



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA**

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción

Laboratorio de Biología del Desarrollo

Respuesta ovulatoria en animales con bloqueo unilateral de los
receptores muscarínicos M1 ováricos a las 13:00 h en cada etapa del
ciclo estral de la rata adulta

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE **BIÓLOGO**

PRESENTA:

EDUARDO MARTÍNEZ GARCÍA



Directora: M. IBSH. Angélica Flores Ramírez



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**

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción

Laboratorio de Biología del Desarrollo

Respuesta ovulatoria en animales con bloqueo unilateral de los
receptores muscarínicos M1 ováricos a las 13:00 h en cada etapa del
ciclo estral de la rata adulta

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE **BIÓLOGO**

PRESENTA:

EDUARDO MARTÍNEZ GARCÍA

JURADO DE EXAMEN

Directora: M. IBSH. Angélica Flores Ramírez

Asesora: Dra. María Elena Ayala Escobar

Asesora: Dra. Juana Monroy Moreno

Sinodal: Dr. Carlos Camilo Silva Méndez

Sinodal: Dra. Elizabeth Vieyra Valdez





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: **MARTINEZ GARCIA EDUARDO** con número de cuenta **314314378** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **23 de Agosto de 2023** a las **11:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE
PRESIDENTE DRA.	AYALA ESCOBAR MARIA ELENA
VOCAL MTRA.	FLORES RAMIREZ ANGELICA
SECRETARIO DRA.	MONROY MORENO JUANA
SUPLENTE DR.	SILVA MENDEZ CARLOS CAMILO
SUPLENTE DRA.	VIEYRA VALDEZ ELIZABETH

FIRMA

El título del trabajo escrito que se presenta es:

RESPUESTA OVULATORIA EN ANIMALES CON BLOQUEO UNILATERAL DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS M1 OVÁRICOS A LAS 13:00 H EN CADA ETAPA DEL CICLO ESTRAL DE LA RATA ADULTA

En la modalidad de: **TESIS**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CDMX, a 23 de Junio de 2023

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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez, por confiar en mí desde cuarto semestre, por permitirme entrar a su laboratorio y aprender de usted.

A los miembros del jurado de examen:

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. Juana Monroy Moreno

Dr. Carlos Camilo Silva Méndez

Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

Por todo el tiempo y apoyo que me brindaron, agradezco sus aportaciones a esta investigación y hacer de ésta, un mejor trabajo.

A los **M. V. Z.; Adriana Altamirano Bautista, Román Hernández Meza y Dolores Elizabeth Guzmán Andrade**, responsables del bioterio de la FES Zaragoza, por su dedicación en el mantenimiento y cuidado de los animales utilizados en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A ti, mamá; por todo el amor que me has dado, gracias por siempre defenderme, cuidarme y motivarme a seguir adelante. Por ti aprendí a no darme por vencido y a poner el corazón en todo lo que hago. Te quiero.

A mi papá, por todo su apoyo y comprensión. Gracias por poner en mí tu cariño y confianza, espero que el “enanius” que hoy conoces, te llene de orgullo.

A mi hermano; Javier, eres mi ejemplo a seguir, te admiro un montón. Gracias por todo lo que has hecho por mí, desde comer aquel plato de pancita que no quería de pequeño, hasta patrocinarme el programa estadístico para mi tesis.

Al amor de mi vida; Aide, por enseñarme el significado del amor incondicional, por darme el lugar seguro que tanto soñaba. Soy tan afortunado de tenerte como mi compa / ñera de aventuras extremas desde los doce años. Gracias por siempre ser la primera en aplaudir mis logros, desde asistir a ver mis dibujos en una cafetería, hasta estar en la ceremonia de premiación de las estancias cortas de investigación; espero que estés orgullosa de mí, todo lo que soy te lo debo en gran parte a ti. Si existe una vida después de la muerte, amaría vivirla contigo, te amo con todo mi corazón.

A la mejor amiga que me dio la E. N. P. 7; Alejandra, no hay día que no extrañe estar contigo viendo el cielo de panditas en las lunas o comiendo galletas de limón en el servicio social. Gracias por todo lo que has hecho por mí, sin ti, ni habría salido de la prepa, te quiero.

A la mejor amiga que me dio la facultad; Judith, gracias por siempre apoyarme, quererme y cuidarme. Nuestros recuerdos en la carrera los atesoro con toda el alma. Gracias por estar cada vez que me rompían el corazón. Eres increíble, serás una gran bióloga, te adoro.

A mis amigas de la carrera; Dani, Areli, Nayello, Perla, Yadira y Sofi, gracias por compartir conmigo sus vidas y por hacer más divertido mi camino por la carrera. Las quiero.

A mis amigos del laboratorio; Ivonne, Mirza, Ángel, Ale y Jesús, gracias por hacerme parte de su increíble equipo, a cada uno lo llevo en mi corazoncito, gracias a ustedes me sentí acompañado durante días difíciles.

A ti; Jesús, por acompañarme en días difíciles y siempre que corría hacia ti, me recibías con los brazos abiertos. Te quiero.

A Gaby, gracias por enseñarme desde cómo marcar a mis animalitos, hasta como ser una mejor persona, un mejor Xavier, por ser parte fundamental en mi formación académica, sin ti, sin tu compañía y apoyo, no estaría hoy aquí. Gracias por todos esos jalones de oreja, por todas esas veces que estuviste para mí en mis momentos de ansiedad y de “no puedo más”. Te debo mucho, este logro también es tuyo.

A Moni, gracias por todo tu apoyo, por enseñarme y acompañarme desde la primera vez que puse un pie en el laboratorio hasta en los inicios de este trabajo.

A las doctoras; Ayala, Juanita, y a Eloir, por hacerme sentir perteneciente al laboratorio, por todas sus enseñanzas y todos los momentos que festejamos juntos.

A la maestra Angélica, gracias infinitas por ser la primera persona en la FES en creer en mí y en mis capacidades, por abrirme las puertas del laboratorio. Gracias por no solo enseñarme temas acerca de reproducción, sino también de la vida, tomaré en cuenta cada uno de sus consejos. La quiero mucho y le prometo ser feliz.

A todas las personas que amo y amé, jamás me alcanzará la vida para agradecerles y compensarles todo lo que han hecho por mí, sin ustedes, no estaría aquí.

Gracias



ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	3
Ciclo estral.....	3
Eje hipotálamo – hipófisis – ovario.....	5
<i>Hipotálamo</i>	5
<i>Hipófisis</i>	8
<i>Ovarios</i>	10
Acetilcolina.....	27
<i>Metabolismo de la acetilcolina</i>	27
<i>Receptores colinérgicos</i>	30
<i>Acetilcolina en el ovario</i>	37
PARTICIPACIÓN DE LA ACETILCOLINA EN LA REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN.....	40
<i>Isoflurano como anestésico y su efecto sobre la ovulación</i>	43
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	44
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	44
HIPÓTESIS.....	45
OBJETIVOS.....	45
<i>Objetivo general</i>	45
<i>Objetivos particulares</i>	45
MATERIAL Y MÉTODOS.....	46
<i>Animales experimentales</i>	46
<i>Procedimientos experimentales</i>	46
<i>Análisis estadístico</i>	50
RESULTADOS.....	51
<i>Intacto</i>	51
<i>Anestesia con isoflurano</i>	51
<i>Microinyección de solución salina en la cavidad bursal ovárica</i>	53
<i>Bloqueo unilateral de los m₁AChR presentes en el ovario por la microinyección de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica</i>	59
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES.....	78
REFERENCIAS.....	79

RESUMEN

Los órganos endocrinos pares son fisiológica y patológicamente similares; no obstante, la evidencia experimental indica que dichos órganos no son idénticos en su función ni en la regulación de sus funciones. En cuanto a las funciones del ovario, estas dependen de diferentes vías de señalización.

Una de las funciones ováricas es la ovulación, la cual consiste en la liberación del ovocito II desde el folículo preovulatorio. Es regulada por señales hormonales que provienen del hipotálamo, la hipófisis y del mismo ovario. Se ha mostrado que las células de la granulosa de los folículos ováricos expresan los receptores muscarínicos M1 (m_1 AChR) cuyo ligando es la acetilcolina (ACh). Por lo anterior, surge la pregunta: ¿qué función desempeña el sistema colinérgico en la regulación de la ovulación?

Con el fin de dilucidar esta interrogante, en el presente estudio se analizó la participación asimétrica de dicho sistema en la regulación de la ovulación mediante el uso de dicloruro de pirenzepina; un antagonista selectivo de los m_1 AChR. Para ello, se utilizaron ratas hembra adultas cíclicas de la cepa CIIZ – V que fueron mantenidas con un fotoperíodo controlado (14 h luz / 10 h oscuridad), temperatura constante (22 ± 2 °C) y con alimento y agua a libre demanda.

Las cirugías se llevaron a cabo bajo anestesia con *isoflurano* entre las 12:50 y las 13:10 h en cada etapa del ciclo estral. Durante este intervalo de tiempo se hizo la laparotomía ventral, se exteriorizó el ovario izquierdo o derecho y se realizó la administración de 1 μ L [4.5 μ mol / L] de dicloruro de pirenzepina por medio de una microinyección en la cavidad de la bursa ovárica. Al grupo control se le microinyectó 1 μ L de solución salina al 0.9 %. La eutanasia de los animales fue a las 09:00 h en el día del estro vaginal inmediato y se obtuvo la tasa de animales ovulantes (TAO) y el número de ovocitos liberados. Se aceptaron como significativas todas aquellas diferencias con una $p \leq 0.05$.

En comparación con los animales del grupo control, los animales tratados en la etapa de diestro 1 con dicloruro de pirenzepina en el ovario derecho presentaron disminución del número de ovocitos liberados por el ovario contralateral (Q1: 3.2, Med: 4.0, Q3: 5.5; vs. Q1: 6.0, Med: 8.0, Q3: 9.5; $p = 0.0317$, U de Mann – Whitney), sin alterar al ovario ipsilateral; sin embargo, cuando la microinyección se realizó en la etapa de diestro 2 en el ovario izquierdo, resultó en disminución del número de ovocitos liberados por el ovario ipsilateral (Q1: 3.2, Med: 4.0, Q3: 4.0; vs. Q1: 6.5, Med: 7.0, Q3: 8.0; $p = 0.0159$, U de Mann – Whitney) y el incremento subsecuente del mismo parámetro por el ovario contralateral (Q1: 10.5, Med: 11.0, Q3: 11.0; vs. Q1: 5.0, Med: 6.0, Q3: 7.5; $p = 0.0079$, U de Mann – Whitney).

Con base en los resultados obtenidos, se sugiere que, en el ovario de la rata adulta, la ACh vía m_1 AChR regula de manera estimulante el desarrollo folicular, esta regulación es asimétrica y varía en función de la etapa del ciclo estral y del ovario tratado.

INTRODUCCIÓN

La ovulación en los mamíferos es el resultado de la liberación pulsátil de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) desde el hipotálamo hacia el sistema portal hipotalámico – hipofisario, con la posterior liberación de la hormona luteinizante (LH) de la adenohipófisis a la circulación sistémica. Las concentraciones elevadas de la LH inducen una cascada de eventos en el folículo preovulatorio que culmina en la ruptura folicular y la liberación del ovocito. El periodo entre una ovulación y la ovulación posterior se denomina ciclo estral; el cual está conformado por cuatro etapas: estro, diestro 1, diestro 2 y proestro. La ovulación ocurre cada cuatro a cinco días en la etapa de estro (Adams & Ratto, 2013; Blanchard *et al.*, 2003; Levine, 2015).

Uno de los sistemas de neurotransmisión involucrados en la regulación de la ovulación es el sistema colinérgico, como lo reportó Everett *et al.* (1949); ellos mostraron que la administración sistémica de sulfato de atropina; un antagonista de todos los receptores muscarínicos (mAChR), en la etapa de proestro, resulta en el bloqueo de la ovulación. Con la finalidad de discernir si el sistema colinérgico del ovario participa directamente en la regulación de la ovulación, Cruz *et al.* (2015) realizaron microinyecciones de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal de cada ovario a las 13:00 h en la etapa de proestro. Encontraron que la inyección en la bursa izquierda resulta en el bloqueo de la ovulación por ambos ovarios, mientras que la inyección en la bursa contralateral no tiene un efecto significativo.

Se desconoce si el sistema colinérgico de los ovarios participa en la regulación de la ovulación durante el resto de las etapas del ciclo estral. Una de las limitantes que se ha mostrado, es que los anestésicos convencionales que se utilizan en procedimientos quirúrgicos en roedores bloquean la ovulación cuando se administran por la tarde del diestro 1 (Morán *et al.*, 2016). Existe evidencia de que el *isoflurano*; un éter halogenado, que se utiliza como anestésico inhalado en animales, no bloquea la ovulación cuando se administra por la tarde de cada etapa del ciclo estral (Contreras *et al.*, 2021). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue analizar si la unión de la ACh a los mAChR en los ovarios, en cada etapa del ciclo estral, regula la ovulación de la rata adulta, utilizando *isoflurano* como anestésico.

MARCO TEÓRICO

Ciclo estral

Se define como el período entre una ovulación y la ovulación posterior; describe las fluctuaciones en los perfiles de secreción de las hormonas esteroides ováricas causadas por la actividad del mismo ovario bajo la influencia de las gonadotropinas hipofisarias, lo que depende de la hora y la etapa del ciclo estral (**Figura 1**). Tales fluctuaciones en los perfiles de secreción de hormonas esteroides conducen a cambios morfológicos en el tracto reproductivo (**Cuadro 1**) (Aritonang *et al.*, 2017; Blanchard *et al.*, 2003).

El ciclo estral está conformado por las etapas denominadas *estro* (25 a 27 h de duración), *diestro 1* (6 a 8 h), *diestro 2* (55 a 57 h) y *proestro* (12 a 14 h). La ovulación ocurre cada cuatro a cinco días en la etapa de estro. Las ratas son poliéstricas y presentan ovulación espontánea (Bales & Hostetler, 2011; Everett *et al.*, 1949; Levine, 2015; Tully, 2009).

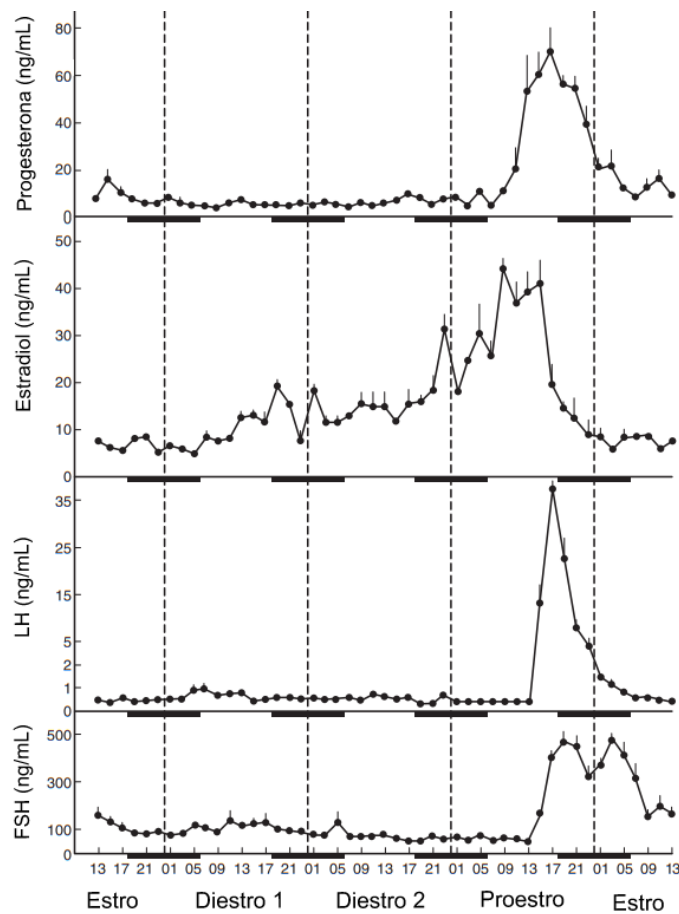


Figura 1. Fluctuaciones en los perfiles de secreción de la hormona estimulante de los folículos, la hormona luteinizante, estradiol y progesterona a lo largo del ciclo estral de cuatro días de duración. Cada punto representa la media \pm E. E. M. de la concentración de hormonas en suero. Las barras negras representan el período de oscuridad (06:00 a 18:00 h) y los números debajo de ellas representan la hora del día. **FSH:** hormona estimulante de los folículos. **LH:** hormona luteinizante (Smith *et al.*, 1975).

Cuadro 1. Resumen de las características histológicas del tracto reproductivo en ratas hembra en cada etapa del ciclo estral (Hirshfield & Midgi, 1978; Westwood, 2008).

	Vagina	Útero	Ovarios
Estro	Desprendimiento progresivo de las capas de células cornificadas. Reducción del grosor del epitelio. Presencia de restos celulares. Infiltración progresiva de leucocitos.	Necrosis/degeneración notable de células epiteliales. Pérdida de actividad mitótica. Infiltración de leucocitos.	A menudo se presentan cuerpos lúteos en degeneración. Cuerpos lúteos con cavidad central llena de líquido y sin tejido fibroso. Folículos menores a 390 µm y de 390 a 500 µm de diámetro.
Diestro 1	Desprendimiento completo de la capa de células cornificadas. Infiltración de leucocitos.	Degeneración continua de células epiteliales endometriales. Regreso de la actividad mitótica; ambos procesos vistos juntos (actividad mitótica y degeneración).	Los cuerpos lúteos todavía pueden contener una cavidad con líquido. Más pequeños que en diestro 2. Generalmente desprovistos de tejido fibroso. Folículos menores a 390 µm y de 390 a 500 µm de diámetro.
Diestro 2	Epitelio delgado con infiltración variable de leucocitos. Proliferación y engrosamiento epitelial con la posterior reducción en la infiltración de leucocitos.	Inicialmente pocos procesos mitóticos, sin embargo, incrementa posteriormente. Células ocasionalmente en degeneración.	Cuerpos lúteos grandes. Formación de tejido fibroso en la cavidad central. Folículos menores a 390 µm y de 390 a 500 µm de diámetro.
Proestro	Presencia de procesos mitóticos. Pocos o ningún proceso de degeneración o descamación.	Epitelio cuboidal a columnar. Presencia de mitosis en células epiteliales con poco o ningún proceso de degeneración y poca infiltración de células inflamatorias.	Cuerpos lúteos a menudo en proceso de degeneración. Proliferación de tejidos fibrosos en la cavidad central. Folículos menores a 390 µm y de entre 600 a 700 µm de diámetro.

Eje hipotálamo – hipófisis – ovario

En los mamíferos hembra, la reproducción es regulada por señales que provienen del hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, que en conjunto funcionan como un eje hormonal denominado *eje hipotálamo – hipófisis – ovario* (**Figura 2**) (Levine, 2015; Mescher, 2018).

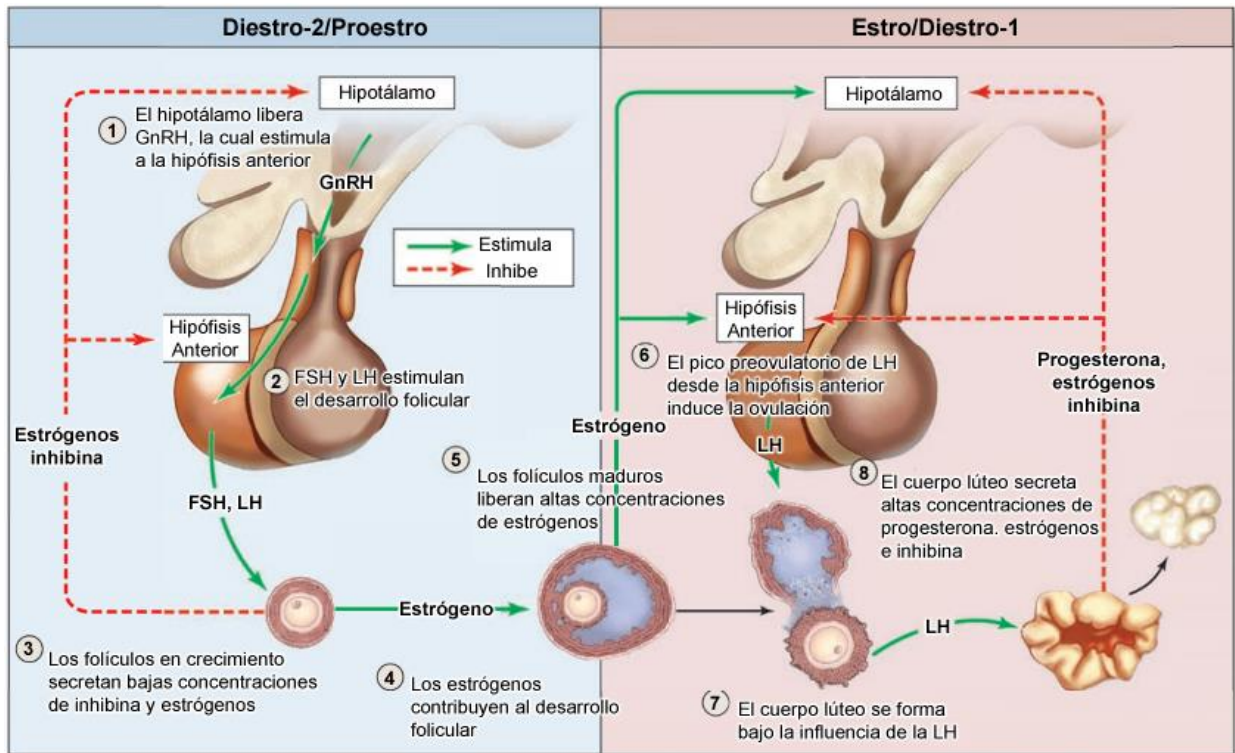


Figura 2. Regulación neuroendocrina de las funciones ováricas (Mescher, 2018).

