schneider y Mccann 1969). Por otra parte, estudios *in vivo* muestran que la inyección de la dopamina en el POA de ratas ovariectomizadas (OVX) que son tratadas con estrógenos, estimula la secreción de las gonadotropinas (Kawakami *et al.*, 1975). En concordancia con estos resultados, el implante unilateral de cristales de haloperidol en el POA resulta en el bloqueo de la ovulación, sin importar el hemisferio que haya sido tratado (Morán y Domínguez, 1995). Posteriormente, se mostró que la microinyección unilateral de un antagonista de los RDA-1 (SCH-23390) en la misma estructura, no modifica la tasa de animales ovulantes (Cortés, 2018). Por lo anterior, en el presente estudio se analizó, de manera puntual, el papel que desempeñan los RDA-2 en el POA durante el estro y el diestro-1 en la regulación de la ovulación de la rata adulta.



Marco teórico

Formación de los folículos primordiales durante la vida fetal

En los mamíferos, la reproducción depende de la actividad de las gónadas, pues en ellas se da la producción de los gametos. Todos los mamíferos poseen un par de gónadas, en el caso de los machos son los testículos y en las hembras los ovarios (Long y Asdell, 1965). El desarrollo de los ovarios comienza durante el periodo embrionario. En los roedores, las células germinales primordiales (PGC) se diferencian en el epiblasto entre los días embrionarios 6 y 7. Posteriormente, alrededor del día embrionario 8.5 éstas pueden ser visualizadas en la base del alantoides y a partir de allí comienzan a migrar a través del mesenterio dorsal del intestino posterior, hasta llegar a la cresta genital aproximadamente durante el día embrionario 9.5 a 10.5. Es allí donde se establecerá la gónada indiferenciada (Ginsburg *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1983; Pepling, 2012).

Las PGC pierden su movilidad poco después de llegar a las crestas genitales, en este punto se les denomina gonocitos, los que proliferan rápidamente, en aproximadamente 3 rondas mitóticas que duran hasta el día embrionario 12.5. La consecuente división meiótica continúa hasta el día embrionario 17.5, momento en el cual estas células son retenidas en la fase de diploteno. Los ovocitos que resultan de este proceso se encuentran unidos entre ellos a través de puentes citoplasmáticos, los cuales forman los llamados “quistes de células germinales” (Anderson, 2001a; Simpson, 2003; Pepling, 2012; Tam y Snow., 1981). Posteriormente, estos quistes se separan y aproximadamente dos tercios de las células resultantes atraviesan por un proceso de apoptosis, esto sucede al mismo tiempo que la degradación del nido de las células germinales. En el ratón, la ruptura del nido de las células germinales comienza poco antes del nacimiento y concluye aproximadamente en el día 6 postnatal. En el caso de la rata esto ocurre alrededor del día embrionario 17.5 y culmina aproximadamente durante el día 4 posnatal (Bristol-Gould *et al.*, 2006; Lechowska *et al.*, 2012; Pepling y Spradling, 2001).

El desarrollo folicular se puede clasificar en dos fases de acuerdo con la etapa del desarrollo en la que se encuentran los folículos y si éstos son o no responsivos a las gonadotropinas (Araújo y Gastal, 2014; Durlinger *et al.*, 1999; Hillier, 1994; McGee y Hsueh, 2000; Monget y Bondy, 2000; Orisaka *et al.*, 2009; Yokota *et al.*, 1997). La primera fase comprende el desarrollo de los folículos primordiales, primarios y secundarios tempranos y es independiente de las gonadotropinas, pues sus células no expresan receptores a la FSH y a la LH mientras que la fase dependiente de las gonadotropinas inicia



con la aparición de los folículos preantrales y continua hasta los folículos de Graff. La formación de los folículos primordiales inicia cuando las células de la pregranulosa encapsulan a los ovocitos dentro de folículos individuales, de esta manera se origina la reserva folicular que tendrá la hembra a lo largo de su vida adulta (Chiarini-Garcia y Rusell, 2001; Grive y Freiman, 2015; Pepling y Spradling, 2001).

El tiempo en el cual aparecen estos folículos varía entre especies (Smith, 2014; Ueno *et al.*, 1989). En los ratones se forman durante el segundo día postnatal, en el conejo alrededor del día 14, en las ovejas entre los días 75 y 100 de la gestación, en los cerdos entre el día 70 y 90 y en los humanos aproximadamente en el día 120 (Carabatsos *et al.*, 1998; Carabatsos *et al.*, 2000; Combelles *et al.*, 2004; Downs, 2010; Gazdag *et al.*, 2009; Mermillod *et al.*, 1999; Peters, 1978; Hutt *et al.*, 2006; Pincus y Enzmann 1932). Por otro lado, se ha mostrado que diversos factores estimulan el reclutamiento de los folículos primordiales para iniciar con su desarrollo, entre ellos, la hormona antimulleriana juega un papel fundamental (Durlinger *et al.*, 1999; Durlinger *et al.*, 2002; Hsueh *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2010). En los humanos, esta hormona favorece el desarrollo de los folículos primordiales y primarios, en cambio, en los roedores parece tener el efecto opuesto, ya que los folículos primordiales de ratones *knockout* a este factor se desarrollan con mayor velocidad, lo que resulta en el agotamiento temprano de la reserva folicular. Esto sugiere que la hormona antimulleriana juega un papel esencial en su conservación y está estrechamente relacionada con la cantidad de los folículos en desarrollo (Durlinger *et al.*, 2002; Orisaka *et al.*, 2021; Rajpert-De *et al.*, 1999; Weenen *et al.*, 2004).

Otro factor involucrado en este proceso es la vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt), que es la vía más estudiada con respecto a la activación, la proliferación y la supervivencia del folículo primordial. La fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) es una enzima que suprime a esta vía, y su actividad mantiene la latencia de los folículos primordiales en el ovario. Sin embargo, cuando se elimina el efecto de la PTEN en los folículos primordiales, el factor de transcripción de los ovocitos FOXO3 se fosforila y se exporta desde el núcleo hasta el citoplasma, donde se degrada (John *et al.*, 2008). La pérdida de la actividad transcripcional de FOXO3 en los ovocitos estimula la activación de los folículos primordiales, ya que actúa como un supresor en la activación de los ovocitos y su ausencia resulta en el agotamiento prematuro de éstos una vez que el organismo ha madurado (Hsueh *et al.*, 2015; Pangas y Rajkovic, 2014; Reddy *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2012).



Se ha reportado que las células de la pregranulosa de los folículos primordiales responden a los activadores de las vías del AMPc como la forskolina y algunos de sus análogos, ya que favorecen la expresión del receptor a la FSH y la actividad enzimática de la aromatasa. Por otro lado, se ha observado que la administración del péptido intestinal vasoactivo o de la norepinefrina a explantes de ovario de ratas recién nacidas resulta en un aumento en la producción del AMPc, lo que acelera el desarrollo folicular temprano. Esto sugiere que la información que llega al ovario a través de su inervación extrínseca juega un papel fundamental en el desarrollo folicular antes de que se adquiera la sensibilidad a las gonadotropinas, lo que ocurre tiempo después de la formación de éstos (Ahmed *et al.*, 1986; Mayerhofer *et al.*, 1997). Todos los factores anteriormente mencionados son de vital importancia para que el folículo primordial se desarrolle de manera óptima. Una vez que esto ocurre, las células de la pregranulosa dejan de dividirse y entran en un período de reposo. A su vez, la meiosis de los ovocitos se detiene en la fase de diploteno de la primera división hasta que se completa la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, lo que ocurre durante la pubertad (Guraya, 1985).

El desarrollo de los folículos ováricos

Los folículos primordiales retoman su desarrollo durante la madurez sexual, lo que ocurre después de meses o años de su formación (en roedores y humanos, respectivamente). Los principales cambios que ocurren son; el crecimiento del ovocito y la reanudación de la meiosis, la acumulación de un mayor número de células de la granulosa que forman múltiples capas alrededor del gameto, y la diferenciación de las células del estroma circundante en las células de las tecas (Smith, 2014). Esto es regulado de manera nerviosa, endocrina, paracrina y autocrina por diferentes factores como el factor de diferenciación del crecimiento (GDF9) y la proteína morfogenética ósea (BMP), que son sintetizados por el ovocito y mensajeros químicos que provienen de otras células (Eppig, 2001; Pangas *et al.*, 2006; Van Den Hurk y Zhao, 2005).

La transición de los folículos primordiales a primarios comienza con un cambio conformacional en las células de la granulosa, ya que pasan de una forma escamosa a una cuboidal (**Figura 1**; Pangas, 2007; Regan, 2018; Visser *et al.*, 2006). Estos folículos presentan una capa única de células de la granulosa y una lámina basal. Durante este estadio, tienen lugar varios eventos que son fundamentales para el desarrollo de los folículos como la expresión de los receptores a FSH en las células de la granulosa, la formación de uniones gap entre estas y el ovocito, el crecimiento de los folículos y la formación de la zona pelúcida. Durante la diferenciación del folículo primario, el gen que codifica para



el receptor de la FSH se activa en las células de la granulosa, lo que establece el potencial del folículo para ser responsivo a la FSH, aunque esta aún no participa en la regulación de su crecimiento (Conti, 2016). En los roedores, los folículos primarios recién formados tienen un diámetro aproximado de 20 μm , en los bovinos de 40 a 81 y en los humanos de entre 50 y 100 μm (Eppig, 1996; Eppig, 1997; Gartner y Hiatt, 2007).

La transición de un folículo primario a uno secundario inicia con la proliferación de las células de la granulosa por mitosis, lo que implica un cambio en su disposición; de un epitelio cuboidal simple a uno columnar estratificado (**Figura 1**). A lo largo de este proceso se inicia el reclutamiento de las células de la teca, provenientes de poblaciones de células intersticiales del estroma, las cuales se encuentran alrededor de la lámina basal (Chang *et al.*, 2016; Hirshfield, 1991; Jamnongjit y Hammes, 2005; Mikkelsen *et al.*, 2000). Otro evento importante es el desarrollo de las uniones gap entre las células de la granulosa y el ovocito (Grazul-Bilska *et al.*, 1997). Estas uniones son formadas por proteínas transmembranales, como la conexina, ya que permiten el intercambio de diferentes moléculas como el AMPc, el GMPc, el Ca^+ , el GDF9 y la BMP entre las células, las cuales tienen un papel vital en la regulación de esta transición, debido a que el crecimiento y el desarrollo del folículo primario se detienen en ausencia de estos factores (Chang *et al.*, 2016; Erickson, 1985; Jamnongjit y Hammes, 2005; Mikkelsen *et al.*, 2000; Rodgers, 2003). En apoyo a lo anterior, los ratones *knockout* a conexina carecen de folículos de Graaf, por lo que no son capaces de ovular cuando son adultos (Simon *et al.*, 1997). En conjunto, éstos antecedentes muestran que la presencia de estos factores y de las uniones gap son indispensables para el desarrollo folicular y la ovulación (Bruzzone *et al.*, 1996; Conti, 2016; Kumar y Gilula, 1996; Grazul-Bilska *et al.*, 1997).

El evento que culmina esta transición es la formación de la zona pelúcida, la cual se encarga de separar al ovocito de las células foliculares circundantes (Conti, 2016). En los seres humanos, se compone de cuatro glicoproteínas designadas como la ZP1, la ZP2, la ZP3 y la ZP4, mientras que en los roedores se compone de la ZP1, la ZP2 y la ZP3 (siendo la Zp4 un pseudogen). Se ha demostrado que en humanos la ZP1, la ZP3 y la ZP4 se unen a los espermatozoides viables e inducen una reacción acrosómica, lo que produce una fusión entre la membrana plasmática del ovulo y la membrana externa del acrosoma. Por otro lado, en los ratones, la ZP3 actúa como el receptor espermático primario (Dunbar *et al.*, 1994).



El folículo secundario se caracteriza por el desarrollo de la teca, en esta fase aparecen dos capas celulares en ella; una interna, constituida por células intersticiales, y una externa constituida por células musculares lisas. Este desarrollo también se acompaña de una vascularización a través de un proceso de angiogénesis. Por consiguiente, la sangre circula alrededor del folículo aportándole nutrientes y eliminando desechos, a la vez que permite la comunicación endocrina mediada por las gonadotropinas (**Figura 1**; Erickson, 1985; Honda *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2001; Ivin *et al.*, 1999; Palma *et al.*, 2012; Solovyeva *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2004).

Las glucoproteínas secretadas por el ovario como la activina, la inhibina y la folistatina juegan un papel clave en este desarrollo, ya que regulan la secreción de la FSH a nivel hipofisario. La inhibina la regula de manera inhibitoria, mientras que la activina la estimula, lo que induce la expresión del receptor a la FSH y de la actividad enzimática de la aromatasa en las células de la granulosa, lo que a su vez estimula la expresión del receptor a la LH. En el caso de la folistatina, funciona como antagonista de la activina y a su vez suprime la expresión del gen que codifica para la cadena β de la FSH. La expresión de los receptores a la FSH y a la LH en las células de la granulosa y las células de la teca, respectivamente, favorece la transición de los folículos secundarios a antrales (DePaolo *et al.*, 1992; Findlay, 1993; Gregory y Kaiser, 2004; Miró *et al.*, 1991; Orisaka *et al.*, 2021; Suszko *et al.*, 2003; Tetsuka *et al.*, 1995; Vendola *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 1997).

Durante la transición de la etapa preantral a la etapa antral temprana se forman múltiples espacios intercelulares llenos de líquido llamados cuerpos de *Call-Exner*, que eventualmente se agrandan y se fusionan en una sola cavidad conocida como el antro folicular (**Figura 1**). También se estimula la proliferación de las células de la granulosa y la expresión de los receptores a las gonadotropinas en mayor proporción. A partir de éste momento la FSH es esencial en la regulación del reclutamiento, el crecimiento y la latencia de los folículos, ya que determina el destino del folículo (crecimiento u atresia) posterior a la etapa preantral, mientras que la LH es indispensable para la maduración del folículo y para la síntesis de hormonas esteroideas durante la etapa antral (Cattanach *et al.*, 1977; Cheung *et al.*, 1997; Filicori *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 1997; McGee y Hsueh, 2000; Orisaka *et al.*, 2006; Orisaka *et al.*, 2009; Pangas *et al.*, 2014). Una vez que esto ocurre, los folículos son denominados como terciarios o folículos antrales, que tras el crecimiento preovulatorio son denominados como folículos de Graaf, mismos que pueden ser ovulados poco después (**Figura 1**; Conti *et al.*, 2002; Mehlmann, 2005; Wang, 2010).



Se ha descrito que en los mamíferos solo los folículos en los que se expresan en mayor proporción los receptores a la FSH y a la LH podrán sobrevivir y continuar desarrollándose como el o los folículos dominantes (Jolly *et al.*, 1994; Yding, 2011; Yding, 2016). La selección de éstos y la maduración final es regulada por las gonadotropinas, las hormonas esteroides, el factor de crecimiento similar a la insulina y un microambiente folicular apto (Fortune, 1994; Ginther *et al.*, 2001; Hattori *et al.*, 2018). Durante este periodo los ovocitos reanudan su desarrollo y avanzan hasta la metafase de la segunda división meiótica, en la que quedan arrestados hasta el momento de la fecundación, lo que depende de la especie (Fajer, 1983; McGee y Hsueh, 2000; Pan y Li, 2019).

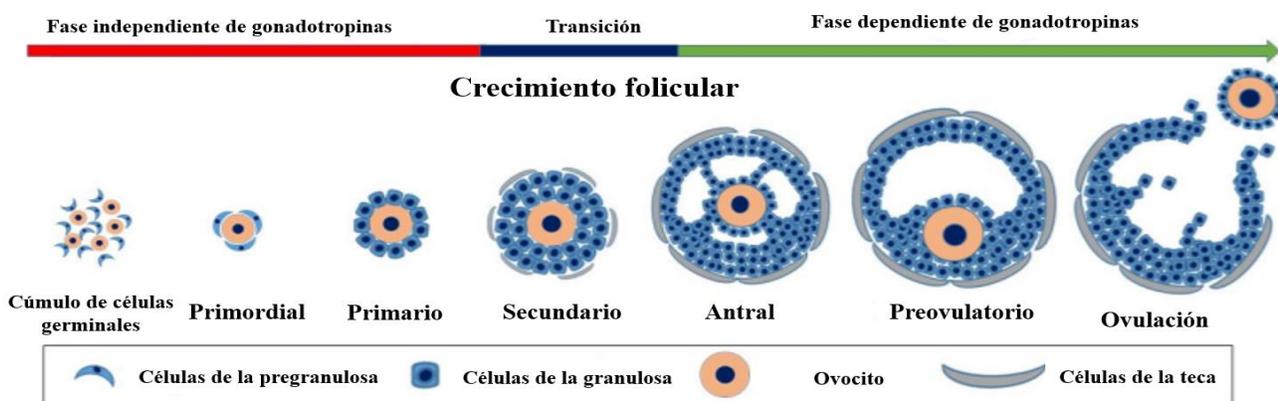


Figura 1. Etapas del desarrollo folicular en los mamíferos. A lo largo de la etapa independiente de gonadotropinas, los folículos primordiales se originan a partir de células germinales primordiales rodeadas por células de la pregranulosa. Durante esta etapa el desarrollo de los folículos es regulado por factores de crecimiento, los cuales promueven el crecimiento de los ovocitos y estimulan el cambio de las células aplanadas de la pregranulosa a células cuboideas de la granulosa. La progresión de los folículos primarios a los folículos secundarios incluye un mayor crecimiento del ovocito, la proliferación de las células de la granulosa para formar una segunda capa y el desarrollo de las células de la teca. El desarrollo de las últimas etapas depende en gran medida de las gonadotropinas, donde los folículos se reconocen por un tamaño más grande, más capas de células granulosas y el desarrollo del antro folicular, después de lo cual, los folículos ovulan o experimentan atresia (Modificada de Edson *et al.*, 2009).

La actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario y el ciclo estral

Las hembras de los roedores son consideradas sexualmente maduras entre los días 24 y 41 después del nacimiento, cuando presentan apertura vaginal e inicia su ciclo reproductivo, que se denomina ciclo estral (Caligioni, 2009; Rivest, 1991). La palabra “estro” es una adaptación latina de la palabra griega “oistros” que significa estación sexual, picadura o frenesí y que fue utilizada para describir el período de deseo sexual que presentan las hembras. Aunado a esto, se implementaron algunos prefijos; pro, di-



y met junto con el sufijo *estrus* para diferenciar a las diferentes etapas que componen al ciclo (Heape, 1900; Mandl y Zuckerman, 1951). El ciclo estral tiene una duración de entre 4 y 5 días y es el resultado de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Barbacka-Surowiak, 2003; Long y Evans, 1922; Mandl, 1951). La fluctuación de las hormonas sintetizadas por los componentes de dicho eje resulta en cambios en la composición del epitelio vaginal y la receptividad sexual, lo que puede observarse como etapas con distinta duración: metaestro (diestro-1), diestro (diestro-2), proestro y estro (**Figura 2**; Butcher *et al.*, 1974; Dazzi *et al.*, 2006; Freeman, 2006; Gallo, 1981, Mandl, 1951a-b).

A lo largo del ciclo, la mucosa vaginal de las ratas presenta diversos cambios como la proliferación, la apoptosis y la diferenciación de sus células, así como el recambio de la matriz extracelular y la infiltración de los leucocitos (Byers *et al.*, 2012; Heape, 1900; Long y Evans, 1922). El diestro-1 tiene una duración de 6 a 8 horas y el diestro-2 de 55 a 57 horas. El tipo celular que predomina en los exudados vaginales son los leucocitos, que son pequeños y con un citoplasma granular, también pueden aparecer células epiteliales nucleadas en menor proporción. La presencia de los leucocitos se debe a una respuesta inflamatoria y a que el tejido celular en las etapas anteriores se degrada y posteriormente es reparado. Por otro lado, el comportamiento sexual característico durante estas etapas es que la hembra no es sexualmente receptiva e inclusive es violenta si el macho intenta la cópula (Astwood, 1939; Long y Evans, 1922; Mandl, 1951).

Durante estas etapas la FSH y la LH se secretan siguiendo un patrón ultradiano, que se caracteriza por pulsos con una periodicidad de entre 30 y 60 minutos. La amplitud de éstos es distinta, ya que la de la FSH es de entre 150 y 220 ng/mL, mientras que la de la LH es de entre 15 y 40 ng/mL. Esto estimula el desarrollo de los folículos ováricos y la síntesis de las hormonas esteroideas, como el estradiol y la progesterona (Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 2006; Gallo, 1981; Irvine y Alexander 1997; Miro *et al.*, 2004). Los folículos que se encuentran en desarrollo secretan estradiol, que mantiene una concentración de aproximadamente 37 pg/mL durante el diestro-1 y hasta el mediodía del diestro-2, cuando incrementa a alrededor de 88 pg/mL. En el caso de la progesterona, su concentración incrementa gradualmente a partir de la mañana del diestro-1, de entre 2 y 9 ng/ml hasta aproximadamente 24 ng/mL durante la madrugada del diestro-2. Éste incremento representa la vida funcional del cuerpo lúteo, que es la estructura ovárica que lo sintetiza después de la ovulación y que prepara al útero engrosándolo con el fin de recibir a los embriones en caso de que haya ocurrido la fecundación, también inhibe sus contracciones, que de otro modo harían que el cuerpo rechazara al embrión. Si no se realizó la



implantación la concentración de esta hormona decrece debido a la regresión del cuerpo lúteo (Butcher *et al.*, 1974; Eto *et al.*, 1962; Freeman, 2006; Gallo, 1981; Irvine y Alexander 1997; Klein y Schwartz, 1999; Miro *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 1969; Wiest *et al.*, 1963).

La etapa del proestro tiene una duración promedio de 12 a 14 horas y las células que predominan en la vagina son las epiteliales nucleadas, las cuales son redondas con un núcleo bien definido. También pueden aparecer algunas células epiteliales cornificadas, lo que depende de la hora en la que haya sido tomada la muestra. Durante esta etapa el comportamiento de la rata cambia, ya que incrementa su apetito sexual y en algunos casos permite la cópula (Astwood, 1939; Long y Evans, 1922; Mandl, 1951).

Durante esta etapa la concentración hormonal cambia drásticamente ya que se activa a la enzima aromatasa, que participa en la conversión de andrógenos (androstenediona y testosterona) a estrógenos (estrone y estradiol) en las células de la granulosa de los folículos ováricos. Esto favorece el incremento de la concentración de estradiol, que alcanza su punto máximo entre las 10:00 y las 12:00 horas, para posteriormente decrecer entre las 18:00 y las 23:00 horas. Dicho incremento es el resultado de la actividad de las células de la granulosa del folículo preovulatorio (Shaikh, 1971; Yoshinaga *et al.*, 1969). La concentración de la testosterona y de la androstenediona tienen un patrón similar al del estradiol (Dupon y Kim, 1973; Gay y Tomacari, 1974). En el caso de la progesterona, su concentración incrementa alrededor de las 15:00 horas y alcanza su máximo, de 46 ng/mL, entre las 18:00 y las 21:00 horas. Cabe mencionar que el incremento en la concentración de esta hormona ocurre casi de manera simultánea que el incremento de las gonadotropinas (Eto *et al.*, 1962; Hashimoto *et al.*, 1968; Hashimoto y Wiest, 1969; Hilliard, 1973). La concentración de la FSH incrementa hasta los 600 ng/ml y la de la LH hasta los 1800 ng/mL, evento que es denominado como el pico preovulatorio de las gonadotropinas (Butcher *et al.*, 1974; Daane y Parlow, 1971a; Fox y Smith, 1985; Gallo, 1981; Gay *et al.*, 1970; Irvine y Alexander 1997; Smith y Freeman *et al.*, 1975). Dicho suceso estimula el crecimiento final de los folículos antrales, así como su ruptura y la consecuente liberación del ovocito, que ocurre horas más tarde al inicio de la etapa del estro (Butcher *et al.*, 1974; Gallo, 1981; McGee y Hsueh, 2000; Miro *et al.*, 2004).

El estro tiene una duración de 25 a 27 horas y se caracteriza porque en el epitelio vaginal predominan las células epiteliales cornificadas. Estas no presentan un núcleo y contienen un citoplasma granular de forma irregular debido a que el estradiol posee un efecto proliferativo sobre las células del epitelio vaginal e induce su queratinización (Astwood, 1939; Byers *et al.*, 2012; Heape, 1900; Long y Evans, 1922; Mandl, 1951). Durante la mañana del estro la concentración de la LH en el plasma se encuentra



en condiciones basales. Sin embargo, la concentración de la FSH presenta un segundo pico, el cual estimula el reclutamiento folicular para los ciclos posteriores. En el caso de la concentración del estradiol, se mantiene basal, entre 17 y 23 pg/ml. De igual forma, la concentración de la progesterona se encuentra en condiciones basales de entre 2 y 9 ng/ml (Butcher *et al.*,1974; Daane y Parlow, 1971a-b; Fox y Smith, 1985; Gallo, 1981; Gay *et al.*, 1970; Irvine y Alexander 1997; Smith y Freeman *et al.*, 1975).

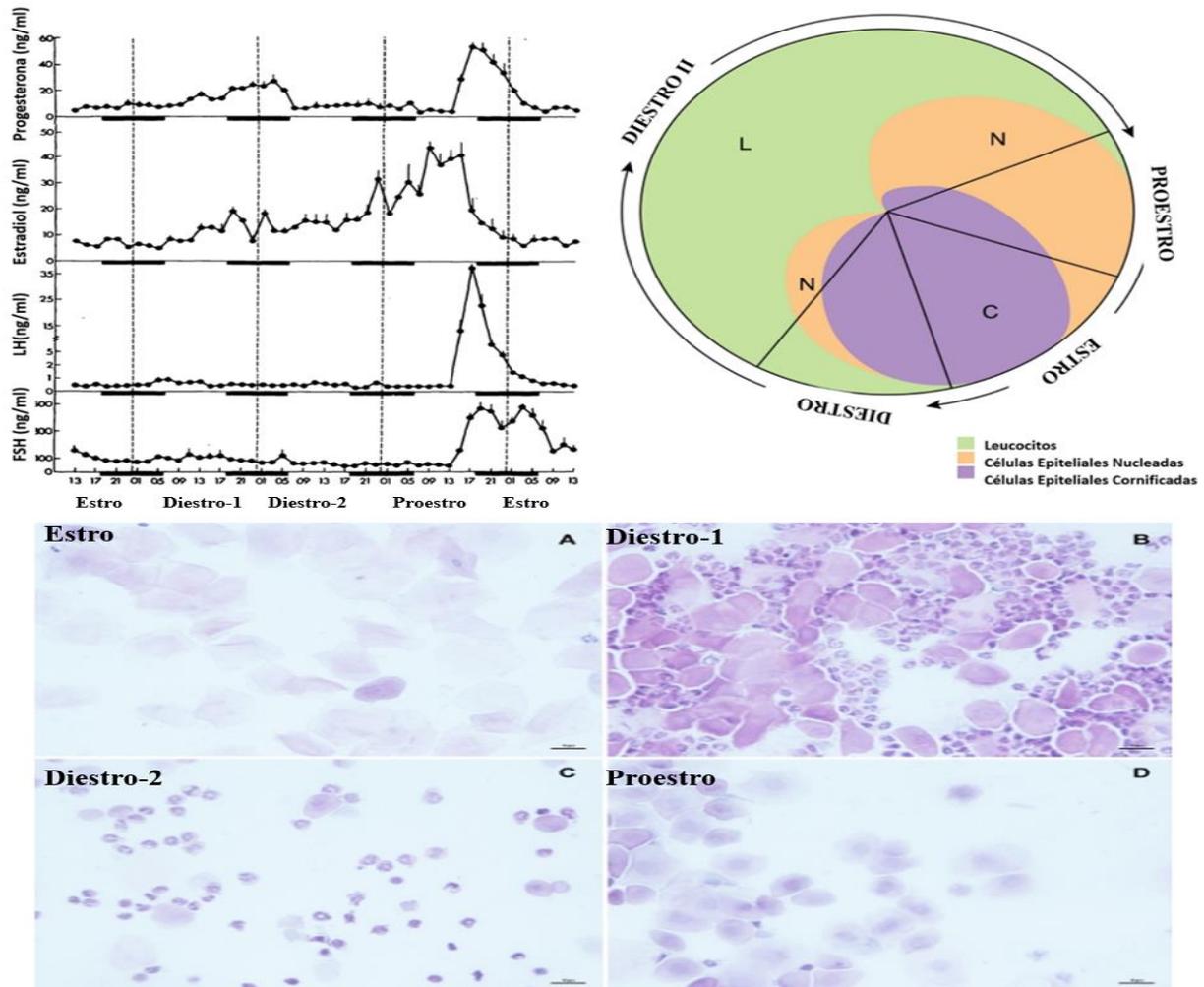


Figura 2. El patrón de concentración de la hormona estimulante de los folículos (FSH), la hormona luteinizante (LH), el estradiol y la progesterona en una rata con un ciclo estral de 4 días de duración. Las barras negras representan el período de oscuridad (1800-0600 h) y las líneas discontinuas indican la medianoche. Cada punto del gráfico representa la concentración media de hormonas y las líneas verticales que atraviesan cada punto representan el error estándar. Las etapas del ciclo estral de los roedores y el tipo característico de células que se encuentran en el epitelio vaginal en cada una: leucocitos (L), células epiteliales nucleadas (N) y células epiteliales cornificadas (C) modificada de Ajayi y Akhigbe, 2020; Silva *et al.*, 2020; Smith *et al.*, 1975).



Como se mencionó, en esta etapa ocurre la ruptura del folículo mediada por el pico preovulatorio de las gonadotropinas. Esta ruptura inicia en el estigma avascular, el cual se encuentra dentro de la pared folicular. La LH estimula la actividad del gen que favorece la síntesis de la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), e induce a las células de la teca a sintetizar colagenasa que hidroliza al colágeno intracelular y debilita la pared folicular. La hidrólisis del colágeno se acompaña de una respuesta inflamatoria y de la secreción de otra prostaglandina, lo que provoca la constricción de los vasos sanguíneos locales, causando isquemia y muerte celular, esto debilita aún más la pared del folículo. El líquido que se encuentra dentro de la cavidad antral ejerce presión, en consecuencia, la pared del folículo se rompe en la zona en la que se encuentra más delgada, denominada estigma. Esto resulta en la expulsión del ovocito, rodeado por las células de la granulosa del cúmulo oóforo (ahora llamado corona radiada), evento denominado como ovulación (Freeman, 2006; Lydon *et al.*, 1995; Mulac-Jericevic y Conneely, 2004; Park *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 2002).

Una vez que el folículo ha ovulado, se pierde la integridad de la membrana basal, se remodela el tejido y los vasos sanguíneos que se originan en la vasculatura de la teca vascularizan a la capa de las células de la granulosa, lo que resulta en el inicio de la formación del cuerpo lúteo. En éste se encuentran células esteroideogénicas, fibroblastos, células inmunitarias y células endoteliales (Fraser y Wulff, 2003; Retamales *et al.*, 1994). Durante las próximas horas, se inicia la angiogénesis y una red de capilares se extiende por todo el tejido del cuerpo lúteo diferenciado, el proceso de neovascularización es regulado por la secreción de la LH (Fraser y Lunn, 2001). Esto se debe a que la LH activa a las metaloproteinasas de la matriz, las cuales degradan a la matriz extracelular que se encuentra asociada con los vasos sanguíneos. Por otro lado, se estimula la síntesis del factor de crecimiento del endotelio vascular, así como las angiopoyetinas 1 y 2, que son de particular importancia para la estabilización y desestabilización de los vasos sanguíneos, respectivamente (Duncan *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2005).

Ya formado el cuerpo lúteo comienza a secretar progesterona en mayor concentración a la del estradiol. Estas hormonas son las principales implicadas en estimular la actividad secretora del endometrio uterino y el mantenimiento de su vascularización, respectivamente (Arioua *et al.*, 1997). Hasta el momento se han descrito cuatro tipos de cuerpos lúteos en los mamíferos. El primero se forma durante el ciclo ovárico que no culmina en el embarazo. El segundo, llamado cuerpo lúteo del embarazo, se encuentra en todos los mamíferos ya que es esencial para la implantación y para el mantenimiento del embarazo. El tercero, el cuerpo lúteo del pseudoembarazo y el cuarto, el cuerpo lúteo de la lactancia,



que se encuentra en especies que ovulan inmediatamente después de dar a luz (Pangas *et al.*, 2006; Stocco *et al.*, 2007).

Las células esteroideogénicas del cuerpo lúteo se han clasificado de acuerdo con su tamaño en células pequeñas y células grandes (Wiltbank y Niswender, 1992). Las primeras provienen de las células de la teca interna y tienen un diámetro de entre 10 y 22 μm . Éstas constituyen aproximadamente del 20 % del volumen total del cuerpo lúteo. Por otro lado, las células lúteas grandes provienen de células granulosas que se hipertrofian, pero no se multiplican, lo que resulta en un diámetro de aproximadamente 25 μm . Las células grandes representan alrededor del 50 % del volumen del cuerpo lúteo y el resto del volumen de éste corresponde a fibrocitos, células endoteliales, pericitos y células de diferentes estirpes (Farin *et al.*, 1986; Hansel *et al.*, 1991; Wiltbank y Niswender, 1992).

Durante la fase lútea, la LH actúa sobre las células pequeñas para producir andrógenos, que posteriormente se convierten a estrógenos en las células lúteas grandes, debido a que estas células contienen a *P450 aromatasa* y responde al estímulo de la FSH (Sanders y Stouffer, 1997). En un inicio este proceso era contradictorio, ya que mostraron que la FSH no estimulaba la síntesis del estradiol durante la fase lútea, ya sea *in vivo* o *in vitro* (Devoto *et al.*, 1989). Estudios posteriores mostraron que, al inyectar a la FSH en hembras durante la fase lútea media, incrementa la concentración de estradiol y de inhibina. Por otro lado, las altas concentraciones de inhibina, de progesterona y de estradiol inhiben la secreción de la GnRH durante la fase lútea, lo que detiene el desarrollo folicular (Adams *et al.*, 2017; Devoto *et al.*, 2002; Groome *et al.*, 1996; Hillier, 2001; Messinis *et al.*, 1996).

En caso de que no se haya dado la fecundación del ovocito, el cuerpo lúteo degenera durante la fase lútea tardía, un proceso llamado luteólisis que depende de la apoptosis (Rolaki *et al.*, 2005). Esta es ocasionada por la secreción pulsátil de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, la cual actúa sobre el cuerpo lúteo ocasionando cambios que conducen a su degeneración (Silvia *et al.*, 1991). El mecanismo por el cual se inicia la síntesis y la secreción de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ depende de la interacción entre el cuerpo lúteo, los folículos ováricos y el útero (McCracken *et al.*, 1984). La degeneración del cuerpo lúteo inicia con la reducción del flujo sanguíneo hacia éste, mediado por la $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina (Knickerbocker *et al.*, 1988) o por la endotelina-1 vasoconstrictora (Ohtani *et al.*, 1998), ya que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ reduce la red de capilares al inducir la degeneración de las células endoteliales (Niswender *et al.*, 2000).



Se ha observado que en las ovejas y en las vacas la secreción pulsátil de la oxitocina por parte de la hipófisis estimula la secreción de la PGF2 α . El primer pulso de la PGF2 α es de baja magnitud, lo que estimula la secreción de la oxitocina de origen lúteo. De esta manera se establece un mecanismo de retroalimentación estimulante entre estos factores. Por otro lado, el estradiol promueve la síntesis del receptor a la oxitocina, al mismo tiempo que la alta concentración de oxitocina induce la desensibilización a esta en el endometrio, por lo que se detiene su secreción. El intervalo entre los pulsos de la PGF2 α es determinado por la pérdida de la sensibilidad del endometrio a la oxitocina y por el tiempo que tarda en recuperarla. De esta manera, el mecanismo de retroalimentación estimulante se interrumpe y se restablece aproximadamente 6 horas después, tiempo suficiente para que el endometrio recupere la sensibilidad a la oxitocina. Debido a esto, los pulsos de la PGF2 α se presentan con un intervalo de 6 a 8 horas, lo que continua hasta que degenera el cuerpo lúteo en su totalidad (Silvia *et al.*, 1991).

La hormona liberadora de las gonadotropinas y su receptor

Los factores que regulan la ovulación comenzaron a dilucidarse debido a experimentos que realizaron diversos investigadores, en los cuales mostraron que la estimulación eléctrica del hipotálamo, pero no de la hipófisis, inducía la ovulación. Este efecto se inhibe si antes de la estimulación se seccionan los capilares sanguíneos y las terminales nerviosas que inervan a la hipófisis. De esta manera, se mostró que es necesaria una conexión intacta entre el hipotálamo y la hipófisis para el mantenimiento de la función gonadal. Con base en ello, se postuló que las terminales neuronales situadas en la eminencia media (EM) podrían ser el origen de factores humorales que se sintetizan en el cerebro y posteriormente son transportados a través del sistema portal para regular la actividad de la hipófisis. En ese entonces, sin embargo, no se habían identificado de manera concluyente las moléculas involucradas, a las que actualmente nos referimos como factores de secreción hipotalámicos (Harris, 1948a; 1948b; Stephen, 1974).

La existencia de la GnRH se dedujo a partir de experimentos que mostraron que los extractos hipotalámicos contienen factores que estimulan la secreción de la LH y la FSH (Schally *et al.*, 1970). Inicialmente se creía que existían dos factores, uno que estimulaba la secreción de la LH y otro la de la FSH (LH-RF y FSH-RF, respectivamente; Schally *et al.*, 1971). Sin embargo, solo se encontró una molécula, la cual fue purificada a partir de extractos hipotalámicos de cerdos y de ovejas (Amoss *et al.*, 1971; Schally *et al.*, 1971). Posterior a su síntesis, se realizaron experimentos en los cuales se administró



a la GnRH sintética a ratas OVX que fueron tratadas con estradiol, lo cual resultó en un incremento de la concentración sérica de la LH y la FSH (Schally *et al.*, 1972). Resultados semejantes fueron obtenidos al agregar a la GnRH en cultivos hipofisarios de rata y de ratón, por lo que se concluyó que esta molécula era la responsable de estimular la secreción de ambas gonadotropinas (Charlton *et al.*, 1983; Mittler *et al.*, 1970; Redding *et al.*, 1972).

La GnRH ha sido llamada de diferentes formas como LH-RH, gonadoliberina y luliberina. En la mayoría de los vertebrados existen al menos dos, y generalmente tres formas de éste decapeptido, estas incluyen a la GnRH-I (descrita en mamíferos), la GnRH-II (descrita en pollos) y la GnRH-III (descrita en lampreas). Por otro lado, con base en los resultados obtenidos en estudios genómicos y filogenéticos se ha propuesto que en los vertebrados existen cuatro tipos de la GnRH (Cheng y Leung 2005; Desaulniers *et al.*, 2017; Kavanaugh *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Millar, 2005; Okubo y Nagahama, 2008; Sower *et al.*, 2012). Hasta la fecha se han identificado más de 20 isoformas de éste decapeptido entre las diversas especies de vertebrados y protocordados, las cuales se han conservado durante millones de años de evolución. La GnRH que posee actividad hipofisiotrófica, sin embargo, es un decapeptido conformado por los siguientes aminoácidos: Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH. Las diferentes isoformas de la GnRH conservan las secuencias de los aminoácidos del extremo N-terminal (pGlu-His-Trp-Ser) y C terminal (Pro-Gly-NH₂) del decapeptido. En el caso de los mamíferos, el fragmento central (Tyr-Gly-Leu-Arg) es el que presenta ligeras variaciones (Falk *et al.*, 2006; Mason *et al.*, 1986; Matsuo *et al.*, 1971; Millar *et al.*, 2004; Millar, 2005; Okubo y Nagahama, 2008; Schally *et al.*, 1972).

En los humanos, el gen *GNRHI* se ubica en el cromosoma 8 y codifica para un péptido precursor de 92 aminoácidos llamado pre pro-GnRH, el cual incluye un péptido señal (de 23 aminoácidos), los 10 aminoácidos de la GnRH, una señal de amidación o procesamiento proteolítico (3 aminoácidos) y un péptido asociado a la GnRH (de 56 aminoácidos) (Russell y White, 1999). La correcta transcripción de este gen es fundamental para que los mamíferos presenten actividad reproductiva, en caso de que se exprese una mutación en dicho gen los mamíferos presentarían hipogonadismo hipogonadotrópico, no obstante, sus funciones reproductivas pueden ser restauradas mediante terapia génica (Mason *et al.*, 1986), administración de GnRH-1 o el trasplante de neuronas fetales de la GnRH (Gibson, 1984). En el caso de los humanos, el hipogonadismo puede ser revertido mediante la administración de la GnRH de



manera pulsátil, lo que muestra que la fertilidad depende del correcto patrón en la secreción de éste péptido (Santoro *et al.*, 1986; Stamatiades *et al.*, 2019; Tsutsumi y Webster, 2009; Wildt *et al.*, 1981).

La GnRH es sintetizada por neuronas distribuidas en diversas áreas del encéfalo, como lo son el septum medial, el POA, el órgano vasculoso de la lámina terminal, el área hipotalámica anterior y la eminencia media. Cabe destacar que la población de las neuronas que sintetizan a la GnRH es relativamente pequeña, de entre 800 a 1000 en ovejas, de entre 1500 y 2000 en el ser humano y aproximadamente 1300 en la rata (Campbell, 2018; Desaulniers *et al.*, 2017; Dufour *et al.*, 1988; Katsiya *et al.*, 1986; Nance *et al.*, 1977; Schally *et al.*, 1971; Wood *et al.*, 1992; Wray y Hoffman, 1986). Estas neuronas se diferencian en la placa olfativa durante el desarrollo embrionario y migran siguiendo una ruta de señalización química que a su vez dirige el desarrollo del sistema olfativo (Fueshko y Wray 1994; Wierman *et al.*, 2011). En los roedores, la presencia de las neuronas de la GnRH se observa por primera vez en el día 10 del desarrollo embrionario. Posteriormente, en el día embrionario 13 se ubican en la periferia de la placa cribiforme para así llegar al hipotálamo entre los días 14 y 15, donde adoptaran su posición final alrededor del día 16 (Mellon, 1990; Schwanzel-Fukuda y Pfaff 1989).

La ruta migratoria antes descrita ha sido confirmada en los roedores y en los primates (Kim, 1999; Ronnekleiv, 1990), sin embargo, existen sutiles diferencias anatómicas entre los roedores y otros mamíferos, como en los primates, las cobayas y los ungulados, pero la distribución que se encuentra en sentido rostro-caudal es similar. A pesar de su distribución dispersa, las neuronas individuales de la GnRH poseen axones excepcionalmente largos, los cuales permiten que la mayoría de ellas proyecten a la eminencia media (Herde *et al.*, 2013; King *et al.*, 1982). En el hipotálamo, las neuronas de la GnRH proyectan sus terminales axonales hacia distintas regiones del encéfalo. Los axones de aquellas neuronas que se originan entre el POA y el septum medial forman el tracto septo-preóptico-infundíbular, que inerva al órgano vasculoso de la lámina terminal y a la eminencia media (Barry, 1979; Braak y Braak, 1992; Merchenthaler *et al.*, 1980; Merchenthaler *et al.*, 1984; Plant, 2015). Esta población neuronal también se comunica con otras estructuras como la banda diagonal de Broca, el tubérculo olfatorio, el bulbo olfatorio, la estría terminal, la estría medular, la estría longitudinal medial y lateral, el tálamo, la fimbria del hipocampo, el haz medial del prosencéfalo, la comisura posterior y la corteza piriforme (**Figura 3**, Bennett-Clarke y Joseph, 1982; Hoffman *et al.*, 1978; Hoffman *et al.*, 1982; Ibata *et al.*, 1979; Krisch 1980; Krey y Silverman, 1978; Sétáló *et al.*, 1976).



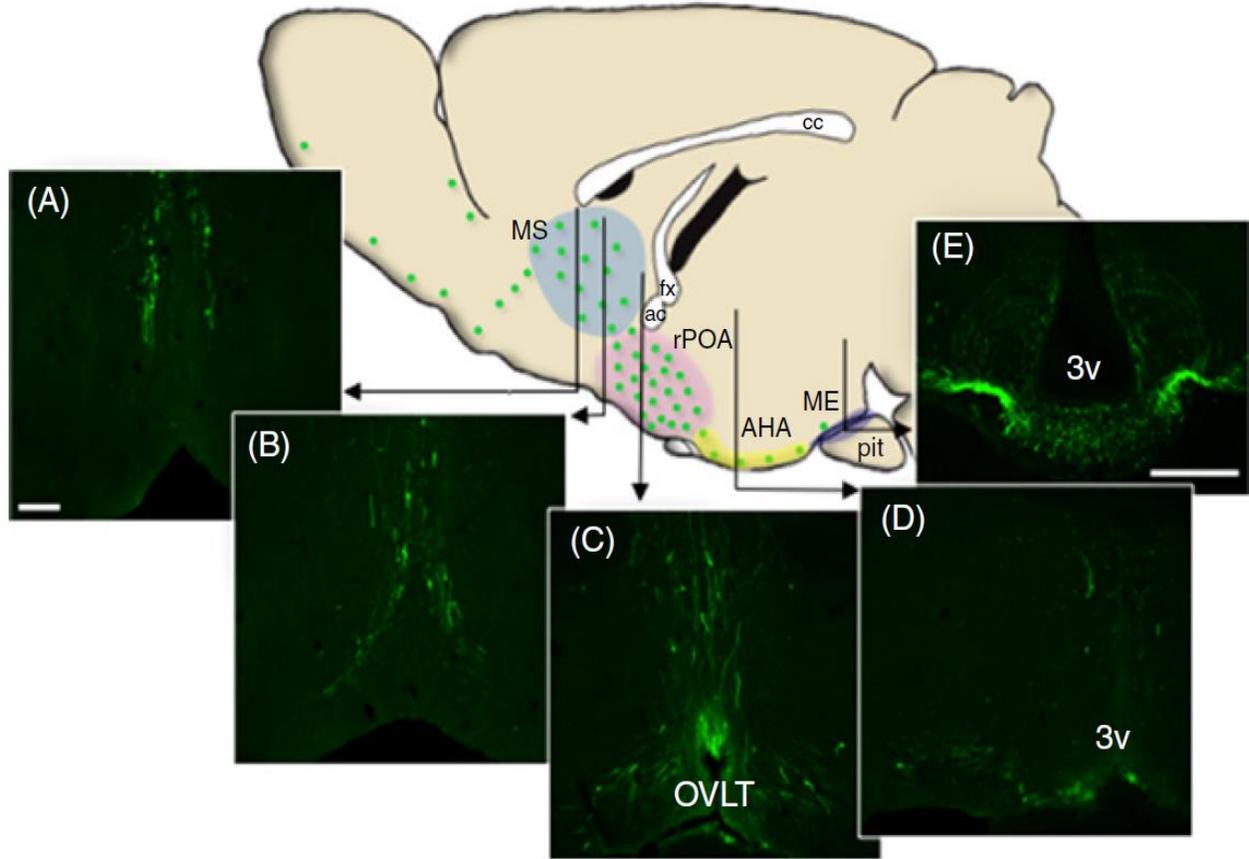


Figura 3. Esquema sagital del cerebro de un roedor que representa la distribución de las neuronas de la GnRH (puntos verdes). Las zonas de colores muestran las áreas descritas por la presencia de neuronas de la GnRH en la región septal medial (MS, azul), el área preóptica rostral (rPOA, rosa) y el área hipotalámica anterior (AHA, amarillo) (Fx) fórnix, (ac) comisura anterior, (cc) cuerpo calloso. Las líneas verticales indican la ubicación rostral a caudal de imágenes confocales en cortes coronales del cerebro de un ratón transgénico. Los somas y sus proyecciones se pueden observar a través del tabique medial rostral (A), extendiéndose en una distribución en la zona preóptica rostral (B) y rodeando al órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT) (C) así como dos poblaciones ventrolaterales a ambos lados del tercer ventrículo (3v) en el AHA. (D) se muestra una población unilateral al 3v (E) y las terminales nerviosas se proyectan desde la mayoría de las neuronas de la GnRH hacia la zona externa de la eminencia media (ME) donde el decapeptido se secreta a la vasculatura portal de la hipófisis (Figura tomada de [Herbison et al., 2018](#)).

Algunos estudios de cultivos organotípicos en los cuales se utilizó el POA de ratones recién nacidos han mostrado que el hipotálamo medio basal secreta factores quimio atrayentes para los axones de la GnRH ([Gibson et al., 2000](#); [Perrett y McArdle, 2013](#)). Esto es entendible ya que se ha mostrado que las neuronas que regulan la secreción de las gonadotropinas se ubican en el POA. Evidencia al respecto proviene de un estudio en el cual se lesionaron diferentes zonas del encéfalo de manera bilateral, estas fueron el POA dorsal, el POA ventral, el hipotálamo anterior y el hipotálamo ventromedial. Los



resultados obtenidos muestran que la tasa de animales ovulantes no se modificó al lesionar el hipotálamo anterior o el hipotálamo ventromedial, en cambio, la lesión del POA dorsal redujo la tasa de animales ovulantes en un 33%, y la lesión del POA ventral inhibió en su totalidad la ovulación (Campbell, 2018; Nance *et al.*, 1977).

La GnRH que es sintetizada en somas neuronales ubicados en el POA y posteriormente es transportada a través de sus axones hasta la eminencia media, en la que es vertida a nivel del sistema portal hipotalámico-hipofisario, que representa una conexión funcional entre la eminencia media y la adenohipófisis (Figura 4, Braak y Braak, 1992). La arteria hipofisaria superior se divide en una extensa red de capilares en la zona externa de la eminencia media, donde la sangre es transportada por sinusoides que convergen en las venas del sistema portal. Éstos atraviesan el tallo hipofisario llegando a la hipófisis anterior, en las porciones laterales de la glándula lugar donde se ubican los gonadotropos, las células blanco de la GnRH, que constituyen aproximadamente el 10% de la población de las células presentes en esta zona. La GnRH se une específicamente a su receptor (GnRH-R), lo que estimula la síntesis y secreción de las gonadotropinas, ya sea de la LH, la FSH o ambas (Andrews y Conn, 1986; Bédécarrat y Kaiser, 2003; Kakar *et al.*, 1992; Kirk, 1994; Plant, 2015; Stamatiades y Kaiser, 2019). Estudios inmunohistoquímicos han mostrado que aproximadamente el 15% de las células gonadotropas solo sintetizan y secretan LH o FSH, en cambio, el porcentaje de gonadotropos que sintetizan y secretan ambas gonadotropinas es de alrededor del 70%. Este porcentaje cambia en diferentes condiciones fisiológicas, como la castración o las fluctuaciones hormonales durante el ciclo estral (Moriarty, 1976; Stanton *et al.*, 1996).

Las gonadotropinas están conformadas por dos subunidades de proteínas, la α y la β . La subunidad α , de 92 aminoácidos, es común tanto para la LH como para la FSH. La subunidad β para la LH (LH- β) y la FSH (FSH- β) tiene 121 y 117 aminoácidos de longitud, respectivamente, y explica la especificidad biológica de estas dos hormonas. En los roedores, la frecuencia alta en la secreción de la GnRH estimula la transcripción del gen que codifica para la LH- β , mientras que las frecuencias más bajas dan como resultado una mayor síntesis de la FSH- β (Dalkin, 1989; Dickinson *et al.*, 2009; Horvath *et al.*, 1993; Stanton *et al.*, 1996). Aunque la GnRH estimula la síntesis y secreción de ambas gonadotropinas, la concentración de éstas no es la misma a lo largo de los ciclos ovulatorios. Se ha reportado que en los primates hay una mayor concentración de la FSH en la fase folicular temprana, mientras que la de la LH es mayor en la fase folicular tardía. La alternancia en la concentración de estas



hormonas es indispensable para la maduración folicular, la síntesis de hormonas esteroideas y la ovulación (Marshall *et al.*, 1983; Rama Raju *et al.*, 2013). Estudios realizados en monos OVX han mostrado una disminución en la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH, lo cual resulta en un aumento del 65% en la concentración de la FSH en plasma y en un decremento del 50% en la de la LH (Wildt *et al.*, 1981). Patrones semejantes han sido descritos en la oveja (Clarke y Cummins, 1985) en la rata (Lambalk *et al.*, 1988) y en la mujer (Gross *et al.*, 1987; Spratt *et al.*, 1987).

Para que la GnRH estimule la síntesis y la secreción de las gonadotropinas debe ser secretada de manera pulsátil, lo cual ocurre aproximadamente cada hora en respuesta a la despolarización conjunta de los somas ubicados principalmente en el POA (Belchetz *et al.*, 1978; Knobil *et al.*, 1980; Stamatiades *et al.*, 2019; Wildt *et al.*, 1981). Una vez secretada al sistema portal hipotalámico-hipofisario, la GnRH se degrada rápidamente mediante proteólisis enzimática, su vida media es de entre 2 y 4 minutos (Glanowska y Moenter, 2015; Wildt *et al.*, 1981). Los pulsos individuales de la GnRH son acompañados de cerca por un pulso correspondiente de la LH y/o la FSH (**Figura 4**; Kawakami *et al.*, 1982; Silverman *et al.*, 1986; Wilson *et al.*, 1984). Uno de los diversos mecanismos que modula la secreción diferencial de la LH y la FSH en respuesta a los cambios de la frecuencia en la secreción de la GnRH, es la variación en el número de los GnRH-R en la superficie de los gonadotropos (Stanton *et al.*, 1996; Yuji *et al.*, 1996).



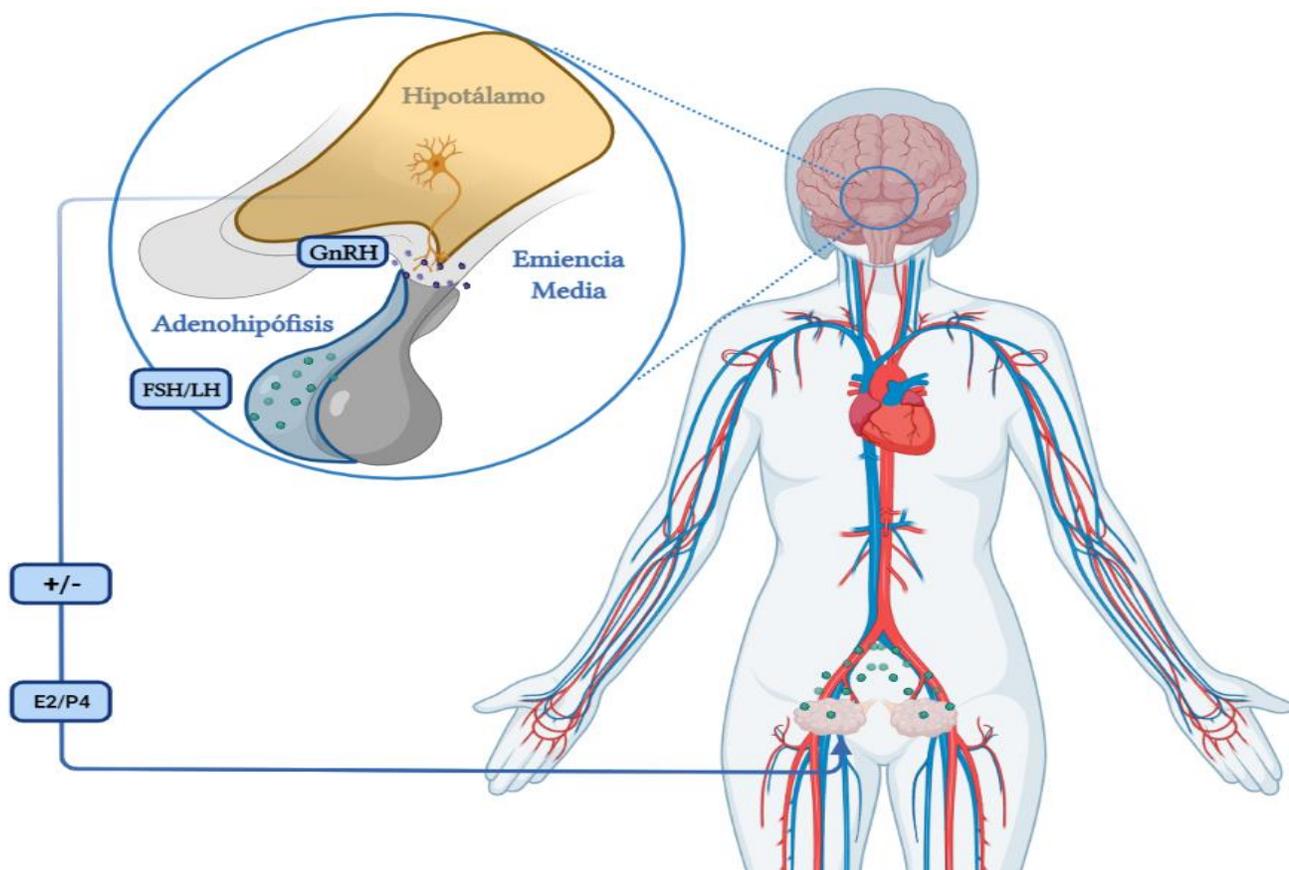


Figura 4. En el hipotálamo se ubican a las neuronas de la GnRH, que proyectan sus axones hacia la eminencia media, donde secretan a este decapeptido. Posteriormente, éste llegara a sus receptores en los gonadotropos, ubicados en la adenohipófisis, donde estimulan la síntesis y la secreción de las gonadotropinas (la hormona luteinizante; LH y la hormona estimulante de los folículos; FSH). Posteriormente, serán transportadas por la circulación general hasta llegar a su órgano blanco, los ovarios, donde estimulan la síntesis y la secreción de las hormonas esteroideas (estradiol y progesterona). A su vez estas hormonas retroalimentan de manera estimulante e inhibitoria la secreción de la GnRH. (Figura elaborada por Carlos Contreras 2022)

El GnRH-R es un miembro de la familia de los receptores metabotrópicos con siete dominios hidrofóbicos y transmembranales que están unidos a bucles extra e intracelulares con estructuras helicoidales. El extremo COOH-terminal del receptor está unido a una cola de aminoácidos que es particularmente corta que regula la desensibilización rápida del receptor (Cheng y Leung, 2005; Tsutsumi *et al.*, 1992). La unión de la GnRH al receptor depende de los dominios transmembranales, mientras que la activación de este último depende del dominio NH₂-terminal, mientras que otros residuos pueden alterar la conformación de la GnRH (Padula, 2005). La interrupción de los enlaces disulfuro del receptor disminuye significativamente la afinidad por su ligando, ya que éste interactúa con la cara extracelular del receptor, induciendo un cambio conformacional para convertirlo a su estado activo (Fernald y White, 1999).



El GnRH-R actúa principalmente a través de las proteínas $G\alpha_{q/11}$, aunque también puede actuar por medio de las proteínas $G\alpha_i$ y $G\alpha_s$ para activar la fosfolipasa C, lo que incrementa la entrada de Ca^{2+} en los gonadotropos a través de canales iónicos y la activación de la calmodulina (una proteína mensajera de unión al calcio). Simultáneamente, el diacilglicerol amplifica la acción de la calmodulina para incrementar la secreción de las gonadotropinas (Millar *et al.*, 2004). De esta manera se eleva la concentración citoplasmática del Ca^{2+} y se activan a las isoenzimas de la proteína quinasa C (PKC). El incremento en la concentración de Ca^{2+} es el principal estimulante en la secreción de la LH (Hislop *et al.*, 2000; McArdle *et al.*, 2002). El GnRH-R también puede activar otras vías que dependen de segundos mensajeros como el AMPc y la PKA (Lariviere *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 2008; Naor, 1999). Se ha informado que el GnRH-R se acopla a las proteínas $G\alpha_s$, que activan la producción del AMPc y, a su vez, la expresión de la LH β (Stanislaus *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002).

La unión de la GnRH a su receptor también resulta en la producción de diacilglicerol, que a su vez estimula la cascada de la proteína cinasa de activación mitogénica (MAPK), que implica la activación de la PKC, la cual aumenta la transcripción del gen que codifica para la LH β y la FSH β (Harrison *et al.*, 2004). Por otro lado, los efectos del decapeptido sobre la síntesis de las gonadotropinas son mediados por la estimulación de la vía MAPK, particularmente la vía ERK, que es dependiente de PKC. Estos factores regulan los efectos transcripcionales de la LH β y la FSH β (Harris *et al.*, 2002; Kanasaki *et al.*, 2002; Mulvaney y Roberson, 2000; Wang *et al.*, 2008). Por otro lado, hay informes contradictorios de que la regulación de la expresión de la LH β es independiente de ERK y es regulada únicamente por el Ca^{2+} (Ferris *et al.*, 2007; Kowase *et al.*, 2007).

Como se mencionó, la secreción pulsátil de la GnRH depende de cambios en la polaridad de la membrana celular de las neuronas que la sintetizan, ya que esta sigue patrones particulares que se modifican en función del tiempo. La variación en los patrones de disparo puede ser regulada por factores intrínsecos a la neurona, pero también por la acción de neurotransmisores secretados por neuronas aferentes, que comunican información con respecto a la disponibilidad de energía, el estrés, los ritmos circadianos, el fotoperíodo, estímulos sociales y feromonas (Bédécarrats y Kaiser, 2003; Hoffman *et al.*, 1978; Sétáló *et al.*, 1976).

Cabe mencionar que el sistema GnRHérgico presenta asimetrías anatómicas y funcionales, por ejemplo, la concentración de éste decapeptido es mayor en el hemisferio derecho del hipotálamo de la rata hembra que en el izquierdo (Duboc *et al.*, 2015; Gerendai y Halász, 1997). Por otra parte, se ha



mostrado que esta diferencia depende de la etapa del ciclo estral en la que se encuentre la hembra, ya que solo se presenta durante el proestro y el estro. Incluso se han reportado diferencias que dependen de la hora del día, lo que sugiere que estas asimetrías se presentan de manera dinámica y son moduladas por diversos factores como los antes mencionados (Olvera-Juárez *et al.*, 2020).

Se ha demostrado la existencia de asimetrías funcionales en el sistema GnRHérgico con la ayuda de estudios de lesión. Los autores analizaron los efectos de la lesión unilateral del POA a lo largo del ciclo estral, y los resultados muestran que al lesionar al POA derecha en la etapa de estro, el número de animales ovulantes disminuye, mientras que al lesionar el lado contrario no hay cambios significativos. En el caso del resto de las etapas, no se modificó la tasa de animales ovulantes de manera significativa tras la lesión de cualquiera de los hemisferios. En el mismo experimento, los autores realizaron un remplazo hormonal mediante la inyección subcutánea de GnRH sintética, en los animales que fueron lesionados en el lado derecho durante el estro, lo que restauró la ovulación. Estos resultados sugieren que el sistema GnRHérgico del hemisferio derecho es indispensable durante el estro para que se lleve a cabo la ovulación, mientras en las otras etapas, cualquiera de los hemisferios puede regular el mismo proceso (Cruz *et al.*, 1990; Morán *et al.*, 1994).

Los resultados sobre el contenido de la GnRH en el POA derecha, así como su participación en la regulación de la ovulación pueden explicarse, a su vez, por asimetrías en los sistemas que regulan la actividad de las neuronas de la GnRH. Por ejemplo, los esteroides sexuales modulan la frecuencia con la que se activan las neuronas de GnRH, ya que ejercen una retroalimentación estimulante o inhibitoria en función de su concentración (Breen y Mellon, 2014; Clarke, 2011; Norberg *et al.*, 2013; Sagrillo *et al.*, 1996). En concordancia, se ha mostrado que el contenido de las isoformas α y β del receptor a estradiol es mayor en el hemisferio derecho del hipotálamo antero-medial y cambia a lo largo del día y del ciclo estral (Stanton *et al.*, 1996). Resultados semejantes se han descrito para la kisspeptina, que es el principal neurotransmisor estimulante de la síntesis y la secreción de la GnRH. Esto sugiere que los mecanismos que participan en la retroalimentación que ejercen los esteroides ováricos a nivel del hipotálamo también son lateralizados (Olvera-Juárez *et al.*, 2020).

Por otro lado, se ha sugerido que la acción de los esteroides sobre la actividad de las neuronas de la GnRH es indirecta, ya que puede ser regulada por diferentes grupos neuronales que interactúan con ellas mediante diversos sistemas de neurotransmisión, entre ellos, el dopaminérgico (Clarke, 2011; Han *et al.*, 2005; Watanabe y Nakai, 1987). En apoyo a esta idea, existe evidencia anatómica que muestra



la existencia de receptores a estradiol en las neuronas dopaminérgicas (Anderson *et al.*, 2001b; Steyn *et al.*, 2007; Turchan *et al.*, 2001), así como las sinapsis que éstas establecen con las neuronas de la GnRH (Bardóczi *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 1989; Leranth *et al.*, 1988). La actividad coordinada de éstas últimas y los diversos sistemas de neurotransmisión resulta en la secreción pulsátil de éste decapeptido (Levine y Ramirez 1982; Levine *et al.*, 1991; Spergel, 2019).