Hipotálamo

Es una estructura cerebral, constituida principalmente de materia gris que, al localizarse en el diencefalo, está limitado anteriormente por el quiasma óptico, lateralmente por los tractos ópticos y posteriormente por el cuerpo mamilar. En dirección rostrocaudal, el hipotálamo se divide en cinco regiones: 1) la región preóptica, 2) el hipotálamo anterior, 3) el hipotálamo medio, 4) la región premamilar también llamada hipotálamo posterior, y 5) la región mamilar (**Figura 3**) (Halász, 2004; Henning, 2001; Saper & Lowell, 2014).

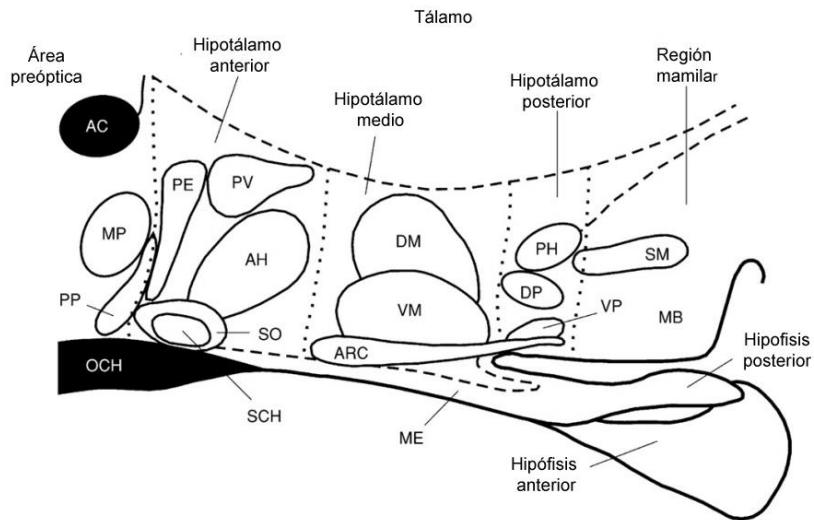


Figura 3. Regiones y núcleos hipotalámicos. **AC:** comisura anterior. **AH:** núcleo hipotalámico anterior. **ARC:** núcleo arqueado. **DM:** núcleo dorsomedial. **DP:** núcleo premamilar dorsal. **MB:** cuerpo mamilar. **ME:** eminencia media. **MP:** núcleo preóptico medial. **OCH:** quiasma óptico. **PE:** núcleo periventricular. **PP:** núcleo periventricular preóptico. **PV:** núcleo paraventricular. **SCH:** núcleo supraquiasmático. **SM:** núcleo supramamilar. **SO:** núcleo supraóptico. **PH:** núcleo hipotalámico posterior. **VM:** núcleo ventromedial. **VP:** núcleo premamilar ventral (Halász, 2004).

El hipotálamo regula diversas funciones fisiológicas como el crecimiento, el metabolismo, la respuesta al estrés, los ritmos circadianos y la reproducción (Gore, 2013).

Hormona liberadora de las gonadotropinas. Es un decapeptido (Figura 4) que es liberado por células neurosecretoras hipotalámicas denominadas *neuronas GnRHérgicas* y actúa como el iniciador central de la cascada hormonal que regula la reproducción (Millar, 2006; Khazeni & Varamini, 2018).

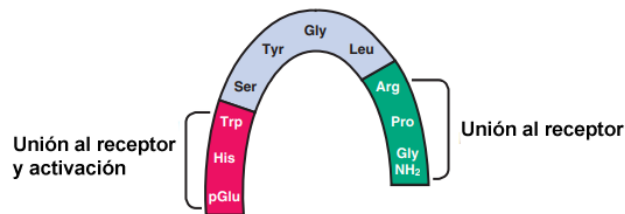


Figura 4. Representación esquemática de la secuencia de aminoácidos de la hormona liberadora de las gonadotropinas de mamífero en su conformación plegada (Khazeni & Varamini, 2018).

Se han descrito dos patrones de secreción de la GnRH (**Figura 5**): 1) la secreción basal o tónica; que se caracteriza por un pulso por hora, y 2) la secreción repentina o fásica; que es una efusión abrupta y masiva de GnRH que induce el pico preovulatorio de LH en la etapa de proestro (*Goodman et al., 2014; Herbison, 2020*).

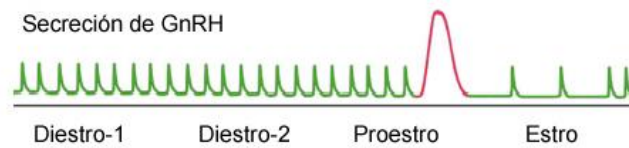


Figura 5. *Patrones de secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas.* Se representa la secreción tónica en color verde y la secreción fásica en color rojo (modificada de *Herbison, 2020*).

Neuronas GnRHérgicas. Son relativamente pocas en número, aproximadamente de 600 a 800 y se encuentran dispersas por varias áreas del cerebro. En los roedores, los somas de las neuronas GnRHérgicas se localizan desde el bulbo olfatorio hasta la eminencia media (ME) y la mayoría reside en tres regiones cerebrales: 1) el tabique medial, 2) el área preóptica (POA), y 3) el área hipotalámica anterior (AHA). Esta distribución a menudo se denomina patrón de Y invertida (**Figura 6**) (*Herbison, 2015; Wilkinson & Brown, 2015*).

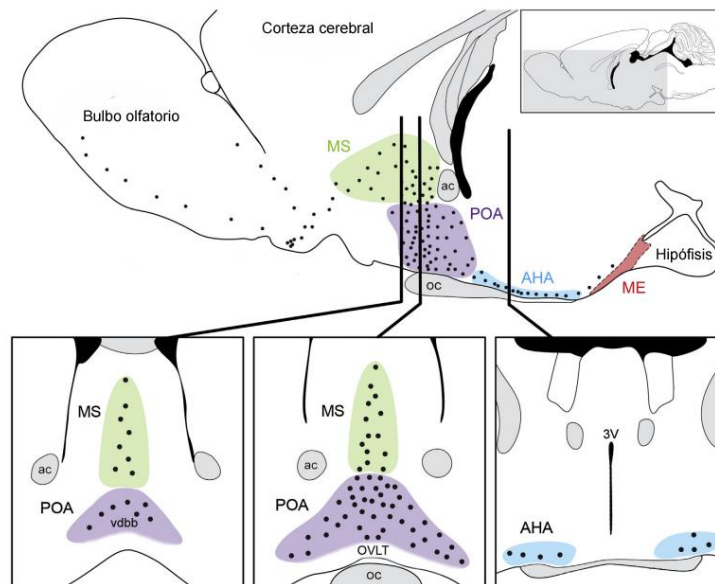


Figura 6. *Distribución de las neuronas GnRHérgicas en el cerebro de roedor.* Los somas de las neuronas GnRHérgicas son representados por los puntos negros en los planos sagital (imagen superior) y coronal (imágenes inferiores). **ac:** comisura anterior. **oc:** quiasma óptico. **AHA:** área hipotalámica anterior. **MS:** tabique medial. **POA:** área preóptica. **OVLT:** *organum vasculosum* de las láminas terminales. **vdbb:** rama vertical de la banda diagonal de Broca. **3V:** tercer ventrículo (*Herbison, 2015*).

La gran mayoría de las neuronas GnRHérgicas no presentan axones, en su lugar envían proyecciones dendríticas atípicas a la ME conocidas como *dendrones*. en otras palabras, la proyección de la neurona a la ME es en realidad una dendrita que recibe entradas sinápticas a lo largo de toda su longitud y al mismo tiempo propaga potenciales de acción. Una vez que llegan a la ME, estos dendrones se dividen en numerosas ramificaciones que se proyectan a los vasos sanguíneos en el plexo capilar primario del sistema portal hipotalámico – hipofisario en la zona externa de la ME (**Figura 7**) (Herbison, 2015).

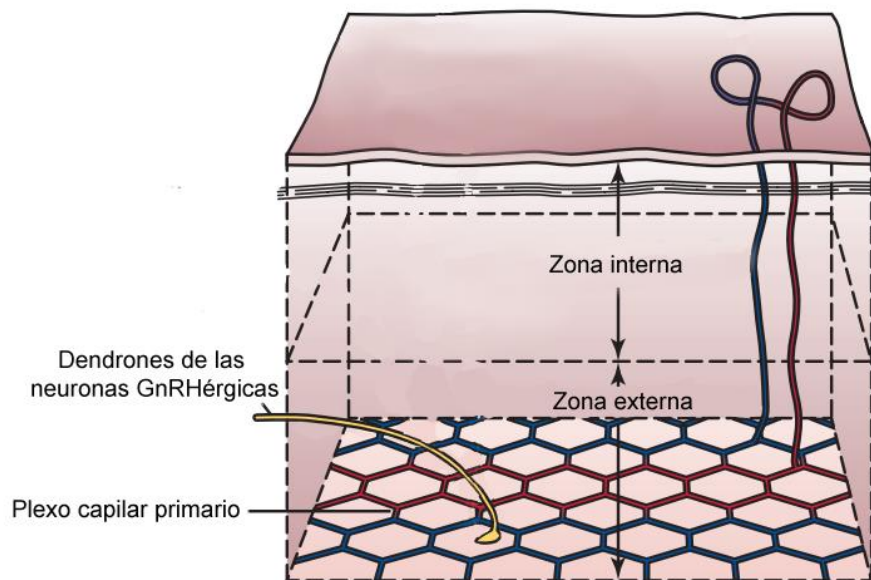


Figura 7. Diagrama esquemático de la eminencia media (modificada de McCartney & Marshall, 2014).

No existen conexiones neurales directas entre el hipotálamo y la adenohipófisis; sin embargo, la ME y el sistema portal hipotalámico – hipofisario representan el vínculo anatómico entre el hipotálamo y la adenohipófisis (McCartney & Marshall, 2014).

Hipófisis

Es una glándula endocrina formada por dos regiones: 1) la neurohipófisis; considerada una extensión del hipotálamo, y 2) la adenohipófisis; un tejido epitelial glandular, donde se localizan los somatotropos, lactotropos, corticotropos, tirotropos y los gonadotropos. La GnRH en el plexo capilar primario es transportada a la porción distal de la adenohipófisis mediante las venas porta hipofisarias, que posteriormente se dividen en el plexo capilar secundario. Enseguida, la GnRH abandona la circulación sanguínea a través de las paredes de los capilares y entra a los espacios de las células de la porción distal hasta llegar a sus receptores en los gonadotropos (**Figura 8**) (Jones & López, 2014; Ross & Pawlina, 2015).

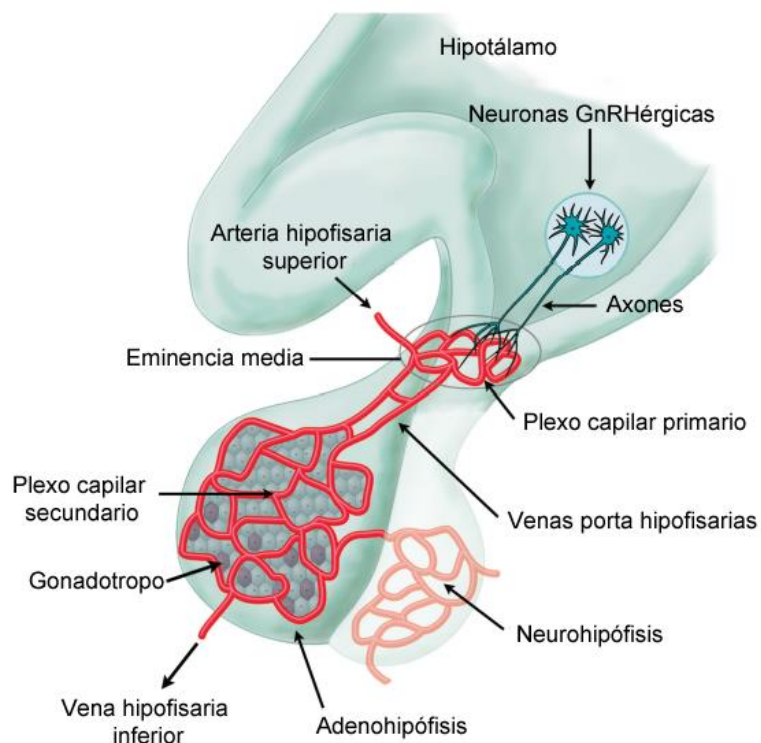


Figura 8. Anatomía de la adenohipófisis (modificada de [Wilkinson & Brown, 2015](#)).

Gonadotropos. Constituyen alrededor del 10 % de las células de la adenohipófisis, están diseminadas por toda la porción distal y en sus membranas citoplasmáticas expresan los receptores a GnRH. Son células ovoides y pequeñas con un núcleo esférico y excéntrico, sintetizan y secretan la hormona estimulante de los folículos (FSH) y la LH, ambas conocidas como las *gonadotropinas* ([Ross & Pawlina, 2015](#)).

Gonadotropinas hipofisarias. La FSH y la LH son glicoproteínas que comparten la subunidad α , por lo tanto, sus características y funciones biológicas son definidas por sus subunidades β (FSH β y LH β) ([Bernard & Brûlé, 2020](#)).

La liberación pulsátil de la GnRH es esencial en el mantenimiento de las concentraciones séricas de las gonadotropinas necesarias en la esteroidogénesis y la gametogénesis (**Figura 9**). A frecuencias pulsátiles altas de la GnRH, aproximadamente un pulso cada 60 min, la adenohipófisis secreta preferentemente LH en relación con la FSH y a frecuencias pulsátiles bajas, un pulso cada 120 min o más, la relación se invierte y se secreta más FSH en relación con la LH ([Bernard & Brûlé, 2020](#); [Counis et al., 2005](#)).

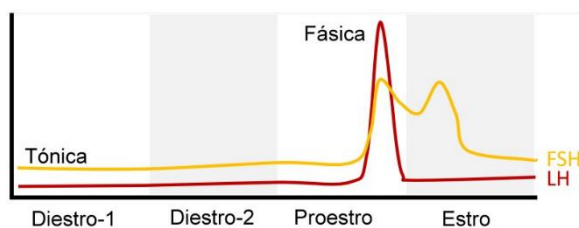


Figura 9. Patrones de secreción de las gonadotropinas hipofisarias a lo largo del ciclo estral en la rata. Representación esquemática de las secreciones tónicas y fásicas de la hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (modificada de [Bernard & Brûlé, 2020](#)).

Las gonadotropinas son liberadas a la circulación general por de la vena hipofisaria inferior y llegan a sus respectivos receptores en los ovarios. Las funciones de la FSH son estimular el crecimiento y desarrollo de las células de los folículos ováricos y el ovocito, la secreción de hormonas esteroides, así como la expresión del receptor a la LH en las células de la granulosa; mientras que las de la LH son: la inducción de la ovulación en los folículos maduros, la reanudación de la meiosis en ovocitos, la detención de la proliferación de las células de la granulosa, la formación del cuerpo lúteo, y la estimulación de la síntesis de hormonas esteroides ([Jones & López, 2014](#); [Levine, 2015](#); [Simonneaux & Bahougne, 2015](#); [Wilkinson & Brown, 2015](#)).

Ovarios

En los roedores son estructuras esféricas con una superficie irregular y nodular, bastante vascularizados; se localizan varios milímetros caudales al riñón, aproximadamente un centímetro lateral a la línea media, y están unidos a la pared abdominal dorsal por el mesovario y los ligamentos suspensorios (**Figura 10**). Cada ovario está contenido en una estructura membranosa delgada denominada *bursa ovárica* (**Figura 11**), en otras palabras, el espacio periovárico está aislado, con excepción de un pequeño canal que permite la entrada y salida de vasos sanguíneos y de nervios por el hilio ([Boyd *et al.*, 2018](#); [Vidal & Dixon, 2018](#); [Zhang *et al.*, 2013](#)).

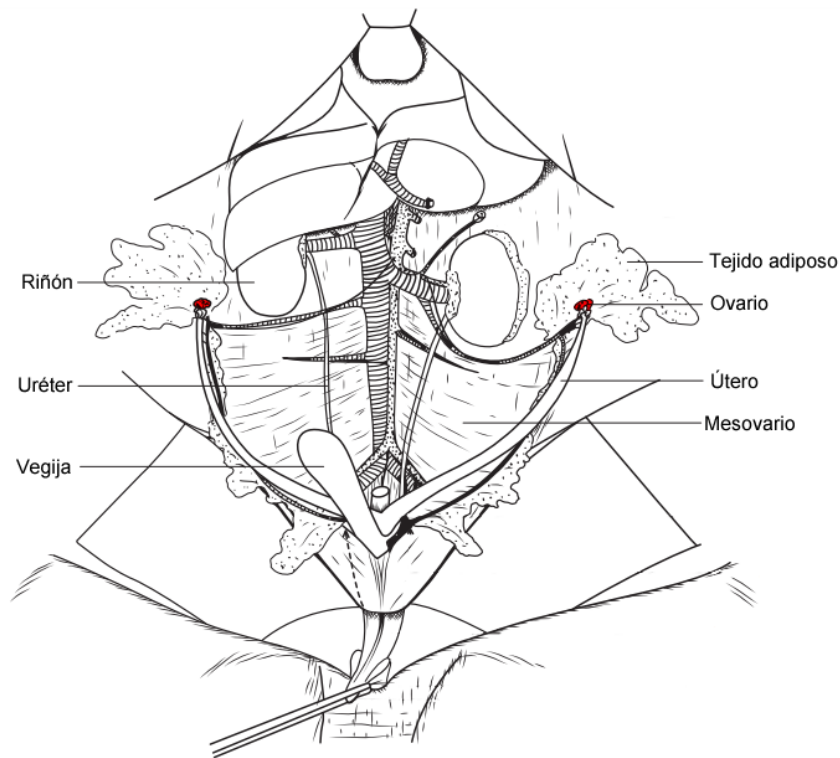


Figura 10. *Sistema reproductor femenino.* Los ovarios se representan en color rojo (modificado de [Lewis & Downes, 2019](#)).

Bursa ovárica. Es una membrana peritoneal delgada cubierta por mesotelio y compuesta por tres capas: 1) la capa externa; conformada por tejido epitelial continuo y se encuentra en contacto directo con la cavidad peritoneal, 2) la capa intermedia; constituida por tejido conectivo que contiene fibroblastos, células del músculo liso y vasos sanguíneos, y 3) la capa interna; formada por tejido epitelial discontinuo orientada hacia el ovario ([Boyd et al., 2018](#); [Martin et al., 1981](#)).

La bursa ovárica protege al ovario del entorno peritoneal. Está relacionada con la homeostasis de los fluidos y el transporte de sustancias alrededor del ovario, es decir, proporciona un entorno óptimo para las funciones ováricas. Además, es considerada la estructura facilitadora en el transporte de los ovocitos liberados hacia el oviducto, de esta manera, evita que los ovocitos escapen a la cavidad peritoneal ([Hosotani et al., 2021](#); [Zhang et al., 2013](#)).

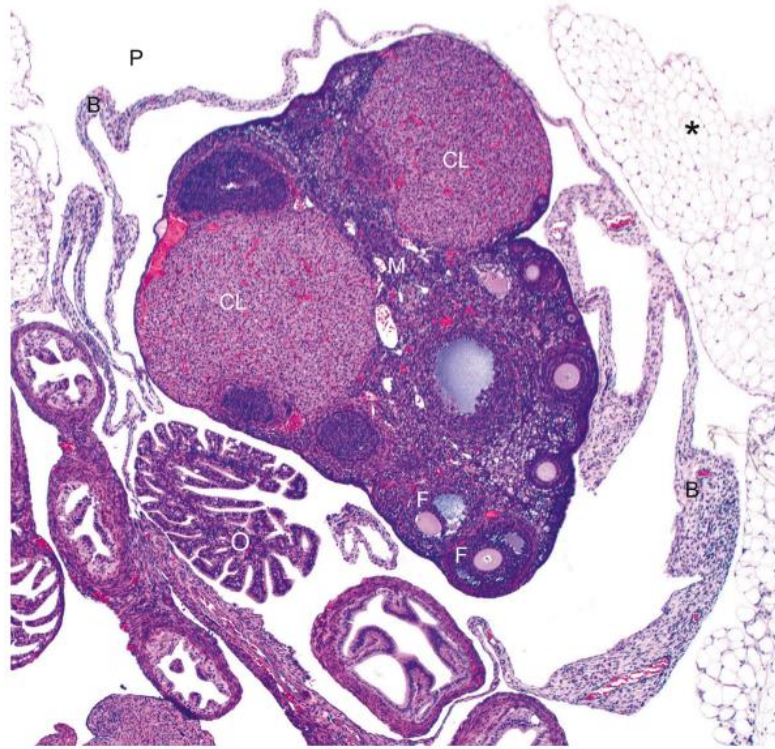


Figura 11. Ovario de roedor. **B:** bursa ovárica. **CL:** cuerpos lúteos. **M:** médula. **F:** folículos en desarrollo. **O:** oviducto. **P:** cavidad peritoneal. **Asterisco (*):** tejido adiposo (Boyd *et al.*, 2018).