La dopamina

La actividad de las neuronas de la GnRH es regulada por diferentes moléculas. Una de ellas es la dopamina, la cual pertenece a un grupo de neurotransmisores llamados catecolaminas y constituye aproximadamente el 80% de su contenido intracerebral (Baladi *et al.*, 2012; Barraclough y Wise, 1982; Hökfelt *et al.*, 1984b). Las catecolaminas se caracterizan por estar conformadas por un grupo amino individual, un núcleo de catecol (un anillo de benceno con dos grupos hidroxilo adyacentes) y una cadena lateral de etilamina o de uno de sus derivados. El primer paso en la síntesis de la dopamina es limitante de la velocidad e implica la conversión de L-tirosina en L-DOPA, mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH) (Arbogast y Voogt, 1990; Arbogast y Voogt, 1991; Carlsson *et al.*, 1957; Hökfelt *et al.*, 1984b; Klein *et al.*, 2018; Liu y Kaeser, 2019; Montagu, 1957; Ugrumov *et al.*, 1989b). Esta conversión requiere de oxígeno, un cofactor de hierro y tetrahidrobiopterina, lo que da como resultado la adición de un grupo hidroxilo al anillo aromático para formar a la L-DOPA, posteriormente, esta molécula es convertida en dopamina por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa. Una vez sintetizada, la dopamina es transportada a las vesículas sinápticas por el transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2) para posteriormente ser secretada (Haavik y Toska, 1998; Sano *et al.*, 1959). Ya que la dopamina se encuentra en la hendidura sináptica puede ser captada de regreso a la neurona presináptica a través de los transportadores de dopamina para su reempaquetado o puede permanecer en el espacio extracelular para ser absorbida por las células gliales o ser metabolizada por enzimas en la membrana celular de la neurona. La dopamina que es secretada al espacio sináptico interactúa con los receptores en las terminales pre y postsinápticas, estimulándolas o inhibiéndolas, según el tipo de receptor que presenten (**Figura 5**; Cooper *et al.*, 1996; Eisenhofer, 2004; Sibley *et al.*, 1993; Tank *et al.*, 1981).

Los transportadores de monoaminas constituyen el principal mecanismo para culminar la transmisión sináptica en el sistema nervioso central (Amara y Kuhar, 1993; Feldman *et al.*, 1997;



Iversen, 1975; Vaughan y Foster, 2013). El transportador para la dopamina pertenece a la familia de las proteínas transportadoras que dependen de Na^+ y de Cl^- (Shimada *et al.*, 1991). Esta familia incluye también a los transportadores de Ácido Gamma-Aminobutírico (GABA), noradrenalina, serotonina, taurina, glicina, betaína y prolina. La función de los transportadores requiere que una molécula de dopamina sea cotransportada al interior de la terminal sináptica con 2 iones de Na^+ y un ion de Cl^- . Los iones de Na^+ se acoplan al dominio extracelular del transportador antes de que la dopamina pueda unirse. Una vez que la dopamina se acopla a su transportador, la proteína sufre un cambio conformacional, lo que permite que tanto el Na^+ como la dopamina se desvinculen en el lado intracelular de la membrana. Esto indica que el transporte de cada molécula de dopamina está acompañado por el movimiento de dos cargas positivas netas, esto se debe a que la dopamina posee carga positiva a un pH fisiológico y, por lo tanto, generará una corriente de entrada (**Figura 5**; Ole y Amara 2003; Sonders *et al.*, 1997).

Se estima que, en el humano, hay entre 400 000 y 600 000 neuronas que sintetizan a la dopamina, estas constituyen una pequeña cantidad de los aproximadamente 100 000 millones de neuronas presentes en el cerebro. De manera semejante, el número de sinapsis que contienen dopamina es bajo, alrededor del 0.001% del total de las sinapsis dentro del cerebro humano, contra lo que se observa con neurotransmisores como el glutamato y el GABA, que participan en aproximadamente el 90% de las sinapsis (Björklund y Dunnett 2007; Moore y Bloom 1978; Moujir *et al.*, 1997; Von Bartheld *et al.*, 2016). Considerando esto, la importancia del sistema dopaminérgico no se encuentra en su cantidad, sino en la implicación que tiene en las diversas funciones neurológicas que regula y la variedad de alteraciones neuroendocrinas que resultan de su disfunción (Li y Pelletier, 1992; Liu y Herbison, 2013; Martínez de la Escalera *et al.*, 1992; Trueta *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1982). Cabe mencionar que el sistema dopaminérgico presenta asimetrías, al igual que se describió antes para el sistema GnRHérgico. Esto ha sido observado en un estudio en el que se analizó la concentración de la dopamina y de su metabolito (DOPAC) en el hipotálamo izquierdo y derecho, en el que se observó un mayor contenido de esta amina en el hipotálamo derecho (Concentración de la dopamina en el hemisferio izquierdo 3.28 ± 0.17 ng/mg vs. el hemisferio derecho 3.62 ± 0.16 ng/mg). Mientras que el contenido del DOPAC fue mayor en el hemisferio izquierdo (DOPAC en el hemisferio izquierdo 0.663 ± 0.026 vs. DOPAC en el hemisferio derecho a 0.566 ± 0.029) (Barnéoud *et al.*, 1990; Moujir *et al.*, 1997).



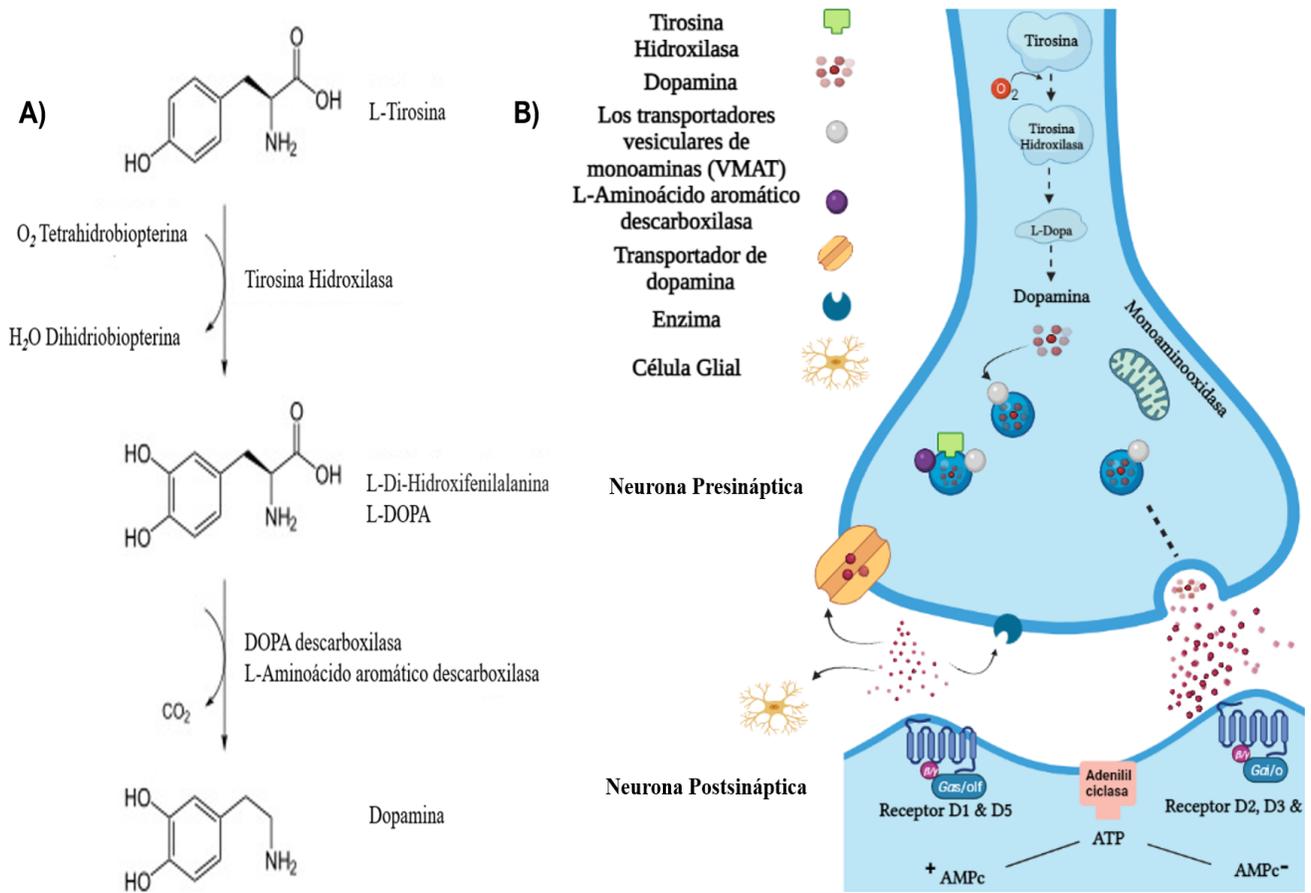


Figura 5. Síntesis, secreción y recaptación de la dopamina. En el panel (A) se observa la síntesis de la dopamina, que inicia con la conversión de la L-tirosina en L-DOPA mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH), esta conversión requiere tetrahidrobiopterina, O_2 y hierro (Fe^{2+}) como cofactores. La L-DOPA se convierte en dopamina por la enzima aromática L-aminoácido descarboxilasa (también conocida como DOPA descarboxilasa). En el panel (B) se aprecia la síntesis, secreción y recaptación de la dopamina. Ya que la dopamina es sintetizada es transportada a las vesículas sinápticas por el transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2) para posteriormente ser secretada. Una vez en el espacio sináptico el excedente puede ser captado de regreso a través de los transportadores de dopamina para que sea reempaquetada o permanecer en el espacio extracelular y ser absorbida por las células gliales o metabolizada por enzimas en la membrana celular de la neurona secretora. La dopamina que es secretada al espacio sináptico interactúa con los receptores en las terminales pre y postsinápticas, estimulándolas o inhibiéndolas, dependiendo del tipo de receptor que presenten (Figura elaborada por Carlos Contreras 2022).

Grupos y vías dopaminérgicos

A inicios de la década de los 60's se publicó el primer mapa que detallaba la distribución de los somas de las neuronas catecolaminérgicas en el cerebro de la rata, el gato, el conejo, el mono y el ser humano para describir la distribución neuronal de la dopamina (Björklund y Nobin, 1973; Kitahama *et al.*, 1990).



Basado en la clasificación que se estableció en el cerebro de la rata, se identificaron 9 grupos de neuronas dopaminérgicas denominados A₈ al A₁₆ (Fuxe, 1965). El grupo A₈ es un pequeño cúmulo de células dopaminérgicas que se presenta en la mayoría de los mamíferos, con una ubicación similar en los roedores y en los primates (Björklund y Dunnett, 2007; Deutch *et al.*, 1988; Nevue *et al.*, 2016). Éste grupo se encuentra predominantemente en el área retrorubral, sin embargo, también abarca a la formación reticular del mesencéfalo dorsolateral a la sustancia negra. Generalmente se considera que las neuronas de este grupo son una extensión del A₉, debido a que la porción rostral y ventral del grupo A₈ no puede ser diferenciada con claridad de las células contiguas a la sustancia negra caudal y lateral. En la rata, las neuronas del grupo A₈ conforman de manera rostral un puente, el cual une a las células de los grupos A₉ y A₁₀ e incluye a las neuronas ubicadas en los fascículos del lemnisco medial. El grupo A₉, por su parte, se ubica en el cerebro medio ventrolateral de los roedores y de los primates (Felten y Sladek, 1983; Nevue *et al.*, 2016). El grupo A₁₀ contiene una de las poblaciones más abundantes de neuronas dopaminérgicas y se localiza en el área tegmental ventral del mesencéfalo, en el núcleo lineal, en la sustancia gris y en el POA (Felten y Sladek, 1983; Nevue *et al.*, 2016; Ruggiero *et al.*, 1984).

El grupo A₁₁ es un pequeño cúmulo de células dopaminérgicas, ubicadas en el área periventricular caudal del mono (Felten y Sladek, 1983), en la rata se encuentran pequeñas cantidades de células asignadas a este grupo en el núcleo posterior del hipotálamo, el área supramamilar y el núcleo reuniens (Nevue *et al.*, 2016). El grupo A₁₂ es un pequeño grupo de células localizado en el núcleo arqueado de los primates (Felten y Sladek, 1983), y en el caso de los roedores, se observan algunas de estas células en la porción anteroventral del núcleo paraventricular. Los somas de estas neuronas se distribuyen a lo largo de la extensión rostro caudal del núcleo arqueado y el núcleo periventricular adyacente del hipotálamo medio basal (Dahlström y Fuxe, 1964; Everitt *et al.*, 1986; Nevue *et al.*, 2016).

En los primates el grupo dopaminérgico A₁₃ tiene una distribución ventromedial al tracto retino hipotalámico. Por otra parte, otras neuronas se extienden al núcleo reuniens del tálamo. En cambio, en el ratón, este grupo se encuentra ventral al tracto mamilotalámico en la zona incerta (Björklund y Dunnett, 2007; Romanowski *et al.*, 1985). Algunos estudios realizados en roedores muestran que los somas de las neuronas inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa (TH-IR) presentan proyecciones dendríticas hacia el núcleo dorso-medial del hipotálamo (**Figura 6**; Chan-Palay *et al.*, 1984; Northcutt y Lonstein, 2011; Porter, 1986; Van den Pol *et al.*, 1984). Por otra parte, el trazado inmunohistoquímico



del tracto dopaminérgico incerto hipotalámico (IHDA) muestra que estas neuronas proyectan a diversas áreas como el núcleo central de la amígdala, la banda diagonal horizontal de Broca y el núcleo paraventricular hipotalámico (Eaton *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1995). Se ha observado que las neuronas IHDA ubicadas en la zona inserta medial, están implicadas en la regulación del ciclo estral (MacKenzie *et al.*, 1988; Sanghera *et al.*, 1991) y en los picos en la concentración de la LH inducidos por los esteroides gonadales (MacKenzie *et al.*, 1984; Záborszky y Vadasz, 2001).

El grupo A₁₄ consiste en una pequeña agrupación de células observadas dentro y cerca del POA de los ratones y de los primates (Felten y Sladek, 1983; Graham y Pfaus, 2010). En un inicio se creía que las proyecciones dopaminérgicas que inervaban a la hipófisis formaban parte del grupo dopaminérgico A₁₂ ubicado en la región más rostral del núcleo arqueado, llamadas neuronas dopaminérgicas tuberohipofisarias (Björklund y Lindvall, 1984), sin embargo, estudios inmunohistoquímicos posteriores mostraron que estas proyecciones se originan a partir de una subpoblación de neuronas del grupo A₁₄, conocidas como neuronas dopaminérgicas hipofisarias periventriculares, ubicadas en el núcleo periventricular dorsal al área retroquiasmática del hipotálamo anterior (Goudreau *et al.*, 1992-1995; Kawano y Daikoku, 1987). La distribución de estas neuronas en la región anteroventral del núcleo periventricular de los roedores presenta un dimorfismo sexual, ya que la cantidad de neuronas dopaminérgicas y las fibras TH-IR son de 2 a 3 veces mayores en las hembras que en los machos (Simerly *et al.*, 1985a-b). Cabe mencionar que las proyecciones de las neuronas del núcleo periventricular rostral se extienden lateralmente hacia el núcleo preóptico medial y al POA (Björklund y Lindvall, 1984). Las neuronas dopaminérgicas de este circuito son sensibles a los esteroides gonadales, que regulan la secreción preovulatoria de las gonadotropinas en las hembras (Simerly, 1997) y la conducta copulatoria en los machos (Baker, 1986; Hull *et al.*, 1997; Hull *et al.*, 1999).

Los somas de las neuronas A₁₅ se describieron originalmente en las ratas y se dividieron en dos grupos; un grupo dorsal compacto ubicado en la porción ventral del núcleo del lecho de la estría terminal, que se extiende caudal y medialmente hasta una posición por debajo de la comisura anterior y un grupo ventrolateral ubicado por encima del quiasma óptico, cerca del núcleo supraóptico que comienza desde el POA y se extiende caudalmente a través del área retroquiasmática. Las neuronas del A₁₅ forman un continuo con las del A₁₄ (Figura 6; Gayrard *et al.*, 1994-1995; Goodman *et al.*, 2000; Hökfelt *et al.*, 1984a; Lehman *et al.*, 1996; Thiéry *et al.*, 1995; Tillet *et al.*, 1990). Por último, el grupo A₁₆, se encuentra distribuido en los bulbos olfatorios de los vertebrados, incluidos los roedores, los primates y los humanos



y representa la mayor cantidad de neuronas que sintetizan a la dopamina endógena dentro del prosencéfalo (Alizadeh *et al.*, 2015; Bjorklund y Dunnett, 2007; Cave y Baker, 2010; Guyenet y Crane, 1981; Smith *et al.*, 1993; Van Vulpén *et al.*, 1999).

Los cúmulos de las neuronas dopaminérgicas descritos anteriormente dan lugar a cuatro plexos axonales, conocidos como las vías dopaminérgicas; la nigroestriatal, la mesolímbica, la mesocortical y la tuberoinfundibular. La vía nigroestriatal está involucrada principalmente en la regulación del movimiento, como parte del sistema circuito motor de los ganglios basales que conecta a la sustancia negra compacta del mesencéfalo con el núcleo accumbens y el putamen dentro del cuerpo estriado dorsal (Demarest *et al.*, 1981; Janhunen y Ahtee, 2007; Moore y Bloom, 1978; Zhang *et al.*, 2019). Esta vía es la más abundante en cuanto a cantidad de neuronas dopaminérgicas, ya que comprende aproximadamente el 70% de todas las neuronas dopaminérgicas cerebrales (**Figura 6**; Gerfen 1992; Lang y Lozano, 1998; Stagkourakis *et al.*, 2019).

La vía mesolímbica comienza en el área tegmental ventral del mesencéfalo y se conecta con el sistema límbico por medio del núcleo acuminado, la amígdala cerebral y el hipocampo, así como con la corteza prefrontal. Se sabe que la vía mesolímbica está involucrada en regular las emociones, el aprendizaje, la memoria y la motivación. La vía mesocortical se origina de células distribuidas en la porción lateral del área tegmental ventral y en la porción medial de la sustancia negra compacta. Se ha reportado que las neuronas ubicadas en la porción medial de la sustancia negra compacta envían proyecciones colaterales tanto a la corteza frontal como a estructuras subcorticales, incluidos el cuerpo estriado y el tabique (Albanese y Minciacchi, 1983; Koob y Bloom, 1988). Por otro lado, esta vía inerva a estructuras corticales y subcorticales y está implicada en la regulación de las funciones motrices y cognitivas relacionadas con la motivación y la recompensa (**Figura 6**; Baladi *et al.*, 2012; Chandler *et al.*, 2014). La vía tuberoinfundibular surge a partir de los núcleos periventricular y arqueado del hipotálamo. Las proyecciones de esta vía alcanzan al POA y a la eminencia media, donde secretan a la dopamina en los espacios perivasculares del plexo capilar del sistema portal hipotalámico-hipofisario (Björklund y Dunnett, 2007; Civelli *et al.*, 1993; Nelson *et al.*, 1996; Selmanoff, 1981; Simmons y Yahr, 2011).



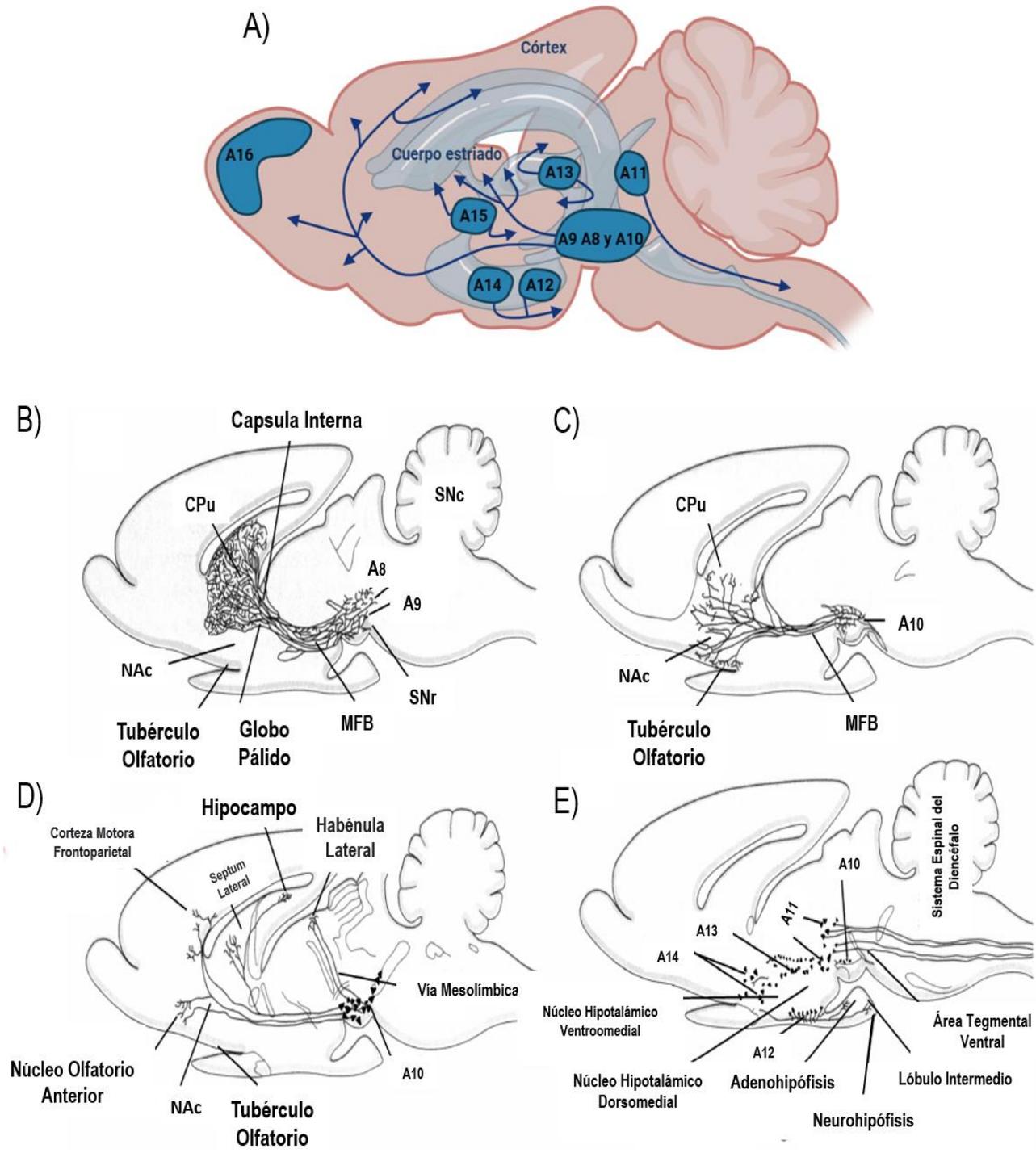


Figura 6. Grupos y vías dopaminérgicas en el cerebro de rata. (A) Los círculos de color azul representan los grupos dopaminérgicos del A8 al A16 y su distribución dentro del cerebro de la rata. Estos grupos dan lugar a 4 vías dopaminérgicas, la nigroestriatal (B), la mesolímbica (C), la mesocortical (D) y la tuberoinfundibular (E). Los cuerpos celulares dopaminérgicos se representan mediante triángulos y los tractos axonales mediante líneas continuas. Putamen caudal (CPu), haz del prosencéfalo medial (MFB), Núcleo accumbens (NAc), Sustancia negra compacta (SNC), Sustancia negra reticulata (SNr). (Modificada de Janhunen, 2005).



Receptores dopaminérgicos (RDA)

La existencia de los RDA en el sistema nervioso central se dedujo aproximadamente en la década de los 70's a partir de estudios bioquímicos en los cuales se mostró que la dopamina es capaz de estimular la síntesis del AMPc a través de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Goldberg *et al.*, 1978; Kebabian y Calne, 1979). Posteriormente, se propuso la existencia de dos receptores, uno que estimulaba la síntesis del AMPc y otro que la inhibía. En 1979, debido a las características que presentaban estos receptores, decidieron llamar RDA-1 al receptor que estimulaba la síntesis y RDA-2 al que la inhibía (Kebabian y Calne, 1979; Pandey *et al.*, 2013). Este esquema de clasificación fue confirmado a través de estudios farmacológicos, bioquímicos y fisiológicos que mostraron las diferencias entre ambos tipos de receptores. Existen subtipos de RDA agrupados dentro de la familia D1 o D2. Los subtipos 1 y 5 (*SRDa₁* y *SRDa₅*) conforman a la familia 1 y se caracterizan por tener un asa *i₃* corta y una región carboxilo terminal larga que se acoplan a las proteínas *G_s*. Cabe mencionar que los *SRDa₁* y los *SRDa₅* presentan una homología del 80%. Por otro lado, los *SRDa₂*, los *SRDa₃* y los *SRDa₄* pertenecen a la familia 2 y poseen una estructura inversa, es decir un asa *i₃* larga y un extremo carboxilo terminal corto que se acoplan a proteínas *G_i*. En el caso de los *SRDa₂* y *SRDa₃* presentan una homología del 75% en sus dominios transmembranales, mientras que los *SRDa₂* y los *SRDa₄* comparten una homología del 53% (Andersen *et al.*, 1990; Bunzow *et al.*, 1988; Civelli *et al.*, 1991; Dal Toso *et al.*, 1989; Freneau *et al.*, 1991; Grierson *et al.*, 1988; Missale *et al.*, 1998; Mohamed *et al.*, 1997; O'Dowd, 1993; Schwartz *et al.*, 1992; Sibley *et al.*, 1982; Sibley *et al.*, 1993; Sunahara *et al.*, 1990; Watanabe, 1987; Zhou *et al.*, 1990).

El *SRDa₁* es el más abundante dentro del sistema nervioso central, se distribuye en áreas como el tubérculo olfatorio, el neostriado, el núcleo accumbens, las islas de Calleja, la amígdala, el núcleo subtalámico, la sustancia negra (reticulada y compacta) y el cerebelo (capa molecular) (Dearry *et al.*, 1990; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Missale *et al.*, 1998). Por otro lado, se han descrito concentraciones moderadas de este receptor en la corteza cerebral (frontal, entorrinal y el cíngulo), el tálamo y el globo pálido, y concentraciones bajas en el hipocampo, la región septal, el hipotálamo, el área tegmental ventral y el colículo inferior (**Figura 7**; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994). Estudios farmacológicos han mostrado que estos receptores poseen una afinidad relativamente baja por la dopamina, con una constante de inhibición $K_i=2 \mu\text{M}$. Por otra parte, se ha observado que los fármacos como el agonista SKF-38393 y el antagonista SCH-23390 se unen a este receptor con mucha mayor



afinidad que el ligando endógeno ($K_i=150$ nM y $K_i=0.3$ nM, respectivamente) (Missale *et al.*, 1998; Watling *et al.*, 1995). La gran afinidad del SCH-23390 ha permitido su uso en forma tritriada ($[^3H]$ SCH-23390) para la identificación de este receptor, ya sea en preparaciones de membranas celulares como *in situ* (por autorradiografía) (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Missale *et al.*, 1998). Comúnmente, la activación del *SRDa1* conduce a la activación de las proteínas G_s con la consecuente producción del AMPc producto de la estimulación de una o varias isoformas de la enzima adenilil ciclasa que se localiza en la membrana celular (Cooper *et al.*, 1996).

El *SRDa5* se expresa en menor proporción que el *SRDa1* (Mansour *et al.*, 1990; Meador-Woodruff *et al.*, 1992; Jaber *et al.*, 1996; Tiberi *et al.*, 1991). Este subtipo presenta una cadena de 475 y 477 residuos de aminoácidos en la rata y en el humano, respectivamente (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994). Se ha mostrado su presencia dentro del sistema nervioso central, en el hipocampo, el tálamo, el neocórtex, el hipotálamo y la corteza cerebral frontal y temporal (**Figura 7**; Jackson y Westlind-Danielsson., 1994; Tiberi *et al.*, 1991). De igual manera al *SRDa1*, la activación del *SRDa5* conduce a la formación del AMPc por la estimulación de una o más isoformas de la adenilil ciclasa, este proceso es regulado por proteínas $G_{\alpha s}$. Las características farmacológicas del *SRDa5* son también similares a las reportadas para el receptor *SRDa1*, ya que es estimulado por el fármaco SKF-38393 ($K_i=100$ nM) y tiene como antagonista selectivo al SCH-23390 ($K_i=0.3$ nM), sin embargo, su afinidad por la dopamina es mayor ($K_i=50$ nM) (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Watling *et al.*, 1995).

En el caso de la familia 2, el *SRDa2* presenta 2 isoformas, una corta y una larga, que son sintetizadas por el *splicing* alternativo del ARNm, generado por un gen único. La forma corta (D_2S) está formada por 414 aminoácidos en el humano y 415 en la rata, mientras que la forma larga (D_2L) tiene 443 y 444 aminoácidos respectivamente. La diferencia en los residuos se observa en la región i_3 , ya que la forma larga contiene 29 aminoácidos más. Dado que la región i_3 es esencial para la unión a las proteínas G, es probable que la variación en la longitud de dicha región se deba a las diferencias en los procesos de transducción de señales y en la regulación de la activación de estas proteínas (Bowyer y Weiner, 1987; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; O'Dowd, 1993). Este subtipo se distribuye en gran proporción en el neocórtex, el tubérculo olfatorio, la capa molecular de la formación hipocampal, el núcleo accumbens, las islas de Calleja, el hipotálamo y el área tegmental ventral. Por otro lado, se encuentra en cantidades moderadas en la sustancia negra reticulada y compacta, la corteza cerebral (regiones prefrontal, entorrinal y cíngulo), el globo pálido, la amígdala, el tálamo, así como en el núcleo



subtalámico y el POA (**Figura 7**; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994). La bromocriptina es un agonista por el cual este receptor muestra una alta afinidad ($K_i=5$ nM), de manera similar, el raclopride muestra una gran selectividad por el $SRDa_2$ y el $SRDa_3$, con valores de K_i entre 0.5 y 5 nM y una vida media de aproximadamente 20 minutos. Hasta el momento no se han reportado un antagonista selectivo a este receptor, sin embargo, la unión de su ligando endógeno muestra una baja afinidad ($K_i=2$ M) (Missale *et al.*, 1998; Seeman y VanTol., 1994). Típicamente la activación del receptor conduce a la inhibición de la adenilil ciclasa y por tanto de la síntesis del AMPc. A su vez, el $SRDa_2$ también pueden modular corrientes iónicas que inhiben a los canales de Ca^{2+} , dicho efecto es mediado por las proteínas $G_{\alpha o}$, lo que facilita la apertura de los canales de K^+ por medio de las proteínas G_{i3} (Jaber *et al.*, 1996; Lledo *et al.*, 1992). Se ha reportado también que en líneas celulares transfectadas con el $SRDa_2$ la estimulación del mismo, provoca la formación del IP_3 y la movilización de Ca^{2+} a partir de depósitos intracelulares (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).

La existencia del $SRDa_3$ fue confirmada por clonación molecular en 1990 (Schwartz *et al.*, 1998). Su distribución en el sistema nervioso central y sus características farmacológicas (en particular su sensibilidad a neurolépticos) son diferentes a las de los $SRDa_2$. En el ser humano este subtipo consta de 400 aminoácidos, mientras que en la rata la cadena peptídica comprende 446 residuos, siendo la diferencia, la extensión del asa i_3 conformada por 120 y 166 aminoácidos, respectivamente. La presencia de este receptor se ha observado en concentraciones elevadas en las islas de Calleja, la región septal, los núcleos geniculados medial y lateral del tálamo, el núcleo mamilar medial del hipotálamo y en las células de Purkinje del cerebelo. Densidades intermedias se observan en la corteza parietal y temporal, la formación hipocampal, el bulbo olfatorio, el neocórtex, el núcleo accumbens, la amígdala, el núcleo subtalámico, el hipotálamo y los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. Por otra parte, se han observado concentraciones mínimas en la sustancia negra compacta, el área tegmental ventral, la corteza frontal, el cíngulo y el globo pálido (**Figura 7**; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Lledo *et al.*, 1992; O'Dowd, 1993).

Este receptor muestra una afinidad por la dopamina ($K_i=30$ nM) y por la mayoría de los agonistas dopaminérgicos mayor que la correspondiente al $SRDa_2$ (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Lledo *et al.*, 1992; O'Dowd, 1993). Por otro lado, la bromocriptina es un agonista con alta afinidad ($K_i=7$ nM) a los $SRDa_3$, aunque también se une con alta afinidad a los $SRDa_2$ ($K_i=5$ nM). Otros agonistas selectivos son el PD128, el 907, el 7-hidroxi-dipropilaminotetralin y el 7 OH-DPAT ($K_i \approx 1$ a 2 nM). Los



fármacos que se han reportado como antagonistas selectivos con gran afinidad para el *SRDa3* incluyen al UH232, la emonaprida, el YM09151-2 ($K_i=0.06$ nM), la nafadotrida y el ⁺S14297 (Missale *et al.*, 1998; Seeman y VanTol, 1994; Watling *et al.*, 1995). Cuando este receptor se expresa en diversas líneas celulares, su activación inhibe la producción del AMPc, estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato e induce la extrusión de los iones de H⁺ por el intercambio de Na⁺/H⁺. Estos efectos son compartidos por los otros miembros de la familia RDA-2 e involucran a proteínas G_{ai} o G_{ao} (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994). Se ha reportado que el *SRDa3* es el autorreceptor presente en las terminales dopaminérgicas, donde regula la síntesis y la secreción de la dopamina. Esto parece deberse a varios mecanismos como la inhibición de la formación del AMPc y la reducción de iones Ca²⁺ al activarse los canales de K⁺ (Akaoka *et al.*, 1992; Gobert *et al.*, 1996; Mestikawy y Hamon, 1986; Onali *et al.*, 1988; Whetzel *et al.*, 1997).

El *SRDa4* fue clonado en 1991 y es una cadena peptídica de 385-515 residuos, el cual muestra una homología significativa con el *SRDa2* y el *SRDa3* (Van Tol *et al.*, 1991). Este subtipo se expresa en gran cantidad en la corteza frontal, el bulbo olfatorio, la amígdala, el mesencéfalo y la retina. Por otro lado, se presenta moderadamente en el neocórtex, mientras que es apenas detectable en el hipotálamo y el hipocampo (Jaber *et al.*, 1996; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Mansour *et al.*, 1990). Los *SRDa4* muestran una afinidad intermedia por la dopamina ($K_i=450$ nM) y una alta afinidad por la apomorfina, (un agonista dopaminérgico), la mayor afinidad de los receptores dopaminérgicos a este fármaco ($K_i=4$ nM). Un agonista con alta afinidad por la *SRDa4* es el quinpirole ($K_i=50$ nM), aunque su afinidad por el subtipo *Da3* es muy similar ($K_i=40$ nM), aun no se ha diferenciado entre estos dos receptores, pero permite distinguirlos del subtipo *SRDa2*, con una afinidad de 30 a 35 veces menor ($K_i=1.400$ nM). Por otra parte, un antagonista selectivo es la clozapina ($K_i=5$ a 50 nM) (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Missale *et al.*, 1998; Watling *et al.*, 1995). Al igual que los subtipos *SRDa2* y *SRDa3*, la activación del *SRDa4* inhibe la producción del AMPc. Otros efectos funcionales acoplados a la activación de estos receptores incluyen la síntesis y la secreción del ácido araquidónico y la extrusión de iones H⁺ por el intercambio de Na⁺/H⁺, estas acciones son mediadas por las proteínas G del tipo G_{ai} o G_{ao}, como en el caso de los *SRDa3* (Figura 7; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).



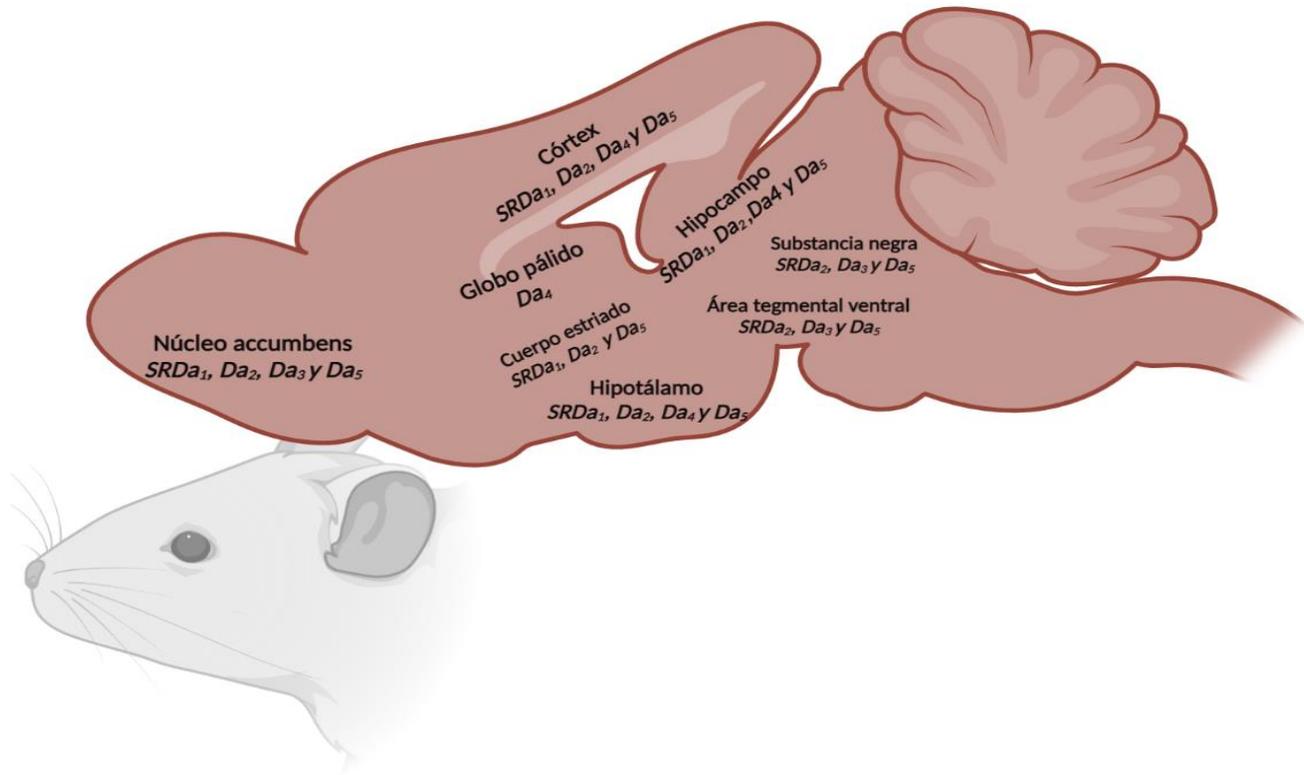


Figura 7. Distribución de los subtipos de receptores dopaminérgicos (SRDa) en el cerebro; Los receptores SRDa₁ se encuentran en el córtex, el cuerpo estriado, el Núcleo accumbens, el hipotálamo y el hipocampo. Los SRDa₂ se localizan en el córtex, en el cuerpo estriado, el núcleo accumbens, el hipotálamo, la substancia negra, el área tegmental ventral y el hipocampo. Los receptores SRDa₃, se encuentran en el núcleo accumbens, la substancia negra y el área tegmental ventral. En el caso de los receptores SRDa₄ se encuentra en el córtex, el globo pálido, el hipotálamo y el hipocampo. Por último, la distribución de los receptores SRDa₅ se encuentra en el córtex en el cuerpo estriado, el núcleo accumbens, el hipotálamo, la substancia negra, el área tegmental ventral y el hipocampo (Figura elaborada por Carlos Contreras 2022).

El papel de la dopamina en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario

La idea de que la dopamina podría desempeñar un papel en la regulación de la secreción de las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario fue respaldada por la presencia de somas de neuronas dopaminérgicas en el núcleo arqueado del hipotálamo, cuyas terminales sinápticas se encontraron cerca del plexo primario de los vasos portales hipofisarios, en la eminencia media. Debido a esta relación anatómica se le atribuyó un posible rol en la secreción de las gonadotropinas. Aunado a esto, se observó que los cambios en la secreción de la FSH y la LH están acompañados por alteraciones en el metabolismo de la dopamina en el hipotálamo (Fuxe *et al.*, 1967; Hunzicker-Dunn y Mayo, 2014).

Algunos de los primeros estudios que analizaron el papel de la dopamina en la regulación del eje reproductivo mostraron que ejerce sus efectos a nivel del hipotálamo y no de la hipófisis. En dichos



experimentos se incubaron fragmentos adenohipófisarios en presencia de la dopamina y se cuantificó la concentración de las gonadotropinas. Los autores reportaron que no existieron cambios significativos en comparación con los cultivos control (Schneider y McCann, 1969). Por otro lado, cuando se añade dopamina al medio de cultivo de fragmentos adenohipófisarios con tejido proveniente del hipotálamo mediobasal, que incluye a la eminencia media, se observa un incremento en la concentración de la GnRH (Negro-Vilar *et al.*, 1979; Selmánoff y Wise, 1981). En conjunto, los resultados de ambos estudios sugieren que la dopamina estimula la secreción de la GnRH y, por lo tanto, de las gonadotropinas hipofisarias.

El papel de la dopamina en la regulación de la secreción de la GnRH es controvertido, ya que se han mostrado estudios que le atañen un papel inhibitorio, mientras que otros uno estimulante. Por ejemplo, al evaluar los efectos de la administración de agonistas o antagonistas a los RDA en ratas OVX, se muestra que la inyección sistémica de los agonistas apomorfina o piribedil inhibe la secreción de la LH y la FSH, sin embargo, si se inyecta de manera conjunta un antagonista como la pimozida o el D-butaclamol, dicho efecto puede ser revertido (Drouva y Gallo, 1977; Gallo, 1978). Adicionalmente, estudios *in vivo* en los que se administró a la dopamina o un agonista a ella en el hipotálamo mediobasal de ratas OVX mostraron que se retrasa la frecuencia de los pulsos de la LH (Arendash y Gallo, 1978; Drouva y Gallo, 1976; Gallo, 1978; Vijayan y McCann, 1978). De manera opuesta, se ha observado que la inyección subcutánea de un antagonista dopaminérgico como el haloperidol en el día del proestro bloquea el incremento preovulatorio de las gonadotropinas y, consecuentemente, la ovulación, no obstante, estos efectos pueden ser revertidos si se inyecta previamente un agonista dopaminérgico como la bromocriptina (Krieg y Cassidy, 1984).

Otros estudios han reportado que la participación del sistema dopaminérgico varía de acuerdo con la etapa del ciclo estral, ya que la inyección sistémica de clorpromazina a las 09:00 horas en las etapas de diestro-1, diestro-2 y proestro reduce la tasa de animales ovulantes de manera significativa con respecto al grupo control. En el estro, sin embargo, la tasa de animales ovulantes no se modifica, por lo que se puede concluir que solo durante el diestro-1, diestro-2 y proestro la integridad del sistema dopaminérgico es fundamental para regular la secreción de la GnRH y, consecuentemente, de las gonadotropinas (Domínguez *et al.*, 1985).

Se ha observado que en las ratas macho castradas a las que se les administró testosterona, la dopamina que se encuentra en la eminencia media inhibe la secreción de la LH, lo que sugiere que el



sistema dopaminérgico tuberoinfundibular, que inerva a esta región, inhibe la secreción de la GnRH (Kalra y Kalra, 1983). Por otra parte, en ratas hembra se observó que el incremento en la concentración de la dopamina precede al pico preovulatorio de las gonadotropinas, sin embargo, en el estro se pierde esta correlación. Se especula que la actividad de las neuronas dopaminérgicas estimula la secreción de la GnRH durante el período crítico a través de la vía preóptico-tuberoinfundibular en la eminencia media (Ahrén *et al.*, 1971). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Domínguez y colaboradores (1985), quienes mostraron que la inyección de clorpromazina solo bloquea la ovulación en el diestro-1, diestro-2 y proestro. En concordancia, estudios anatómicos mostraron que las terminales de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares se encuentran muy cerca de las terminales GnRHérgicas que provienen de neuronas ubicadas en la banda diagonal horizontal (Baraclough y Wise, 1982; Fuxe *et al.*, 1972; Kalra y Kalra, 1983; Miller y Lonstein, 2005).

Además de la inervación de las terminales GnRHérgicas por fibras de la vía tuberoinfundibular, se ha identificado que células dopaminérgicas ubicadas en distintas regiones como el prosencéfalo y el mesencéfalo proyectan hacia el POA. Dichas células dopaminérgicas forman parte de extensiones del grupo A₁₀, particularmente del hipotálamo posterior ventrocaudal, el núcleo supramamilar medial y del área tegmental ventral. También se encuentran células del hipotálamo rostral y su región circundante, del grupo A₁₃ y de la misma POA (Miller y Lonstein, 2009). Debido a esta relación anatómica, se ha estudiado si las neuronas GnRHérgicas y dopaminérgicas presentan aposiciones, para ello, se realizó una inmunohistoquímica de doble marcaje contra GnRH y TH. Los resultados obtenidos mostraron que las fibras dopaminérgicas se superponen a las neuronas de la GnRH, ya sea teniendo contacto en las espinas dendríticas o directamente en sus somas (Bardóczi *et al.*, 2018). Otro estudio demostró que las proyecciones sinápticas de las neuronas de la GnRH establecen aposiciones con los somas y/o las dendritas de las neuronas dopaminérgicas en el POA y la eminencia media, sin embargo, no se detectaron somas en los que co-localizara la GnRH y la TH (Bogus-Nowakowska *et al.*, 2016; Hoffman *et al.*, 1982). Las aposiciones entre las células de la GnRH y las fibras catecolaminérgicas en el POA han sido descritas en la rata, (Hoffman y Beninger 1985; Leranthe *et al.*, 1988) el ratón (Liu y Herbison, 2013) y el humano, lo que sugiere una comunicación cruzada entre ambos sistemas (Dudas y Merchenthaler, 2001; Dudas y Merchenthaler, 2020; Wright y Jennes, 1993).

Se ha observado que diferentes factores pueden regular la actividad dopaminérgica en el POA y su participación en la regulación de la secreción de la GnRH, como la estimulación o la inhibición de



los receptores dopaminérgicos y la retroalimentación que ejercen las hormonas ováricas (Advis *et al.*, 1980; Liu y Herbison, 2013; Warembourg *et al.*, 1996). En un estudio *in vitro* fueron analizadas las neuronas GnRHérgicas de ratón macho y hembra con el fin de examinar si la dopamina puede modular su actividad. Para ello se incubaron fragmentos hipotalámicos de áreas densamente pobladas por neuronas de GnRH, como el área anteroventral periventricular y el POA, en presencia de dopamina, SCH-23390 y/o raclopride y se analizó la actividad neuronal. Los resultados muestran que la administración de la dopamina inhibió la activación del 50% de las neuronas GnRHérgicas analizadas. Por otra parte, aproximadamente un tercio de ellas incrementó su actividad después de la administración del SCH-23390 y/o raclopride, lo que indica una inhibición tónica por la dopamina endógena. Con base en ello se concluye que la dopamina es uno de los inhibidores más potentes de la actividad de las neuronas de la GnRH a través de sus acciones pre- y post-sinápticas reguladas por los RDA1, los RDA2 o ambos (Liu y Herbison, 2013).

En otro estudio se observó el efecto de la administración de estrona, estradiol o de dopamina de manera bilateral en el POA sobre la secreción de la LH en ratas OVX inyectadas de manera subcutánea con benzoato de estradiol. Los resultados muestran que la administración de estrona o dopamina 72 horas después de la inyección del benzoato de estradiol incrementa la concentración de la LH, mientras que la administración de estradiol no la modificó (Graham y Pfau, 2012; Hashimoto y Fukuko, 1986). Por otro lado, se ha informado que la administración hipotalámica de la pimozida inhibe la secreción de la LH (Ojeda *et al.*, 1974), no obstante, se han reportado resultados opuestos en ratas OVX tratadas con esteroides, ya que el mismo tratamiento estimula la secreción de esta gonadotropina (Weiner y Ganong, 1978). Debido a la evidencia anatómica que muestra la presencia de receptores a estrógenos en las neuronas dopaminérgicas ubicadas en el POA, se sugiere que esta región regula la retroalimentación estimulante o inhibitoria por parte de los estrógenos en las neuronas dopaminérgicas y, que, a su vez, la actividad dopaminérgica regula la secreción de la GnRH (Advis *et al.*, 1980; Havern *et al.*, 1994; Numan y Stolzenberg, 2009; Tobiansky *et al.*, 2015).

Se ha intentado discernir el papel de la dopamina en el POA sobre la regulación de la ovulación a través de estudios farmacológicos en los que se realizaron inyecciones de dopamina o uno de sus antagonistas de manera unilateral en el POA de ratas OVX tratadas con estradiol. Los resultados muestran que la microinyección de la dopamina incrementa la concentración de las gonadotropinas, no obstante, dicho incremento puede ser bloqueado si se administra pimozida, lo que sugiere que la



dopamina participa de manera estimulante en la secreción de la GnRH/gonadotropinas y que la señalización mediada por los RDA-2 es vital en la secreción de éstas (Hashimoto y Kimura, 1986).

En otro estudio se implantó un cristal de haloperidol en el POA izquierda o derecha en cada etapa del ciclo estral de la rata con el objetivo de analizar si la participación del sistema dopaminérgico del POA sobre la ovulación es asimétrica y si ésta varía durante el ciclo estral. Los resultados obtenidos muestran que el implante de haloperidol, ya sea en el POA izquierda o derecha, reduce la tasa de animales ovulantes casi en su totalidad cuando se realiza en el estro o diestro-1. Por otro lado, la implantación del cristal en las etapas de diestro-2 o proestro no modifica la tasa de animales ovulantes. Posteriormente, los autores realizaron un remplazo hormonal mediante la inyección de GnRH sintética o de benzoato de estradiol en las etapas en las que se redujo la tasa de animales ovulantes. La inyección de la GnRH restaura la ovulación sin importar la etapa o el hemisferio en el que hayan sido tratados los animales. En el caso del benzoato de estradiol, solo se reestablece la ovulación en los animales que fueron implantados en el hemisferio izquierdo durante el estro, mientras que en el diestro-1 se reestableció en todos los animales sin importar el hemisferio tratado. Esto sugiere que el sistema dopaminérgico del POA regula la secreción de la GnRH y, por tanto, la ovulación, durante el estro y diestro-1. En adición, este sistema modula la retroalimentación del estradiol de manera asimétrica en el estro, pero no en el diestro-1 (Morán y Domínguez, 1995). En concordancia, la administración de antagonistas de los RDA-1 en el tercer ventrículo a las 11:00 horas estimula la secreción de la GnRH, mientras que un antagonista de los RDA-2 la inhibe (Sarkar y Fink, 1981). Finalmente, estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la microinyección unilateral de SCH-23390, un antagonista de los RDA-1, en el POA de ratas hembra no modifica de manera significativa la tasa de animales ovulantes con respecto al grupo control (Cortés, 2018). Con base en ello, se descarta que los RDA-1 medien la respuesta ovulatoria observada en el experimento de Morán y Domínguez, lo que podría sugerir que la dopamina que llega al POA actúa a través de los RDA-2 o bien de la actividad redundante de ambas familias.



Planteamiento del problema

Como se describió anteriormente, no se ha esclarecido si la dopamina modula la secreción de la GnRH al actuar en los somas ubicados en el POA o bien, en sus terminales sinápticas en la eminencia media. Tampoco se ha determinado si estimula o inhibe la ovulación, ni el tipo de receptores que regulan la comunicación dopaminérgica en las neuronas de la GnRH. Debido a esto, nuestro laboratorio se ha interesado en entender la participación de la dopamina en la regulación de la ovulación. Se ha mostrado que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos de ambas familias en el POA ya sea izquierda o derecha bloquea la ovulación en las etapas de estro y diestro-1, en cambio, en las etapas de diestro-2 y proestro no tiene efecto (Morán y Domínguez, 1995). Por otro lado, el bloqueo específico de los RDA-1 en el POA izquierda o derecha no tiene efecto en ninguna etapa (Cortés, 2018). Estos resultados nos sugieren que la dopamina actúa a través de los RDA-2 localizados en el POA, en donde estimula la secreción de la GnRH. Una explicación alternativa es que los RDA-1 y los RDA-2 tengan un papel redundante, por lo que cualquiera de ellos puede transmitir el mensaje dopaminérgico al sistema GnRHérgico. En el presente estudio se analizaron los efectos del bloqueo de los RDA-2 en el POA izquierda o derecha en ratas hembra en las etapas de estro y diestro-1 con el fin de discernir si los RDA-2 participan en la regulación de la ovulación, también se evaluó si su efecto varía en función de la etapa del ciclo estral y del hemisferio que haya sido tratado.



Pregunta de investigación

¿Cuál es el papel de los RDA-2 ubicados en el POA izquierda o derecha en las etapas en las etapas de estro y diestro-1, sobre la ovulación de la rata adulta?



Hipótesis

Si la dopamina modula la actividad de las neuronas del POA izquierda o derecha que participan en la regulación de la ovulación durante las etapas de estro y diestro-1 a través de los RDA-2, entonces el bloqueo de éstos resultará en el decremento del número de animales ovulantes o del número de ovocitos liberados. Por otro lado, si el papel de los RDA-1 y los RDA-2 es redundante, no se verá modificada la ovulación.



Objetivos

General

Analizar el efecto del bloqueo de los RDA-2 del POA izquierda o derecha a las 09:00 horas sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.

Particulares

Analizar el efecto del bloqueo de los RDA-2 en el POA izquierda o derecha a las 9:00 en las etapas de estro o diestro-1 sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.

Analizar la masa de los ovarios, el útero y las glándulas adrenales tras el bloqueo de los RDA-2 en el POA izquierda o derecha a las 9:00 en las etapas de estro o diestro-1.



Materiales y Métodos

Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron ratas hembra de la cepa CIIZ-V, las cuales fueron mantenidas en jaulas estándar para roedor en grupos de 5 individuos en una sala con condiciones controladas de luz/oscuridad 14/10 (luces encendidas de las 05:00 a las 19:00 horas). La temperatura se estableció en 22 ± 2 °C, la humedad fue del 40% y los animales tuvieron acceso libre al agua y al alimento. Para monitorear el ciclo estral, se les tomo frotis vaginal diario entre las 10:00 y las 11:00 h. Únicamente fueron utilizados los animales que presentaron tres ciclos estrales consecutivos de 4 días de duración. Posteriormente, fueron divididos en 2 grupos experimentales, el primero consistió en ratas intactas, las cuales fueron sacrificadas en la mañana del estro vaginal y fungieron como control absoluto. El segundo grupo fue sometido a una cirugía estereotáxica en la cual se implantó una cánula guía unilateral de acero inoxidable dirigida al POA izquierda o derecha como se describe a continuación.

Implantación de las cánulas

Aquellas ratas que se encontraron en la etapa del diestro-1 fueron anestesiadas con una mezcla de 91 mg/kg de ketamina (PiSA agropecuaria, México) y 9.1 mg/kg de xilazina (PiSA agropecuaria, México) inyectada por vía intraperitoneal. Posteriormente, se les afeitó la cabeza con una rasuradora eléctrica y se les eliminó cualquier resto de pelo del cuerpo y de la cabeza con un rollo adhesivo. Cuando alcanzaron el plano anestésico se les administró una dosis preoperatoria de analgésico/antiinflamatorio no esteroideo (2 mg/kg de Meloxicam, Laboratorio Aranda, México) y de antibiótico (5 mg/kg de Enrofloxacin, Laboratorio Senosiain, México). Posteriormente, se aplicaron lagrimas artificiales en cada ojo para evitar su desecación (Hipromelosa, Sophia Labs, Ciudad de México, México). A continuación, los animales fueron montados en un aparato estereotáxico modelo 900 (David Kopf Instruments, Tjunga, CA, EE. UU) y la cabeza fue fijada por medio de barras antitrauma. Posteriormente, el cuero cabelludo fue lavado una ocasión con una solución de iodopovidona jabonosa y con alcohol al 70% y, posteriormente, dos veces con iodopovidona neutra y alcohol al 70%, para descontaminar el área de la cirugía. Se realizó una incisión en el cuero cabelludo de 1.5 cm de largo a través de la cual se ubicó la posición de bregma, la cual sirvió como punto de referencia para el uso de las coordenadas del POA provenientes del atlas de Paxinos y Watson (2014). Las coordenadas para la cirugía fueron modificadas



para coincidir con nuestra cepa de ratas y son las siguientes: anteroposterior: +0.1, mediolateral: ± 0.6 y dorsoventral: -8.6.

A partir de las coordenadas referidas se realizó un trepano en el cráneo con ayuda de un mototool Dremel modelo 3000 y una fresa odontológica. También se hicieron tres orificios equidistantes a la craneotomía, en los cuales se insertaron tornillos quirúrgicos de acero inoxidable. Posteriormente se insertó una cánula guía de acero inoxidable calibre 23G de 1.4 cm de longitud siguiendo las coordenadas antes referidas, misma que se fijó al cráneo y los tornillos de sujeción con cemento dental. Se utilizaron obturadores de calibre 30G para asegurar la patencia de las cánulas a lo largo del experimento. Una vez terminada la cirugía, se dejó reposar a los animales en una caja de recuperación con soporte térmico hasta que recobraron el conocimiento y entonces fueron alojados en el bioterio de la Facultad en jaulas individuales. Los animales recibieron dosis postoperatoria del antibiótico y del analgésico 24 y 48 horas después de la cirugía. Posteriormente, a las 72 horas, se reanudó la toma de frotis vaginal, misma que continuó hasta que los animales tratados presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración. Aquellos animales que recuperaron la ciclicidad fueron a su vez divididos en dos grupos, el tratado con solución vehículo (líquido cefalorraquídeo artificial: ACSF; BASi, USA) y el grupo tratado con el antagonista de los RDA-2 (S (-)-Raclopride (+)-tartrate salt; Sigma, México).

Microinyección

Los animales fueron microinyectados en libre movimiento (n= 5-7) las 09:00 horas en la etapa de estro o diestro-1 con 0.4 μ l de ACSF o raclopride disuelto en ACSF (12.5 mg/ml). La solución a inyectar se colocó en una jeringa Hamilton de 10 μ L que se conectó a microinyectores de calibre 30G mediante un tubo de teflón MF-5164 con un diámetro interno de 0.12 mm y uno externo de 0.65 mm (BASi Instruments, USA). Los microinyectores tuvieron una longitud que sobresalió 0.5 mm de las cánulas guía. Las jeringas se controlaron mediante una bomba de infusión de un canal modelo Legato 100 (KD Scientific, USA). La tasa de infusión que se utilizó fue de 0.1 μ l/min durante 4 minutos. Una vez terminada la microinyección, las agujas permanecieron en posición por un minuto más para evitar el reflujo. Posteriormente, los animales fueron devueltos a su jaula y se continuó con el monitoreo del ciclo estral hasta el día de la eutanasia.



Eutanasia y procesamiento de los tejidos

Los animales microinyectados fueron sometidos a la eutanasia a las 09:00 horas del día del estro predicho inmediato al tratamiento. Para esto, se inyectó una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg) y una vez que perdieron la conciencia y no presentaron reflejos al dolor, fueron decapitados. Durante la autopsia se obtuvieron los ovarios, el útero y las adrenales, los cuales fueron pesados en una balanza analítica (Mettler AT261 Delta Range Marshall Scientific, USA). Los ovocitos fueron extraídos de los oviductos y fueron contados mediante la ayuda de un microscopio óptico después de ser teñidos con hematoxilina y eosina. Durante la autopsia también se obtuvo el cerebro, al cual se le removió el cerebelo y los bulbos olfatorios y se congeló a -20°C para realizar cortes histológicos de $50\ \mu\text{m}$ a lo largo del hipotálamo anterior en un criostato modelo CM1520 (Leica Biosystems, Alemania). Los cortes obtenidos fueron colocados en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina, teñidos con la técnica de Nissl y observados en un microscopio Optiphot-2 (Nikon Corp, Japón). Posteriormente, se hizo una inspección visual de los cortes con el fin de determinar la localización final de la cánula y también para observar la dispersión de la solución microinyectada.

Análisis de los datos

La tasa de animales ovulantes fue calculada como $\text{TAO} = \text{número de animales ovulantes}/n$ y, al igual que la proporción de animales cíclicos, se analizó mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher. El número de ovocitos liberados se analizó mediante la prueba U de Mann-Whitney o la de Kruskal-Wallis, seguida de Dunn, dependiendo si la comparación fue entre dos grupos o más, respectivamente. Las masas de los órganos se expresaron como la media \pm el error estándar de la media y fueron sometidas a pruebas de normalidad y homocedasticidad, posteriormente, se analizaron mediante la prueba t de Student cuando fueron dos grupos o mediante análisis de varianza de una vía en el caso de que fueran tres o más. En todos los casos se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue menor a 0.05. Se utilizó el programa GraphPad Prism, Version 7.0 para Windows (GraphPad Software, USA).



Resultados

Para este estudio se utilizaron un total de 105 ratas, 7 de ellas pertenecen al grupo intacto y las 98 restantes fueron sometidas a una cirugía estereotáxica en la que se les implantó una cánula guía dirigida al POA derecha o al POA izquierda. Se analizaron por separado los datos obtenidos de los animales en los que se confirmó que la cánula y la dispersión del líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o del raclopride se localizó en el POA (49 animales), que en el atlas de Paxinos y Watson comprende las láminas 35 a 37 (2014) (**Figura 8**), de aquellos obtenidos de animales en los que las cánulas se ubicaron fuera de la misma (49 animales).

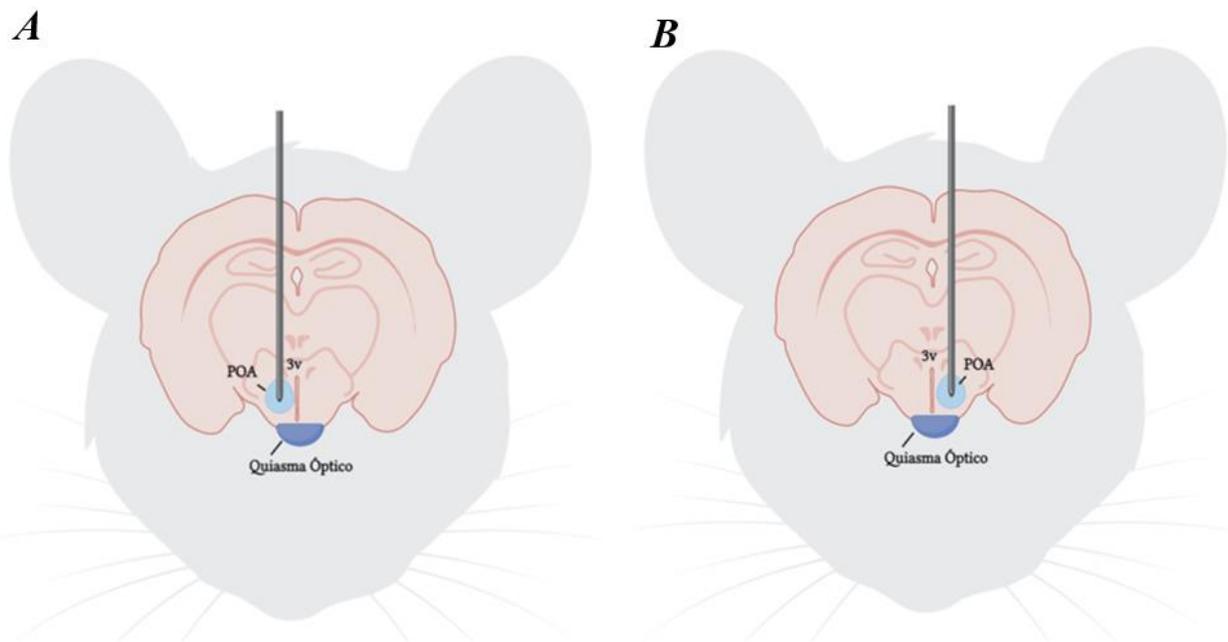


Figura 8. Representación gráfica de un corte coronal en el que se resalta al POA, la línea de color gris ejemplifica la trayectoria y la ubicación final de una cánula, de color azul claro se muestra la dispersión del fármaco inyectado líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o raclopride (Racl). En el inciso A se aprecia una cánula dirigida al POA-D y en el panel B una cánula dirigida al POA-I.