La superficie externa del ovario está cubierta por una capa de mesotelio modificado llamado *epitelio de la superficie del ovario*, que está formado por una sola capa de células cuboidales / columnares. Debajo de este epitelio se encuentra la túnica albugínea; una capa de tejido conectivo que contiene células similares a fibroblastos. El resto del ovario se divide en dos áreas poco definidas: la corteza y la médula; por lo general, el área medular contiene predominantemente vasos sanguíneos, linfáticos, estroma y células intersticiales, mientras que la corteza contiene mayormente a los folículos en desarrollo y los cuerpos lúteos (**Figura 12**) (Boyd *et al.*, 2018; Lewis & Downes, 2019; Vidal & Dixon, 2018).

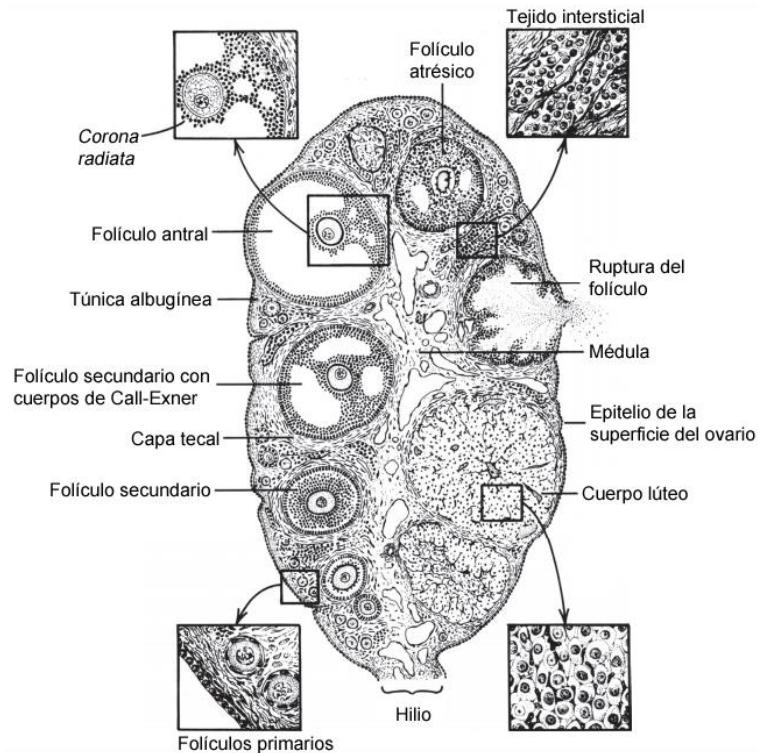


Figura 12. *Histología del ovario* (Levine, 2015).

Los ovarios presentan dos funciones interrelacionadas: 1) una función citogénica; que consiste en la generación y liberación de ovocitos aptos para ser fecundados, y 2) una función endocrina; que consiste en la secreción de hormonas esteroides (principalmente estrógenos y progestágenos), peptídicas (activinas, inhibinas y folistatina) y factores de crecimiento (las proteínas de la familia del factor de crecimiento transformante β son las más destacadas) (Pangas & Rajkovic, 2015; Ross & Pawlina, 2015; Vantman & Vega, 2010).

Ovogénesis

La producción de gametos femeninos es nombrada *ovogénesis*; comienza con la migración de las células germinales primordiales del saco vitelino a los primordios gonadales. A medida que los ovarios se desarrollan, estas células germinales experimentan divisiones mitóticas sincronizadas con citocinesis incompleta, lo que da como resultado ovogonias interconectadas. Posteriormente, dichas células se diferencian en ovocitos I y su desarrollo se detiene en la etapa de diploteno de la profase I de la meiosis y permanecen detenidos en el ciclo celular hasta que la LH induzca la ovulación y la reanudación de la meiosis (Figura 13) (Albertini, 2015; Mescher, 2018; Ross & Pawlina, 2015; Szmelskyj *et al.*, 2015).

La ovogénesis se divide en tres etapas: 1) crecimiento, 2) pre - maduración, y 3) maduración (**Figura 13**). A medida que progresa la ovogénesis, el ovocito mantiene una relación temporal dentro del folículo ovárico asegurando que la ovogénesis y la foliculogénesis estén integrados (**Albertini, 2015**).

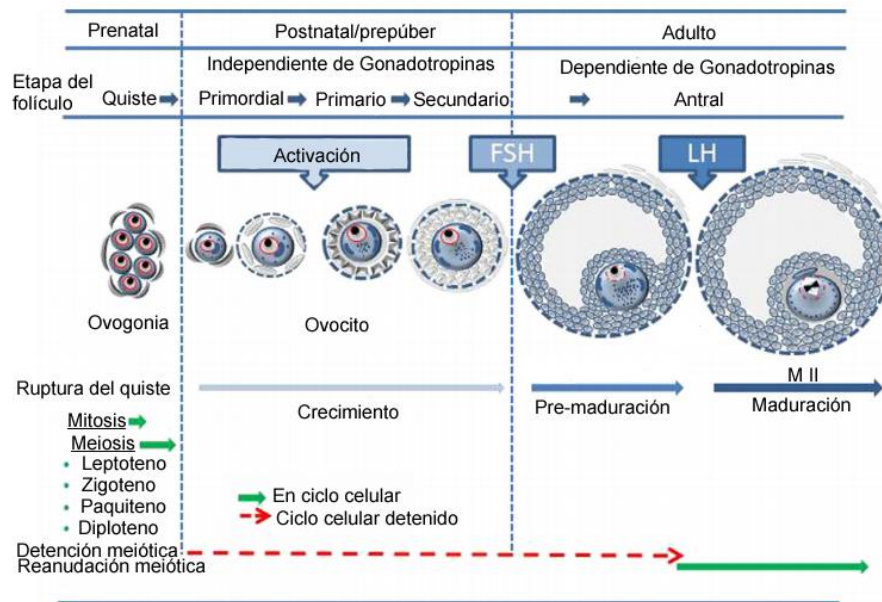


Figura 13. Etapas de la ovogénesis (**Albertini, 2015**).

Foliculogénesis

Es el proceso que describe el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos en una serie de etapas morfológicas y funcionales; este proceso culmina en la atresia o la ovulación. La foliculogénesis temprana es dirigida por señales intraóvaricas, es decir, independiente de las gonadotropinas, sin embargo, las gonadotropinas hipofisarias son esenciales para que la foliculogénesis avance más allá de la etapa antral. A su vez, el ovario produce hormonas necesarias en la retroalimentación hipotalámica – hipofisaria (**Findlay, 2003; Monniaux et al., 2019; Pangas & Rajkovic, 2015**).

El folículo ovárico es la unidad anatómico - funcional del ovario, está formado por el ovocito I, por una lámina basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario y las células tecales; estas últimas conforman la denominada teca interna. Además de las células de la granulosa y tecales, el folículo está rodeado por fibras de colágeno, células de tejido conectivo y fibras musculares lisas, a todo lo anterior se le denomina *teca externa* (**Domínguez et al., 1991**).

El receptor a FSH (FHSR) se expresa en las células de la granulosa en los folículos ováricos, mientras que el receptor a LH (LHR) se expresa mayormente en las células de la granulosa mural, las células de la teca interna y en las células del cuerpo lúteo (**Bernard & Brûlé, 2020; Ross & Pawlina, 2015**).

Formación del folículo primordial. Durante el desarrollo ovárico fetal, las ovogonias están contenidas en grupos de células o quistes, los cuales se forman por división clonal y por agregación de ovogonias. Cada grupo contiene ocho o más células germinales, con puentes intercelulares que conectan a algunas de estas células. Durante la formación del folículo primordial, las proyecciones de las células somáticas penetran entre las ovogonias, lo que lleva a la constricción de los puentes intercelulares y al eventual encerramiento de tales células por las células somáticas. Se ha sugerido que las altas concentraciones de estradiol y progesterona maternos inhiben el ensamblaje de los folículos primordiales en roedores, mientras que la caída de estas concentraciones después del nacimiento da paso al ensamblaje folicular (Pangas & Rajkovic, 2015).

Folículo primordial. Se conforma por el ovocito I de aproximadamente 25 μm de diámetro rodeado de una capa plana de células pregranulosas y con un núcleo bien diferenciado (Figura 14). Se localiza inmediatamente debajo de la túnica albugínea (Lewis & Downes, 2019).

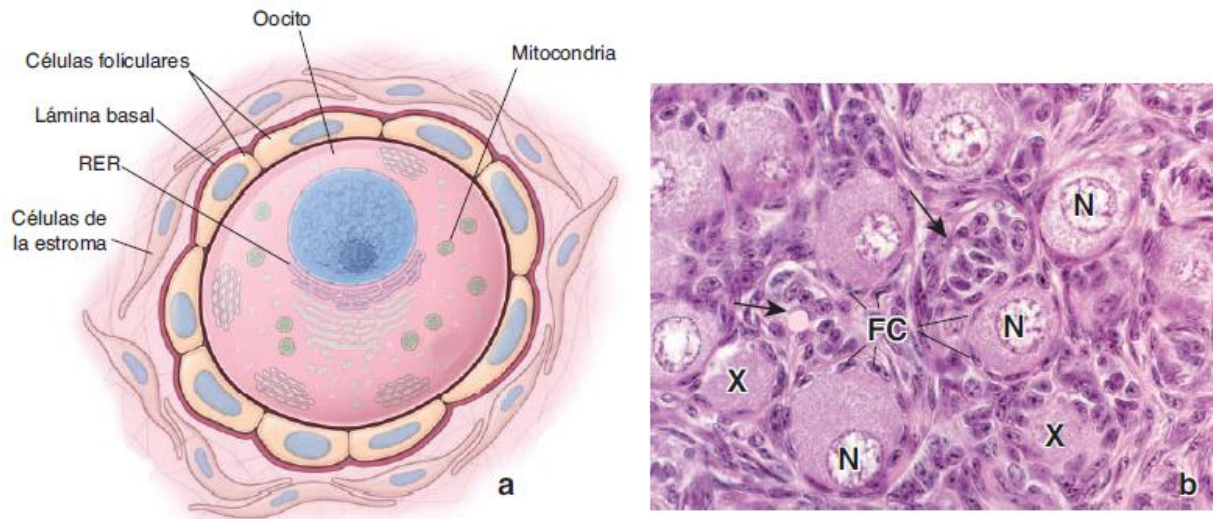


Figura 14. Folículo primordial. **a.** Diagrama esquemático del folículo primordial que muestra el ovocito detenido en la profase I. **b.** Fotomicrografía de los folículos primordiales. Muestra los ovocitos rodeados por una capa simple de células foliculares aplanadas (FC). **N:** núcleo. **RER:** retículo endoplasmático rugoso. **X:** ovocitos en los cuales el núcleo no está incluido en el plano del corte. **Flechas:** folículos que se cortaron tangencialmente y por ello solo se ven las células foliculares y no el ovocito. 640 x (Ross & Pawlina, 2015).

Una vez que se establece la población de folículos primordiales, el folículo está destinado a cuatro finales: 1) permanecer inactivo durante períodos de tiempo variables para constituir la reserva ovárica, 2) entrar directamente en atresia, 3) ingresar al reclutamiento inicial y finalmente ovular, o 4) experimentar el destino más común, que es someterse al reclutamiento inicial y sufrir atresia. Más del 99 % de todos los folículos

del ovario se pierden por atresia, lo que significa que menos del 1 % de los folículos ovulan (Hannon & Curry, 2018).

El ovario de la rata contiene alrededor de 40 000 folículos primordiales que transitan a folículos primarios a lo largo de la vida reproductiva del animal; esta transición no está bajo control hormonal ni está relacionada con el ciclo estral. Los mecanismos moleculares que controlan la transición o reclutamiento inicial son poco conocidos. El reclutamiento de folículos primordiales es un proceso complejo y multidireccional que involucra varios tipos de células y moléculas de señalización que convergen en múltiples vías de señalización (Cuadro 2). Es probable que la intrincada coordinación entre estas sustancias estimulantes e inhibitorias determine el destino de supervivencia, inactividad o reclutamiento de un folículo primordial (Hannon & Curry, 2018; Lewis & Downes, 2019).

Cuadro 2. Factores ováricos intrínsecos involucrados en la transición de folículos primordiales a primarios (reclutamiento inicial) (Hannon & Curry, 2018).

Factor	Célula emisora	Célula diana	Acción en el reclutamiento inicial
AKT	Ovocito	Ovocito	Estimula
bFGF	Ovocito	Células de la granulosa, precursores de las células de la teca y estroma	Estimula
BMP4/7	Precusores de las células de la teca	Células de la granulosa	Estimula
KGF	Precusores de las células de la teca	Células de la granulosa, precursores de las células de la teca y estroma	Estimula
Kit	Ovocito	Ovocito y precursores de las células de la teca	Estimula
Ligando Kit	Células de la granulosa	Ovocito y precursores de las células de la teca	Estimula
LIF	Células de la granulosa	Ovocito y células de la granulosa	Estimula
mTORC1	Ovocito	Ovocito	Estimula
PDGF	Ovocito y células de la granulosa	Células de la granulosa	Estimula
AMH	Células de la granulosa de folículos antrales	Folículos primordiales	Inhibe
FOXL2	Células de la granulosa	Células de la granulosa	Inhibe
FOXO3	Ovocito	Ovocito	Inhibe
PTEN	Ovocito	Ovocito	Inhibe
TSC1/2	Ovocito	Ovocito	Inhibe

AKT: proteína cinasa B. **AMH:** hormona antimulleriana. **bFGF:** factor de crecimiento de fibroblastos básico. **BMP4/7:** proteínas morfogenéticas óseas 4 y 7. **FOXL2:** proteína forkhead box L2. **FOXO3:** proteína forkhead box O3. **KGF:** factor de crecimiento de queratinocitos. **LIF:** factor inhibidor de la leucemia. **mTORC1:** complejo 1 de la diana de rapamicina en células de mamífero. **PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas. **PTEN:** homólogo de fosfatasa y tensina. **TSC1/2:** complejo esclerosis tuberosa 1 y 2.

Folículo primario. A medida que el folículo primordial transita a un folículo en crecimiento, ocurren cambios en el ovocito, en las células foliculares y en el estroma contiguo. Inicialmente, el ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares aplanadas circundantes proliferan, se tornan cúbicas y reciben el nombre de *células de la granulosa* (**Figura 15**), y es la primera etapa de la foliculogénesis. A medida que el ovocito crece, secreta proteínas específicas que se ensamblan en una cubierta extracelular denominada *zona pelúcida*, esta zona aparece entre el ovocito y las células foliculares contiguas, dando lugar al folículo secundario (Ross & Pawlina, 2015).

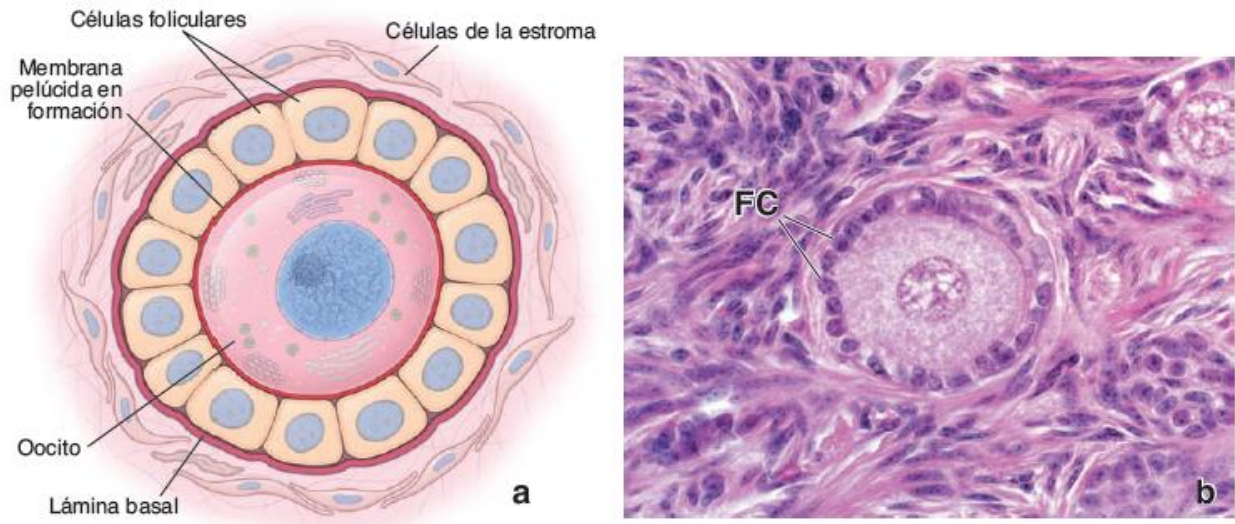


Figura 15. *Folículo primario.* **a.** Dibujo esquemático del folículo primario en la etapa inicial de desarrollo. **b.** Fotomicrografía del folículo primario. **FC:** capa de células foliculares. 640 x (Ross & Pawlina, 2015).

Folículo secundario. Durante el desarrollo del folículo secundario, las células de la granulosa se multiplican y forman una zona avascular multicapa que rodea al ovocito (**Figura 16**). El ovocito y las células de la granulosa circundante permanecen en contacto por uniones gap (Lewis & Downes, 2019).

Conforme las células de la granulosa proliferan, las células del estroma perifolicular forman una vaina de células de tejido conjuntivo, conocida como *teca folicular*, justo por fuera de la lámina basal. Posteriormente, la teca folicular se diferencia en dos capas, la teca interna y la teca externa (**Figura 16**). La teca interna comprende una capa vascular de células secretoras poligonales que presentan todas las características de las células productoras de esteroides, asimismo, contiene fibroblastos y haces de fibras colágenas; mientras que la teca externa contiene células de músculo liso y haces de fibras de colágeno (Lewis & Downes, 2019; Ross & Pawlina, 2015).

Las sustancias que ingresan por el torrente sanguíneo y los productos secretados por las células de la granulosa en proliferación dan como resultado la formación de espacios llenos de líquido entre las células de la granulosa llamados *cueros de Call-Exner*. Conforme el líquido continúa acumulándose, las cavidades comienzan a confluir para finalmente formar una cavidad única denominada *antro* (**Figura 16**). La formación del antro marca las etapas finales de la foliculogénesis y la transición de la regulación intraovárica (**Cuadro 3**) a la extraovárica (Hannon & Curry, 2018; Ross & Pawlina, 2015; Pangas & Rajkovic, 2015).

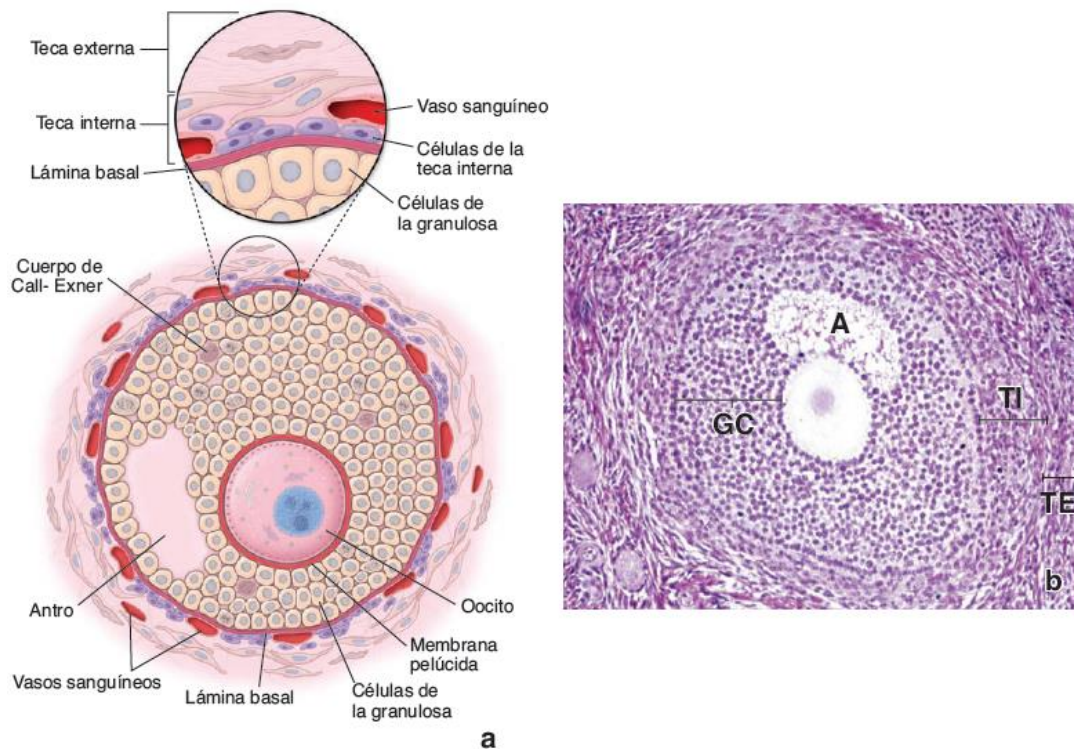


Figura 16. Folículo secundario. **a.** Dibujo esquemático del folículo secundario. **b.** Fotomicrografía del folículo secundario. **A:** antro. **GC:** células de la granulosa. **TE:** células de la teca externa. **TI:** células de la teca interna. 85 x (Ross & Pawlina, 2015).