El efecto de la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial o de raclopride realizada a las 09:00 horas en el POA

En el caso de los animales en los que se determinó que las cánulas fueron implantadas en el POA, primero, se analizaron los datos sin tomar en cuenta la etapa del ciclo estral ni el hemisferio tratado (**Figura 9**). Se inició por el análisis del porcentaje de animales cíclicos y se encontró que no existieron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Intacto: 7/7 vs. ACSF: 25/26, $p= 0.7879$; Intacto: 7/7 vs. Raclopride: 23/23, $p> 0.9999$; ACSF: 25/26 vs. Raclopride: 23/23, $p= 0.5306$; prueba de probabilidad exacta de Fisher, **Figura 9a**). Posteriormente se analizó la tasa de animales ovulantes (Intacto: 7/7 vs. ACSF: 25/26, $p= 0.3653$; Intacto: 7/7 vs. Raclopride: 23/23, $p> 0.9999$; ACSF: 25/26 vs. Raclopride: 23/23, $p= 0.0706$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 9b**) y el número de ovocitos liberados (Intacto: M: 13 y RI: 12-14 vs. ACSF: M: 12 y RI: 9.5-14 vs. Raclopride: M: 13 y RI: 10-15, $p= 0.5617$; prueba de Kruskal-Wallis, **Figura 9c**).

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en las variables analizadas, se apreció un incremento en la dispersión de los datos del número de ovocitos liberados en los grupos tratados con el ACSF o con el raclopride. Al analizar a detalle, notamos que en 10 de los 49 animales que se canularon se redujo el número de ovocitos liberados con respecto al grupo control, ya que se encuentran por debajo del cuartil del 25%. En general, se pudo apreciar que el bloqueo de los RDA-2 en el POA no modificó la ciclicidad ni la ovulación de los animales tratados. Finalmente, se analizaron las masas de los ovarios ($F(2, 53) = 0.3225$, $p= 0.7257$; ANOVA), del útero ($F(2, 56) = 0.2980$, $p= 0.7435$; ANOVA) y de las adrenales ($F(2, 53) = 0.3264$, $p= 0.7230$; ANOVA) y tampoco se encontraron diferencias significativas.



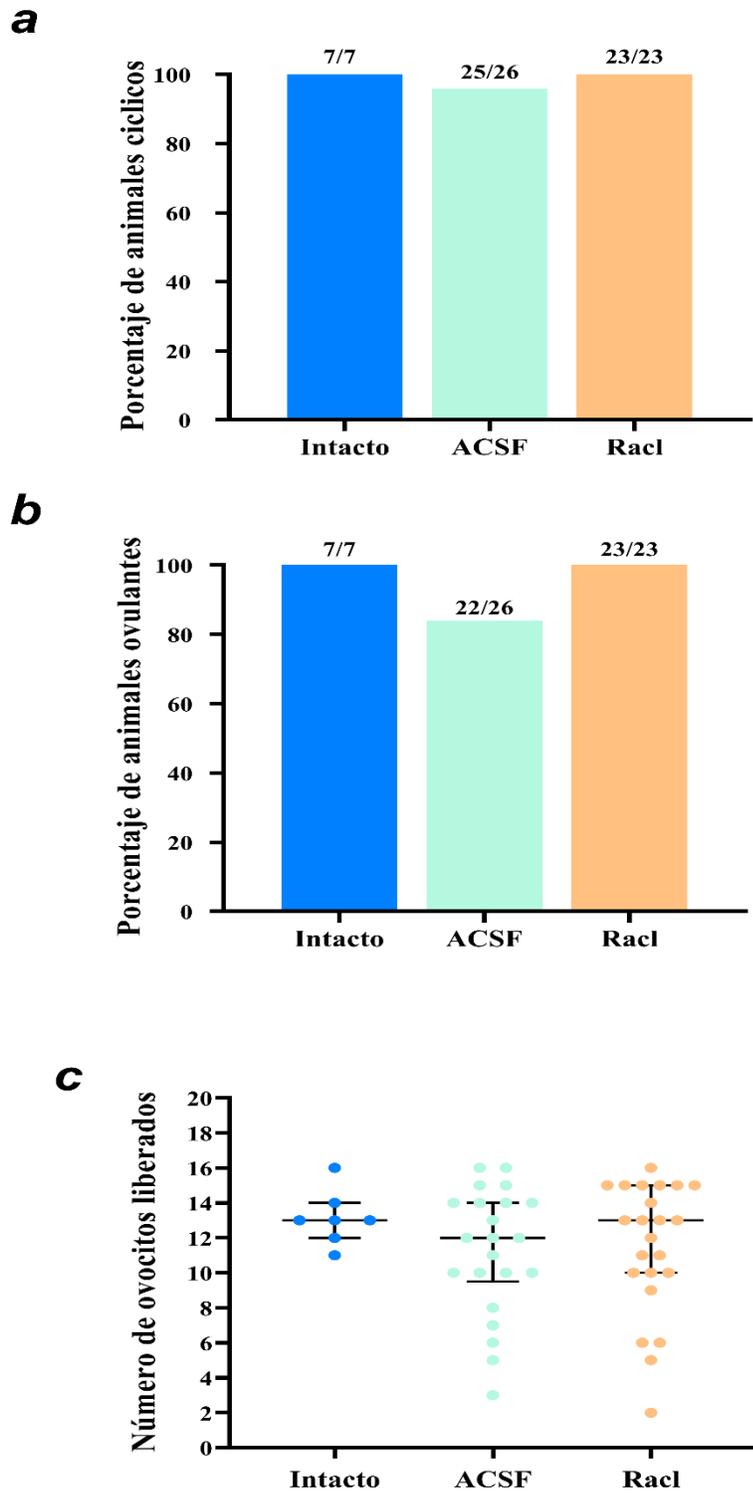


Figura 9. Efecto de la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o de raclopride (Racl) en el área preóptica sin considerar la etapa del ciclo estral o el hemisferio tratado, sobre el porcentaje de animales cíclicos (a), la tasa de animales ovulantes (b) y el número de ovocitos liberados, en donde se grafica la mediana y el rango inter cuartil (c).



El efecto de la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial o de raclopride en el POA a las 09:00 horas del estro o del diestro-1

Posteriormente se analizaron los datos considerando a la etapa del ciclo estral en la que se realizaron los tratamientos como una variable. El porcentaje de animales cíclicos no se modificó tras la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial o de raclopride a las 9:00 horas del estro (Intacto: 7/7 vs. ACSF_E: 12/12, $p > 0.9999$, Intacto:7/7 vs. Raclopride_E: 11/11, $p > 0.9999$, ACSF_E: 12/12 vs. Raclopride_E: 11/11, $p > 0.9999$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 10**), ni del diestro-1 (Intacto: 7/7 vs. ACSF_{D1}: 13/14, $p = 0.6667$, Intacto vs. Raclopride_{D1}: 12/12, $p > 0.9999$, ACSF_{D1}: 13/14 vs. Raclopride_{D1}: 12/12, $p = 0.1400$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 10**). Se observaron resultados semejantes al evaluar la tasa de animales ovulantes tratados durante el estro (Intacto: 7/7 vs. ACSF_E: 11/12, $p = 0.6316$, Intacto: 7/7 vs. Raclopride_E: 11/11, $p > 0.9999$, ACSF_E: 11/12 vs. Raclopride_E: 11/11, $p = 0.5217$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 10**) o el diestro-1 (Intacto: 7/7 vs. ACSF_{D1}: 11/14, $p = 0.2737$, Intacto: 7/7 vs. Raclopride_{D1}: 12/12, $p > 0.9999$, ACSF_{D1}: 11/14 vs. Raclopride_{D1}: 12/12, $p = 0.1400$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 10**). Tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar el número de ovocitos liberados (Intacto: M: 13 y RI: 12-14 vs ACSF_E: M: 12 y RI: 10-14 vs. Raclopride_E: M: 13 y RI: 10-15; $p = 0.5169$; prueba de Kruskal-Wallis; **Figura 10**) ni durante el diestro-1 (Intacto: M: 13 y RI: 12-14 vs. ACSF_{D1}: M: 12 y RI: 8-14 vs. Raclopride_{D1}: M: 12 y RI: 9.25-15; $p = 0.6584$; prueba de Kruskal-Wallis; **Figura 10**). Cabe mencionar que la comparación entre un mismo tratamiento realizado en las dos etapas evaluadas tampoco mostró diferencias significativas.



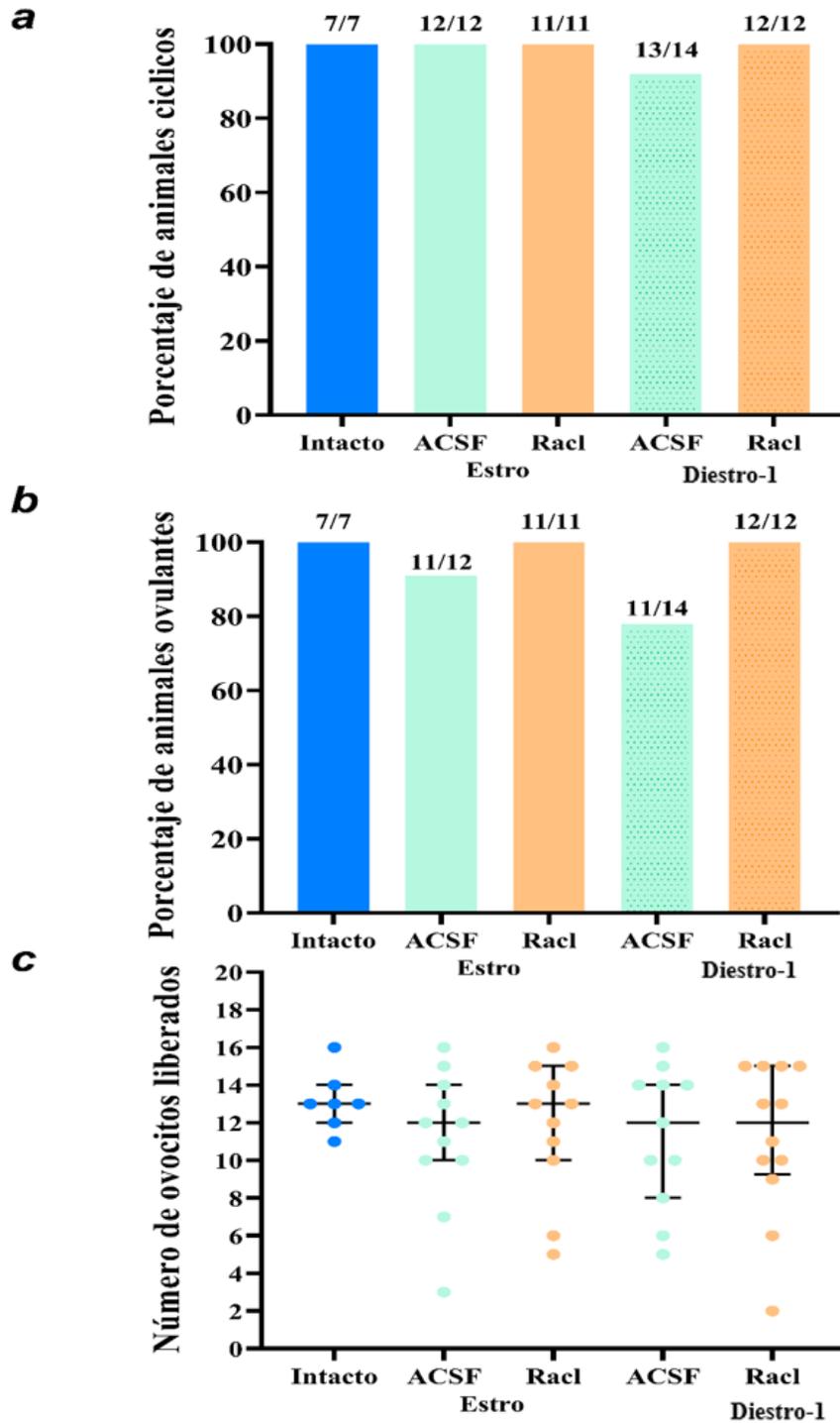


Figura 10. Porcentaje de animales cíclicos (a), ovulantes (b) y número de ovocitos liberados (c) de los grupos tratados con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o con raclopride (Racl) a las 9:00 horas de la etapa de estro o diestro-1. En la parte superior de cada barra se representa la proporción de animales cíclicos u ovulantes. En el caso del número de ovocitos liberados se muestra la mediana y el rango intercuartílico del número de ovocitos liberados por los animales tratados con ACSF o con Racl a las 9:00 horas de la etapa de estro o de diestro-1.



El análisis de las masas ováricas de los animales tratados en estro (Intacto: 24.99 ± 1.239 vs. ACSF_E: 25.86 ± 1.933 vs. Raclopride_E: 24.35 ± 1.047 , (F (2, 27) = 0.2608; p = 0.7723; ANOVA y en diestro-1, Intacto: 24.99 ± 1.239 ACSF_D: 21.03 ± 1.417 vs. Raclopride_D: 23.53 ± 1.393 , (F (2, 30) = 1.832; p= 0.1775; ANOVA; **Cuadro 1**), o de un mismo tratamiento entre las dos etapas analizadas, tampoco arrojó diferencias significativas. Lo mismo se observó en el caso del análisis de las masas uterinas en el estro (Intacto: 175.1 ± 9.969 vs. ACSF_E: 188.0 ± 14.88 vs. Raclopride_E: 187.9 ± 14.38 , (F (2, 27) = 0.2131; p= 0.8095, o en diestro-1, Intacto: 175.1 ± 9.969 vs ACSF_D: 161.3 ± 7.387 vs. Raclopride_D: 178.1 ± 13.61 , (F (2, 30) = 0.7917; p= 0.4623; ANOVA; **Cuadro 1**) y de las masas adrenales en estro (Intacto: 21.14 ± 0.8660 vs. ACSF_E: 22.08 ± 1.314 vs. Raclopride_E: 21.89 ± 0.7562 , (F (2, 27) = 0.1683; p= 0.8459; ANOVA y en diestro-1, Intacto: 21.14 ± 0.8660 vs. ACSF_D: 22.24 ± 0.7550 vs. Raclopride_D: 21.22 ± 1.302 , (F (2, 30) = 0.3746; p= 0.6907; ANOVA; **Cuadro 1**).

<i>Análisis de masas</i>	<i>Intacto</i>	<i>Estro</i>		<i>Diestro-1</i>	
		<i>ACSF</i>	<i>RACL</i>	<i>ACSF</i>	<i>RACL</i>
<i>Masa de los ovarios</i>	24.99 ± 1.239	25.86 ± 1.933	24.35 ± 1.047	21.03 ± 1.417	23.53 ± 1.393
<i>Masa del útero</i>	175.1 ± 9.969	188.0 ± 14.88	187.9 ± 14.38	161.3 ± 7.387	178.1 ± 13.61
<i>Masa de las adrenales</i>	21.14 ± 0.8660	22.08 ± 1.314	21.89 ± 0.7562	22.24 ± 0.7550	21.22 ± 1.302

Cuadro 1. Efecto de la microinyección de líquido cefalorraquídeo (ACSF) o de raclopride (Racl) a las 9.00 horas en la etapa de estro o diestro-1 sobre las masas (mg/100g de masa corporal) de los ovarios, el útero y las glándulas adrenales. Se muestra la Media \pm el error estándar de la media.



El efecto de la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial o de raclopride en el POA-I o en el POA-D a las 09:00 horas

Posteriormente, se analizaron los datos considerando únicamente el hemisferio del POA tratado como variable. En el caso de la ciclicidad, se mostró que no hay diferencias significativas entre los animales tratados con ACSF o raclopride en el POA-I (Intacto: 7/7 vs. ACSF_{POAI}: 13/14, $p=0.6667$, Intacto:7/7 vs. Raclopride_{POAI}: 13/13, $p>0.9999$, ACSF_{POAI}: 13/14 vs. Raclopride_{POAI}: 13/13, $p=0.5385$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 11a**) o POA-D (Intacto: 7/7 vs. ACSF_{POAD}: 12/12, $p=0.6316$, Intacto:7/7 vs. Raclopride_{POAD}: 11/11, $p>0.9999$, ACSF_{POAD}: 12/12 vs. Raclopride_{POAD}: 11/11, $p=0.5217$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 11a**). Adicionalmente, se mostró que no existen diferencias entre los grupos que fueron tratados con la solución vehículo en el hemisferio izquierdo o derecho (ACSF_{POAI}: 11/14 vs. ACSF_{POAD}: 11/12, $p=0.7200$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 11a**). Un resultado semejante se observó en los animales tratados con raclopride (Raclopride_{POAI}: 13/13 vs. Raclopride_{POAD}: 11/11, $p>0.9999$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 11a**).

En el caso del porcentaje de animales ovulantes tampoco mostró diferencias significativas cuando se microinyectó en el POA-I (Intacto: 7/7 vs. ACSF_{POAI}: 13/14, $p=0.2737$, Intacto:7/7 vs. Raclopride_{POAI}: 13/13, $p>0.9999$, ACSF_{POAI}: 11/14 vs. Raclopride_{POAI}: 12/12, $p=0.1400$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 11b**), o derecha (Intacto: 7/7 vs. ACSF_{POAD}: 12/12, $p=0.6316$, Intacto:7/7 vs. Raclopride_{POAD}: 11/11, ACSF_{POAD}: 11/12 vs. Raclopride_{POAD}: 11/11, $p=0.5217$; prueba de probabilidad exacta de Fisher; **Figura 11b**). En el caso del número de ovocitos liberados, tampoco se encontraron diferencias significativas en los animales tratados en el hemisferio izquierdo (Intacto: M:13 y RI:12-14 vs. ACSF_{POAI}: M:13 y RI:10-15 vs. Raclopride_{POAI}: M:13 y RI:10-15, $p=0.9481$; prueba de Kruskal-Wallis; **Figura 11c**) ni en el derecho (Intacto: M:13 y RI:12-14 vs. ACSF_{POAD}: M:11 y RI:6-14 vs. Raclopride_{POAD}: M:11 y RI:9-14, $p=0.2489$; prueba de Kruskal-Wallis; **Figura 11c**).



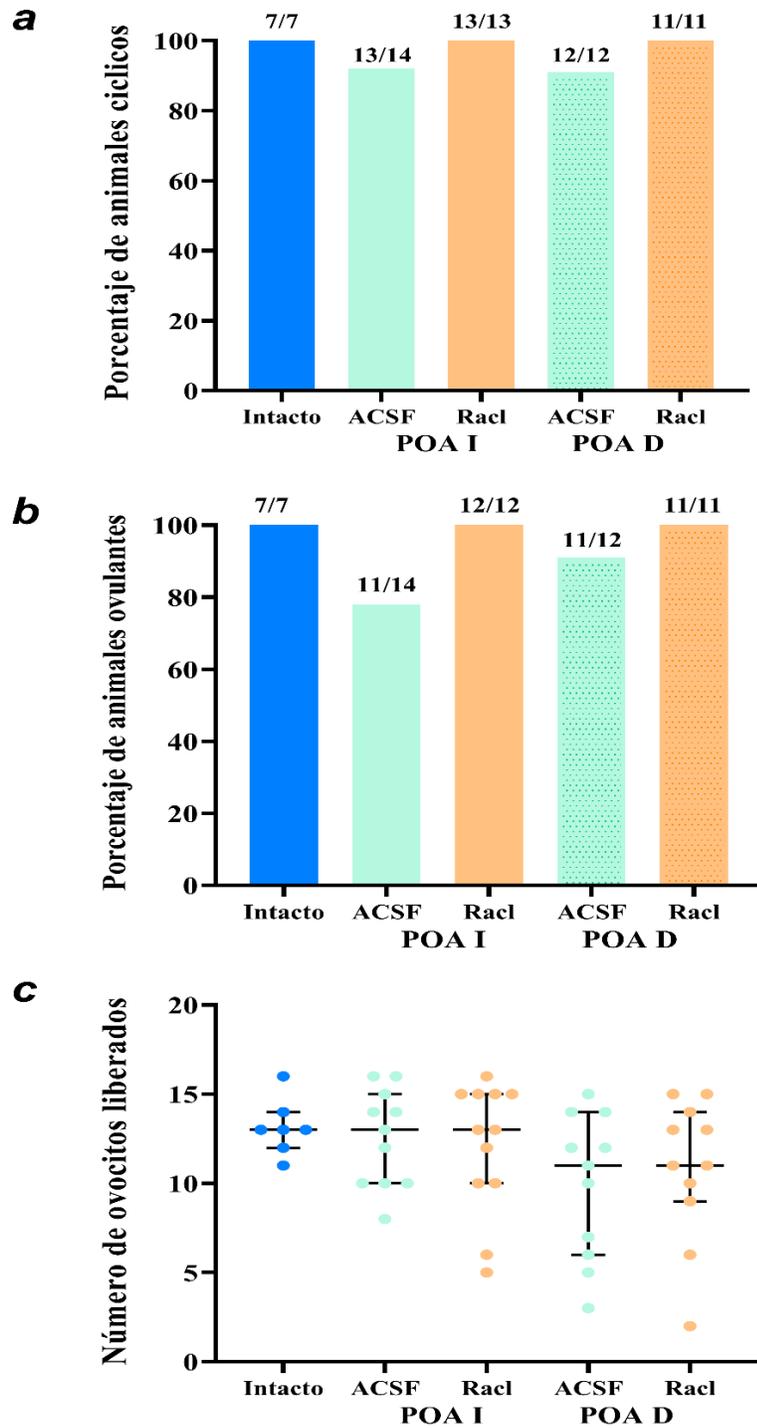


Figura 11. Porcentaje de animales cíclicos (a), ovulantes (b) y número de ovocitos liberados (c). En la parte superior de cada barra se aprecia la proporción de animales cíclicos u ovulantes, en el caso del número de ovocitos liberados se muestra la mediana y el rango intercuartílico del número de ovocitos liberados por los animales tratados con ACSF o con Racl a las 9:00 horas en el POA-I o en el POA-D.



Al analizar la masa de los órganos, se observó que los tratamientos no tuvieron ningún efecto sobre la masa ovárica cuando se realizaron en el POA-I (Intacto: 24.99 ± 1.239 vs. ACSF_{POAI}: 24.82 ± 1.784 vs. Raclopride_{POAI}: 23.01 ± 1.353 F (2, 30) = 0.4535, p= 0.6397; prueba de ANOVA) o en el POA-D (Intacto: 24.99 ± 1.239 vs. ACSF_{POAD}: 21.43 ± 1.642 vs. Raclopride_{POAD}: 24.93 ± 1.035 , F (2, 27) = 2.234, p= 0.1265; prueba de ANOVA; **Cuadro 2**). Resultados semejantes se encontraron en cuanto a la masa uterina de los animales tratados en el hemisferio izquierdo (Intacto: 175.1 ± 9.969 vs. ACSF_{POAI}: 180.6 ± 12.74 vs. Raclopride_{POAI}: 178.7 ± 13.02 , F (2, 30) = 0.03855, p= 0.9622; prueba de ANOVA) o en el derecho (Intacto: 175.1 ± 9.969 vs. ACSF_{POAD}: 165.4 ± 9.824 vs. Raclopride_{POAD}: 187.2 ± 15.05 , F (2, 27) = 0.8811, p= 0.4259; prueba de ANOVA; **Cuadro 2**). Por último, los tratamientos en el POA-I no modificaron significativamente la masa de las adrenales cuando se realizaron en el hemisferio izquierdo (Intacto: 21.14 ± 0.8660 vs. ACSF_{POAI}: 23.38 ± 0.6764 vs. Raclopride_{POAI}: 21.36 ± 1.039 , F (2, 30) = 2.083 p= 0.1422; prueba de ANOVA) ni en el POA-D (Intacto: 21.14 ± 0.8660 vs. ACSF_{POAD}: 20.75 ± 1.243 vs. Raclopride_{POAD}: 21.74 ± 1.152 , F (2, 27) = 0.1989, p= 0.8208; prueba de ANOVA; **Cuadro 2**).

<i>Análisis de masas</i>	<i>Intacto</i>	<i>POA-I</i>	<i>POA-D</i>	<i>POA-I</i>	<i>POA-D</i>
		<i>ACSF</i>	<i>ACSF</i>	<i>RACL</i>	<i>RACL</i>
<i>Masa de los ovarios</i>	24.99 ± 1.239	24.82 ± 1.784	21.43 ± 1.642	23.01 ± 1.353	24.93 ± 1.035
<i>Masa del útero</i>	175.1 ± 9.969	180.6 ± 12.74	165.4 ± 9.824	178.7 ± 13.02	187.2 ± 15.05
<i>Masa de las adrenales</i>	21.14 ± 0.8660	23.38 ± 0.6764	20.75 ± 1.243	21.36 ± 1.039	21.74 ± 1.152

Cuadro 2. Efecto de la microinyección de líquido cefalorraquídeo (ACSF) o de raclopride (Racl) a las 9.00 horas en el POA-I o en el POA-D sobre las masas de los ovarios, el útero y las glándulas adrenales (mg/100g de masa corporal). Se muestra la Media \pm el error estándar de la media.



El efecto de la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial o de raclopride en el POA-I o POA-D en las etapas de estro y diestro-1 a las 09:00

Finalmente, se realizaron todos los análisis previos tomando como variables a la etapa del ciclo estral y al hemisferio en el que se realizó la microinyección. En el caso del porcentaje animales cíclicos, el porcentaje de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados no se encontraron diferencias significativas ($p \geq 0.05$, **Cuadro 3**). No obstante, al analizar la masa ovárica se encontró un decremento al comparar el grupo de ACSF POA-IE: 27.70 ± 2.374 vs. ACSF POA-DD1: 20.11 ± 1.739 , ***p= 0.0242**; prueba de ANOVA. En el caso de la masa uterina se observó un decremento al comparar el grupo de ACSF POA-IE: 208.5 ± 19.71 vs. ACSF POA-ID1: 152.8 ± 7.49 , ^**p= 0.0234**; prueba de ANOVA. Por último, se observó un incremento en cuanto a la masa de las glándulas adrenales al comprar el grupo de ACSF POA-IE: 24.31 ± 1.081 vs. ACSF POA-DE: 18.94 ± 2.173 , @**p= 0.0342**; prueba de ANOVA, así como en la comparación del grupo ACSF POA-IE: 24.31 ± 1.081 vs. Raclopride POA-IE: 20.45 ± 0.9468 , #**p= 0.0338**; prueba de ANOVA (**Cuadro 3**).

Efecto de la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial o de raclopride fuera del POA

El análisis histológico del cerebro de 49 animales mostró que la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial o de raclopride se realizó fuera del POA, estas inyecciones se ubicaron en el núcleo supraquiasmático, el tercer ventrículo, el quiasma óptico y el área retroquiasmática. Debido al número de observaciones en cada grupo, los datos se agruparon por tratamiento y se analizaron los parámetros descritos anteriormente. Se encontró que no hay cambios significativos en cuanto a la ciclicidad (Intacto: 7/7 vs. ACSF: 24/26, $p=0.6155$; Intacto: 7/7 vs. Raclopride: 23/23, $p>0.9999$; ACSF: 24/26 vs. Raclopride: 23/23, $p=0.2764$; prueba de probabilidad exacta de Fisher) ni la tasa de animales ovulantes (Intacto: 7/7 vs. ACSF 20/26, $p=0.2079$; Intacto: 7/7 vs. Raclopride: 22/23, $p=0.7667$; ACSF: 20/26 vs. Raclopride: 22/23, $p=0.6993$, prueba de probabilidad exacta de Fisher). Por otro lado, se encontró una disminución significativa en el número de ovocitos liberados por los animales tratados con la solución vehículo (Intacto: M:13.14 y RI:12-14, ACSF: M:9.550 y RI:6.250-11.75, Raclopride: M:12.36 y RI:10-14.25; Kruskal Wallis **p=0.0088****). Por último, no se encontraron diferencias significativas en la masa de los ovarios ($F(2, 53) = 2.187$, $P=0.1223$; prueba de ANOVA), el útero (F



(2, 53) = 0.7116, P=0.4955; prueba de ANOVA) o las glándulas adrenales (F (2, 53) = 0.05966, P=0.9421; prueba de ANOVA).

Análisis	Intacto	Estro				Diestro-1			
		POA-I		POA-D		POA-I		POA-D	
		ACSF	Raclopride	ACSF	Raclopride	ACSF	Raclopride	ACSF	Raclopride
Ciclicidad	7/7	7/7	6/6	5/5	5/5	6/7	6/6	7/7	6/6
TAO	7/7	6/7	6/6	5/5	5/5	5/7	6/6	6/7	6/6
Ovocitos liberados	M:13 RI:12-14	M:13.50 RI:10-15.25	M:12.50 RI:8.75-15.25	M:11 RI:5-12	M:13 RI:8.50-14.50	M:12 RI:9-15	M:14 RI:9-15	M:12 RI:5.75-14.25	M:10.50 RI:7.25-13.50
Masa de los ovarios	24.99 ± 1.239	27.70 ± 2.374	24.35 ± 1.474	23.28 ± 3.158	24.36 ± 1.665	21.94 ± 2.324	21.67 ± 2.271	20.11 ± 1.739*	25.40 ± 1.409
Masa del útero	175.1 ± 9.969	208.5 ± 19.71	184.9 ± 25.32	159.3 ± 17.11	191.5 ± 13.04	152.8 ± 7.49^	172.6 ± 9.501	169.8 ± 12.50	183.7 ± 26.68
Masa de las adrenales	21.14 ± 0.8660	24.31 ± 1.081	20.45 ± 0.9468#	18.94 ± 2.173@	23.62 ± 0.6560	22.44 ± 0.7221	22.27 ± 1.878	22.04 ± 1.391	20.17 ± 1.869

Cuadro 3. Efecto del tratamiento con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o con Raclopride (Racl) en el POA-I o en el POA-D en las etapas de estro o diestro-1 sobre la ciclicidad estral, la tasa de animales ovulantes (TAO), el número de ovocitos liberados, la masa de los ovarios, el útero y las glándulas adrenales (Media ± el error estándar de la media expresado en mg/100g de masa corporal). ***p= 0.0242**, ACSF POA-I_E vs. ACSF POA-D_{D1}; prueba de ANOVA. ^**p= 0.0234**, ACSF POA-I_E vs. ACSF POA-I_{D1}; prueba de ANOVA. @**p= 0.0342**, ACSF POA-I_E vs. ACSF POA-D_E; prueba de ANOVA. #**p= 0.0338**, ACSF POA-I_E vs. Raclopride POA-I_E; prueba de ANOVA.



Discusión

El presente estudio se realizó con el fin de discernir si los RDA-2 presentes en el POA participan en la regulación de la ovulación de la rata adulta a las 9:00 horas del estro o del diestro-1. Al analizar los datos considerando la etapa del ciclo estral y el hemisferio cerebral en el que se realizaron los tratamientos, se mostró que la tasa de animales cíclicos, el número de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados no se modificó con respecto al grupo control. Esto ocurre sin importar si la microinyección se realizó con el ACSF o con el raclopride. Debido a que la inhibición de una familia de los RDA no resulta en el bloqueo de la ovulación, rechazamos la hipótesis planteada en el párrafo anterior y pensamos que el papel de los RDA-1 y los RDA-2 es redundante, por lo que el bloqueo de una sola familia en el POA no altera la ovulación.

Una explicación alternativa a la ausencia de efectos del raclopride puede ser la hora en la que se realizó el tratamiento, ya que la actividad del sistema dopaminérgico varía de acuerdo con la hora y con la etapa del ciclo estral. Se ha reportado que, en la médula espinal y en el POA esta amina alcanza su concentración máxima durante la fase de luz, alrededor de las 12:00 horas y posteriormente comienza a decrecer hasta llegar a su concentración más baja a las 20:00 horas (Jiménez-Zárte et al., 2021; Renner et al., 1984). Cabe mencionar que las ratas en las que se cuantificó la concentración de la dopamina se mantuvieron bajo fotoperiodo 12/12, por lo que el momento en el que ocurre la acrofase y la batifase en nuestras ratas podría variar. En cuanto a las variaciones que dependen de la etapa del ciclo, se ha descrito que la concentración es basal en el proestro, incrementa ligeramente en diestro-1 y diestro-2 y finalmente alcanza su concentración máxima durante el estro (Dazzi et al., 2006). Domínguez y colaboradores (1985) reportaron que la administración sistémica de clorpromazina a las 13:00 horas resulta en el bloqueo de la ovulación en el proestro, en el diestro-1 y diestro-2 reduce la tasa de animales ovulantes y en el estro no la modifica. Esto tiene sentido ya que se ha descrito que la eficacia de los antagonistas se reduce cuando los receptores están expuestos a mayores concentraciones de su ligando endógeno, con el que compiten por el sitio de unión (Scimemi y Beato, 2009).

Los resultados de Domínguez y colaboradores (1985) pueden deberse a la naturaleza sistémica del tratamiento y a que la clorpromazina es un antagonista de alta afinidad por los RDA-1 y de baja afinidad por los RDA-2. Para clarificar el sitio en el que el antagonista actuó para modificar la ovulación, Morán y Domínguez (1995) implantaron cristales de haloperidol directamente en el POA-I o en el POA-



D y mostraron que el tratamiento reduce casi en su totalidad la tasa de animales ovulantes en las etapas de estro y diestro-1, en el diestro-2 la reduce parcialmente y en el proestro no tiene efecto. La diferencia entre estos resultados y los del experimento de 1985 podría deberse a que la concentración de la dopamina es diferente en el sistema nervioso periférico que, en el sistema nervioso central, por lo que la respuesta ante el bloqueo del sistema dopaminérgico a nivel de la hipófisis y el ovario sería igualmente distinta (Ahrén *et al.*, 1971; Ben-Jonathan *et al.*, 1977; Juárez *et al.*, 2016).

Como se mencionó, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de ovocitos liberados, sin embargo, se incrementó la dispersión de los datos en los grupos tratados con la solución vehículo o con el raclopride dentro o fuera del POA a las 9:00 horas. Estos resultados pueden deberse al efecto de la administración de una sustancia exógena, ya que se ha reportado que esto modifica de forma abrupta el volumen celular y la concentración de iones en el medio extracelular. Lo que puede tener consecuencias dañinas, especialmente en el cerebro, donde la expansión del volumen es limitada por la rigidez del cráneo y las alteraciones en la concentración de iones pueden estimular o inhibir la excitabilidad neuronal, además de ocasionar varios tipos de lesiones como isquemia, traumatismo e infecciones (Massieu *et al.*, 2004; Saly y Andrew 1993). Se ha descrito que de 24 a 48 horas posteriores a una lesión cerebral se sintetizan y se secretan citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa y las interleucinas 1 y 6, que son mediadores clave de la inflamación. Estas citocinas pueden actuar como neurotransmisores y desempeñar funciones directas sobre el sistema nervioso central, como inducir fiebre, regular el sueño y la estimulación del sistema neuroendocrino. Cabe mencionar que se ha reportado que la interleucina 1 suprime la síntesis y la secreción de la GnRH (Ayus *et al.*, 2000; Gullans y Verbalis, 1993; Hussy *et al.*, 2000; Kimelberg y Mongin, 1998; Machino y Yoshizawa, 2006; Strange, 1992; Tomaszewska-Zaremba y Andrzej, 2009).

En adición al sistema inmune, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal responde ante las condiciones de estrés. En el núcleo paraventricular se lleva a cabo la síntesis y la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que es transportada por el sistema porta hasta la adenohipófisis, donde se une a sus receptores en los corticotropos. Esto da como resultado la síntesis y la secreción de la proopiomelanocortina y de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Posteriormente, la ACTH es transportada a través de la sangre hasta su órgano diana, las glándulas adrenales, donde estimula la secreción de glucocorticoides, corticosterona en roedores y cortisol en humanos. Se ha reportado que diversos factores pueden estimular la secreción de la ACTH y de la CRH como la serotonina, la



norepinefrina y la dopamina (Kusmenkov *et al.*, 2019; Loche *et al.*, 2009; Malarkey y Zvara 1989; Wei *et al.*, 2019).

Wei y colaboradores (2019) reportaron que, en los mamíferos, la corticosterona reduce la secreción de la GnRH y, consecuentemente, la de las gonadotropinas. Esto provoca la disminución de la tasa de animales ovulantes, la masa de los ovarios, la cantidad de folículos maduros y la concentración de estradiol y de progesterona, lo que conlleva al bloqueo de la ovulación en algunos animales (Vitellius *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019). Considerando los antecedentes antes expuestos, la dispersión en el número de ovocitos liberados pudo deberse a los efectos de la alteración del microambiente que rodea a las neuronas del POA ocasionado por la microinyección de ACSF o de raclopride. Esto pudo estimular la participación del sistema inmune, lo que a su vez indujo el incremento en la concentración de corticosterona y, por lo tanto, redujo la síntesis y la secreción de la GnRH, modificando el número de ovocitos liberados en algunos animales, lo que además nos sugiere que existen diferencias en la sensibilidad a estos estímulos que dependen de cada individuo.

En el caso de la masa ovárica se observó una reducción en el grupo tratado con ACSF en el POA-D en la etapa de diestro-1 en comparación al grupo de ACSF en el POA-D en la etapa de estro a las 9:00 horas. Esto puede deberse a la sensibilidad de la hembra para percibir y responder a estímulos estresantes a lo largo del ciclo estral. En este sentido, se ha reportado una mayor susceptibilidad en la respuesta al estrés en la fase no receptiva del ciclo (diestro) en comparación a la fase receptiva (estro) (Lovick, 2012). Considerando esto, podemos atribuir la reducción en la masa ovárica a la activación del eje del estrés ocasionada por la microinyección de ACSF en el POA-D a las 9:00 del diestro-1, lo que estimularía la secreción de la CRH y la ACTH, que inhiben la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas y por ende el desarrollo de los folículos ováricos (Calogero *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 2015; Oakley *et al.*, 2009; Vitellius *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019).

Se encontraron resultados semejantes al analizar la masa uterina en los animales tratados con ACSF en el POA-I a las 9:00 horas del diestro-1, de igual manera, esto puede deberse al incremento en la concentración de la CRH y la ACTH, ya que éstas reducen la secreción de la progesterona y el estradiol, que son las encargadas de estimular el engrosamiento del útero (Kalantaridou *et al.*, 2004). Al analizar la masa ovárica y la masa uterina de los animales tratados con raclopride no se apreció esta reducción sin importar el hemisferio tratado. Liu y Herbison (2013) observaron que la administración de SCH-23390 y/o raclopride *in vitro* estimula aproximadamente al 50% de las neuronas de la GnRH,



basándonos en esto, podríamos sugerir, con reserva, que la microinyección de raclopride en el POA-I o en el POA-D puede estimular la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y finalmente de las hormonas esteroides, por lo que no se aprecia el decremento en la masa ovárica y uterina.

Finalmente, en el caso de las glándulas adrenales se mostraron diferencias significativas al comparar los efectos de la microinyección de ACSF en el POA-IE contra los del ACSF en el POA-DE, así como los del grupo de ACSF en el POA-IE contra los del raclopride en el POA-IE. En el primer caso, se observó un incremento en la masa de las glándulas adrenales tras la inyección. Esto puede deberse a una asimetría en la sensibilidad de ambos hemisferios, ya que se ha mostrado la participación diferencial del sistema inmune entre los mismos (Duboc *et al.*, 2015). Por ejemplo, la lesión de la neocorteza izquierda o derecha induce efectos opuestos sobre la síntesis de interleucinas, la activación de macrófagos y de las células natural killer (Neveu, 1992). Aunado a esto, se ha observado que al realizar lesiones corticales en el hemisferio izquierdo se deprimen las funciones de los linfocitos T, en cambio, al lesionar al hemisferio derecho estas funciones mejoran (Barnéoud *et al.*, 1990; Malarkey y Zvara, 1989; Pruessner *et al.*, 2004; Ulrich-Lai *et al.*, 2006). Con base en lo anterior, podría ser que a las 9:00 horas del estro el incremento de las funciones del sistema inmune en el hemisferio derecho estimule la síntesis y la secreción de la ACTH y la CRH y estas, a su vez, estimulen la mitosis en las células de las glándulas adrenales, lo que incrementaría su masa.

En el segundo caso, se observó que la inyección de raclopride en el hemisferio izquierdo disminuyó la masa adrenal con respecto al grupo tratado con ACSF, lo que no ocurrió en el hemisferio derecho. Se sabe que en el hemisferio izquierdo del encéfalo hay una menor concentración de dopamina que en el derecho por lo que el efecto de la microinyección de raclopride en dicho hemisferio sería mayor debido a un decremento en la competencia por los sitios de unión. Por otra parte, se ha observado que las neuronas de la GnRH ubicadas en el POA proyectan hacia el núcleo paraventricular y que la CRH modula la actividad de estas neuronas de manera directa, lo que depende de la concentración de estradiol (Phumsatitpong *et al.*, 2020; Tian *et al.*, 1991). En conjunto, estos resultados sugieren un sistema de retroalimentación entre el eje reproductivo y el del estrés, debido a esta relación anatómica y funcional, podría ser que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos en el POA inhiba la secreción de la CRH y de la ACTH, dando como resultado la reducción de la masa de las glándulas adrenales (Barnéoud *et al.*, 1990; Saldanha *et al.*, 2001; Silverman *et al.*, 1981; Shao-jun *et al.*, 2010). Otra posible explicación es que a las 9:00 horas del estro el hemisferio encargado de regular la síntesis y la secreción de la CRH sea



el izquierdo, por lo que la microinyección de ACSF o de raclopride en el hemisferio derecho no modifica la concentración de la CRH y por ende no hubo un incremento en la masa de las glándulas adrenales. Con respecto a ello, se ha mostrado que existe una mayor concentración de CRH en el hemisferio izquierdo de ratas que fueron sometidas a estrés (Keck *et al.*, 2002).



Conclusiones

1. En la rata adulta el bloqueo de los RDA-2 en el POA izquierda o derecha a las 9:00 horas de las etapas de estro y diestro-1 no tiene efecto sobre la tasa de animales ovulantes, el porcentaje de animales cíclicos y el número de ovocitos liberados, por lo que sugerimos que la dopamina no modula la secreción de la GnRH en estos momentos del ciclo.
2. La microinyección de ACSF disminuyó la masa ovárica y uterina en función del hemisferio tratado, lo que no ocurrió tras la administración de raclopride, por lo que sugerimos que, en condiciones de estrés, la dopamina inhibe la secreción de la GnRH actuando a través de los RDA-2.
3. La microinyección de raclopride en el POA-I, pero no en el POA-D, resulta en el decremento de la masa de las glándulas adrenales, por lo que proponemos que existe una asimetría en la respuesta del sistema inmune y del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, que depende de la comunicación entre el sistema dopaminérgico del POA.



Perspectivas

Considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, nos planteamos las siguientes preguntas:

1. ¿Los efectos de la microinyección de ACSF o raclopride sobre la masa de los ovarios, el útero y las adrenales depende de alteraciones en la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y de las hormonas ováricas en respuesta a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal? Para ello, proponemos analizar la concentración de dichas hormonas tras los tratamientos evaluados en el presente estudio. Adicionalmente, analizar la dinámica del desarrollo folicular en los ovarios de los animales que se utilizaron en este experimento.
2. ¿La modulación de la actividad de las neuronas del POA que ejerce la dopamina al unirse a los RDA-2 se modifica en función de la hora del día y de la etapa del ciclo estral? Proponemos el análisis de la participación de estos receptores en un horario distinto, por ejemplo, alrededor del periodo crítico de las distintas etapas del ciclo estral, o en los momentos en que se ha reportado una menor concentración de la dopamina en el hipotálamo, con el fin de resolver esta pregunta.
3. ¿Los efectos de las soluciones microinyectadas sobre el número de ovocitos liberados en algunos animales se debe al daño mecánico que ejercen las soluciones en el cerebro, lo que resulta en la activación del eje del estrés? Para ello proponemos modificar el volumen administrado y alargar el tiempo en el que se microinyectan las soluciones con el fin de disminuir el daño ocasionado.



Referencias

- Adams C, Stroberg W, DeFazio RA, Schnell S, Moenter SM.** (2017). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron excitability is regulated by estradiol feedback and kisspeptin. *The Journal of Neuroscience* 38(5): 1249-1263.
- Advis JP, McCann SM, Negro-Vilar A.** (1980). Evidence that catecholaminergic and peptidergic (luteinizing hormone-releasing hormone) neurons in suprachiasmatic-medial preoptic, medial basal hypothalamus and median eminence are involved in estrogen-negative feedback. *Endocrinology* 107(4): 892-901.
- Ahmed CE, Dees WL, Ojeda SR.** (1986). The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118(4): 1682–1689.
- Ahrén K, Fuxe K, Hamberger L, Hökfelt T.** (1971). Turnover Changes in the Tubero-infundibular Dopamine Neurons During the Ovarian Cycle of the Rat I. *Endocrinology* 88(6): 1415–1424.
- Ajayi AF, Akhigbe RE.** (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice* 6(1) 5.
- Ajika K.** (1979). Simultaneous localization of LHRH and catecholamines in rat hypothalamus. *Journal of Anatomy* 128: 331–347.
- Akaoka H. CP, Saunier CF, Buda M, Chouvet G.** (1992). Inhibition of nigral dopamine neurons by systemic and local apomorphine: Possible contribution of dendritic autoreceptors. *Neuroscience* 49(4): 879–891.
- Albanese A, Miniciacchi D.** (1983). Organization of the ascending projections from the ventral tegmental area: A multiple fluorescent retrograde tracer study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 216(4): 406–420.
- Alizadeh R, Hassanzadeh G, Soleimani M, Joghataei MT, Siavashi V, Khorgami Z.** (2015). Gender and age-related changes in number of dopaminergic neurons in adult human olfactory bulb. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 69: 1–6.
- Amara SG, Kuhar MJ.** (1993). Neurotransmitter Transporters: Recent Progress. *Annual Review of Neuroscience* 16(1): 73–93.
- Amoss M, Burgus R, Blackwell R, Vale W, Fellows R, Guillemin R.** (1971). Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44(1): 205-10.
- Andersen PH, Gingrich JA, Bates Md, Dearry A, Falardeau P, Senogles SE, Caron MG.** (1990). Dopamine Receptor Subtypes: Beyond the D1/D2 Classification. *Trends in Pharmacological Sciences* 11(6): 231–236.
- Anderson GM, Connors JM, Hardy SL, Valent M, Goodman RL.** (2001a). Oestradiol microimplants in the ventromedial preoptic area inhibit secretion of luteinizing hormone via dopamine neurones in anoestrous ewes. *Journal of Neuroendocrinology* 13:1051–1058.
- Anderson R.** (2001b). *International Review of Cytology. Cell Lineage and Embryo Patterning. Early events in the mammalian germ line.* Academic Press 203: 215–230.
- Andrews WV, Conn PM.** (1986). Gonadotropin-releasing hormone stimulates mass changes in phosphoinositides and diacylglycerol accumulation in purified gonadotrope cell cultures. *Endocrinology* 118(3):1148-58.
- Araújo VR, Gastal MO.** (2014). In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(1): 78.



- Arbogast LA, Voogt JL.** (1990). Sex-related alterations in hypothalamic tyrosine hydroxylase after neonatal monosodium glutamate treatment. *Neuroendocrinology* 52: 460–467.
- Arbogast LA, Voogt JL.** (1991). Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA signal levels in central dopaminergic neurons: development of a gender difference in the arcuate nuclei. *Developmental Brain Research* 63(1-2): 151-61.
- Arendash G, Gallo RV.** (1978). Apomorphine-induced inhibition of episodic LH release in ovariectomized rats with complete hypothalamic deafferentation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 159: 121-125.
- Arioua RK, Benhaim A, Feral C, Leymarie P.** (1997). Luteotrophic factors in hyperstimulated pseudopregnant rabbit: II – High sensitivity to hCG of luteal tissue and small luteal cells. *Journal of Endocrinology* 154(2): 259–65.
- Astwood EB.** (1939). Changes In the Weight and Water Content of The Uterus of The Normal Adult Rat. *American Journal Of Physiology-Legacy Content* 126(1): 162–170.
- Ayus JC, Varon J, Arieff AI.** (2000). Hyponatremia, cerebral edema, and noncardiogenic pulmonary edema in marathon runners. *Annals of Internal Medicine* 132(9): 711-714.
- Baker H.** (1986). Species differences in the distribution of substance P and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology* 252: 206–226.
- Baladi MG, Daws LC, France CP.** (2012). You are what you eat: Influence of type and amount of food consumed on central dopamine systems and the behavioral effects of direct-and indirect-acting dopamine receptor agonists. *Neuropharmacology* 63(1): 76–86.
- Barbacka-Surowiak G, Surowiak J, Stokłowska S.** (2003). The involvement of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. *Reproductive Biology* 3(2): 99-129.
- Bardóczy Z, Wilhelm T, Skrapits K, Hrabovszky E, Rácz G, Matolcsy A, Liposits Z, Sliwowska Jh, Dobolyi Á, Kalló I.** (2018). GnRH Neurons Provide Direct Input to Hypothalamic Tyrosine Hydroxylase Immunoreactive Neurons Which Is Maintained During Lactation. *Frontiers in Endocrinology* 9: 685.
- Barnéoud P, le Moal M, Neveu PJ.** (1990). Asymmetric distribution of brain monoamines in left- and right-handed mice. *Brain Research* 520(1-2): 317-321.
- Barraclough C, Wise PM.** (1982). The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocrine Reviews* 3: 91-119.
- Barry J.** (1979). Immunohistochemistry of luteinizing hormone-releasing hormone-producing neurons in vertebrates. *International Review of Cytology* 60: 179-221.
- Beck W, Wuttke W.** (1977). Desensitization Of the Dopaminergic Inhibition of Pituitary Luteinizing Hormone Release by Prolactin in Ovariectomized Rats. *Journal of Endocrinology* 74(1): 67-74.
- Bédécarrats GY, Kaiser UB.** (2003). Differential Regulation of Gonadotropin Subunit Gene Promoter Activity by Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in Perfused L β T2 Cells: Role of GnRH Receptor Concentration. *Endocrinology* 144(5): 1802–1811.
- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E.** (1978). Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202: 631–633.
- Ben-Jonathan N, Weiner OC, Howard J, Mical RS, Porter JC.** (1977). Dopamine in Hypophysial Portal Plasma of the Rat During the Estrous Cycle and Throughout Pregnancy. *Endocrinology* 100(2): 452–458.
- Bennett-Clarke C, Joseph SA.** (1982). Immunocytochemical distribution of LH-RH neurons and processes in the rat: hypothalamic and extrahypothalamic locations. *Cell and Tissue Research* 221(3):493-504.



- Björklund A, Dunnett SB.** (2007). Dopamine neuron systems in the brain: An update. *Trends in Neuroscience* 30(5): 194–202.
- Björklund A, Lindvall O.** (1975). Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Research* 83(3): 531–537.
- Björklund A, Lindvall O.** (1984). Dopamine-containing systems in the CNS. *Handbook of chemical neuroanatomy. Classical transmitters in the CNS.* Elsevier 1(2): 55-122.
- Björklund A, Nobin A.** (1973). Fluorescence histochemical and microspectrofluorometric mapping of dopamine and noradrenaline cell groups in the rat diencephalon. *Brain Research* 51: 193-205.
- 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.
- Bowyer JF, Weiner N.** (1987). Modulation of the Ca⁺⁺-evoked release of [3H]dopamine from striatal synaptosomes by dopamine (D2) agonists and antagonists. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics.* 241(1): 27-33.
- Braak H, Braak E.** (1992). Anatomy of the human hypothalamus (chiasmatic and tuberal region). *Progress in Brain Research* 93: 3–14.
- Breen KM, Mellon PL.** (2014). Influence of stress-induced intermediates on gonadotropin gene expression in gonadotrope cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 385(1-2): 71–77.
- Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Mayo KE, Shea LD, Woodruff TK.** (2006). Fate of the initial follicle pool: Empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Developmental Biology* 298(1), 149–154.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL.** (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European Journal of Biochemistry* 238(1): 1-27.
- Bunzow JR, Tol HHMV, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Civelli O.** (1988). Cloning And Expression of a Rat D2 Dopamine Receptor cDNA. *Nature* 336(6201): 783-787.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW.** (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17b throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94(6):1704-1708.
- Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA.** (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE* 7(4): e35538.
- Caligioni C.** (2009). Assessing Reproductive Status/Stages in Mice. *Current Protocols in Neuroscience.* Appendix 4.
- Calogero AE, Burrello N, Bosboom AMJ, Garofalo MR, Weber RFA, D’Agata R.** (1999). Glucocorticoids inhibit gonadotropin-releasing hormone by acting directly at the hypothalamic level. *Journal of Endocrinological Investigation* 22(9): 666-670.
- Campbell RE.** (2018). Morphology of the Adult GnRH Neuron. *The GnRH Neuron and Its Control.* 121–148.
- Carabatsos MJ, Elvin J, Matsuk MM.** (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor9-deficient mice. *Developmental Biology* 204: 373–384.
- Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini DF.** (2000). Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Developmental Biology* 226(2): 167-179.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T.** (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature* 180(4596): 1200.



- Cattanach** BM, Iddon CA, Charlton HM, Chiappa SA, Fink G. (1977). Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* 269: 338-340.
- Cave** JW, Baker H. (2010). Dopamine systems in the forebrain. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 651: 15–35.
- Chandler** DJ, Waterhouse BD, Gao WJ. (2014). New perspectives on catecholaminergic regulation of executive circuits: Evidence for independent modulation of prefrontal functions by midbrain dopaminergic and noradrenergic neurons. *Frontiers in Neural Circuits* 8: 53–65.
- Chang** HM, Qiao J, Leung PC. (2016). Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Human Reproduction Update* 23(1): 1-18.
- Chan-Palay** V, Záborszky L, Kohler C, Goldstein M, Palay SL. (1984). Distribution of tyrosine-hydroxylase immunoreactive neurons in the hypothalamus of rats. *The Journal of Comparative Neurology* 227(4): 467-96.
- Charlton** HM, Halpin, DMG, Iddon C, Rosie R, Levy G, McDowell IFW, Fink G. (1983). The Effects of Daily Administration of Single and Multiple Injections of Gonadotropin-Releasing Hormone on Pituitary and Gonadal Function in The Hypogonadal (Hpg) Mouse. *Endocrinology* 113(2): 535–544.
- Chen** WP, Witkin JW, Silverman AJ. (1989). Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Neurons Are Directly Innervated by Catecholamine Terminals. *Synapse* 3(3): 288–290.
- Cheng** CK, Leung PCK. (2005). Molecular Biology of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH)-I, GnRH-II, And Their Receptors in Humans. *Endocrine Reviews* 26(2): 283–306.
- Cheung** S, Will YM, Hentschel K, Moore KE, Lookingland KJ. (1997). Role of gonadal steroids in determining sexual differences in expression of Fos-related antigens in tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in subdivisions of the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocrinology* 138(9): 3804-3810.
- Chiarini-Garcia** H, Russell LD. (2001). High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biology of Reproduction* 65(4): 1170-1178.
- Civelli** O, Bunzow JR, Grandy DK, Zhou QY, Van Tol HHM. (1991). Molecular Biology of The Dopamine Receptors. *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 207(4): 277–286.
- Civelli** O, Bunzow JR, Grandy DK. (1993). Molecular Diversity of the Dopamine Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 33: 281-307.
- Clarke** IJ, Cummins JT. (1985). GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 73(2): 425–431.
- Clarke** IJ. (2011). Control of GnRH secretion: One step back. *Frontiers in Neuroendocrinology* 32(3): 367–375.
- Combelles** CMH, Carabatsos MJ, Kumar RT; Matzuk MM, Albertini DF. (2004). Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Molecular Reproduction and Development* 69(3): 347–355.
- Conti** M, Carsten Bo Andersen, Francois Richard, Celine Mehats, Sang-Young Chun, Kathleen Horner, Catherine Jin, Alex Tsafriiri. (2002). Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 187(1-2): 153-159.
- Conti** M. (2016). *Endocrinology: Adult and Pediatric* || Folliculogenesis, Ovulation, and Luteogenesis. 2179–2191.e3.
- Cooper** JR, Bloom FE, Roth RH. (1996). *The biochemical basis of neuropharmacology*, Ed 7. New York: Oxford UP.



- Cortés GD.** (2019). Tesis de maestría: Efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos de tipo 1, en el Área Preóptica del hipotálamo, sobre la regulación de la ovulación. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Cruz ME, Morán, JL, Jaramillo LP, Domínguez R.** (1990). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Research Bulletin* 24(6): 739–742.
- Daane TA, Parlow AF.** (1971a). Perioviulatory patterns of rat serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the normal estrous cycle: effects of pentobarbital. *Endocrinology* 88(3): 653-63.
- Daane TA, Parlow AF.** (1971b). Serum FSH and LH in Constant Light-Induced Persistent Estrus: Short-Term and Long-Term Studies. *Endocrinology* 88(4): 964–968.
- Dahlströöm A, Fuxe K** (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum* 232:1-55.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett Db, Bach A, Seeburg PH.** (1989). The Dopamine D2 Receptor: Two Molecular Forms Generated by Alternative Splicing. *The Embo Journal* 8(13): 4025–4034.
- Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC.** (1989). The Frequency of Gonadotropin-Releasing-Hormone Stimulation Differentially Regulates Gonadotropin Subunit Messenger Ribonucleic Acid Expression. *Endocrinology*, 125(2): 917–923.
- Dazzi LS, Giulia EC, Paolo BP, Matzeu A, Biggio G.** (2007). Estrous Cycle-Dependent Changes in Basal and Ethanol-Induced Activity of Cortical Dopaminergic Neurons in the Rat. *Neuropsychopharmacology* 32(4): 892–901.
- De Quijada MG, Tommie WR, Coy DH, Torres-Aleman I, Schally AV.** (1983). Inhibition of Growth of a Prolactin-Secreting Pituitary Tumor in Rats by Analogs of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone and Somatostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 80(11): 3485–3488.
- Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Bates MD, Caron MG.** (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347(6288): 72–76.
- Demarest KT, McKay DW, Riegle GD, Moore KE.** (1981). Sexual differences in tuberoinfundibular dopamine nerve activity induced by neonatal androgen exposure. *Neuroendocrinology* 32: 108–113.
- DePaolo LV, Bald LN, Fendly BM.** (1992). Passive immunoneutralization with a monoclonal antibody reveals a role for endogenous activin-B in mediating FSH hypersecretion during estrus and following ovariectomy of hypophysectomized, pituitary-grafted rats. *Endocrinology* 130: 1741-1743.
- 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* 8: 269.
- Deutch AY, Goldstein M, Baldino F Jr, Roth RH.** (1988). Telencephalic projections of the A8 dopamine cell group. *Annals of the New York Academy of Sciences* 537: 27–50.
- Devoto L, Vega M, Paulina Kohen, Castro O, Carvallo P, Palomino A.** (2002). Molecular regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum throughout the menstrual cycle. *Journal of Reproductive Immunology* 55(1-2): 11-20.
- Devoto LV, Margarita, Navarro V Sir, T, Alba F, Castro O.** (1989). Regulation of steroid hormone synthesis by human corpora lutea: failure of follicle-stimulating hormone to support steroidogenesis in vivo and in vitro. *Fertility and Sterility* 51(4): 628–633.
- Dickinson RE, Stewart AJ, Myers M, Millar RP, Duncan WC.** (2009). Differential Expression and Functional Characterization of Luteinizing Hormone Receptor Splice Variants in Human Luteal Cells: Implications for Luteolysis. *Endocrinology* 150(6): 2873–2881.



- Domínguez R**, Zipitria D, Riboni L, Revilla, R. (1985). Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation throughout the estrous cycle of the rat. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research* 16(1): 63–72.
- Downs SM**. (2010). Regulation of the G2/M Transition in Rodent Oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 77(7): 566–585.
- Drouva S**, Gallo RV. (1976). Catecholamine Involvement in Episodic Luteinizing Hormone Release in Adult Ovariectomized Rats. *Endocrinology* 99(3): 651–658.
- Drouva SV**, Gallo RV. (1977). Further Evidence for Inhibition of Episodic Luteinizing Hormone Release in Ovariectomized Rats by Stimulation of Dopamine Receptors I. *Endocrinology* 100(3): 792–798.
- Duboc V**, Dufourcq P, Blader P, Roussigné M. (2015). Asymmetry of the Brain: Development and Implications. *Annual Review of Genetics* 49: 647-72.
- Dudas B**, Merchenthaler I. (2001). Catecholaminergic Axons Innervate LH-Releasing Hormone Immunoreactive Neurons of the Human Diencephalon. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(11): 5620–5626.
- Dudas B**, Merchenthaler I. (2020). Thyrotropin-releasing hormone axonal varicosities appear to innervate dopaminergic neurons in the human hypothalamus. *Brain Structure and Function* 225(7): 2193-2201.
- Dufour S**, Lopez E, Le Menn F, Le Belle N, Baloché S, Fontaine YA. (1988). Stimulation Of Gonadotropin Release and Of Ovarian Development, By the Administration of a Gonadoliberin Agonist and Of Dopamine Antagonists, In Female Silver Eel Pretreated with Estradiol. *General and Comparative Endocrinology* 70(1): 20–30.
- Dunbar BS**, Avery S, Lee V, Prasad S, Schwahn D, Schwoebel E, Skinner S, Wilkins B. (1994). The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reproduction, Fertility and Development* 6(3): 331-347.
- Duncan TJ**, Al-Attar A, Rolland P, Scott IV, Deen S, Liu DTY, Spendlove I, Durrant LG. (2008). Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Ovarian Cancer: A Model for Targeted Use of Novel Therapies. *Clinical Cancer Research* 14(10): 3030–3035.
- Dupon C**, Kim MH. (1973). Peripheral plasma levels of testosterone, androstenedione and oestradiol during the rat estrous cycle. *The Journal of Endocrinology* 59(3): 653–654.
- Durlinger AL**, Gruijters MJ, Kramer P, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JThJ, Grootegoed JA, Themmen APN. (2002). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143(3): 1076- 1084.
- Durlinger AL**, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140(12): 5789-5796.
- Durlinger AL**, Visser JA, Themmen AP. (2002). Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 124(5): 601-9.
- Eaton MJ**, Wagner CK, Moore KE, Lookingland KJ. (1994): Neurochemical identification of A13 dopaminergic neuronal projections from the medial zona incerta to the horizontal limb of the diagonal band of Broca and the central nucleus of the amygdala. *Brain Research* 659(1-2): 201-207.
- Edson MA**, Nagaraja AK, Matzuk MM. (2009). The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocrine Reviews* 30(6): 624–712.
- Eisenhofer G**. (2004). Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacological Reviews* 56(3): 331-349.
- Eppig J**. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122(6): 829–838.



- Eppig JJ**, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y, Murine. (1997). oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction* 56(4): 976-984.
- Eppig JJ**. (1996). Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction* 54(1): 197–207.
- Erickson GF**, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. (1985). The Ovarian Androgen Producing Cells: A Review of Structure/Function Relationships. *Endocrine Reviews* 6(3): 371–399.
- Eto T**, Massuda H, Suzuki Y, Hosi T. (1962). Progesterone and pregn-4-en-20 a-ol-3-one in rat ovarian venous blood at different stages in reproductive cycle. *The Japanese journal of animal reproduction*; 8: 34–40.
- Everett JW**, Sawyer CH. (1950). A 24-hour periodicity in the “LH-release apparatus” of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 47: 198.
- Everitt BJ**, Meister B, Hokfelt T, Melander T, Terenius L, Rokaeus A, Theodorsson-Norheim E, Dockray G, Edwardson J, Cuello AC, Elde R, Goldstein M, Flemmings H, Ouimet C, Walaas I, Greengard P, Valet W. (1986). The hypothalamic arcuate nucleus-median eminence complex: immunohistochemistry of transmitters, peptides and DARPP-32 with special reference to coexistence in dopamine neurons. *Brain Research* 396(2): 97-155.
- Fajer AB**. (1983). Changes in glucose metabolism in premeiotic and meiotic ovaries of the hamster. *Journal of Reproduction and Fertility* 69(1): 101–104.
- Falk S**, Wolfgang T, Carsten G. (2006). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. *Theriogenology* 66(4): 691–709.
- Farin CE**, Moeller CL, Sawyer HR, Gamboni F, Niswender GD. (1986). Morphometric Analysis of Cell Types in The Ovine Corpus Luteum Throughout the Estrous Cycle. *Biology of Reproduction* 35(5): 1299-1308.
- Feldman RS**, Meyer JS, Quenzer LF. (1997). Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, Sinauer. 277-344.
- Felten DL**, Sladek, JR. (1983). Monoamine distribution in primate brain V. Monoaminergic nuclei: Anatomy, pathways and local organization. *Brain Research Bulletin* 10(2): 171–284.
- Fernald RD**, White RB. (1999). Gonadotropin-Releasing Hormone Genes: Phylogeny, Structure, and Functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20: 224–240.
- Ferris HA**, Walsh HE, Stevens J, Fallest PC, Shupnik MA. (2007). Luteinizing hormone beta promoter stimulation by adenylyl cyclase and cooperation with gonadotropin-releasing hormone 1 in transgenic mice and LBetaT2 cells. *Biology of Reproduction* 77(6): 1073-1080.
- Filicori M**, Cognigni GE, Tabarelli C, Pocognoli P, Taraborrelli S, Spetoli D, Ciampaglia W. (2002). Stimulation and growth of antral ovarian follicles by selective LH activity administration in women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 1156-1161.
- Findlay JK**. (1993). An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biology of Reproduction* 48(1): 15–23.
- Fortune JE**. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*. 50(2): 225-32.
- Fox SR**, Smith MS. (1985). Changes in the pulsatile pattern of luteinizing hormone secretion during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 116(4): 1485-92.
- Fraser HM**, Lunn SF. (2001). Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction*; 121(3): 355-62.
- Fraser HM**, Wulff C. (2003). Angiogenesis in the corpus luteum. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 1: 88.