Cuadro 3. Factores ováricos intrínsecos involucrados en el desarrollo de folículos preantrales (Hannon & Curry, 2018).

Factor	Célula emisora	Acción
Activina	Células de la granulosa	Estimula la proliferación en células de la granulosa
AMH	Células de la granulosa	Factor inhibidor en el desarrollo de folículos pequeños
BMP15	Ovocito	Estimula la proliferación en células de la granulosa
BMP4/7	Células de la teca	Modula la señalización de la FSH con el fin de aumentar las concentraciones de estradiol y evitar la luteinización prematura
Conexina 37/43	Uniones entre células de la granulosa y células de la granulosa y el ovocito	Comunicación entre las células de la granulosa y entre las células de la granulosa y el ovocito. En individuos <i>knockout</i> , los folículos ováricos no se desarrollan más allá de la etapa primaria
Ciclina D2	Células de la granulosa	Factor estimulado por FSH que controla la proliferación de células de la granulosa
GDF9	Ovocito	Reclutamiento de las células de la teca. En individuos <i>knockout</i> , los folículos ováricos no se desarrollan más allá de la etapa primaria
Vía de señalización <i>Hedgehog</i>	Células de la granulosa y de la teca	Función adecuada de las células de la teca
IGF1/IGFR	Células de la granulosa	Mejora la capacidad de respuesta de las células de la granulosa a la FSH
KGF	Células de la teca	Modula la comunicación entre las células de la teca y las células de la granulosa
Kit/ligando kit	Células de la granulosa y ovocito	Desarrollo continuo de folículos, crecimiento de ovocitos y organización de las células de la teca
NTF5/BDNF/NTRK2	Células de la granulosa y ovocito	En individuos <i>knokout</i> se ha afectado el desarrollo folicular en etapas posteriores a la primaria
WT1	Células de la granulosa	Factor inhibidor en el desarrollo de folículos pequeños

AMH: hormona antimulleriana. **BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro. **BMP4/7/15:** proteínas morfogenéticas óseas 4, 7 y 15. **GDF9:** factor de diferenciación del crecimiento derivado de ovocitos 9. **IGFI:** factor de crecimiento similar a la insulina 1. **IGFR:** receptor del factor de crecimiento similar a la insulina. **NTF5:** neurotropina 5. **NTRK2:** receptor de tirosina cinasa neurotrófico de tipo 2. **WT1:** tumor de Wilms 1.

Hasta este punto de la foliculogénesis, el ovario contiene una cohorte de folículos preantrales que responden a las gonadotropinas y pueden ser estimulados por la FSH para la maduración final hasta la etapa preovulatoria. Sin la estimulación de la FSH los folículos preantrales entran en atresia, por lo tanto, el desarrollo ahora depende de las gonadotropinas. Dado que el patrón de secreción de FSH es cíclico y que la FSH es el factor predominante en el desarrollo y supervivencia del folículo antral, este período de foliculogénesis es considerado *reclutamiento cíclico* (Hannon & Curry, 2018).

Folículo antral. A medida que el antro aumenta de tamaño, se diferencian dos subpoblaciones de células de la granulosa: 1) las células de la granulosa mural; que son las células más externas y rodean la membrana basal, y 2) las células de la granulosa que forman el *cumulus oophorus* (**Figura 17**). Estas subpoblaciones de células de la granulosa presentan características distintivas. Las células de la granulosa mural presentan la mayor actividad esteroidogénica, expresan las enzimas 3β – hidroxisteroide deshidrogenasa y la aromatasa del citocromo P450, además, exhiben mayor cantidad de receptores a LH. En contraste, las células del *cumulus* no expresan la aromatasa y su contenido de receptores a LH y su respuesta a la misma son sustancialmente más bajas (Hannon & Curry, 2018; Strauss & Williams, 2019).

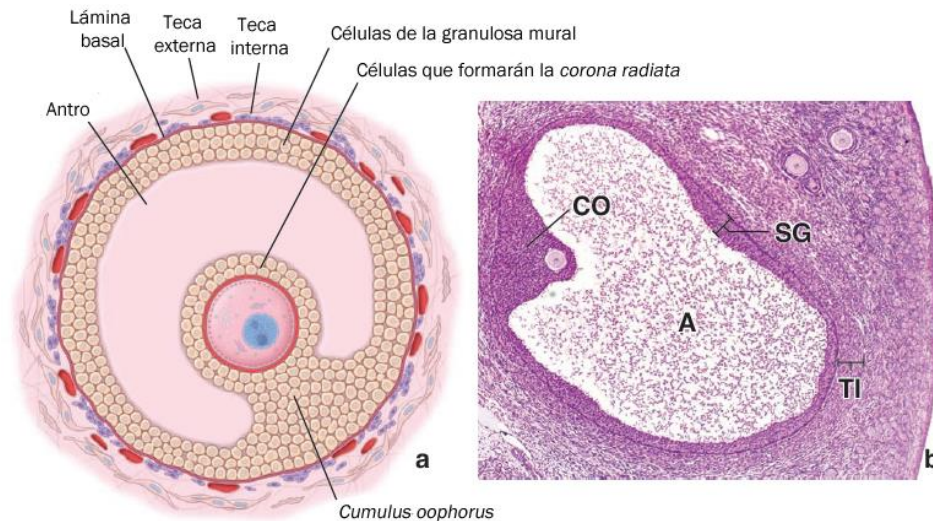


Figura 17. Folículo antral. **a.** Dibujo esquemático del folículo antral. **b.** Fotomicrografía del folículo antral. **A:** antro. **CO:** *cumulus oophorus*. **TI:** células de la teca interna. **SG:** células de la granulosa. 45x (Ross & Pawlina, 2015).

Folículo preovulatorio. El folículo continúa creciendo hasta alcanzar un diámetro de 600 a 700 μm , mientras que el diámetro del ovocito es de 80 a 90 μm y está rodeado por células del *cumulus oophorus* (**Figura 18**). Estos folículos preovulatorios son el único tipo de folículo capaz de ovular, de esta manera, la culminación de la foliculogénesis da como resultado la ruptura del folículo preovulatorio y la liberación del ovocito durante el proceso de ovulación (Hannon & Curry, 2018; Lewis & Downes, 2019).

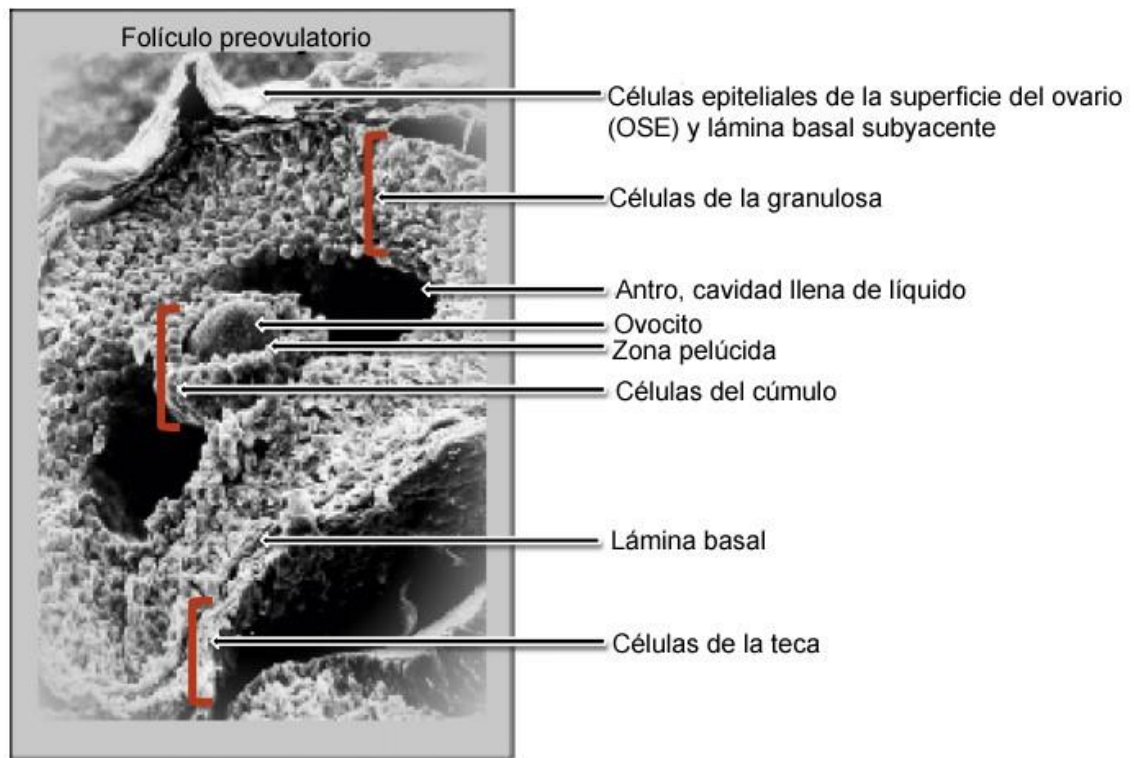


Figura 18. Tipos de células y organización dentro del folículo preovulatorio (Richards *et al.*, 2015).

En los ovocitos I, la primera profase meiótica no se completa hasta justo antes de la ovulación. Una vez que se completa dicha división meiótica (división reduccional) en el folículo maduro, cada célula hija del ovocito I recibe una cantidad equivalente de cromatina, pero solo una de ellas recibe mayor parte del citoplasma y se convierte en ovocito II. A medida que el ovocito II es expulsado del folículo, la segunda división meiótica (división ecuatorial) está en progreso, esta división queda detenida en la metafase y se completa únicamente si el ovocito II es penetrado por un espermatozoide (Ross & Pawlina, 2015).

Ovulación

Es el proceso por el cual se libera el ovocito II desde el folículo preovulatorio. El estímulo que desencadena la ovulación es la secreción preovulatoria de la LH que es liberada desde la adenohipófisis. En respuesta a esta secreción, las señales intrafoliculares que se originan son: 1) la reactivación de la meiosis del ovocito y 2) la promoción de la producción de la matriz extracelular especializada, la cual conduce a la expansión del complejo ovocito – *cumulus* (Figura 19A) (Ross & Pawlina, 2015; Russell & Robker, 2019).

La combinación de fluctuaciones hormonales y efectos enzimáticos resulta en la liberación del ovocito. Dichos procesos incluyen: 1) aumento del volumen y de la presión del líquido folicular; 2) proteólisis enzimática por plasminógeno activado (necesaria en la ruptura folicular y en la morfogénesis del tejido), incluida la invasión por células de la teca dentro de las capas de células de la granulosa (formación del cuerpo lúteo); 3) depósitos de glicosaminoglicanos dirigidos por hormonas entre el complejo ovocito – *cumulus* y entre las células de la granulosa; 4) generación de mediadores inflamatorios, en particular prostaglandinas y citocinas; y 5) contracción de las fibras musculares lisas en la capa de la teca externa desencadenada por prostaglandinas (**Figura 19A**) (Ross & Pawlina, 2015; Russell & Robker, 2019).

A medida que el folículo madura, éste sobresale hacia el espacio periovárico en preparación para la ovulación. Antes de la ovulación, el flujo sanguíneo cesa en una pequeña región de la superficie ovárica sobre el folículo que sobresale, esta región del epitelio se conoce como *estigma folicular* (**Figura 19B**), que se eleva y finalmente se rompe. De esta manera, el ovocito rodeado por la corona radiata y las células del *cumulus oophorus* son expulsados del folículo hacia el espacio periovárico (Boyd *et al.*, 2018; Ross & Pawlina, 2015).

Después de la ovulación, las células de la granulosa se hipertrofian, se vascularizan desde la teca interna y forman el cuerpo lúteo (Boyd *et al.*, 2018).

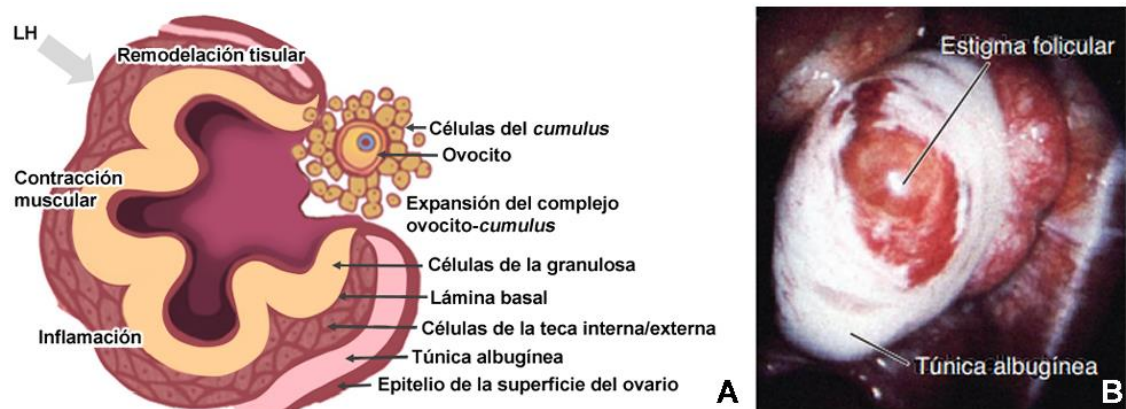


Figura 19. Ovulación. **A.** Eventos intrafoliculares requeridos en la ovulación. El incremento de la hormona luteinizante (LH) inicia múltiples procesos dentro del folículo ovárico, incluida la remodelación tisular, la expansión del complejo ovocito – *cumulus*, la inflamación y la contracción muscular. También se indican las diversas capas y tipos de células dentro del folículo ovárico. **B.** Fotografía que muestra una vista del ovario humano, se observa el área del folículo que sobresale, en la cual su estigma folicular es claramente visible (Ross & Pawlina, 2015; Russell & Robker, 2019).

Cuerpo lúteo

Durante la ovulación, la pared folicular compuesta por las células de la granulosa y de la teca remanentes adquiere pliegues conforme el folículo colapsa y se convierte en el *cuerpo o glándula lútea* (**Figura 20**). En principio, la hemorragia de los capilares en la teca interna hacia la luz folicular lleva a la formación del cuerpo hemorrágico; un coágulo central. El tejido conjuntivo desde el estroma invade la antigua cavidad folicular y las células de la granulosa y de la teca interna se diferencian en células luteínicas de la granulosa y células luteínicas de la teca en un proceso denominado *luteinización* (**Figura 20**) (Ross & Pawlina, 2015).

La LH es el regulador central de dicho proceso, en respuesta al pico preovulatorio de la LH, las células de la granulosa presentan una serie coordinada de respuestas que incluyen la remodelación intracelular y la expresión génica. Aunque se desconocen los mecanismos celulares precisos por los cuales la LH inicia los procesos de luteinización, es probable que el aumento de AMPc u otras moléculas de señalización intracelular activen o repriman las vías de señalización que controlan la diferenciación y la proliferación celular. En cuanto a la expresión génica, los genes que codifican a la proteína reguladora aguda de esteroides, la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol P450 y la enzima 3 β – hidroxisteroide deshidrogenasa, se expresan de manera elevada en las células luteínicas de la granulosa (Conti & Chang, 2016; Zeleznik & Plant, 2015).

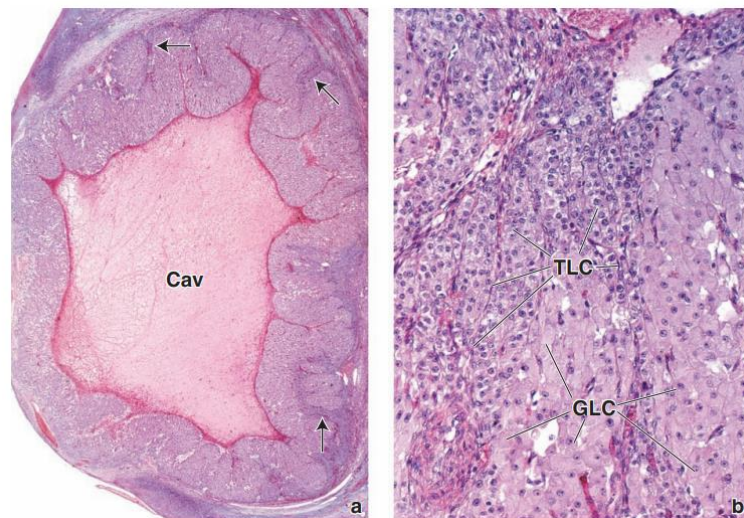


Figura 20. Micrografía del cuerpo lúteo humano. **a.** Las células luteínicas de la granulosa forman una capa plegada gruesa alrededor de la antigua cavidad folicular (**Cav**). Dentro de los pliegues se localizan las células de la teca interna (**flechas**). 12X. **b.** Pared folicular del cuerpo lúteo. **GLC:** Células de la granulosa luteínicas. **TLC:** Células de la teca luteínicas. 240X. (Ross & Pawlina, 2015).

Atresia folicular

La mayoría de los folículos ováricos entran al proceso degenerativo denominado atresia folicular ovárica, en el cual las células foliculares y los ovocitos sufren apoptosis y posteriormente son fagocitados. La atresia afecta a los folículos en cualquier etapa del desarrollo, sucede espontáneamente o en respuesta a factores ambientales o fármacos, sin embargo, el proceso se torna más complejo a medida que el folículo madura (Mescher, 2018; Ross & Pawlina, 2015; Strauss & Williams, 2019).

En la atresia de los folículos primordiales y de los folículos en crecimiento pequeños, el ovocito inmaduro y las células de la granulosa reducen su tamaño y degeneran. Los folículos atrésicos se retraen y por último son degradados en el estroma ovárico como resultado de la apoptosis y fagocitosis de las células de la granulosa. A medida que las células se reabsorben, las células circundantes del estroma migran al espacio antes ocupado por el folículo, de esta manera, se elimina todo rastro de su existencia (Ross & Pawlina, 2015).

En la atresia de los folículos antrales en crecimiento (**Figura 21**), la degeneración del ovocito inmaduro se retrasa y ocurre en forma secundaria a las alteraciones degenerativas de las células de la granulosa en la pared folicular. Este retraso indica que una vez que el ovocito ha logrado su madurez ya no es sensible a los mismos estímulos que inician la atresia en las células de la granulosa. Los cambios foliculares comprenden: 1) iniciación de la apoptosis en las células de la granulosa; la cual comienza por el cese de la mitosis, la activación de las caspasas y las endonucleasas dentro de estas células, 2) invasión de la capa granulosa por neutrófilos y macrófagos, 3) invasión de la capa granulosa por tejido conjuntivo vascularizado, 4) exfoliación de las células de la granulosa dentro del antro folicular, 5) hipertrofia de las células de la teca interna, 6) colapso del folículo conforme la degeneración continua, e 7) invasión de la cavidad del folículo por tejido conjuntivo (Ross & Pawlina, 2015).

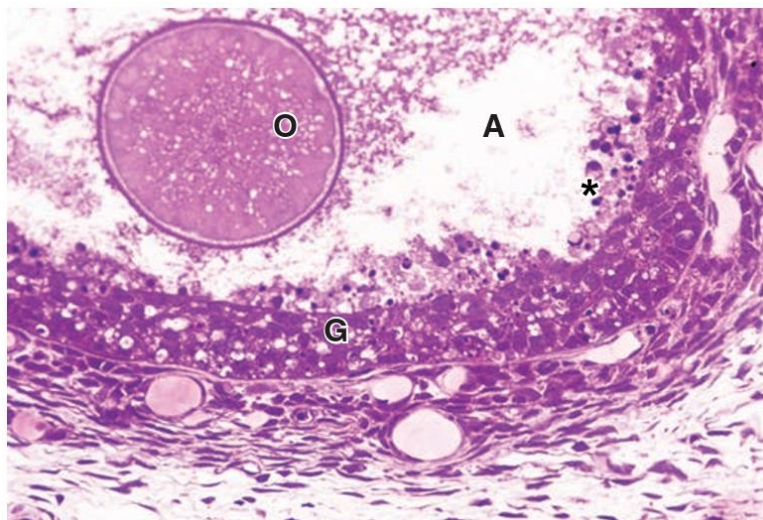


Figura 21. *Atresia folicular ovárica.* Se muestra un folículo antral atrésico. Se caracteriza por la apoptosis de las células de la granulosa (**G**) y la autólisis del ovocito (**O**), con macrófagos que ingresan a la estructura en degeneración para fagocitar los desechos. Se observan cuerpos apoptóticos (*) en el antro (**A**) y las células de la *corona radiata* han sido reabsorbidas, dejando libre al ovocito degenerativo dentro del antro (x200) (Mescher, 2018).

Esteroidogénesis

La síntesis de hormonas esteroides o *esteroidogénesis* requiere de dos tipos de células somáticas foliculares y de las dos gonadotropinas, por tanto, este proceso se denomina *teoría de dos células, dos gonadotropinas* (Figura 22). Las células esteroidogénicas presentan características ultraestructurales, como son un retículo endoplasmático liso abundante y mitocondrias con crestas tubulares, lo que facilita: 1) la captación del colesterol de las lipoproteínas sanguíneas, 2) la síntesis *de novo* del colesterol o, 3) el almacenamiento en vesículas lipídicas citoplasmáticas para su futuro uso en la esteroidogénesis (Hannon & Curry, 2018; Ross & Pawlina, 2015; Strauss & Williams, 2019).