- Freeman ME.** (2006). The Neuroendocrine control of the ovarian cycle of rat. En: *The Physiology of Reproduction, Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. Vol 1: 613-654.
- Freneau RT, Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, Caron MG.** (1991). Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(9): 3772–3776.
- Fueshko S, Wray S.** (1994). LHRH cells migrate on peripherin fibers in embryonic olfactory explant cultures: an in vitro model for neurophilic neuronal migration. *Developmental Biology* 166(1): 331-48.
- Fuxe K, Hökfelt T, Sundstedt CD, Ahrén K, Hamberger L.** (1972). Amine Turnover Changes in the Tubero-Infundibular Dopamine (DA) Neurons in Immature Rats Injected with PMS. *Neuroendocrinology* 10(5): 282–300.
- Fuxe K.** (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948)* 65(4): 573–596.
- Gallo RV.** (1978). The effect of blockade of dopamine receptors on the inhibition of episodic luteinizing hormone release during electrical stimulation of the arcuate nucleus in ovariectomized rats. *Endocrinology*, 102(4): 1026–1035.
- Gallo RV.** (1980). Neuroendocrine Regulation of Pulsatile Luteinizing Hormone Release in the Rat. *Neuroendocrinology* 30(2): 122–131.
- Gallo RV.** (1981). Pulsatile LH release during periods of low-level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biology of Reproduction* 24(4): 771-777.
- Gallo RV.** (1981). Pulsatile LH release during the ovulatory LH surge on proestrus in the rat. *Biology of Reproduction* 24: 100–104.
- Gartner P, Hiatt L.** (2007). “*Texto Atlas de Histología*”. 3ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana, Pp. 218-225.
- Gay VL, Midgley AR Jr, Niswender GD.** (1970). Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation. *Federation Proceedings* 29(6): 1880-1887.
- Gay VL, Tomacari RL.** (1974). Follicle stimulating hormone in the female rat: cyclic release is dependent on circulating androgen. *Science* 184: 75–77.
- Gayrard V, Malpoux B, Tillet Y, Thiéry JC.** (1994). Estradiol increases tyrosine hydroxylase activity of the A15 nucleus dopaminergic neurons during long days in the ewe. *Biology of Reproduction* 50(5): 1168-1177.
- Gayrard V, Thiéry JC, Thibault J, Tillet Y.** (1995). Efferent projections from the retrochiasmatic area to the median eminence and to the par’s nervosa of the hypophysis with special reference to the A15 dopaminergic cell group in the sheep. *Cell and Tissue Research* 281: 561–567.
- Gazdag E, Santenard A, Ziegler-Birling C, Altobelli G, Poch O, Tora L, Torres-Padilla ME.** (2009). TBP2 is essential for germ cell development by regulating transcription and chromatin condensation in the oocyte. *Genes & Development* 23(18): 2210–2223.
- Gerendai I, Halász B.** (1997). Neuroendocrine Asymmetry. *Frontiers of Neuroendocrinology* 18(3): 354–381.
- Gerfen CR.** (1992). D1 and D2 dopamine receptor regulation of striatonigral and striatopallidal neurons. *Seminars in Neuroscience* 4(2): 109–118.
- German DC, Manaye KF.** (1993): Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 331(3): 297–309.
- Gibson M, Krieger D, Charlton H, Zimmerman E, Silverman A, Perlow M.** (1984). Mating and pregnancy can occur in genetically hypogonadal mice with preoptic area brain grafts. *Science* 225(4665): 949–951.



- Gibson MJ, Ingraham L, Dobrjansky A. (2000).** Soluble Factors Guide Gonadotropin-Releasing Hormone Axonal Targeting to the Median Eminence. *Endocrinology* 141(9): 3065–3071.
- Ginsburg M, Snow MH, McLaren A. (1990).** Primordial Germ Cells in The Mouse Embryo During Gastrulation. *Development* 110(2): 521- 528.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. (2001).** Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction* 65(3): 638-647.
- Glanowska KM, Moenter SM. (2015).** Differential Regulation of GnRH Secretion in the Preoptic Area (POA) and the Median Eminence (ME) in Male Mice. *Endocrinology* 156(1): 231–241.
- Gobert A, Lejeune F, Rivet JM, Cistarelli L, Millan MJ. (1996).** Dopamine D3 (auto) receptors inhibit dopamine release in the frontal cortex of freely moving rats in vivo. *Journal of Neurochemistry* 66(5): 2209-2212.
- Goldberg LI, Volkman PH, Kohli JD. (1978).** A Comparison of the Vascular Dopamine Receptor with Other Dopamine Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 18(1): 57–79.
- Goodman RL, Thiéry J-C, Delaleu B, Malpaux B. (2000).** Estradiol increases the electrical activity in the A15 area of ewes exposed to inhibitory photoperiods. *Biology of Reproduction* 63(5): 1352–1357.
- Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE. (1995).** Periventricular-hypophysial dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Neuroendocrinology* 62(2): 147-54.
- Goudreau JL, Lindley SE, Lookingland KJ, Moore KE. (1992).** Evidence that hypothalamic periventricular dopamine neurons innervate the intermediate lobe of the rat pituitary. *Neuroendocrinology* 56(1): 100-105.
- Graham MD, Pfau 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, Pfau 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.
- Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Redmer DA. (1997).** Gap junctions in the ovaries. *Biology of Reproduction* 57(5): 947–957.
- Gregory SJ, Kaiser UB. (2004).** Regulation of Gonadotropins by Inhibin and Activin. *Seminars in Reproductive Medicine* 22(3): 253–267.
- Grierson JP, James MD, Pearson JR, Wilson CA. (1988).** The effect of selective D1 and D2 dopaminergic agents on sexual receptivity in the female rat. *Neuropharmacology* 27(2): 181–189.
- Grive KJ, Freiman RN. (2015).** The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development* 142(15): 2554–2563.
- Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, R Pai, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS. (1996).** Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 81(4): 1401-1405.
- Gross KM, Matsumoto AM, Bremner WJ. (1987).** Differential control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion by luteinizing hormone-releasing hormone pulse frequency in man. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 64(4): 675-680.
- Gullans SR, Verbalis JG. (1993).** Control of brain volume during hyperosmolar and hypoosmolar conditions. *Annual Review of Medicine* 44: 289-301.
- Guraya SS. (1985).** *Biology of Ovarian Follicles in Mammals.* SpringerVerlag, New York, pp. 3–14



- Guyenet PG, Crane JK.** (1981). Non-dopaminergic nigrostriatal pathway. *Brain Research* 213(2): 291–305.
- Haavik J, Toska K.** (1998). Tyrosine Hydroxylase and Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology* 16(3): 285–309.
- Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, Clifton DK, Steiner RA, Allan E, Herbison.** (2005). Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty. *Journal of Neuroscience* 25(49): 11349–11356.
- Hansel W, Aula HW, Dowd JP, Milvae RA.** (1991). Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 43: 77-89.
- Harris D, Bonfil D, Chuderland D, Kraus S, Seger R, Naor Z.** (2002). Activation of MAPK cascades by GnRH: ERK and Jun N-terminal kinase are involved in basal and GnRH-stimulated activity of the glycoprotein hormone LHBeta-subunit promoter. *Endocrinology*. 143(3): 1018-1025.
- Harris GW.** (1948a). Electrical Stimulation of The Hypothalamus and The Mechanism of Neural Control of The Adenohypophysis. *The Journal of Physiology* 107(4): 418–429.
- Harris GW.** (1948b). Neural Control of The Pituitary Gland. *Physiological Review* 28(2): 139-179.
- Harrison GS.** (2004). Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocrine-Related Cancer* 11(4): 725–748.
- Hashimoto I, Hendricks DM, Anderson LL, Melampy RM.** (1968). Progesterone and pregn-4-en-20 a-ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* 82(2): 333-341.
- Hashimoto I, Wiest WG.** (1969). Correlation of the secretion of ovarian steroids with function of a single generation of corpora lutea in the immature rat. *Endocrinology* 84(4): 873–885.
- 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.
- Hattori K, Orisaka M, Fukuda S, Tajima K, Yamazaki Y, Mizutani T, Yoshida Y.** (2018). Luteinizing hormone facilitates antral follicular maturation and survival via thecal paracrine signaling in cattle. *Endocrinology* 159(6): 2337-2347.
- Hauser TU, Eldar E, Dola, Raymond J.** (2017). Separate mesocortical and mesolimbic pathways encode effort and reward learning signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(35): E7395–E7404.
- Havern RL, Whisnant CS, Goodman RL.** (1994). Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. *Endocrinology* 134(4): 1905-1914.
- Heape W.** (1900). The “sexual season” of mammals and the relation of the “pro-oestrus” to menstruation. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 44: 1–70.
- Herbison AE.** (2016). Control Of Puberty Onset and Fertility by Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Nature Reviews Endocrinology* 12: 452–466.
- Herde MK, Iremonger KJ, Constantin S, Herbison AE.** (2013). GnRH Neurons Elaborate a Long-Range Projection with Shared Axonal and Dendritic Functions. *The Journal of Neuroscience* 33(31): 12689–12697.
- Hilliard J.** (1973). Corpus Luteum Function in Guinea Pigs, Hamsters, Rats, Mice and Rabbits. *Biology Of Reproduction*, 8(2) 203–221.
- Hillier SG.** (1994). Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis. *Human Reproduction* 9(2): 188-91.



- Hillier** SG. (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 179(1-2): 39-46.
- Hirshfield** AN. (1991). Development of Follicles in the Mammalian Ovary. *International Review of Cytology* 124: 43-101.
- Hislop** JN, Madziva MT, Everest HM, Harding T, Uney JB, Willars GB, Millar RP, Troskie BE, Davidson JS, McArdle CA. (2000). Desensitization and internalization of human and *Xenopus* gonadotropin-releasing hormone receptors expressed in alphaT4 pituitary cells using recombinant adenovirus. *Endocrinology* 141(12): 4564-4575.
- Hoffman** AR, Crowley WF. (1982). Induction of Puberty in Men by Long-Term Pulsatile Administration of Low-Dose Gonadotropin-Releasing Hormone. *The New England Journal of Medicine* 307(20): 1237-1241.
- Hoffman** DC, Beninger RJ. (1985). The D1 dopamine receptor antagonist, SCH 23390 reduces locomotor activity and rearing in rats 22(2): 341-342.
- Hoffman** GE, Melnyk V, Heryes T, Bennett CC, Fowler E. (1978). Immunocytochemistry of LHRH neurons. In "Brain Endocrine Interaction III. Neural Hormones and Reproduction" (D. E. Scott, G. P. Kozlowski, and A. Weindel, Eds.), pp. 67-82. Karger, New York.
- Hökfelt** T, Johansson O, Goldstein M. (1984a). "Central catecholamine neurons as revealed by immunohistochemistry with special reference to adrenaline neurons," in *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol. 2: Classical Transmitters in the CNS* eds Björklund A. Hokfelt T. Amsterdam: Elsevier 157-276.
- Hökfelt** T, Martensson R, Björklund A, Kleinau S, Goldstein M. (1984b). Distribution maps of tyrosinehydroxylase- immunoreactive neurons in the rat brain. In: Björklund A, Hökfelt T (Eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Classical Transmitters in the CNS, Part I, Chapter 6*, pp. 277-379. Elsevier, Amsterdam.
- Honda** A, Hirose M, Hara K, Matoba S, Inoue K, Miki H, Hiura H, Kanatsu-Shinohara M, Kanai Y, Kono T, Shinohara T, Ogura A. (2007). Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (30): 12389-12394.
- 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): 71-9.
- Hsueh** AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*. 36(1): 1-24.
- Huang** CT, Weitsman SR, Dykes BN, Magoffin DA. (2001). Stem cell factor and insulin-like growth factor-I stimulate luteinizing hormone-independent differentiation of rat ovarian theca cells. *Biol Reprod*. 64(2): 451-6.
- Hull** EM, Du J, Lorrain DS, Matuszewich L. (1997). Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. *Brain Research Bulletin* 44(4): 327-333.
- Hull** EM, Lorrain DS, Du J, Matuszewich L, Lumley LA, Putnam SK, Moses J. (1999). Hormononeurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. *Behavioural Brain Research* 105(1): 105-16.
- Hunzicker-Dunn** M, Mayo K. (2014). Gonadotropin Signaling in the Ovary. In: TM Plant, AJ Zeleznik, eds. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. London: Elsevier. 895- 1022.
- Hussy** N, Deleuze C, Desarménien MG, Moos FC. (2000). Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. *Progress in Neurobiology* 62(2): 113-134.
- Hutt** KJ, Eileen AM, Michael KH. (2006). Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell and Tissue Research* 326(3): 809-822.



- Ibata Y**, Watanabe K, Kinoshita H, Kubo S, Sano Y, Sin S, Hashimura E, Imagawa K. (1979). The location of LH-RH neurons in the rat hypothalamus and their pathways to the median eminence. *Experimental immunohistochemistry and radioimmunoassay. Cell and Tissue Research* 198: 381–395.
- Irvine CH**, Alexander SL. (1993). Secretory patterns and rates of gonadotropin-releasing hormone, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone revealed by intensive sampling of pituitary venous blood in the luteal phase mare. *Endocrinology*, 132(1): 212–218.
- Irvine CHG**, Alexander SL. (1997). Patterns of secretion of GnRH, LH and FSH during the postovulatory period in mares: mechanisms prolonging the LH surge. *Journal of Reproduction and Fertility* 109(2): 263–271.
- Iversen L**. (1975). Dopamine receptors in the brain. *Science* 188(4193): 1084–1089.
- Jaber M**, Robinson SW, Missale C, Caron MG. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35(11): 1503-1519.
- Jackson DM**, Westlind-Danielsson A. (1994). Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology & Therapeutics* 64(2): 291-370.
- Jamnonjitt M**, Hammes SR. (2005). Oocyte Maturation: The Coming of Age of a Germ Cell. *Seminars in Reproductive Medicine* 23(3): 234–241.
- Janhunen S**. (2005). Different responses of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways to nicotinic receptor agonists. Academic Dissertation. Division of Pharmacology and Toxicology. Faculty of Pharmacy. University of Helsinki.
- Janhunen S**, Ahtee L. (2007). Differential nicotinic regulation of the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways: Implications for drug development. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 31(3): 287–314.
- Jennes L**, Stumpf WE, Tappaz ML. (1983). Anatomical Relationships of Dopaminergic and Gabaergic Systems with The GnRH-Systems in The Septo-Hypothalamic Area. *Experimental Brain Research* 50(1): 91-99.
- Jeppesen JV**, Kristensen SG, Nielsen ME, Humaidan P, Dal Canto M, Fadini R, Schmidt KT, Ernst E, Andersen CY. (2012). LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97(8): E1524-31.
- Jiménez-Zárate BS**, Piña-Leyva C, Rodríguez-Sánchez M, Florán-Garduño B, Jiménez-Zamudio LA, Jiménez-Estrada I. (2021). Day-Night Variations in the Concentration of Neurotransmitters in the Rat Lumbar Spinal Cord. *Journal of Circadian Rhythms* 19(1): 1-9.
- John GB**, Gallardo TD, Shirley LJ, Castrillon DH. (2008). Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Developmental Biology* 321(1): 197-204.
- Jolly PD**. (1994). Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biology of Reproduction* 51(5): 934–944.
- Juárez OH**, Calderón GD, Hernández GE, Barragán MG. (2016). The Role of Dopamine and its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 9730467.
- Kakar SS**, Lois C, Musgrove, Daniel C, Devor, Jeffrey C, Sellers, Neill JD. (1992). Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 189(1): 289-295.
- Kalantaridou SN**, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP. (2004). Stress and the female reproductive system. *Journal of Reproductive Immunology* 62(1-2): 61–68.
- Kalra SP**, Kalra PS. (1983). Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocrine Reviews* 4(4): 311-351.



- Kanasaki H**, Bedecarrats GY, Kam KY, Xu S, Kaiser UB. (2005). Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase pathways in perfused LbetaT2 cells. *Endocrinology* 146(12): 5503-5513.
- Katsiya GV**, Chirkov AM, Goncharov NP. (1986). Influence Of Luliberin and Chorionic Gonadotropin on Luteinizing Hormone and Testosterone in The Blood of Monkeys Under Conditions of Acute Stress. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 16(2): 157-160.
- Kavanaugh SI**, Nozaki M, Sower SA. (2008). Origins Of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) In Vertebrates: Identification of A Novel GnRH in A Basal Vertebrate, The Sea Lamprey. *Endocrinology* 149(8): 3860-3869.
- Kawakami M**, Kimura F, Manaka M, Kawagoe S. (1975). LH Discharge Induced by Medial Preoptic Implantation of Estrone or Dopamine in The Ovariectomized Estradiol Primed Rat. *Endocrinologia Japonica* 22(6): 549-554.
- Kawakami M**, Uemura T, Hayashi R. (1982). Electrophysiological correlates of pulsatile gonadotropin release in rats. *Neuroendocrinology* 35(1): 63-67.
- Kawano H**, Daikoku S. (1987). Functional topography of the rat hypothalamic dopamine neuron systems. Retrograde tracing and immunohistochemical study. *The Journal of Comparative Neurology* 265(2): 242-53.
- Kebabian JW**, Calne DB. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277(5692): 93-96.
- Keck ME**, Wigger A, Welt, T, Müller MB, Gesing A, Reul JM, Holsboer F, Landgraf R, Neumann ID. (2002). Vasopressin mediates the response of the combined dexamethasone/CRH test in hyper-anxious rats: Implications for pathogenesis of affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 26(1): 94-105.
- Kim DK**, Cho EB, Moon MJ, Park S, Hwang JI, Kah O. (2011). Revisiting the evolution of gonadotropin-releasing hormones and their receptors in vertebrates: secrets hidden in genomes. *General and Comparative Endocrinology* 170(1): 68-78.
- Kim KH**, Patel L, Tobet SA; King JC, Rubin BS, Stopa EG. (1999). Gonadotropin-releasing hormone immunoreactivity in the adult and fetal human olfactory system. *Brain Research* 826(2): 220-229.
- Kimelberg HK**, Mongin AA. (1998). Swelling-activated release of excitatory amino acids in the brain: relevance for pathophysiology. *Cell Volume Regulation* 123: 240-257.
- King JC**, Tobet SA, Snavely FL, Arimura AA. (1982). LHRH immunopositive cells and their projections to the median eminence and organum vasculosum of the lamina terminalis. *The Journal of Comparative Neurology* 209(3): 287-300.
- Kirk SE**, Dalkin AC, Yasin M, Haisenleder DJ, Marshall JC. (1994). Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency regulates expression of pituitary follistatin messenger ribonucleic acid: a mechanism for differential gonadotrope function. *Endocrinology* 135(3): 876-880.
- Kishi H**, Kitahara Y, Imai F, Nakao K, Suwa H. (2018). Expression of the gonadotropin receptors during follicular development. *Reproductive Medicine and Biology* 17(1): 11-19.
- Kitahama K**, Geffard M, Okamura H, Nagatsu I, Mons N, Jouvét M. (1990). Dopamine- and dopa-immunoreactive neurons in the cat forebrain with reference to tyrosine hydroxylase-immunohistochemistry. *Brain Research* 518(1-2): 83-94.
- Klein MO**, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. (2018). Dopamine: Functions, Signaling, And Association with Neurological Diseases. *Cellular And Molecular Neurobiology* 39(1): 31-59.
- Klein S**, Schwartz N. (1999). Estrous cycle. En Knobil E. and Neill JD. (eds.) *Encyclopedia of reproducción* (Vol. 2). USA: Academic Press.
- Knickerbocker JW**. (1988). Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. *Domestic Animal Endocrinology* 5(2): 91-107.



- Knobil E**, Plant TM, Wildt L, Belchetz PE, Marshall G. (1980). Control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 207(4437): 1371-1373.
- Koob GF**, Bloom FE. (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242 (4879): 715–723.
- Kowase T**, Walsh HE, Darling DS, Shupnik MA. (2007). Estrogen enhances gonadotropin-releasing hormone-stimulated transcription of the luteinizing hormone subunit promoters via altered expression of stimulatory and suppressive transcription factors. *Endocrinology* 148(12): 6083-6091.
- Krey L**, Silverman AJ. (1978). The luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) neuronal networks of the guinea pig brain. II. The regulation on gonadotropin secretion and the origin of terminals in the median eminence. *Brain Research* 157(2): 247–256.
- Krieg Jr RJ**, Cassidy JR. (1984). Counteraction of the Haloperidol Blockade of Ovulation by Bromocriptine, and the Effect of Bromocriptine on LH and Prolactin Secretion. *Neuroendocrinology* 38(5): 371–375.
- Krisch B**. (1980). Two types of luteinizing hormone-immunoreactive perikarya in the preoptic area of the rat. *Cell and Tissue Research* 212(3): 443-55.
- Kumar NM**, Gilula NB. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84(3): 381-388.
- Kumar TR**, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics* 15(2): 201-204.
- Kusmenkov T**, Braunstein M, Schneider HJ, Bidlingmaier M, Prall WC, Flatz W, Boecker W, Bogner V. (2019). Initial free cortisol dynamics following blunt multiple trauma and traumatic brain injury: A clinical study. *The Journal of International Medical Research* 47(3): 1185-1194.
- Lambalk CB**, van Rees GP, Schoemaker J, De Koning J, van Dielen JAMJ. (1988). The influence of pulsatile GnRH administration to the ovariectomized rat on the pituitary response to GnRH and the occurrence of spontaneous LH pulses. *European Journal of Endocrinology* 117(3): 373–380.
- Lang AE**, Lozano AM. (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *The New England Journal of Medicine* 339(15): 1044-1053.
- Lariviere S**, Garrel G, Simon V, Soh JW, Laverriere JN, Counis R, Cohen-Tannoudji J. (2007). Gonadotropin-Releasing Hormone Inhibits Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide Coupling to 3',5'-Cyclic Adenosine-5'-Monophosphate Pathway in L β T2 Gonadotrope Cells through Novel Protein Kinase C Isoforms and Phosphorylation of Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide Type I Receptor. *Endocrinology* 149(12): 6389-6398.
- Lechowska A**, Bilinski SM, Rasweiler IV JJ, CJ Cretekos, Behringer RR, Kloc M. (2012). Early oogenesis in the short-tailed fruit bat *Carollia perspicillata*: Transient germ cell cysts and noncanonical intercellular bridges. *The Journal of Genetics and Development* 50(1): 18–27.
- Lehman MN**, Durham DM, Jansen HT, Adrian B, Goodman RL. (1996). Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative feedback in anestrus, but not breeding season, ewes. *Endocrinology* 137(10): 4443-4450.
- Leranth C**, Maclusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. (1988). Catecholaminergic Innervation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone and Glutamic Acid Decarboxylase Immunopositive Neurons in the Rat Medial Preoptic Area. *Neuroendocrinology* 48(6): 591–602.
- Levine JE**, Bayer-Dantoin AC, Besecke LM, Conaghan LA, Leagn SJ, Meredith JM, Strobl FJ, Urban JH, Vogeisong KM, Wolfe AM. (1991). Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in the rat. *Recent Progress in Hormone Research* 47: 97-151.



- Levine JE, Ramirez VD.** (1982). Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* 111(5): 1439-1448.
- Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hsueh AJW.** (2010). Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(22): 10280-10284.
- Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hsueh AJW.** (2010). Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(22): 10280–10284.
- Li S, Pelletier G.** (1992). Role Of Dopamine in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone in the Male Rat Brain as Studied by in Situ Hybridization. *Endocrinology* 131(1): 395–399.
- Liu C, Kaeser PS.** (2019). Mechanisms And Regulation of Dopamine Release. *Current Opinion in Neurobiology* 57: 46-53.
- Liu C, Peng J, Matzuk MM, Yao HHC.** (2015). Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nature Communications* 6: 6934.
- Liu F, Usui I, Evans LG, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, Webster NJG.** (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 S, Plachez C, Shao Z, Puche A, Shipley T.** (2013). Olfactory bulb short axon cell release of GABA and dopamine produces a temporally biphasic inhibition-excitation response in external tufted cells. *The Journal of Neuroscience* 33(7): 2916-2926.
- Liu X, Herbison AE.** (2013). Dopamine Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Excitability in Male and Female Mice. *Endocrinology* 154(1): 340–350.
- Lledo PM, Homburger V, Bockaert J, Vincent JD.** (1992). Differential G protein-mediated coupling of D2 dopamine receptors to K⁺ and Ca²⁺ currents in rat anterior pituitary cells. *Neuron* 8(3): 455–463.
- Loche S, Cappa M, Ghizzoni L, Maghnie M, Savage MO.** (2009). Central Nervous System-Acting Drugs Influencing Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function. *Endocrine Development* 17: 108-120.
- Long CA, Asdell SA.** (1965). Patterns Of Mammalian Reproduction. *Journal of Mammalogy* 46(2): 357.
- Long JA, Evans HM.** (1922). The estrous cycle of the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ.* Vol 6: 1–148.
- Lovick TA.** (2012). Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45(4): 314-320.
- Luo E, Stephens, Shannon BZ, Chaing S, Munaganuru N, Kauffman AS, Breen KM.** (2015). Corticosterone blocks ovarian cyclicity and the LH surge via decreased kisspeptin neuron activation in female mice. *Endocrinology* 157(3): 1187-1199.
- Luo SX, Huang EJ.** (2015). Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways: From Neurogenesis to Circuit Assembly. *The American Journal of Pathology* 186(3): 478-488.
- Ivin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM.** (1999). Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular Endocrinology* 13(6): 1018-1034.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW.** (1995). Mice lacking progesterone receptors exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development* 9(18): 2266-2278.
- Ma TP, Johnson JC, Hoskins GA.** (1997). Organization of the zona incerta in the macaque: an electron microscopic study. *The Anatomical Record* 249(2): 259-275.



- Machino T**, Yoshizawa T. (2006). Brain shrinkage due to acute hypernatremia. *Neurology* 67(5): 880.
- MacKenzie FJ**, Hunter AJ, Daly C, Wilson CA. (1984). Evidence that dopaminergic incerto-hypothalamic tract has a stimulatory effect on ovulation and gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 39(4): 289-295.
- MacKenzie FJ**, James MD, Wilson CA. (1988). Changes in dopamine activity in the zona incerta (ZI) over the rat oestrous cycle and the effect of lesions of the ZI on cyclicity: further evidence that the incerto-hypothalamic tract has a stimulatory role in the control of LH release. *Brain Research* 444(1): 75-83.
- Magnusson O**, Mohring B, Fowler CJ. (1987). Comparison of the effects of dopamine D1 and D2 receptor antagonists on rat striatal, limbic and nigral dopamine synthesis and utilization. *Journal of Neural Transmission* 69(3-4): 163-177.
- Malarkey WB**, Zvara BJ. (1989). Interleukin-1 β and Other Cytokines Stimulate Adrenocorticotropin Release from Cultured Pituitary Cells of Patients with Cushing's Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 69(1): 196-199.
- Mandl AM**, Zuckerman S. (1951). The Relation of Age to Numbers of Oocytes. *Journal of Endocrinology* 7(2): 190-193.
- Mandl AM**. (1951a). Cyclical changes in the vaginal smear of adult ovariectomized rats. *Journal of Experimental Biology* 28(4): 585-592.
- Mandl AM**. (1951b). The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology* 28: 576-584.
- Mansour A**, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ. (1990). Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in-situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *The Journal of Neuroscience* 10(8): 2587-2600.
- Marshall JC**, Case GD, Valk TW, Corley KP, Sauder, Kelch RP. (1983). Selective inhibition of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol. Mechanism for modulation of gonadotropin responses to low dose pulses of gonadotropin-releasing hormone. *The Journal of Clinical Investigation* 71(2): 248-257.
- Martínez de la Escalera G**, Gallo F, Choi AL, Weiner RI. (1992). Dopaminergic regulation of the GT1 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal cell lines: stimulation of GnRH release via D1-receptors positively coupled to adenylate cyclase. *Endocrinology* 131(6): 2965-2971.
- Mason A**, Hayflick J, Zoeller R, Young W, Phillips H, Nikolics K, Seeburg P. (1986). A Deletion Truncating the Gonadotropin-Releasing Hormone Gene Is Responsible for Hypogonadism in The Hpg Mouse. *Science* 234(4782): 1366-1371.
- Massieu L**, Montiel T, Robles G, Quesada O. (2004). Brain amino acids during hyponatremia in vivo: clinical observations and experimental studies. *Neurochemical Research* 29(1): 73-81.
- Matsuo H**, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV. (1971). Structure Of the Porcine LH- And FSH-Releasing Hormone. I. The Proposed Amino Acid Sequence. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 43(6): 1334-1339.
- Mayer SI**, Willars GB, Nishida E, Thiel G. (2008). Elk-1, Creb, and MKP-1 regulate Egr-1 expression in gonadotropin-releasing hormone stimulated gonadotrophs. *Journal of Cell Biochemistry* 105(5): 1267-1278.
- Mayerhofer A**, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 138(8): 3320-3329.
- McArdle CA**, Franklin J, Green L, Hislop JN. (2002). Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *The Journal of Endocrinology* 173(1): 1-11.
- McCracken JA**, Schramm W, Okulicz WC. (1984). Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. *Animal of Reproduction Science* 7: 31-55.



- McGee EA, Hsueh AJW.** (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews* 21(2): 200–214.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Grandy DK, Damask SP, Civelli O, Watson SJ.** (1992). Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neuroscience Letters* 145(2): 209–212.
- Mehlmann LM.** (2005). Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Developmental Biology* 288(2): 397–404.
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI.** (1990). Immortalization of hypothalamic GnRH by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5(1): 1–10.
- Merchenthaler G, Kovács G, Lovász G, Sétáló.** (1980). The preoptico-infundibular LH-RH tract of the rat. *Brain Research* 198(1): 63–74
- Merchenthaler I, Stres T, Stalo G, Petrusz P, Flerko B.** (1984). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell and Tissue Research* 237(1): 15–29.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y.** (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 54: 449–460.
- Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K, Templeton AA.** (1996). Effect of follicle stimulating hormone or human chorionic gonadotrophin treatment on the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) during the luteal phase of the human menstrual cycle. *Clinical Endocrinology* 44(2): 169–175.
- Mestikawy S, Glowinski J, Hamon M.** (1986). Presynaptic Dopamine Autoreceptors Control Tyrosine Hydroxylase Activation in Depolarized Striatal Dopaminergic Terminals. *Journal of Neurochemistry* 46(1): 12–22.
- Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S.** (2000). Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. *Human Reproduction* 15 Suppl 5:11–7.
- Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan Ca, Morgan K, Maudsley SR.** (2004). Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors. *Endocrine Reviews* 25(2): 235–275.
- Millar RP.** (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science* 88(1–2): 5–28.
- 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.
- Miro F, Parker SW, Aspinall LJ, Coley J, Perry PW, Ellis JE.** (2004). Relationship between Follicle-Stimulating Hormone Levels at the Beginning of the Human Menstrual Cycle, Length of the Follicular Phase and Excreted Estrogens: The FREEDOM Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(7): 3270–3275.
- Miró F, Smyth CD, Hillier SG.** (1991). Development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology* 129: 3388–3394.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG.** (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 78(1): 189–225.
- Mittler JC, Arimura A, Schally AV.** (1970). Release And Synthesis of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Pituitary Cultures in Response to Hypothalamic Preparations. *Experimental Biology And Medicine* 133(4): 1321–1325.