El paso limitante en la velocidad de la estroidogénesis es la traslocación del colesterol, la molécula precursora, hacia las mitocondrias, un proceso mediado por la proteína reguladora aguda de esteroides. Posteriormente, en las membranas mitocondriales internas se da el primer paso enzimático catalizado por la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol P450; que convierte el colesterol en pregnenolona. El metabolismo de la pregnenolona en el ovario puede ocurrir en dos vías diferentes: 1) la vía $\Delta 4$; en la que la pregnenolona se convierte en progesterona por acción de la enzima 3β – hidroxisteroide deshidrogenasa, o 2) la vía $\Delta 5$. La importancia de estas dos vías es que la pregnenolona es el sustrato para la enzima citocromo P450 17α – hidroxilasa, que convierte los progestágenos en andrógenos. Dichos andrógenos secretados en respuesta a la LH por las células de la teca interna se difunden con el fin de llegar a las células

de la granulosa para su posterior conversión en estrógenos, principalmente estrona y estradiol, por acción de la aromatasa del citocromo P450, en respuesta a la FSH (**Figura 22**) (Strauss & Williams, 2019).

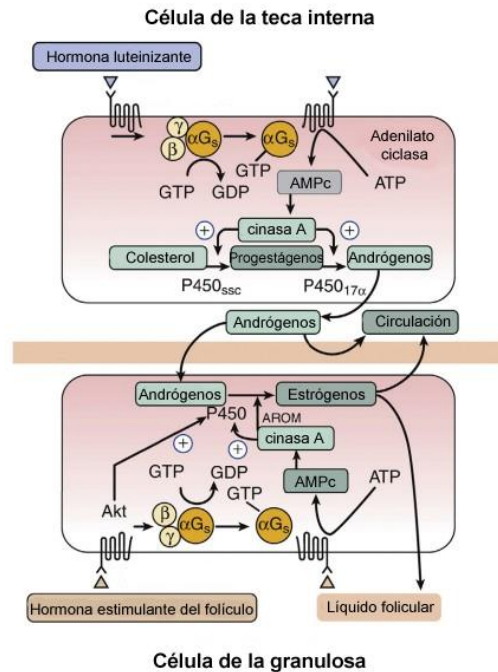


Figura 22. Hipótesis de las dos células, dos gonadotropinas. La hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de los folículos (FSH) estimulan el adenilato ciclasa a través de los receptores acoplados a proteínas G. El adenosín monofosfato cíclico (AMPc) generado a partir del adenosín trifosfato (ATP) activa a la proteína cinasa A con el objetivo de estimular la expresión de las respectivas enzimas esteroidogénicas en las células de la teca interna y de la granulosa. Además, en las células de la granulosa, la unión de FSH al receptor a FSH conduce a la activación de la proteína cinasa B (Akt) que aumenta la expresión de la aromatasa. **GDP:** guanosín difosfato. **GTP:** guanosín trifosfato (Strauss & Williams, 2019).

El folículo preovulatorio sintetiza altas concentraciones de estradiol, mientras que en el cuerpo lúteo progesterona. Ambos esteroides ováricos en el hipotálamo estimulan o disminuyen la secreción de la GnRH y en la hipófisis incrementan la sensibilidad a la GnRH en los gonadotropos; estos efectos dependen de la etapa del ciclo estral en la que se encuentre el organismo (Bernard & Brûlé, 2020; Bliss *et al.*, 2010; Strauss & Williams, 2019).

Las funciones ováricas son reguladas por el hipotálamo, la hipófisis, por eventos ováricos autocrinos / paracrinos y, además, por sistemas de neurotransmisión (Mayerhofer *et al.*, 2003; Vantman & Vega, 2010). Uno de los sistemas de neurotransmisión involucrado en la regulación de la ovulación es el sistema colinérgico (Cruz *et al.*, 2015; Domínguez *et al.*, 1982; Everett *et al.*, 1949).

El sistema colinérgico está constituido por la ACh, sus receptores y el complejo enzimático responsable de su síntesis y degradación (Ventura *et al.*, 2010).

Acetilcolina

Es un éster compuesto de ácido acético y colina (Figura 23), y es el principal neurotransmisor en todas las terminales nerviosas autónomas parasimpáticas preganglionares, en todas las uniones neuroefectoras parasimpáticas posganglionares, en la unión neuromuscular del nervio motor somático y en las sinapsis colinérgicas en el sistema nervioso central (SNC). La síntesis, almacenamiento, liberación y degradación de la ACh son similares en todas las estructuras mencionadas y probablemente también lo sean en los sistemas colinérgicos no neurales en diversas partes del cuerpo (Westfall, 2009; Whitehouse, 2014).

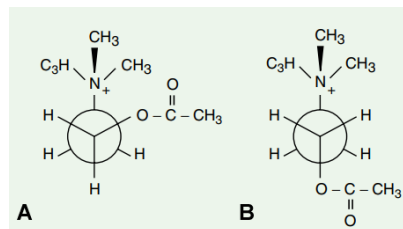


Figura 23. Estructura de la acetilcolina. **A.** Proyección de Newman en la conformación *gauche*. **B.** Proyección de Newman en la conformación *trans* (Taylor & Brown, 2006).

Metabolismo de la acetilcolina

Se sintetiza a partir de la colina y del acetil coenzima A en una reacción de un solo paso que es catalizada por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) (Figura 24) (Merino, 2019).

La disponibilidad de colina es un punto crítico en la biosíntesis de la ACh y debido a la escasa síntesis *de novo* de colina, ésta se obtiene principalmente de la dieta. La colina está presente tanto en su forma hidrosoluble (colina libre, fosfocolina y glicerofosfocolina), como en su forma liposoluble (fosfatidilcolina y esfingomielina) en alimentos de origen animal (hígado de res, huevos y salmón) y vegetal (brócoli, frijoles y semillas). De esta manera, la glicerofosfocolina, la fosfocolina y la fosfatidilcolina generan la colina que es utilizada como sustrato y se transporta a través de la circulación sanguínea; la concentración de colina en la circulación es de 10 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (Ventura *et al.*, 2010; Westfall, 2009; Wiedeman *et al.*, 2018).

La síntesis comienza con una transferencia dependiente de Ca^{2+} de acetil coenzima A mitocondrial, formada a partir de la D-glucosa a través del piruvato, al citoplasma de la neurona colinérgica; mientras que la colina es captada del espacio extracelular por dos sistemas de transporte: el sistema de transporte de baja

afinidad independiente de Na^+ y el sistema de transporte de colina de alta afinidad dependiente de Na^+ y Cl^- (**Figura 24**) (Merino, 2019; Westfall, 2009).

La ACh se absorbe en vesículas sinápticas mediante una bomba dependiente de ATP que acidifica dicha vesícula. La vesícula acidificada utiliza el transportador de acetilcolina vesicular (VACHT) para intercambiar dos protones por una molécula de ACh (**Figura 24**). Cada paquete vesicular o *quantum* alcanza hasta 50 000 moléculas de ACh. El contratransporte acoplado de iones H^+ y ACh permite que la vesícula permanezca isoosmótica y electroneutral (Merino, 2019; Prado *et al.*, 2002; Taylor & Brown, 2006; Zaagsma & Meurs, 2006).

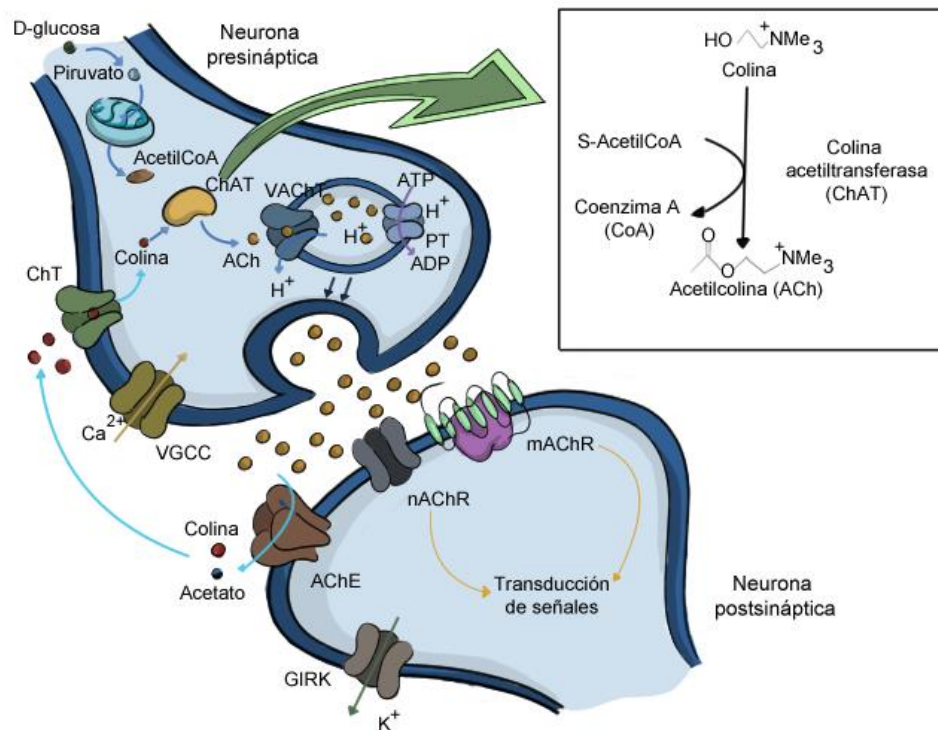


Figura 24. Síntesis, almacenamiento, liberación, hidrólisis y recaptación de acetilcolina. **AChE:** acetilcolinesterasa. **ChAT:** colina acetiltransferasa. **ChT:** transportador de colina. **GIRK:** canal de potasio rectificador interno acoplado a proteínas G. **PT:** transportador de protones. **VACHT:** transportador vesicular de acetilcolina. **VGCC:** canal de calcio dependiente de voltaje (modificada de Merino, 2019).

La liberación de ACh se inicia por la entrada de Ca^{2+} en los canales de calcio operados por voltaje. Este incremento intracelular favorece la unión de los iones Ca^{2+} con la proteína asociada a vesículas (sinaptotagmina) que, a su vez, favorece la asociación de una segunda proteína de vesículas (sinaptobrevina) con una o más proteínas en la membrana plasmática de la terminal nerviosa. Después del acoplamiento de las vesículas, se produce la fusión entre la membrana de la vesícula y la membrana plasmática seguida de

exocitosis (**Figura 24 y 25**). Posterior a la liberación, la vesícula vacía se recupera por endocitosis y se reutiliza (**Zaagsma & Meurs, 2006**).

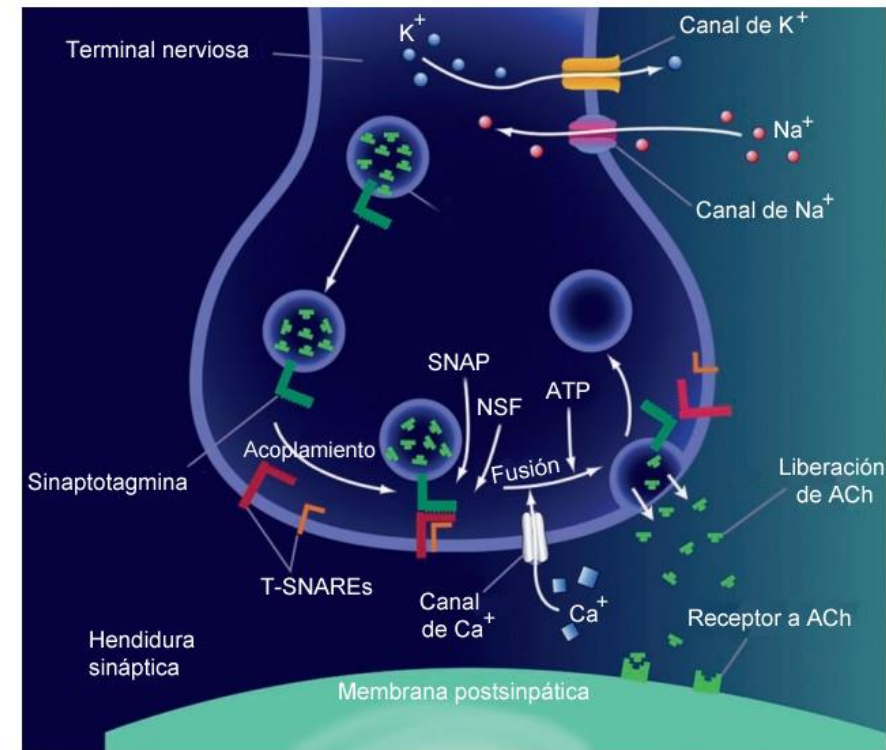


Figura 25. Mecanismo de liberación de la acetilcolina. Los neurotransmisores se liberan de la terminal nerviosa después de la fusión de la membrana de la vesícula sináptica con la membrana plasmática. Esta fusión se logra a través de proteínas específicas, que incluyen sinaptotagmina, NSF, SNAP y SNARE que permiten que se produzca la fusión. NSF es una proteína de fusión, mientras que SNAP es una proteína de unión a NSF; T-SNARE es un receptor de SNAP y la sinaptotagmina es una proteína de unión a vesículas para SNAP. **ATP:** adenosín trifosfato. **NSF:** factor sensible a N-etilmaleimida. **SNAP:** proteínas solubles de unión a SNF **SNARE:** proteína receptora a SNAP (**Wilkinson & Brown, 2015**).

Una vez liberada en la hendidura sináptica, la ACh interactúa con los receptores nicotínicos (nAChR) o muscarínicos (mAChR). A continuación, la ACh se disocia de su receptor y se inactiva por acción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), que la hidroliza en acetato y colina. La colina es movilizada por el transportador de colina de alta afinidad de regreso a la terminal presináptica, donde es utilizada para sintetizar nueva ACh (**Figura 24**) (**English & Jones, 2012; Merino, 2019**).

Receptores colinérgicos

El término colinérgico se refiere a aquellos receptores que responden al transmisor ACh. La clasificación de los diferentes subtipos de receptores colinérgicos se establece principalmente con base en: 1) la unión de ligandos específicos, 2) sus respectivos sistemas de acoplamiento efector, y 3) su homología en la secuencia de aminoácidos primaria (English & Jones, 2012; Tiwari *et al.*, 2013).

Con base en lo anterior, se han identificado dos subtipos de receptores colinérgicos, los nAChR y mAChR. Los primeros pertenecen a la familia de canales iónicos operados por ligando, son estimulados por la nicotina; son excitadores y muestran una respuesta rápida a la estimulación, en cambio, los segundos son estimulados por la muscarina y tienen efectos excitadores o inhibitorios dependiendo del tipo de proteína G a la que estén acoplados; además, muestran una respuesta más lenta a la estimulación. Existen diferentes subtipos dentro de las clases nicotínica y muscarínica (**Diagrama 1**) (Flores & Segura, 2005; Merino, 2019).

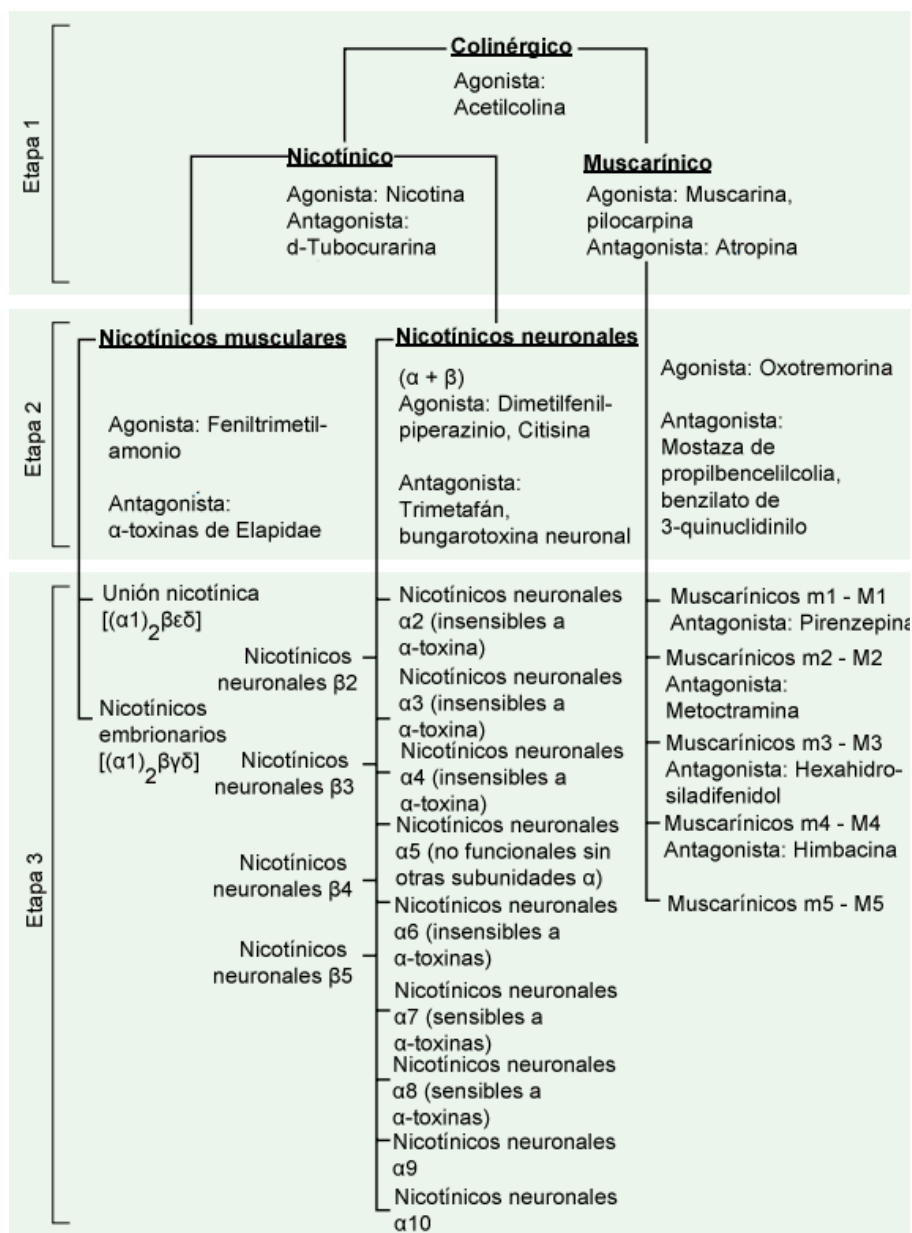


Diagrama 1. Clasificación de los receptores colinérgicos. El diagrama muestra una clasificación histórica de los receptores colinérgicos con base en las distintas respuestas a alcaloides (etapa 1), la resolución parcial de los subtipos de receptores con agonistas y antagonistas sintetizados químicamente (etapa 2) y la distinción de las estructuras primarias de los receptores a través de clonación mediante técnicas de ADN recombinante (etapa 3) (Taylor & Brown, 2006).

Los nAChR y mAChR están relacionados con otros receptores en sus respectivas familias que, entre sí, tanto estructural como funcionalmente, aun así, ambos median las diversas acciones de la ACh en el SNC y en los tejidos no nerviosos inervados por el sistema nervioso parasimpático (Fritz *et al.*, 2001b; Taylor & Brown, 2006).

Receptores muscarínicos

Todos los subtipos de mAChR son proteínas monoméricas de siete dominios transmembranales que interactúan con miembros del grupo de proteínas reguladoras de unión a nucleótidos de guanina heterotriméricas o también llamadas *proteínas G*, que a su vez están vinculadas a diversos efectores celulares. Dentro de la familia de mAChR se han identificado cinco subtipos de receptores, denominados M1, M2, M3, M4 y M5. Se han clonado y secuenciado al menos cinco genes distintos de mAChR; los genes se denominan *m1* a *m5* y se correlacionan respectivamente con los mAChR identificados (English & Jones, 2012; Taylor & Brown, 2006; Tiwari *et al.*, 2013).

Los ligandos muscarínicos se unen a un sitio muy conservado en las profundidades de las regiones transmembrana TM3, TM5, TM6 y TM7 (Figura 26). La ACh se une a las regiones externas en el sitio de unión donde Asp105 estabiliza al nitrógeno cargado positivamente. Además de este sitio ortostérico, los mAChR presentan varios sitios alostéricos donde los ligandos pueden modular la función agonista (Merino, 2019).

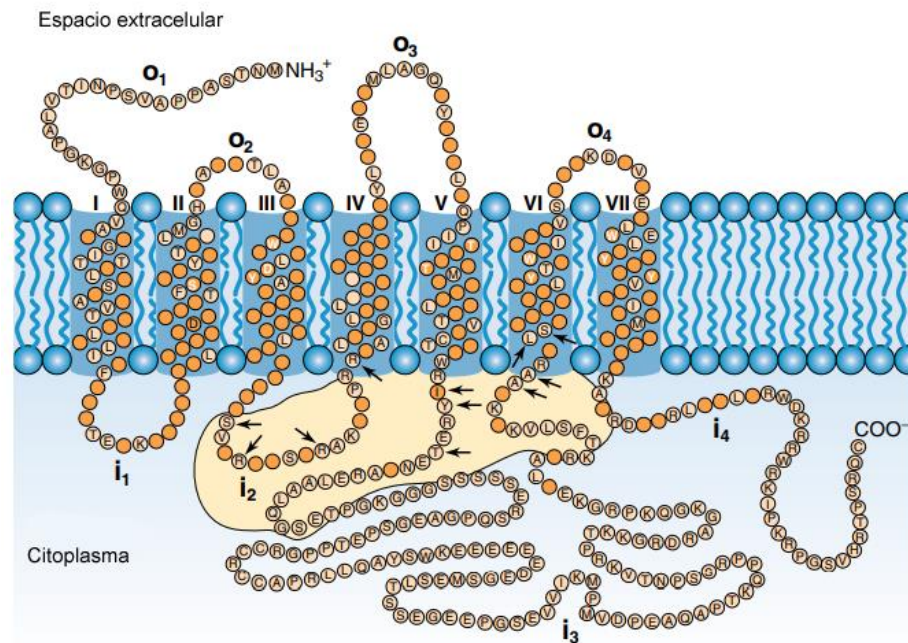


Figura 26. Secuencia de aminoácidos y estructura del dominio transmembrana del receptor muscarínico M1 de humano. Los aminoácidos que son idénticos entre los receptores M1, M2, M3 y M4 se representan de color naranja oscuro. La nube sombreada representa la región aproximada que determina el acoplamiento receptor-proteína G. Las flechas indican aminoácidos importantes para el acoplamiento de la proteína G. Los aminoácidos que están implicados en la unión de agonistas o antagonistas se indican con letras blancas (Taylor & Brown, 2006).

La unión de ACh a un mAChR provoca un cambio conformacional responsable de la activación de proteínas G acopladas. Los receptores M1, M3 y M5 se acoplan a la subunidad alfa de la proteína G_q ($G_{q/11}$), aumentan la actividad de la fosfolipasa C y posteriormente las concentraciones citosólicas de inositol trifosfato (IP_3) y de diacilglicerol (DAG). El incremento de IP_3 y DAG da como resultado una mayor liberación de Ca^{2+} intracelular de las reservas del retículo endoplasmático y la subsecuente activación de la proteína cinasa C (**Figura 27**). La liberación de Ca^{2+} intracelular resulta en la contracción del músculo liso y la secreción de la célula apropiada, mientras que la activación de la proteína cinasa C da como resultado la fosforilación de numerosas proteínas y diversas respuestas fisiológicas (English & Jones, 2012; Merino, 2019; Westfall, 2009).

Por el contrario, los receptores M2 y M4 están acoplados a la subunidad alfa de la proteína G_i ($G_{i/o}$), lo que da como resultado la inhibición de adenilato ciclasa, la activación de los canales internos de K^+ rectificadores acoplados a proteínas G (GIRK) y la supresión de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, a la vez que activan proteínas cinasas activadas por mitógenos (**Figura 27**). En general, GIRK se activa directamente al unirse subunidades $\beta\gamma$ liberadas de $G_{i/o}$. Es un mecanismo principal por el cual los agonistas muscarínicos causan hiperpolarización en células auriculares cardíacas y neuronas (English & Jones, 2012; Merino, 2019; Taylor & Brown, 2006).

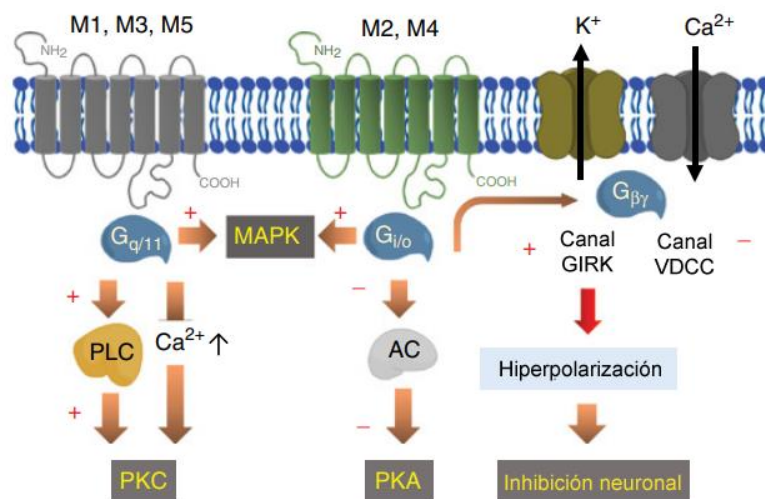


Figura 27. Transducción de señales de los diferentes subtipos de receptores muscarínicos. **AC:** adenilato ciclasa. **MAPK:** proteínas cinasas activadas por mitógenos. **GIRK:** canal de potasio rectificador interno acoplados a proteínas G. **PLC:** fosfolipasa C. **PKA:** proteínas cinasa A. **PKC:** proteínas cinasa C (modificada de Merino, 2019).

Los mAChR se localizan en el cuerpo según el subtipo (**Cuadro 4**). Los receptores M1 y M4 se encuentran en el cuerpo estriado, la corteza y el hipocampo; los receptores M2 en el prosencéfalo, el tálamo y predominantemente en el corazón de los mamíferos; los receptores M3 en el hipotálamo, en el músculo liso y las glándulas exocrinas; mientras que los receptores M5 en los ganglios basales, la vasculatura cerebral y las neuronas dopaminérgicas (Merino, 2019; Taylor & Brown, 2006).

Cuadro 4. Características de los subtipos de mAChR (Westfall, 2009).

Receptor	Tamaño y ubicación cromosómica	Ubicación celular y tisular ^a	Respuesta celular
M1	460 aa 11q 12-13	SNC; más abundante en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. Ganglios autónomos. Glándulas (gástricas y salivales). Nervios entéricos.	Activación de la PLC; \uparrow IP ₃ y DAG \rightarrow \uparrow Ca ²⁺ y PKC. Despolarización y excitación (\uparrow sEPSP). Activación de PLD ₂ \uparrow AA Acoplado a G _{q/11} . Inhibición de adenilato ciclasa \downarrow AMPc. Activación de canales de K ⁺ rectificadores internos.
M2	466 aa 7q 35-36	Ampliamente expresado en SNC, corazón, músculo liso, terminales nerviosas autónomas.	Inhibición de los canales de Ca ²⁺ activados por voltaje. Hiperpolarización e inhibición. Acoplado de G _{i/o} . Activación de la PLC; \uparrow IP ₃ y DAG \rightarrow \uparrow Ca ²⁺ y PKC.
M3	590 aa 1q 43-44	Ampliamente expresado en SNC (< que otros mAChR). Abundante en músculo liso y glándulas. Corazón	Despolarización y excitación (\uparrow sEPSP). Activación de PLD ₂ , PLA ₂ ; \uparrow AA. Acoplado a G _{q/11} . Inhibición de adenilato ciclasa \downarrow AMPc. Activación de canales de K ⁺ rectificadores internos.
M4	479 aa 11p 12-11.2	Expresado preferentemente en el SNC, particularmente en el prosencéfalo.	Inhibición de los canales de Ca ²⁺ activados por voltaje. Hiperpolarización e inhibición. Acoplado a de G _{i/o} . Activación de la PLC; \uparrow IP ₃ y DAG \rightarrow \uparrow Ca ²⁺ y PKC.
M5	532 aa 15q 26	Expresado en niveles bajos en SNC y periferia. mAChR predominantes en neuronas dopaminérgicas en VTA y sustancia negra.	Despolarización y excitación (\uparrow sEPSP). Activación de PLD ₂ , PLA ₂ ; \uparrow AA. Acoplado a G _{q/11} .

^aLa mayoría de los órganos, tejidos y células expresan múltiples mAChR. **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico. **DAG:** Diacilglicerol. **IP₃:** Inositol-1,4,5-trifosfato. **PLA:** Fosfolipasa A. **PLC:** Fosfolipasa C. **PLD₂:** Fosfolipasa D. **PKC:** Proteína quinasa C. **sEPSP:** Potencial postsináptico excitador. **SNC:** Sistema nervioso central. **VTA:** Área tegmental ventral.

Funciones de la acetilcolina

La ACh regula diversas funciones fisiológicas dentro del SNC (**Cuadro 5**) y el sistema nervioso autónomo (**Cuadro 6**). Es un neurotransmisor de acción rápida en la unión neuromuscular y en los ganglios autónomos, mientras que en el SNC cambia predominantemente la excitabilidad neural, altera la liberación presináptica de neurotransmisores y coordina la activación de grupos de neuronas; como resultado, la ACh actúa como un *neuromodulador* en el cerebro, a pesar de su rol como neurotransmisor excitador primario en la periferia (English & Jones, 2012; Picciotto *et al.*, 2012).

Cuadro 5. Localización y efectos de los receptores muscarínicos en el sistema nervioso central (Westfall, 2009).

Receptor	Ubicación celular y tisular	Respuesta funcional
M1	SNC; más abundante en la corteza cerebral, el hipocampo y el cuerpo estriado. Ganglios autónomos. Nervios entéricos.	Aumento de la función cognitiva (aprendizaje y memoria). Disminución de la liberación de dopamina y la locomoción. Aumento de la despolarización de los ganglios autónomos.
M2	Ampliamente expresado en SNC y terminales nerviosas autónomas.	Inhibición neural. ↑ Temblores, hipotermia; analgesia. Inhibición neural a través de autorreceptores y heterorreceptores). ↓ Transmisión ganglionar.
M3	Ampliamente expresado en SNC (< que otros mAChR).	Inhibe la liberación de dopamina. Síntesis de NO.
M4	Expresado preferentemente en el SNC, particularmente en el prosencéfalo.	Inhibición mediada por autorreceptores y heterorreceptores de la liberación del transmisor en el SNC y la periferia. Analgesia; actividad cataléptica. Facilitación de la liberación de dopamina.
M5	Expresado en concentraciones bajas en SNC y periferia. mAChR predominantes en neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral y sustancia negra.	Mediador de la dilatación en arterias y arteriolas cerebrales (?). Facilita la liberación de dopamina. Aumento del comportamiento de búsqueda de drogas y recompensa (Opiáceos, cocaína).

Cuadro 6. Resumen de las respuestas y receptores colinérgicos periféricos (English & Jones, 2012; Westfall, 2009).

Órgano	Respuesta	Receptor
<i>Ojo</i>		
Músculo esfínter (circular) del iris	Contracción (miosis)	M3, M2
Iris	Contracción (acomodación)	M3, M2
<i>Vasos sanguíneos</i>		
Arterias	Dilatación (vía óxido nítrico de las células endoteliales)	M3
Venas	Dilatación (vía óxido nítrico de las células endoteliales)	M3
<i>Pulmón</i>		
Músculo bronquial	Contracción (broncoconstricción)	M2 = M3
Glándula bronquial	Estimulación	M3, M2
<i>Tracto gastrointestinal</i>		
Motilidad	Incremento	M3 (M2)
Esfínter	Relajación	M, M2
Secreción	Estimulación	M3, M2
Vesícula biliar	Contracción	M2
<i>Vejiga urinaria</i>		
Músculo detrusor	Contracción	M3 > M2
Esfínter urinario	Relajación	M2
<i>Pene</i>		
	Erección	M
<i>Trígono y esfínter</i>		
	Relajación	M3 > M2
<i>Glándulas</i>		
Sudorípara	Diaforesis	M3
Salival, lagrimal, bronquial, etc.	Secreción	M3
<i>Nervios</i>		
Terminal parasimpática	Disminución de la liberación de acetilcolina	M2, M4
Terminal simpática	Disminución de la liberación de noradrenalina	M2, M4
Ganglios autónomos	Estimulación	N _N o N ₁
<i>Músculo esquelético</i>		
(Unión neuromuscular)	Contracción	N _M O N ₂

La ACh se produce y ejerce acciones en tejidos periféricos que no están inervados por fibras colinérgicas. Algunas células eucariotas, como las epiteliales o inmunitarias, expresan todos los componentes del sistema colinérgico independientemente de la inervación neural. Aunado a esto, se ha demostrado que la ACh está involucrada en la regulación de funciones celulares básicas e independientes del sistema nervioso, tales como la proliferación, diferenciación, contacto célula – célula, organización del citoesqueleto, liberación local de mediadores (por ejemplo, óxido nítrico y citocinas proinflamatorias), locomoción, secreción, absorción y actividad ciliar. Estos datos en conjunto han llevado a la introducción del término *citotransmisor universal*, es decir, una molécula de señalización celular local para indicar las funciones celulares basales de la ACh (Fritz *et al.*, 2001b; Grando *et al.*, 2003; Wessler *et al.*, 2003).

Acetilcolina en el ovario

Acetilcolina neural

El funcionamiento del ovario depende de acciones concertadas de diferentes clases de moléculas de señalización como son hormonas, factores producidos localmente y moléculas de señalización neural, así como la integración de éstas con sus células diana. Se ha demostrado que las moléculas de señalización neural modulan la acción de las gonadotropinas en los ovarios, incluida la esteroidogénesis, el inicio del crecimiento folicular y la regulación de la expresión génica (Mayerhofer & Kunz, 2005).

El ovario recibe principalmente fibras nerviosas simpáticas y sensoriales junto con un pequeño componente parasimpático, las cuales ingresan a través del plexo perivascular hiliar. La inervación simpática del ovario es representada por fibras nerviosas que contienen catecolaminas, mientras que la sensorial es proporcionada por el neuropéptido Y, la sustancia P, el péptido intestinal vasoactivo y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina. Estos nervios extrínsecos llegan al ovario a través de dos vías: 1) el nervio del plexo ovárico (NPO); que viaja a lo largo de la arteria ovárica, y 2) el nervio ovárico superior (NOS); que está asociado al ligamento suspensorio del ovario (**Figura 28**). La mayoría de las fibras nerviosas derivadas del NPO son perivasculares, en tanto que las derivadas del NOS inervan a vasos sanguíneos y al tejido intersticial (Dissen *et al.*, 2004; Lawrence & Burden, 1980; Strauss & Williams, 2019).

La inervación parasimpática es proporcionada por neuronas colinérgicas posganglionares que llegan al ovario vía eferentes vagales (**Figura 28**) y / o fibras del plexo hipogástrico que contribuyen al NPO. Tales fibras contienen ACh, somatostatina, sustancia P, gastrina, neuropéptido Y, péptido intestinal vasoactivo y el gen relacionado con la calcitonina (Cruz *et al.*, 2015; Dissen *et al.*, 2004).

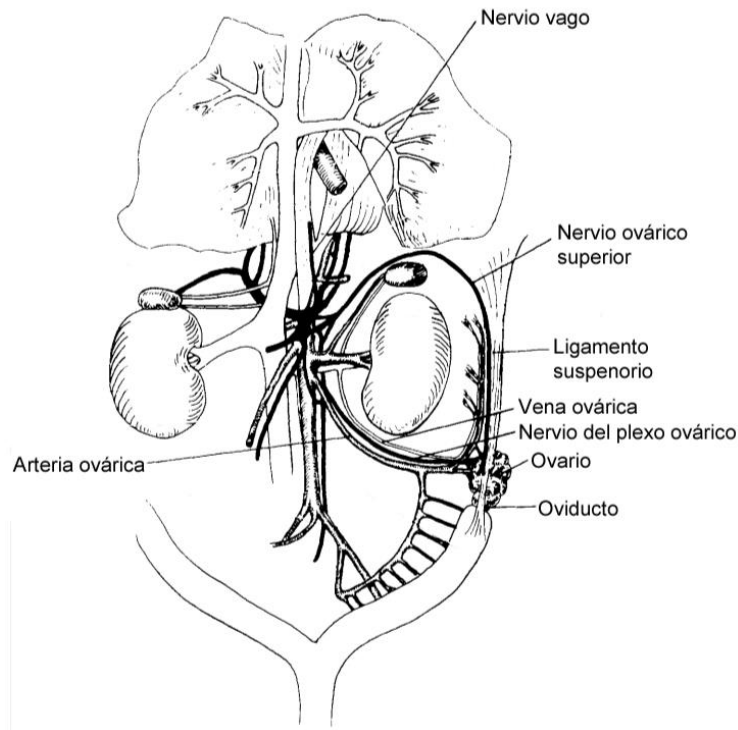


Figura 28. *Inervación autónoma del ovario* (modificado de Lawrence & Burden, 1980).

Acetilcolina no neural

Adicionalmente, el ovario es capaz de sintetizar su propia ACh y ejercer acciones locales específicas. Las células ováricas, en particular las células de la granulosa de folículos antrales y preovulatorios, así como las células de la granulosa luteinizadas expresan la enzima ChAT y sintetizan ACh bajo el control de la FSH. Además, dichas células expresan el VACHT, m_1 AChR, así como la enzima hidrolítica AChE; en otras palabras, las células de la granulosa presentan todos los componentes del sistema colinérgico (Fritz *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 2001b; Mayerhofer *et al.*, 2006).

La ACh no neural, vía su unión a los mAChR en las células de la granulosa incrementa el Ca^{2+} intracelular lo que conlleva a la activación de sus canales, afecta el potencial de membrana, estimula la síntesis de proteínas involucradas en la esteroidogénesis e interrumpe la comunicación gap; además, está implicada en el crecimiento folicular, puesto que estimula la proliferación celular e induce la expresión de factores de transcripción relacionados con la diferenciación celular inducida por la LH (Figura 29) (Fritz *et al.*, 2001a; Fritz *et al.*, 2002; Mayerhofer & Kunz, 2005; Urra *et al.*, 2016).

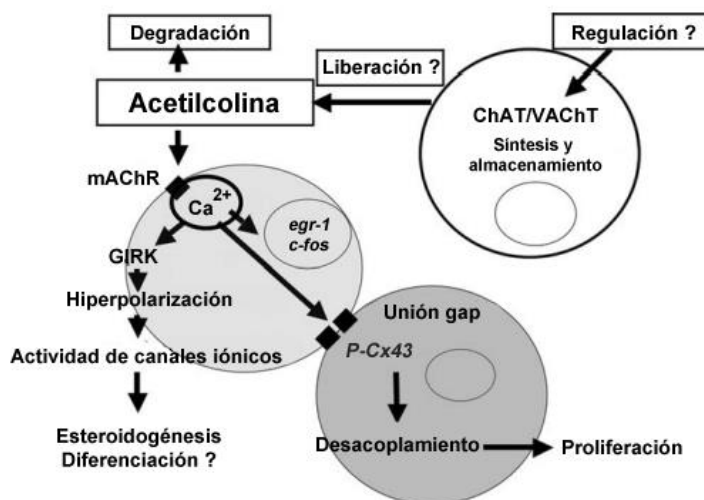


Figura 29. Cadenas de acción propuestas para la acetilcolina intraovárica en células de la granulosa. **ChAT:** colina acetiltransferasa. **egr – 1:** proteína de respuesta de crecimiento temprano 1. **GIRK:** canal de potasio rectificador interno acoplado a proteínas G. **mAChR:** receptor muscarínico. **p – Cx43:** fosforilación de la proteína conexina 43. **VAcHT:** transportador vesicular de acetilcolina (Mayerhofer & Kunz, 2005).

Pirenzepina

La pirenzepina, o en su nombre clínico el dicloruro de pirenzepina, es una amina terciaria (Figura 30A) y antagonista selectivo de los m_1 AChR; todos los antagonistas muscarínicos compiten con la ACh por unirse a su receptor (Figura 30B). Es un polvo cristalino de color blanco a amarillo pálido, soluble en agua, fotosensible, con un pH de 7.4 y un peso molecular de 424.32 g / mol (Jewell, 2007; Stringer, 2011).

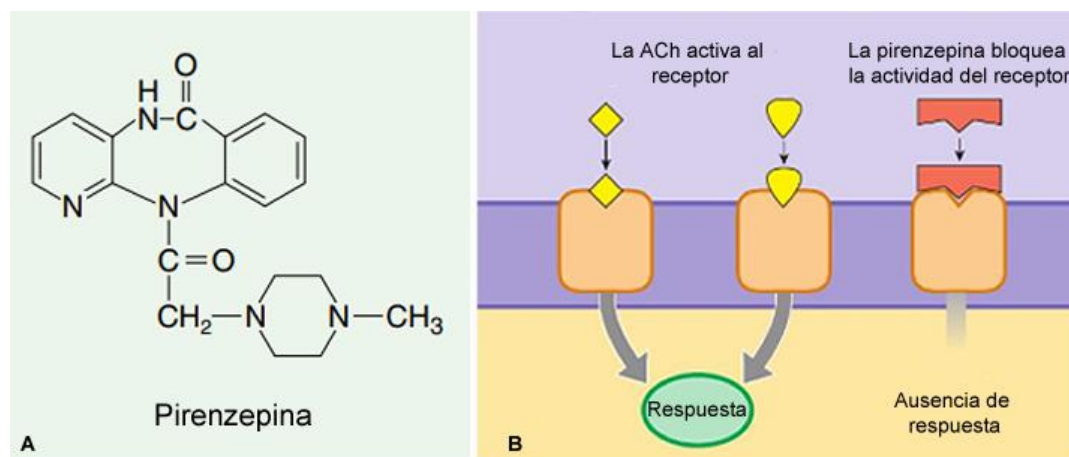


Figura 30. A. Dihidrocloruro de pirenzepina (Taylor & Brown, 2006). B. Mecanismo de acción de la pirenzepina (modificada de Silverthorn, 2019).