- Mohamed** Jaber, Susan W Robinson, Cristina Missale, Marc G Caron. (1997). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35(11): 1503–1519.
- Monget** P, Bondy C. (2000). Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 163: 89-93.
- Montagu** KA. (1957). Catechol Compounds in Rat Tissues and In Brains of Different Animals. *Nature* 180(4579): 244-245.
- Moore** RY, Bloom FE. (1978). Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annual Reviews of Neuroscience* 1: 129-69.
- Morán** JL, Cruz, ME, Domínguez R. (1994). Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic or anterior hypothalamic area performed on each day of the estrous cycle of adult rats. *Brain Research Bulletin* 33(6): 663–668.
- 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.
- Moriarty** GC. (1976). Immunocytochemistry of the pituitary glycoprotein hormones. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 24(7): 846-63.
- Moujir** F, Santana C, Hernandez FJ, Reiter RJ, Abreu P. (1997). Daily time course of the contents in monoamines and their metabolites in the pineal gland of Syrian hamster. *Neuroscience Letters* 223(2): 77–80.
- Mulac-Jericevic** B, Conneely OM. (2004). Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128(2): 139–146
- Mulvaney** JM, Roberson MS. (2000). Divergent signaling pathways requiring discrete calcium signals mediate concurrent activation of two mitogen-activated protein kinases by gonadotropin-releasing hormone *The Journal of Biological Chemistry* 275: 14182–14189.
- 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.
- Naor** Z. (2009). Signaling by G-protein-coupled receptor (GPCR): studies on the GnRH receptor. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30(1): 10-29.
- Negro-Vilar** A, Ojeda SR, Mccann SM. (1979). Catecholaminergic Modulation of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Release by Median Eminence Terminals in Vitro. *Endocrinology* 104(6): 1749–1757.
- Nelson** EL, Liang C-L, Sinton CM, German DC. (1996). Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: computer-assisted mapping. *The Journal of Comparative Neurology* 369(3): 361–371.
- Neveu** PJ. (1992). Asymmetrical brain modulation of the immune response. *Brain Research Reviews* 17(2): 101–107.
- Nevue** AA, Felix RA, Portfors CV. (2016). Dopaminergic projections of the subparafascicular thalamic nucleus to the auditory brainstem. *Hearing Research* 341: 202–209.
- Niswender** GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* 80(1): 1-29.
- Norberg** R, Campbell R, Suter KJ. (2013). Ion Channels and Information Processing in GnRH Neuron Dendrites. *Channels* 7(3): 135–145.
- Northcutt** KV, Lonstein JS. (2011). Neuroanatomical Projections of the Species-Specific Tyrosine Hydroxylase-Immunoreactive Cells of the Male Prairie Vole Bed Nucleus of the Stria Terminalis and Medial Amygdala. *Brain Behavior and Evolution* 77(3): 176–192.



- 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.
- O’dowd BF.** (1993). Structures Of Dopamine Receptors. *Journal of Neurochemistry* 60(3): 804–816.
- Oakley AE, Breen KM, Clarke IJ, Karsch FJ, Wagenmaker ER, Tilbrook AJ.** (2009). Cortisol Reduces Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Frequency in Follicular Phase Ewes: Influence of Ovarian Steroids. *Endocrinology* 150(1): 341–349.
- Ohtani M, Kobayashi S, Miyamoto A, Hayashi K, Fukui Y.** (1998). Realtime relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandin F₂alpha-induced luteolysis in the cow. *Biology of Reproduction* 58(1): 103–108.
- Ojeda SR, Harms PG, McCann SM.** (1974). Effect of Blockade of Dopaminergic Receptors on Prolactin and LH Release: Median Eminence and Pituitary Sites of Action. *Endocrinology* 94(6): 1650–1657.
- Okubo K, Nagahama Y.** (2008). Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiologica* 193(1): 3–15.
- Ole MV, Amara SG.** (2003). Dynamic regulation of the dopamine transporter. *European Journal of Pharmacology* 479(1-3): 159–170.
- Olvera-Juárez E, Silva CC, Flores A, Arrieta-Cruz I, Mendoza-Garcés L, Martínez-Coria H, López-Valdés HE, Cárdenas M, Domínguez R, Gutiérrez-Juárez R, Cruz ME.** (2020). The content of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), kisspeptin, and estrogen receptors (ER α /ER β) in the anteromedial hypothalamus displays daily variations throughout the rat estrous cycle. *Cell and Tissue Research* 381(3): 451–460.
- Onali P, Oliansa MC, Bunse B.** (1988). Evidence that adenosine A₂ and dopamine autoreceptors antagonistically regulate tyrosine hydroxylase activity in rat striatal synaptosomes. *Brain Research* 456(2): 302–309.
- Orisaka M, Miyazak Y, Shirafuji A, Tamamura Chiyo, Tsuyoshi H, Tsang BK, Yoshida Y.** (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. *Reproductive Medicine and Biology* 20(2): 169–175.
- Orisaka M, Jiang JY, Orisaka S, Kotsuji F, Tsang BK.** (2009). Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology* 150(6): 2740–2748.
- Orisaka M, Orisaka S, Jiang JY, Craig J, Wang Y, Kotsuji F, Tsang BK.** (2006). Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Molecular Endocrinology* 20(10): 2456–2468.
- Orisaka M, Tajima K, Mizutani T, Miyamoto K, Tsang BK, Fukuda S, Yoshida Y, Kotsuji F.** (2006). Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary. *Biology of Reproduction* 75(5): 734–740.
- Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F.** (2009). Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research* 2(1): 9.
- Padula AM.** (2005). GnRH analogues—agonists and antagonists. *Animal Reproduction Science* 88(1-2): 115–126.
- Palma GA, Argañaraz ME, Barrera AD, Rodler D, Mutto, AÁ, Sinowatz F.** (2012). Biology and Biotechnology of Follicle Development. *The Scientific World Journal* 2012: 938138.
- Pan B, Li J.** (2019). The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reproductive Biology and Endocrinology* 17(1): 8.
- 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.



- Pangas S, Li X, Robertson EJ, Matzuk MM.** (2006). Premature luteinization and cumulus cell defects in ovarian-specific Smad4 knockout mice. *Molecular Endocrinology* 20(6): 1406-1422.
- Pangas S.** (2007). Growth Factors in Ovarian Development. *Seminars in Reproductive Medicine* 25(4): 225-34.
- Pangas SA, Rajkovic A.** (2006). Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Human Reproduction Update* 12(1): 65-76.
- Pangas SA, Rajkovic.** (2014). A Follicular Development: Mouse, Sheep; and Human Models. In: TM Plant, AJ Zeleznik, eds. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. London: Elsevier 947-996.
- Panzanelli P, Fritschy JM, Yanagawa Y, Obata K, Sassoe-Pognetto M.** (2007). GABAergic phenotype of periglomerular cells in the rodent olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology* 502(6): 990-1002.
- Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M.** (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303(5658): 682-4.
- Paxinos GY, Watson C.** (2014). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 7th Edition. San Diego: Academic Press.
- Pepling ME, Spradling AC.** (2001). Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. *Developmental Biology* 234(2): 339–351.
- Pepling ME.** (2012). Follicular Assembly: Mechanisms of Action. *Reproduction* 143(2): 139–149.
- Perrett RM, McArdle CA.** (2013). Molecular Mechanisms of Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling: Integrating Cyclic Nucleotides into the Network. *Frontiers in Endocrinology* 4: 180.
- Peters H, Byskov AG, Grinsted J.** (1978). Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries of humans and other primates. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 7: 469–485.
- Phumsatitpong C, De Guzman RM; Zuloaga DG, Moenter SM.** (2020). A CRH receptor type 1 agonist increases GABA transmission to GnRH neurons in a circulating-estradiol-dependent manner. *Endocrinology* 161(11): bqaa140.
- Pincus G, Enzmann EV.** (1932). Fertilisation In the Rabbit. *Journal of Experimental Biology* 9(4): 403–408.
- Plant TM.** (2015). 60 Years of Neuroendocrinology: The Hypothalamo-Pituitary–Gonadal Axis. *The Journal of Endocrinology* 226(2): T41–T54.
- Porter JC.** (1986). Relationship of age, sex and reproductive status to the quantity of tyrosine hydroxylase in the median eminence and superior cervical ganglion of the rat. *Endocrinology* 118(4): 1426-32.
- Pruessner JC.** (2004). Dopamine Release in Response to a Psychological Stress in Humans and Its Relationship to Early Life Maternal Care: A Positron Emission Tomography Study Using [¹¹C] Raclopride. *Journal of Neuroscience* 24(11): 2825–2831.
- Rajpert-De Meys E, Jørgensen N, Graem N, Müller J, Cate RL, Skakkebaek NE.** (1999). Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84(10): 3836-3844.
- Rama Raju GA, Chavan R, Deenadayal M, Govindarajan M, Gunasheela D, Gutgutia R, Haripriya G, Patel NH, Patki AS.** (2013). Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone synergy: A review of role in controlled ovarian hyper-stimulation. *Journal of Human Reproductive Sciences* 6(4): 227-234.



- Redding** TW, Schally AV, Arimura A, Matsuo H. (1972). Stimulation of Release and Synthesis of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) in Tissue Cultures of Rat Pituitaries in Response to Natural and Synthetic LH and FSH Releasing Hormone. *Endocrinology* 90(3): 764-770.
- Reddy** P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hämäläinen T, Peng SL, Lan ZJ, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 319(5863): 611-613.
- Regan** SLP, Knight PG, Yovich JL, Leung Y, Arfuso, F, Dharmarajan A. (2018). Granulosa Cell Apoptosis in the Ovarian Follicle—A Changing View. *Frontiers in Endocrinology* 9: 61.
- Renner** KJ, Gerhardt, GA, Quadagno DM. (1984). Brain catecholamine content during the estrous cycle and in steroid-primed rats. *Brain Research Bulletin* 12(4): 363–368.
- Retamales** I, Carrasco I, Troncoso JL, Las Heras J, Devoto L, Vega M. (1994). Morpho-functional study of human luteal cell subpopulations. *Human Reproduction* 9(4): 591-596.
- Reynolds** LP, Borowicz PP, Vonnahme KA. (2005). Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 26(10): 689-708.
- Richards** JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. (2002). Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research* 57: 195–220
- Richards** JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN. (1998). Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145(1-2): 47-54.
- Rivest** RW. (1991). Sexual Maturation in Female Rats: Hereditary, Developmental and Environmental Aspects. *Experientia* 47(10): 1026–1038.
- Rodgers** R, Irving-Rodgers HF, Russell D. (2003). Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction* 126(4): 415–424.
- Rolaki** A, Drakakis P, Millingos S, Loutradis D, Makrigiannakis A. (2005). Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reproductive BioMedicine Online* 11(1): 93-103.
- Romanowski** CAJ, Mitchell IJ, Crossman AR. (1985). The organisation of the efferent projections of the zona incerta. *Journal of Anatomy* 143: 75–95.
- Ronnekleiv** OK, Resko JA. (1990). Ontogeny Of Gonadotropin-Releasing Hormone-Containing Neurons in Early Fetal Development of Rhesus Macaques. *Endocrinology*, 126(1): 498-511.
- Ruggiero** DA, Baker H, Joh TH, Reis DJ. (1984). Distribution of catecholamine neurons in the hypothalamus and preoptic region of mouse. *Journal of Comparative Neurology*. 223(4): 556-82.
- Russell** DF, White RB. (1999). Gonadotropin-Releasing Hormone Genes: Phylogeny, Structure, and Functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20(3): 224-240.
- Sagrillo** CA, Grattan DR, McCarthy MM, Selmanoff, M. (1996). Hormonal and neurotransmitter regulation of GnRH gene expression and related reproductive behaviors. *Behavior Genetics* 26(3): 241–277.
- Saldanha** CJ, Silverman AJ, Silver R. (2001). Direct Innervation of GnRH Neurons by Encephalic Photoreceptors in Birds. *Journal of Biological Rhythms*, 16(1), 39–49.
- Saly** V, Andrew RD. (1993). CA3 neuron excitation and epileptiform discharge are sensitive to osmolality. *Journal of Neurophysiology* 69: 2200–2208.



- Sanders SL, Stouffer RL.** (1997). Localization of steroidogenic enzymes in macaque luteal tissue during the menstrual cycle and simulated early pregnancy: immunohistochemical evidence supporting the two-cell model for estrogen production in the primate corpus luteum. *Biology of Reproduction* 56: 1077–1087.
- Sanghera MK, Anselmo-Franci J, McCann SM.** (1991). Effect of medial zona incerta lesions on the ovulatory surge of gonadotropins and prolactin in the rat. *Neuroendocrinology* 54: 433–438.
- Sano I, Gamo T, Kakimoto Y, Taniguchi K, Takesada M, Nishinuma K.** (1959). Distribution Of Catechol Compounds in Human Brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 32: 586–587.
- Santoro N, Filicori M, Crowley WF.** (1986). Hypogonadotropic Disorders in Men and Women: Diagnosis and Therapy with Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone. *Endocrine Reviews* 7(1): 11–23.
- Sarkar DK, Fink G.** (1981). Gonadotropin-Releasing Hormone Surge: Possible Modulation through Postsynaptic α -Adrenoreceptors and Two Pharmacologically Distinct Dopamine Receptors*. *Endocrinology*, 108(3): 862–867.
- Schally AV, Arimura A, Bowers CY, Wakabayashi I, Kastin AJ, Redding TW, Segal AJ.** (1970). Purification Of Hypothalamic Releasing Hormones of Human Origin I. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 31(3): 291–300.
- Schally AV, Kastin AJ, Arimura A.** (1971). Hypothalamic Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH)-Regulating Hormone: Structure, Physiology, and Clinical Studies. *Fertility and Sterility* 22(11): 703–721.
- Schally AV, Kastin AJ, Arimura A.** (1972). The Hypothalamus and Reproduction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 114(3): 423-442
- Schneider HPG, Mccann SM.** (1969). Possible Role of Dopamine as Transmitter to Promote Discharge of Lh-Releasing Factor. *Endocrinology* 85(1): 121-32.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW** (1989) Origin of luteinizing hormone- releasing neurons. *Nature* 338(6211): 161-4.
- Schwartz JC, Diaz J, Bordet R, Griffon N, Perachon S, Pilon C, Ridray S, Sokoloff P.** (1998). Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D1/D3 receptor coexistence. *Brain Research Reviews* 26(2-3): 236-242.
- Schwartz JV, Giros B, Martres MP, Sokoloff P.** (1992). The Dopamine Receptor Family: Molecular Biology and Pharmacology. *Seminars In Neuroscience* 4(2): 99–108.
- Scimemi A, Beato M.** (2009). Determining the Neurotransmitter Concentration Profile at Active Synapses. *Molecular Neurobiology* 40(3): 289–306.
- Seeman Philip, Van Tol HHM.** (1994). Dopamine receptor pharmacology. *Trends in Pharmacological Science* 15(7): 264-270.
- Selmanoff MK, Wise PM.** (1981). Decreased dopamine turnover in the median eminence in response to suckling in the lactating rat. *Brain Research* 212(1): 101–115.
- Selmanoff MK.** (1981). The lateral and medial median eminence distribution of dopamine, norepinephrine and luteinizing hormone releasing hormone and the effect of prolactin on catecholamine turnover. *Endocrinology* 108: 1716–1722.
- Sétáló G, Vigh S, Schally AV, Arimura A, Flerkó B.** (1976). Immunohistological study of the origin of LH-RH-containing nerve fibers of the rat hypothalamus. *Brain Research* 103(3): 597–602.
- Shaikh AA.** (1971). Estrone and estradiol levels in the ovarian venous blood from rats during the estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction* 5(3): 297-307.



- Shao-Jun W**, Bing Z, Xiao-Xuan R, Lian-Hong T. (2010). Experimental Study on Acupuncture Activating the Gonadotropin releasing Hormone Neurons in Hypothalamus. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 30(1): 30-39.
- Shimada S**, Kitayama S, Lin CL, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G. (1991). Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254(5031): 576-578.
- Sibley DR**, Leff SE, Creese I. (1982). Interactions Of Novel Dopaminergic Ligands With D-1 And D-2 Dopamine Receptors. *Life Sciences* 31(7): 637-645.
- Sibley DR**, Monsma FJ, Shen Y. (1993). Molecular Neurobiology of Dopaminergic Receptors. *International Review of Neurobiology*: 35:391-415.
- Sibley DR**, Monsma Jr FJ. (1992). Molecular biology of dopamine receptors. *Trends in Pharmacological Science* 13(2): 61-69.
- Silva CC**, Bolaños-Hurtado M, Juárez-Tapia C, Flores A, Arrieta-Cruz I, Cruz ME, Domínguez R. (2020). Unraveling the Role of Discrete Areas of the Rat Brain in the Regulation of Ovulation through Reversible Inactivation by Tetrodotoxin Microinjections *Jove* (163): 1-24.
- Silverman AJ**, Hoffman DL, Zimmerman EA. (1981). The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Research Bulletin* 6(1): 47-61.
- Silverman AJ**, Wilson R, Kesner JS, Knobil E. (1986). Hypothalamic localization of multiunit electrical activity associated with pulsatile LH release in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 44: 168-171.
- Silvia WJ**, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson L. (1991). Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2alpha during luteolysis in ruminants. *Biology of Reproduction* 45: 655-663.
- Simerly RB**, Swanson LW, Gorski RA. (1985a). The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. *Brain Research* 330: 55-64.
- Simerly RB**, Swanson LW, Handa RJ, Gorski RA. (1985b). Influence of perinatal androgen on the sexually dimorphic distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 40: 501-510.
- Simerly RB**, Zee MC, Pendleton JW, Lubahn DB, Korach KS. (1997). Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(25): 14077-14082.
- Simmons DA**, Yahr P. (2011). Distribution of catecholaminergic and peptidergic cells in the gerbil medial amygdala, caudal preoptic area and caudal bed nuclei of the stria terminalis with a focus on areas activated at ejaculation. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 41:13-19.
- Simon AM**, Goodenough DA, Li E, Paul DL. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385: 525-529.
- Simpson JL** (2003). The Ovary || Germ Cell Failure and Ovarian Resistance. *American Journal of Medical Genetics* 89(4): 186-200.
- Skinner DC**, Herbison AE. (1997). Effects of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, and b-endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. *Endocrinology* 138: 2585-2595.
- Smith GC**, Simpson RW. (1970). Monoamine fluorescence in the median eminence of foetal, neonatal and adult rats. *Z Zellforsch* 104: 541-556.
- Smith Ms**, Freeman Me, Neill JD. (1975). The Control of Progesterone Secretion During the Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in the Rat: Prolactin, Gonadotropin and Steroid Levels Associated with Rescue of the Corpus Luteum of Pseudopregnancy. *Endocrinology* 96(1): 219-26.



- Smith RM, Shikanov A, Kniazeva E, Ramadurai D, Woodruff TK, Shea LD. (2014).** Fibrin-Mediated Delivery of an Ovarian Follicle Pool in a Mouse Model of Infertility. *Tissue Engineering. Part A* 20(21-22): 3021–3030.
- Smith SS, Newman JP, Evans A. (1993).** Comorbid psychopathy is not associated with increased D 2 dopamine receptor TaqI A or B gene marker frequencies in incarcerated substance abusers. *Biological Psychiatry* 33: 845-848.
- Solovyeva EV, Hayashi M, Margi K, Barkats C, Klein C, Amsterdam A, Hsueh AJW, Tsafirri A. (2000).** Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biology of Reproduction* 63: 1214-1218.
- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG. (1997).** Multiple Ionic Conductances of the Human Dopamine Transporter: The Actions of Dopamine and Psychostimulants. *The Journal of Neuroscience*, 17(3): 960–974.
- Sower SA, Decatur WA, Joseph NT, Freamat M. (2012).** Evolution of Vertebrate GnRH Receptors from the Perspective of a Basal Vertebrate. *Frontiers in Endocrinology* 3: 140.
- Spergel DJ. (2019).** Modulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Secretion in Mice by Non-peptide Neurotransmitters, Gasotransmitters, and Gliotransmitters. *Frontiers in Endocrinology* 10: 329.
- Spratt DI, Finkelstein JS, Butler JP, Badger TM, Crowley WF Jr. (1987).** Effects of increasing the frequency of low doses of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on gonadotropin secretion in GnRH-deficient men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 64: 1179–1186.
- Stagkourakis S, Dunevall J, Taleat Z, Ewing AG, Broberger C. (2019).** Dopamine release dynamics in the tuberoinfundibular dopamine system. *The Journal of Neuroscience* 39(21): 4009-4022.
- Stamatiades GA, Carroll RS, Kaiser UB. (2019).** GnRH-A Key Regulator of FSH. *Endocrinology*, 160(1): 57–67.
- Stanislaus D, Ponder S, Ji TH, Conn PM. (1998).** Gonadotropin-releasing hormone receptor couples to multiple G proteins in rat gonadotrophs and in GGH3 cells: evidence from palmitoylation and overexpression of G proteins. *Biology of Reproduction* 59(3): 579-86.
- Stanton PG, Burgon PG, Hearn MTW, Robertson DM. (1996).** Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology* (1-2): 133-41.
- Stephen LK. (1974).** Hypothalamic Factors, *Western Journal of Medicine* 120(5): 402–403.
- Steyn FJ, Anderson GM, Grattan DR. (2007).** Expression Of Ovarian Steroid Hormone Receptors in Tuberoinfundibular Dopaminergic Neurones During Pregnancy and Lactation. *Journal of Neuroendocrinology* 19(10): 788–793.
- Stocco C, Telleria C, Gibori G. (2007).** The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. *Endocrine Reviews* 28(1): 117–149.
- Strange K. (1992).** Regulation of solute and water balance and cell volume in the central nervous system. *Journal of American Society of Nephrology* 3(1): 12-27.
- Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Stormann TM, Brann MR, Kennedy JL, O’dowd BF. (1990).** Human Dopamine D1 Receptor Encoded by An Intronless Gene on Chromosome 5. *Nature* 347(6288): 80–83.
- Suszko MI, Lo DJ, Suh H, Camper SA, Woodruff TK. (2003).** Regulation of the rat follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter by activin. *Molecular Endocrinology* 17: 318-332.
- Tam P, Snow M. (1981).** Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 64:133–147.



- Tank AW, Weiner H, Thurman JA.** (1981). Enzymology And Subcellular Localization of Aldehyde Oxidation in Rat Liver. *Biochemical Pharmacology*, 30(24): 3265–3275.
- Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ, Millar MR, Smyth CD, Hillier SG.** (1995). Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *The Journal of Endocrinology* 145: 535-543.
- Thiéry JC, Gayrard V, Le Corre S, Viguie' C, Martin GB, Chemineau P, Malpoux B.** (1995). Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 49: 285–296.
- Tian Y, Lookingland KJ, Moore KE.** (1991). Contribution of noradrenergic neurons to 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations in the regions of the rat brain containing incertohypothalamic dopaminergic neurons. *Brain Research* 555(1): 135–140.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Freneau RT Jr, Caron MG.** (1991). Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(17): 7491–7495.
- Tillet Y, Batailler M, Krieger-Poullet M, Thibault J.** (1990). Presence of dopamine-immunoreactive cell bodies in the catecholamine group A15 of the sheep brain. *Histochemistry* 93(3): 327–333.
- Tobiansky DJ, Will RG, Lominac KD, Turner JM; Hattori T, Krishnan K, Martz JR, Nutsch VL, Dominguez JM** (2015). Estradiol in the Preoptic Area Regulates the Dopaminergic Response to Cocaine in the Nucleus Accumbens. *Neuropsychopharmacology* 41(7): 1897-1906.
- Tomaszewska-Zaremba D, Andrzej H.** (2009). The role of immunological system in the regulation of gonadoliberein and gonadotropin secretion. *Reproductive Biology*, 9(1): 11–23.
- Trueta CS, Salgado ZO, Clapp C, de la Escalera GM.** (1996). The catecholaminergic stimulation of gonadotropin-releasing hormone release by GT1-1 cells does not involve phosphoinositide hydrolysis. *Life Sciences* 58(17): 1453–1459.
- Tsutsumi M, Zhou W, Millar RP, Mellon PL, Roberts JL, Flanagan CA, Dong K, Gillo B, Sealfon SC.** (1992). Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Molecular Endocrinology* 6(7):1163–1169.
- Tsutsumi R, Webster NNJG.** (2009). GnRH Pulsatility, The Pituitary Response and Reproductive Dysfunction. *Endocrine Journal* 56(6): 729–737.
- Turchan J, Anderson C, Hauser KF, Sun Q, Zhang J, Liu Y, Na A.** (2001). Estrogen Protects Against the Synergistic Toxicity by HIV Proteins, Methamphetamine and Cocaine. *BMC Neuroscience* 2(1): 3.
- Uchida K, Kadowaki M, Miyake T.** (1969). Ovarian secretion of progesterone and 20 a-hydroxypregn-4-en-3-one during rat estrous cycle in chronological relation to pituitary release of luteinizing hormone. *Japan Endocrinology* 16(2): 227–237.
- Ueno S, Kuroda T, Maclaughlin DT, Ragin RC.; Manganaro TF, Donahoe PK.** (1989). Mullerian Inhibiting Substance in The Adult Rat Ovary During Various Stages of The Estrous Cycle. *Endocrinology* 125(2): 1060–1066.
- Ugrumov M, Hisano S, Daikoku S.** (1989b). Topographical relations between tyrosine hydroxylase- and luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive fibers in the median eminence. *Neuroscience Letters* 102(2-3): 159-64.
- Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP.** (2006). Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal Physiology. Endocrinology and Metabolism* 291(5): E965-73.
- Van den Hurk R, Zhao J.** (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63(6): 1717–1751.



- Van den Pol AN, Herbst RS, Powell JF.** (1984). Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons of the hypothalamus: A light and electron microscopic study. *Neuroscience* 13(4): 1117–1156.
- Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O.** (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350(6319): 610–614.
- Van Vulpén EHS, Yang CR, Nissen R, Renaud LP.** (1999). Hypothalamic A14 and A15 catecholamine cells provide dopaminergic innervation to the supraoptic nucleus in rat: a combined retrograde tracer and immunohistochemical study. *Neuroscience* 93: 675–680.
- Vaughan RA, Foster JD.** (2013). Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends in Pharmacological Sciences* 34(9): 489–496.
- Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA.** (1998). Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *The Journal of Clinical Investigation*. 101(12): 2622–2629.
- Vijayan E, McCann SM.** (1978). The effects of systemic administration of dopamine and apomorphine on plasma LH and prolactin concentration in conscious rats. *Neuroendocrinology* 25(4): 221–35.
- Visser JA, De Jong FH, Laven JSE, Themmen APN.** (2006). Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Review Reproduction* 131(1): 1–9.
- Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombes M.** (2018). Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling. *Annals of Endocrinology* 79: 98–106.
- Von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S.** (2016). The Search for True Numbers of Neurons and Glial Cells in the Human Brain: A Review of 150 Years of Cell Counting. *Journal of Comparative Neurology* 524(18): 3865–3895.
- Wagner CK, Eaton MJ, Moore KE, Lookingland KJ.** (1995). Efferent projections of the medial zona incerta containing A13 dopaminergic neurons: a PHA-L anterograde tract tracing study in the rat. *Brain Research* 677: 229–237.
- Wang H, Andoh K, Hagiwara H.** (2001). Effect of adrenal and ovarian androgens on type 4 follicles unresponsive to FSH in immature mice. *Endocrinology* 142: 4930–4936.
- Wang S, Kou Z, Jing Z, Zhang Y, Guo, X, Dong M, Wilmut I, Gao S.** (2010). Proteome of mouse oocytes at different developmental stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(41): 17639–17644.
- Wang WK, Jenq LS, Chiang Y, Chien NK.** (1982). Inhibition of dopamine biosynthesis by gonadotropin-releasing hormone in rat. *Nature* 296(5855): 354–354.
- Wang Y, Fortin J, Lamba P, Bonomi M, Persani L, Roberson MS.** (2008). Activator protein-1 and smad proteins synergistically regulate human follicle-stimulating hormone beta-promoter activity. *Endocrinology* 149: 5577–9110.
- Warembourg M, Deneux D, Krieger M, Jolivet A.** (1996). Progesterone receptor immunoreactivity in aromatic l-amino acid decarboxylase-containing neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *The Journal of Comparative Neurology*, 367(4): 477–490.
- Watanabe H.** (1987). D1-type of dopamine autoreceptors are not involved in the regulation of dopamine synthesis in the striatum. *Japan Journal Pharmacology* 43: 327–330.
- Watanabe T, Nakai Y.** (1987). Electron Microscopic Cytochemistry of Catecholaminergic Innervation of LHRH Neurons in The Medial Preoptic Area of The Rat. *Archives Of Histology And Cytology* 50 (1): 103–112.
- Watling KJ, Kebabian JW, Neumeyer JL** (1995). *The RBI handbook of receptor classification and signal transduction.* Drug Development Research 33: 461



- Weenen C**, Laven JS, Von Bergh AR. (2004). Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction* 10: 77-83
- Wei Y**, Li W, Xueqing M, Zhang L, Shen M, Liu H. (2019). Corticosterone Injection Impairs Follicular Development, Ovulation and Steroidogenesis Capacity in Mice Ovary. *Animals (Basel)* 9(12): 1047.
- Weiner RI**, Ganong WF. (1978). Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiological Reviews* 58: 905–976.
- Whetzel SZ**, Shih YH, Georgic LM, Akunne HC, Pugsley TA. (1997). Effects of the Dopamine D3 Antagonist PD 58491 and Its Interaction with the Dopamine D3 Agonist PD 128907 on Brain Dopamine Synthesis in Rat. *Journal of Neurochemistry* 69(6): 2363–2368.
- Wierman ME**, Kiseljak-Vassiliades K, Tobet S. (2011). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: Initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 32(1): 43–52.
- Wiest WG**, Kidwell WR, Kirschbaum THG. (1963). Induction of rat ovarian 2-a-hydroxysteroid dehydrogenase activity by gonadotropic hormone administration. *Steroids* 2: 617–629.
- Wildt L**, Häusler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, Knobil E. (1981). Frequency And Amplitude of Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation and Gonadotropin Secretion in the Rhesus Monkey. *Endocrinology* 109(2): 376–385.
- Wilson RC**, Kesner JS, Kaufman JM, Uemura T, Akema T, Knobil E. (1984). Central electrophysiologic correlates of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 39: 256-260.
- Wiltbank MC**, Niswender GD. (1992). Functional aspects of differentiation and degeneration of the steroidogenic cells of the corpus luteum in domestic ruminants. *Animal Reproduction Science* 28: 103-110.
- Wood RI**, Newman SW, Lehman MN, Foster DL. (1992). GnRH neurons in the fetal lamb hypothalamus are similar in males and females. *Neuroendocrinology* 55: 427–433.
- Wray S**, Hoffman G. (1986). A developmental study of the quantitative distribution of LHRH neurons within the central nervous system of postnatal male and female rats. *The Journal of Comparative Neurology* 252(4): 522–531.
- Wright DE**, Jennes L. (1993). Origin of noradrenergic projections to GnRH perikarya-containing areas in the medial septum-diagonal band and preoptic area. *Brain Research* 621(2), 272–278.
- Wu X**, Chen L, Brown CA, Yan C, Matzuk MM. (2004). Interrelationship of growth differentiation factor 9 and inhibin in early folliculogenesis and ovarian tumorigenesis in mice. *Molecular Endocrinology* 18: 1509-1519.
- Yding AC**, Bungum L, Nyboe AA, Humaidan P. (2011). Preovulatory progesterone concentration associates significantly to follicle number and LH concentration but not to pregnancy rate. *Reproductive BioMedicine Online* 23: 187-195.
- Yding AC**. (2016). Inhibin-B secretion and FSH isoform distribution may play an integral part of follicular selection in the natural menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction* 23: 16-24.
- Yokota H**, Yamada K, Liu X. (1997). Paradoxical action of activin A on folliculogenesis in immature and adult mice. *Endocrinology* 138: 4572- 4576.
- Yoshinaga K**, Hawkins RA, Stocker JF. (1969). Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology* 85: 103–112.
- Yuji M**, Tomomi T, Tomohiro H, Yukari T (1996). Electrophysiological correlates of GnRH secretion. *Animal Reproduction Science* 42(1-4): 537–550.



Záborszky L, Vadasz C. (2001). The midbrain dopaminergic system: anatomy and genetic variation in dopamine neuron number of inbred mouse strains. *Behav Genetics* 31:47–59.

Zhang W, Sun C, Shao Y, Zhou Z, Hou Y, Li A. (2019). Partial depletion of dopaminergic neurons in the substantia nigra impairs olfaction and alters neural activity in the olfactory bulb. *Scientific Reports* 9 (1): 254.

Zheng W, Nagaraju G, Liu Z, Liu K. (2012). Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 356: 24-30.

Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C. (1997). Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Molecular Endocrinology* 11(13): 1924–1933.

Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Tol, Hubert HMV, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O. (1990). Cloning and expression of human and rat Dt dopamine receptors. *Nature* 347(6288): 76–80.