PARTICIPACIÓN DE LA ACETILCOLINA EN LA REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN

Everett *et al.* (1949, 1953) mostraron que, en ratas hembra adultas cíclicas, la inyección subcutánea de 700 mg / kg m. c. de sulfato de atropina; un antagonista muscarínico, en la etapa de proestro entre las 14:00 y las 16:00 h bloqueaba al sistema colinérgico y la ovulación. Esta es la primera evidencia de que el sistema colinérgico participa de manera estimulante en la regulación de la ovulación.

Respecto a lo anterior, Domínguez *et al.* (1982), inyectaron en ratas hembra adultas cíclicas, vía subcutánea, sulfato de atropina a las 09:00, 13:00, 17:00 o 21:00 h en las etapas de estro, diestro 1 y diestro 2. Sus resultados mostraron el bloqueo parcial de la ovulación cuando la inyección se realizó en los diferentes horarios en las 3 etapas de ciclo estral; sin embargo, al aplicarla a las 13:00 h en la etapa de diestro 1, resultó en el bloqueo total de la ovulación (**Figura 31**). Por lo anterior, los autores sugieren que el patrón diario de la actividad neural responsable de la liberación de las gonadotropinas a lo largo del ciclo estral varía en función de la hora y de la etapa, además, que está bajo control colinérgico.

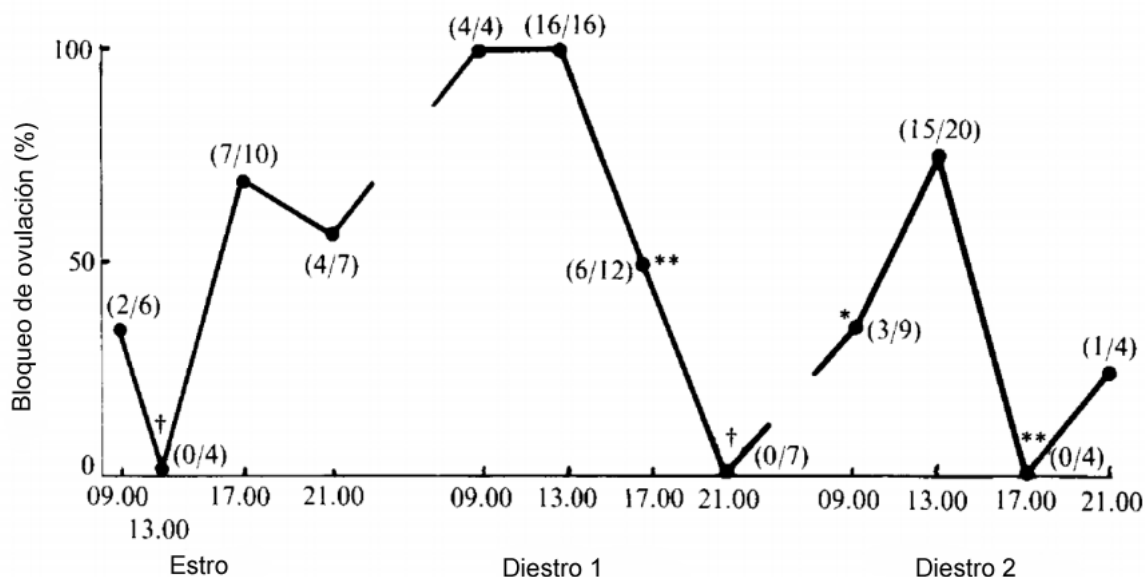


Figura 31. Porcentaje de bloqueo de la ovulación en ratas cíclicas tratadas con 100 mg de sulfato de atropina por kilogramo de masa corporal en diferentes horarios en las etapas de estro, diestro 1 y diestro 2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ en comparación con ratas tratadas a las 13:00 h en el mismo día (prueba de chi-cuadrada), $t p < 0.05$ en comparación con ratas tratadas a las 17:00 h en el mismo día (prueba de probabilidad exacta de Fisher) (Domínguez *et al.*, 1982).

También, se ha sugerido la existencia de una lateralización hipotalámica en los mecanismos colinérgicos que regulan la función ovárica, la cual depende del día del ciclo estral, ya que el implante unilateral de cristales de atropina [$\approx 25 \pm 3 \mu\text{g}$] en el área preóptica hipotalámica anterior (POA – AHA) izquierda o derecha a las 13:00 h en diestro 1 bloqueó la ovulación. En cambio, el mismo tratamiento en diestro 2

bloqueó la ovulación cuando el implante estuvo del lado izquierdo, mientras que en la etapa de estro, el bloqueo se presentó cuando el implante se realizó en el lado derecho (**Cuadro 7**) (Cruz *et al.*, 1989).

Cuadro 7. Tasa de ovulación en ratas con implante unilateral de cristales de atropina en el lado derecho o izquierdo de POA – AHA a las 13:00 h en las diferentes etapas del ciclo estral (Cruz *et al.*, 1989).

	Estro	Diestro 1	Diestro 2	Proestro
Control				
Derecho	7 / 10			
Izquierdo	9 / 13			
Implante de cristales de atropina				
Derecho	0 / 8	2 / 10*	5 / 7	S / D
Izquierdo	8 / 8	1 / 9*	0 / 4*	S / D

* $p < 0.05$ vs. grupo control (prueba de probabilidad exacta de Fisher). **S / D:** Sin datos.

Aunado a ello, Cruz *et al.* (1992), mostraron que el remplazo de la señal ovárica con benzoato de estradiol o de la señal hipofisaria con gonadotropina sérica de yegua preñada; un análogo de la FSH restauró la ovulación en animales con implante de cristales de atropina en POA – AHA izquierda a las 13:00 h en diestro 1, sin embargo, el remplazo hormonal no fue eficaz en animales con implante en POA – AHA derecha. En contraste, la administración de GnRH sintética restauró la ovulación en casi todos los animales, independientemente del lado de POA – AHA tratado. Con estos resultados, los autores apoyan la idea de que la regulación de la secreción de gonadotropinas y la ovulación por el sistema colinérgico de POA – AHA es lateralizado y que la información neural que proviene de los ovarios y se integra en POA – AHA desempeña un rol importante en dicha regulación.

Cruz *et al.* (2001), reportaron que la inyección subcutánea de 100 mg de sulfato de atropina por kilogramo de masa corporal a las 13:00 h en diestro 1 resultó en el retraso del pico preovulatorio de la LH por 24 h. Además, el mismo tratamiento permitió observar el aumento tres veces mayor de las concentraciones del 17β – estradiol. Con estos resultados, los autores sugieren que durante la etapa de diestro 1 existe un vínculo funcional con el sistema colinérgico en POA – AHA que regula la liberación de la LH, la cual induce la ovulación.

Además, Flores *et al.* (2005, 2006), observaron que la inyección subcutánea de sulfato de atropina en concentraciones conocidas que bloquean al sistema colinérgico a las 12:00 h resultó en el incremento de las concentraciones séricas de progesterona en animales tratados en proestro y diestro 2, mientras que el mismo tratamiento en diestro 1 resultó en el aumento de las concentraciones séricas de testosterona. Con los resultados obtenidos, los autores concluyen que la secreción de tales hormonas es regulada por el sistema colinérgico.

De igual manera, *Cruz et al.* (2006), observaron que la inyección subcutánea de sulfato de atropina en diestro 1 o proestro resultó en la disminución de las concentraciones séricas de estradiol, sin aparentes alteraciones en las concentraciones de la misma hormona cuando el tratamiento se realizó en diestro 2. Con base en estos resultados, los autores sugieren que el sistema colinérgico a las 12:00 h en la etapa de diestro 1 y proestro participa en la regulación de la secreción de estradiol.

Cruz et al. (2014) indicaron que el implante de cristales de atropina [$\approx 23 \pm 5$] en POA – AHA izquierda a las 13:00 h en diestro 2 resultó en la disminución del desarrollo folicular y la atresia en el ovario ipsilateral, mientras que no observaron efectos aparentes en el ovario contralateral; sin embargo, el implante en POA – AHA derecha en la etapa de proestro resultó en menor número de folículos pequeños y mayor número de folículos preovulatorios en el ovario ipsilateral. Los autores concluyen que el sistema colinérgico de POA – AHA participa de manera asimétrica en la regulación del crecimiento folicular.

Los trabajos mostrados anteriormente se enfocan en la ACh de origen neural; sin embargo, con las evidencias registradas acerca de la ACh intraovárica y dadas sus acciones específicas mediante los mAChR, *Cruz et al.* (2015), examinaron la posible participación de los m_1 AChR ováricos en la regulación de la ovulación; además, considerando que algunas funciones ováricas son asimétricas, se plantearon la hipótesis de la existencia de un papel diferencial por los m_1 AChR presentes en el ovario izquierdo o derecho. Por lo tanto, bloquearon unilateralmente a los m_1 AChR ováricos mediante la microinyección de dicloruro de pirenzepina [$4.5 \mu\text{mol} / \text{L}$]; un antagonista selectivo, a las 13:00 h en la etapa de proestro. Los autores observaron que el bloqueo de los m_1 AChR en el ovario izquierdo bloqueó la ovulación por ambos ovarios, por el contrario, el mismo tratamiento en el ovario derecho no modificó la ovulación (**Cuadro 8**). Con estos resultados, los autores sugieren que en la etapa de proestro, la estimulación de los m_1 AChR presentes en el ovario izquierdo regula la ovulación de manera inhibitoria.

Cuadro 8. Tasa de animales ovulantes y la media \pm E. E. M. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho en ratas con microinyección de dicloruro de pirenzepina o agua destilada a las 13:00 h en la etapa de proestro (*Cruz et al.*, 2015).

Grupo	Ovario tratado	Tasa de ovulación		Número de ovocitos liberados	
Control		8 / 8 (100 %)	8 / 8 (100 %)	6.4 \pm 1.1	7.1 \pm 1.1
Agua destilada	Izquierdo	8 / 8 (100 %)	8 / 8 (100 %)	6.0 \pm 1.8	7.0 \pm 0.7
Pirenzepina	Izquierdo	0 / 8 ^b (0 %)	1 / 8 ^b (12.5 %)	0	5
Agua destilada	Derecho	8 / 8 (100 %)	8 / 8 (100 %)	5.5 \pm 0.6	6.7 \pm 1.7
Pirenzepina	Derecho	7 / 10 (70 %)	7 / 10 (70 %)	4.7 \pm 0.9	6.0 \pm 0.4

^b $p = 0.001$ indica diferencias significativas entre los animales tratados con agua destilada y pirenzepina.

Antagonizar los m_1 AChR en el ovario izquierdo resulta en el bloqueo de la ovulación y debido a que se requiere de la liberación preovulatoria de GnRH / LH para la ovulación, *Cruz et al.* (2015) analizaron si dicho bloqueo alteró la secreción preovulatoria de dichas hormonas. Como resultados, en ratas tratadas con pirenzepina, la ovulación se restauró totalmente después de la inyección subcutánea de GnRH sintética (pirenzepina + LHRH, 8 / 8 animales, $p < 0.001$), o parcialmente después de la inyección subcutánea de hCG (pirenzepina + hCG, 6 / 8 animales, $p < 0.04$). Con esta información, los autores sugieren que la activación de los m_1 AChR en el ovario izquierdo es necesaria para la secreción preovulatoria de la GnRH y la subsecuente ovulación.

El anestésico utilizado en el estudio anterior fue la mezcla de ketamina / xilacina, una solución recomendada por la NOM – 062 – ZOO de 1999 (especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio); no obstante, esta solución bloquea la ovulación en función de la hora y del día del ciclo estral (*Morán et al.*, 2016). Dado lo anterior, no está claro si el sistema colinérgico a las 13:00 h en la etapa de diestro 1 forma parte de la información que se requiere para llevar a cabo la ovulación. Otro anestésico recomendado por la misma norma es el *isoflurano*.

Isoflurano como anestésico y su efecto sobre la ovulación

El *isoflurano* (**Figura 32**), un isómero estructural del enflurano, es un halógeno volátil y un agente anestésico inhalatorio. El mecanismo de acción de todos los anestésicos inhalatorios es poco conocido, sin embargo, se ha mostrado en estudios con roedores que el *isoflurano* se une a los receptores GABA_A y de glicina, lo que contribuye a las acciones depresoras sobre el asta ventral espinal, de esta manera produce inmovilidad (*Ong – Sio et al.*, 2022).

El hígado, es el principal sitio de metabolismo de la mayoría de los anestésicos inhalados. En promedio, el 95 % del *isoflurano* es recuperado del aire espirado, el 0.2 % que es absorbido por el cuerpo es metabolizado. El principal metabolito es el ácido trifluoroacético (*Ong – Sio et al.*, 2022).

El *isoflurano* es un analgésico relativamente débil y debe usarse en combinación con antiinflamatorios no esteroideos, con el objetivo de un control óptimo del dolor intraoperatorio y postoperatorio (*Lee – Parritz*, 2013).

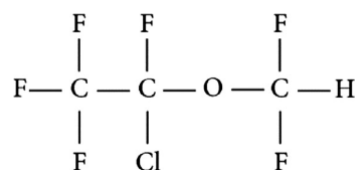


Figura 32. Estructura del *isoflurano* (*Ong – Sio et al.*, 2022).

Con el fin de conocer los efectos del *isoflurano* sobre el proceso ovulatorio, [Contreras et al. \(2021\)](#) mostraron que cuando se aplica dicho anestésico a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral, no se modifican los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La principal diferencia entre los ovarios derecho e izquierdo radica en su capacidad de integrar las señales del sistema neuroendocrino que participan en la regulación de las funciones ováricas. Estas diferencias están vinculadas con la inervación extrínseca e intrínseca que recibe cada ovario y su comunicación con el SNC. El funcionamiento del ovario depende de acciones concertadas de diferentes clases de moléculas de señalización. En los folículos ováricos, la ACh induce la expresión de factores de transcripción implicados en la diferenciación celular inducida por la LH y estimula la síntesis de proteínas involucradas en la esteroidogénesis ([Domínguez & Cruz – Morales, 2011](#); [Mayerhofer & Kunz, 2005](#); [Fritz et al., 2001a](#); [Fritz et al., 2002](#); [Urra et al., 2016](#)).

Con base en las acciones de la ACh vía los mAChR en las funciones ováricas, [Cruz et al. \(2015\)](#) bloquearon unilateralmente los m₁AChR ováricos a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral con el objetivo de examinar la participación asimétrica de tales receptores en la regulación de la ovulación; sin embargo, no se logró esclarecer si el sistema colinérgico en la etapa de diestro 1 formó parte de la información que se requiere para llevar a cabo exitosamente la ovulación, debido a que el anestésico utilizado durante la cirugía fue la solución de ketamina / xilacina, la cual *per se* bloquea la ovulación en función de la hora y de la etapa del ciclo estral ([Morán et al., 2016](#)).

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Si se utiliza un anestésico que no influya en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación, la ACh al unirse a sus m₁AChR ováricos en las diferentes etapas del ciclo estral de la rata adulta ¿modulará la acción de las gonadotropinas sobre la ovulación?

HIPÓTESIS

En el ovario, las células de la granulosa expresan los m_1 AChR. La ACh al unirse a dichos receptores regula la proliferación celular y la esteroidogénesis. Por lo anterior, el bloqueo de los m_1 AChR resultará en disminución de la ovulación, lo cual dependerá del ovario tratado y de la etapa del ciclo estral.

Debido a que en la cirugía se utilizará un anestésico que no afecta los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación, dicha alteración será resultado del antagonista administrado.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la respuesta ovulatoria en animales con bloqueo unilateral de los m_1 AChR del ovario izquierdo o derecho las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral de la rata adulta.

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la microinyección de solución salina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h bajo anestesia con *isoflurano* en cada etapa del ciclo estral sobre la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados y la masa de las glándulas adrenales, los ovarios y el útero.
2. Evaluar el efecto del bloqueo de los m_1 AChR mediante la microinyección de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h bajo anestesia con *isoflurano* en cada etapa del ciclo estral sobre la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados y la masa de las glándulas adrenales, los ovarios y el útero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales experimentales

Se utilizaron ratas hembra adultas cíclicas de la cepa CIIZ – V de tres meses de edad, y con una masa corporal de aproximadamente 250 g. Fueron mantenidas bajo condiciones controladas de luz – oscuridad (14 h luz / 10 h oscuridad; luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), temperatura constante (22 ± 2 °C), y con alimento y agua a libre demanda.

Los animales fueron marcados cuatro días antes de cumplir los tres meses de edad. El ciclo estral fue monitoreado mediante la toma diaria de frotis del epitelio vaginal y únicamente se utilizaron aquellos animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración. El trabajo experimental se realizó bajo la Norma Oficial Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM – 062 – ZOO – 1999).

Procedimientos experimentales

La cirugía se llevó a cabo entre las 12:50 y las 13:10 h en cada etapa del ciclo estral. Cinco animales fueron tomados al azar, pesados y anestesiados a las 12:50 h con *isoflurano* (PiSA, México) a través de un vaporizador. La anestesia se realizó en dos etapas: 1) inducción y 2) mantenimiento. La primera etapa se llevó a cabo en una cámara hermética por la cual se administró 3 % de *isoflurano* en un flujo de 900 mL / min de oxígeno por aproximadamente dos minutos. Una vez que los animales estuvieron completamente anestesiados se pasaron a la etapa de mantenimiento. Durante dicha etapa, los animales se trasladaron a la mesa de cirugía y se les colocó una boquilla por la cual se administró 2.5 % de *isoflurano* en un flujo de 600 mL / min de oxígeno (**Figura 33**).

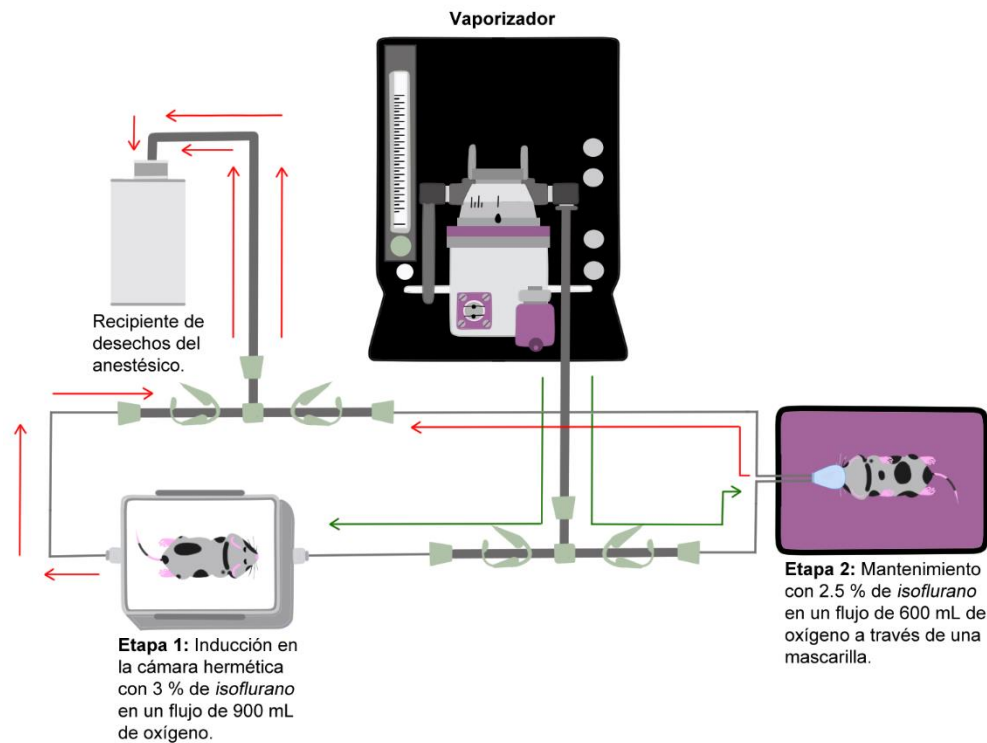


Figura 33. Anestesia con *isoflurano*. Esquema representativo del procedimiento de anestesia con *isoflurano* a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral. Las líneas verdes indican el flujo del *isoflurano*, mientras que las rojas el flujo de los desechos.

Posteriormente se realizó una laparotomía ventral. Para ello, se midió 2 cm por debajo de la última costilla, se colocó jabón quirúrgico (ALTAMIRANO de México, S. A. de C. V.) en un área de aproximadamente 2 cm² y posteriormente se retiró el pelo con una navaja para afeitar. La asepsia del área afeitada se realizó mediante el uso de yodopovidona espuma (ALTAMIRANO de México, S. A. de C. V.), alcohol etílico al 70 % y yodopovidona (ALTAMIRANO de México, S. A. de C. V.). Al terminar este procedimiento, se les inyectó vía subcutánea 0.1 mL de antibiótico (50 mg / kg de masa corporal, Enroxil, SENOSAIN) en el muslo derecho y 0.1 mL de antiinflamatorio (5 mg / kg de masa corporal, Melodex, ARANDA) en el muslo izquierdo.

A continuación, se colocó el campo quirúrgico estéril sobre los animales y con pinzas de disección, pinzas Kelly y bisturí se realizó el corte de piel, músculo y peritoneo con el objetivo de ingresar a la cavidad abdominal. Con el fin de facilitar la búsqueda de los ovarios, la cavidad abdominal fue iluminada con una lámpara de fibra óptica (Fiber Lite). Se exteriorizó el ovario izquierdo o derecho evitando la manipulación de otros órganos e inmediatamente después se introdujo en la bursa ovárica una aguja de acero inoxidable de calibre 27 (0.4 x 12 mm) (**Figura 34**) conectada a un tubo de teflón (0.65 mm de diámetro exterior)

conectado a su vez a una jeringa Hamilton de 10 μL montada en una bomba de infusión (CMA 402, Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, USA), por medio de la cual se administró:

- a) 1 μL de solución salina al 0.9 % (PiSA, México) durante 1 min. Estos animales fueron asignados al grupo vehículo.
- b) 1 μL de solución de dicloruro de pirenzepina [4.5 $\mu\text{mol} / \text{L}$] (antagonista específico de los $m_1\text{AChR}$) disuelta en solución salina (Sigma-Aldrich, México) durante 1 min. Dosis utilizada en el bloqueo de los $m_1\text{AChR}$ (Cruz *et al.*, 2015).

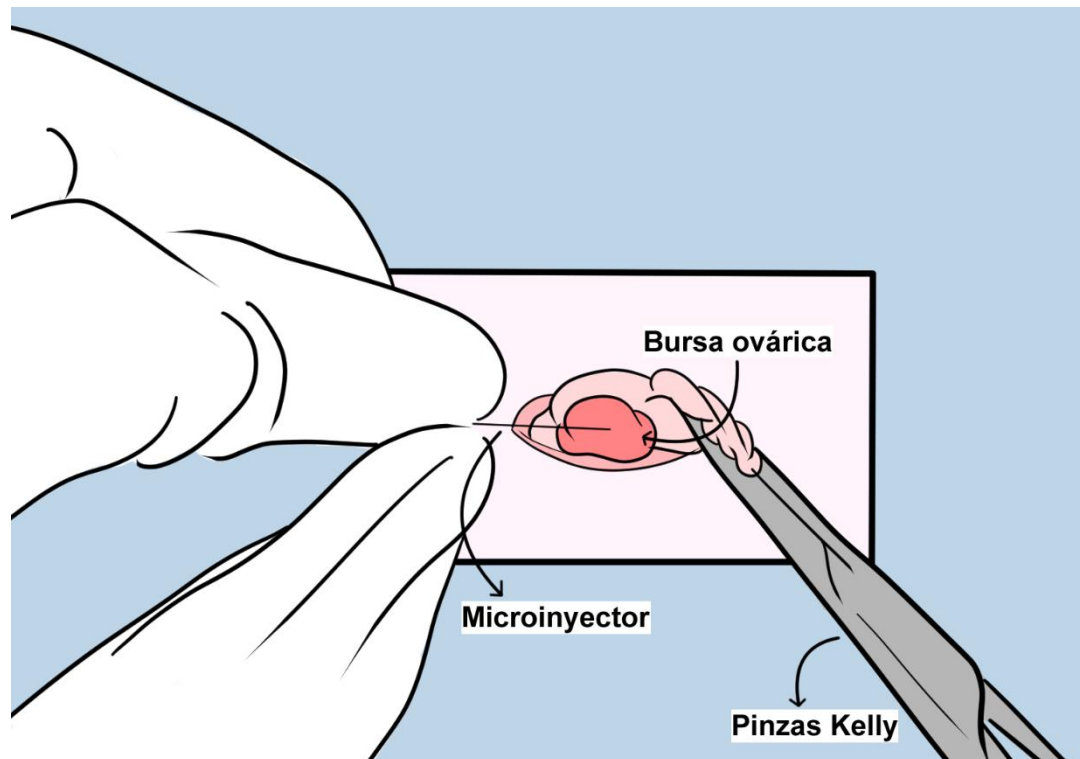


Figura 34. Microinyección en la cavidad bursal ovárica.

La tasa de infusión de la microinyección fue de 1 μL por minuto. Con el fin de evitar la pérdida de las soluciones y permitir que éstas cubrieran completamente al ovario tratado, la aguja se mantuvo en la cavidad bursal ovárica durante 1 min después de la microinyección. Posteriormente, la superficie del ovario tratado se enjuagó cuidadosamente con solución salina y se volvió a colocar dentro de la cavidad (Cruz *et al.*, 2015), de inmediato se administró 1 mL de solución salina (PiSA, México) en la cavidad abdominal, debido a que es útil en el reemplazo del sangrado y pérdidas de otros líquidos por evaporación durante la cirugía (Cardona, 2000). Finalmente, en el músculo se realizó una sutura discontinua con hilo de seda no absorbible (SEDA-SILK 3-0, ETHICON, México), y en la piel se realizó una sutura discontinua con hilo de poliamida no absorbible (NYLON 3-0, ETHICON, México). Al término de la cirugía, los animales fueron colocados

sobre un cojín térmico (BENESTA) hasta su recuperación de la anestesia, fueron llevados al bioterio y se continuó con la toma de frotis vaginal.

Todos los animales fueron pesados y la eutanasia se llevó a cabo en una cámara de CO₂ entre las 09:00 y las 10:00 h en la mañana del estro vaginal inmediato al tratamiento. Asimismo, se realizó la eutanasia de un grupo de animales cíclicos sin tratamiento en la mañana del estro vaginal, tales animales fueron considerados como el grupo intacto.

Se diseccionaron los ovarios, el útero y las glándulas adrenales. Tanto al ovario tratado como el contralateral (sin tratamiento) se le separó el oviducto, se localizó la ampolla y se extrajeron los ovocitos liberados los cuales fueron cuantificados en un microscopio estereoscópico (Stemi DV4, ZEISS). Posteriormente, los ovocitos fueron teñidos con la técnica de hematoxilina – eosina y se verificó el conteo inicial en un microscopio óptico (OPTIPHOT-2, Nikon, USA). Los órganos fueron pesados en una balanza analítica (0.0001 g, Mettler AT261 DeltaRange, USA)

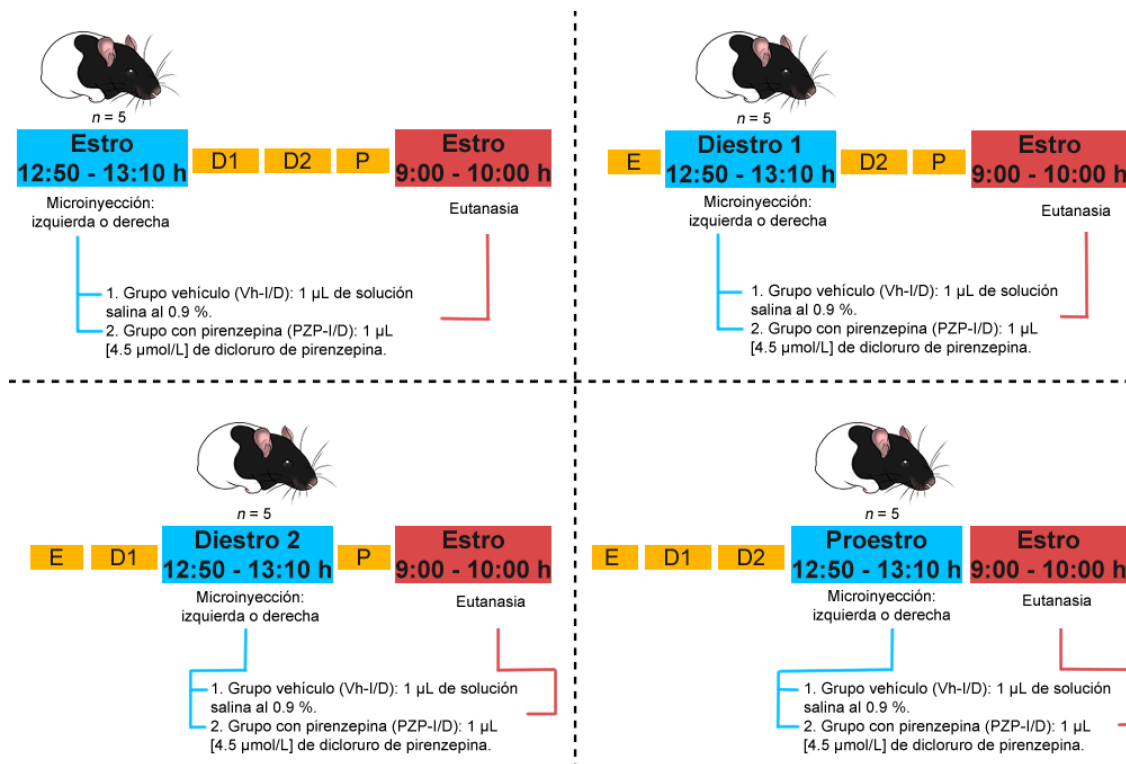


Figura 35. Línea temporal del procedimiento realizado en este trabajo. Esquema representativo que muestra el tratamiento de los animales con microinyección unilateral en la bursa ovárica a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral y la eutanasia en el día del estro vaginal.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con las pruebas de normalidad y homocedasticidad (Kolmogorov – Smirnov y Shapiro – Wilk), con el fin de observar el comportamiento de los datos.

Los resultados de la TAO, expresados como el porcentaje de animales ovulantes (PAO; número de animales que ovulan / número total de animales) fueron analizados mediante la prueba de la probabilidad exacta de Fisher, y el número de ovocitos liberados por la prueba de Kruskal – Wallis seguida de la prueba de Dunn cuando se compararon más de dos grupos y en la comparación de dos grupos se realizó la prueba de U de Mann – Whitney. Los datos del número de ovocitos liberados fueron expresados como la mediana y los cuartiles 1 y 3.

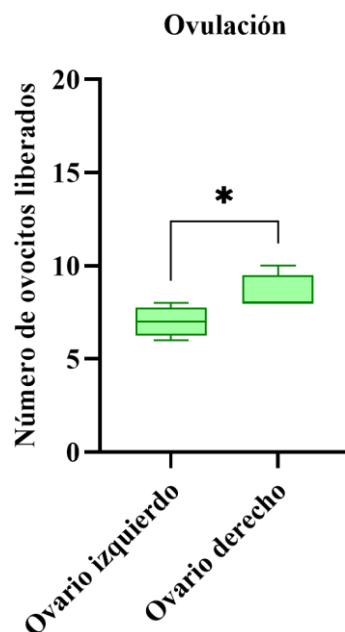
Los resultados de la masa corporal y de órganos fueron analizadas mediante la prueba de Análisis de Varianza Múltiple en la comparación de más de dos grupos, mientras que la comparación de dos grupos se realizó por medio de una “t” de Student. Los datos de las masas fueron expresados como la media \pm E. M.

Se consideraron estadísticamente significativas todas aquellas diferencias con una $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism versión 9. 5. 1 para Windows (GraphPad Software, USA).

RESULTADOS

Intacto

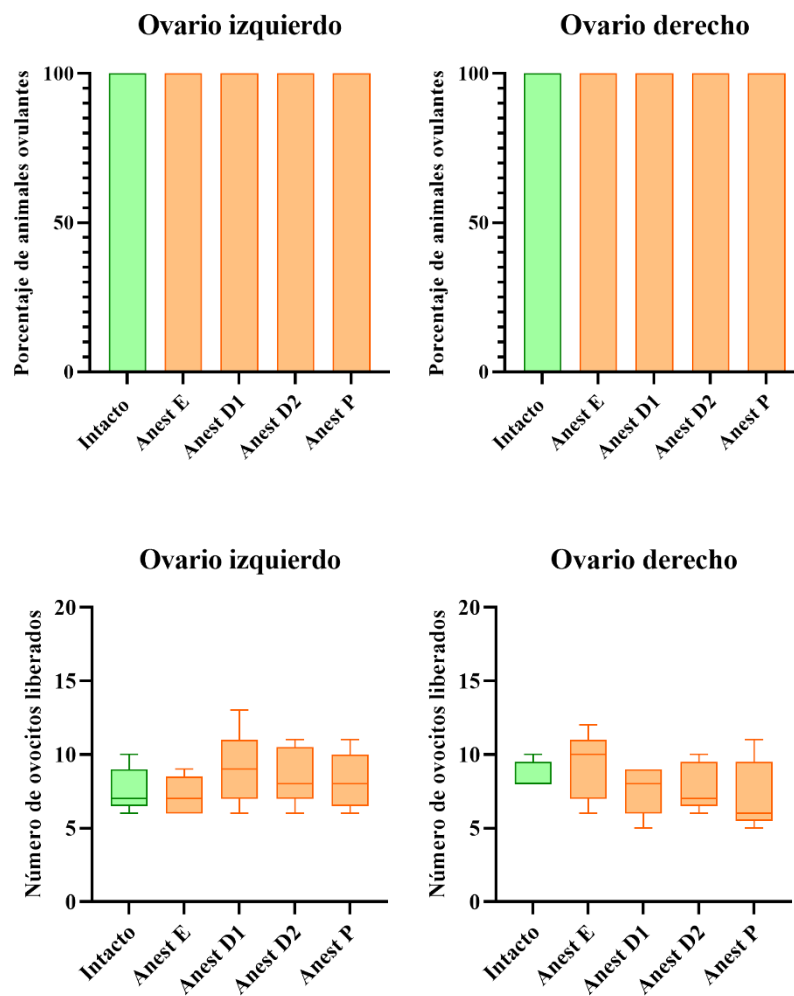
Los animales del grupo intacto ovularon en el día del estro vaginal. La mediana del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo fue de 7.0 y del ovario derecho de 8.0 (**Gráfica 1**).



Gráfica 1. *Ovulación del grupo intacto.* Número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuartiles 1 y 3. * $p = 0.0317$ vs. ovario contralateral (prueba U de Mann – Whitney).

Anestesia con isoflurano

La anestesia con *isoflurano* a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral no modificó el porcentaje de animales ovulantes, ni el número de ovocitos liberados con respecto al grupo intacto (**Gráfica 2**).



Gráfica 2. Anestesia con isoflurano a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral. Paneles superiores: porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho. Paneles inferiores: número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuartiles 1 y 3. **Anest:** anestesia. **E:** estro. **D1:** diestro 1. **D2:** diestro 2. **P:** proestro.

De igual manera, los animales del grupo con anestesia no presentaron alteraciones en la masa corporal, ni en las masas de los órganos (**Cuadros 9 – 11**).

Cuadro 9. Media \pm E. E. M. de la masa corporal de animales del grupo intacto o bajo anestesia con *isoflurano* (Anest) a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral.

Grupo	Etapas	n	Masa corporal en la cirugía	Masa corporal en la eutanasia	Diferencia de medias
Intacto		5	275.2 \pm 2.87	275.2 \pm 2.87	0.0
				g	
Anest	Estro		286.4 \pm 3.41	288.4 \pm 2.61	-2.0 \pm 1.37
	Diestro 1	5	284.0 \pm 2.70	286.2 \pm 1.53	-2.2 \pm 2.51
	Diestro 2		279.0 \pm 2.79	276.0 \pm 2.38	3.0 \pm 2.07
	Proestro		279.4 \pm 3.98	276.6 \pm 4.82	2.80 \pm 2.41

Cuadro 10. Media \pm E. E. M. de la masa de los órganos de animales del grupo intacto o bajo anestesia con *isoflurano* (Anest) a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral.

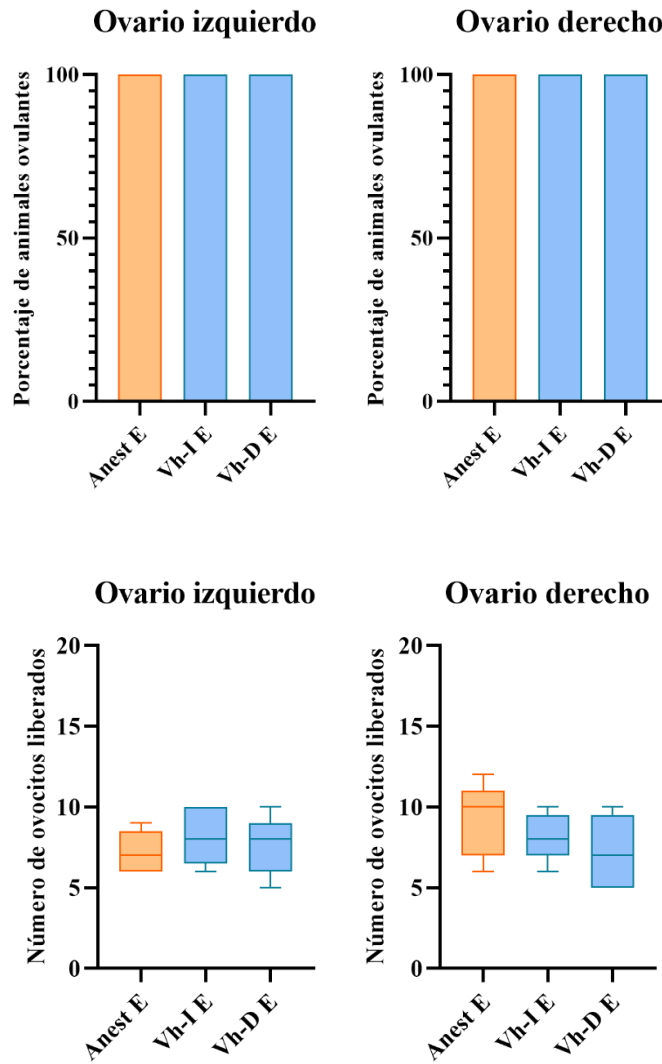
Grupo	Etapas	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Adrenal izquierda	Adrenal derecha
Intacto		5	13.53 \pm 1.09	13.37 \pm 0.76	14.58 \pm 0.87	12.54 \pm 1.09
					mg / 100 g de masa corporal	
Anest	Estro		14.22 \pm 0.66	12.74 \pm 0.65	12.09 \pm 0.61	10.89 \pm 0.21
	Diestro 1	5	12.54 \pm 0.48	12.81 \pm 1.10	12.46 \pm 0.89	11.93 \pm 0.76
	Diestro 2		13.49 \pm 0.35	13.21 \pm 0.89	14.58 \pm 1.53	12.89 \pm 1.17
	Proestro		11.93 \pm 0.66	11.80 \pm 0.24	13.57 \pm 0.70	11.66 \pm 0.72

Cuadro 11. Media \pm E. E. M. de la masa ovárica, uterina y adrenal de animales del grupo intacto o bajo anestesia con *isoflurano* (Anest) a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral.

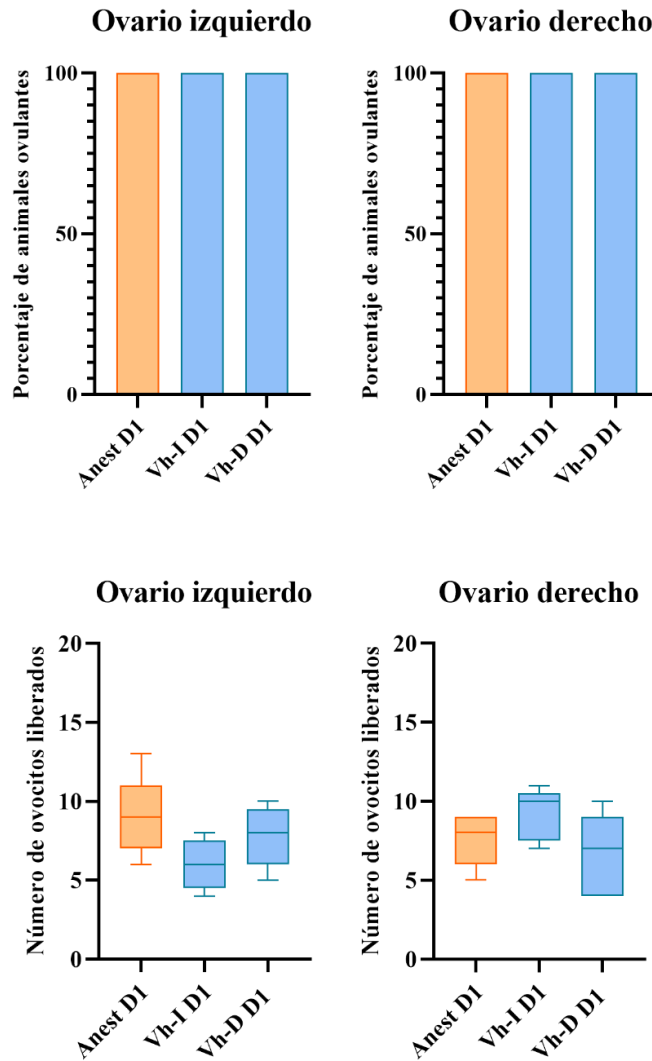
Grupo	Etapas	n	Masa ovárica	Masa uterina	Masa adrenal
Intacto		5	26.90 \pm 1.23	146.6 \pm 11.07	27.12 \pm 1.95
					mg / 100 g de masa corporal
Anest	Estro		26.96 \pm 0.89	146.8 \pm 9.03	22.98 \pm 0.74
	Diestro 1	5	25 \pm 0.88	148.3 \pm 7.91	24.39 \pm 1.57
	Diestro 2		26.70 \pm 0.77	141.2 \pm 8.90	27.47 \pm 2.68
	Proestro		23.73 \pm 0.54	144.2 \pm 5.10	25.23 \pm 1.34

Microinyección de solución salina en la cavidad bursal ovárica

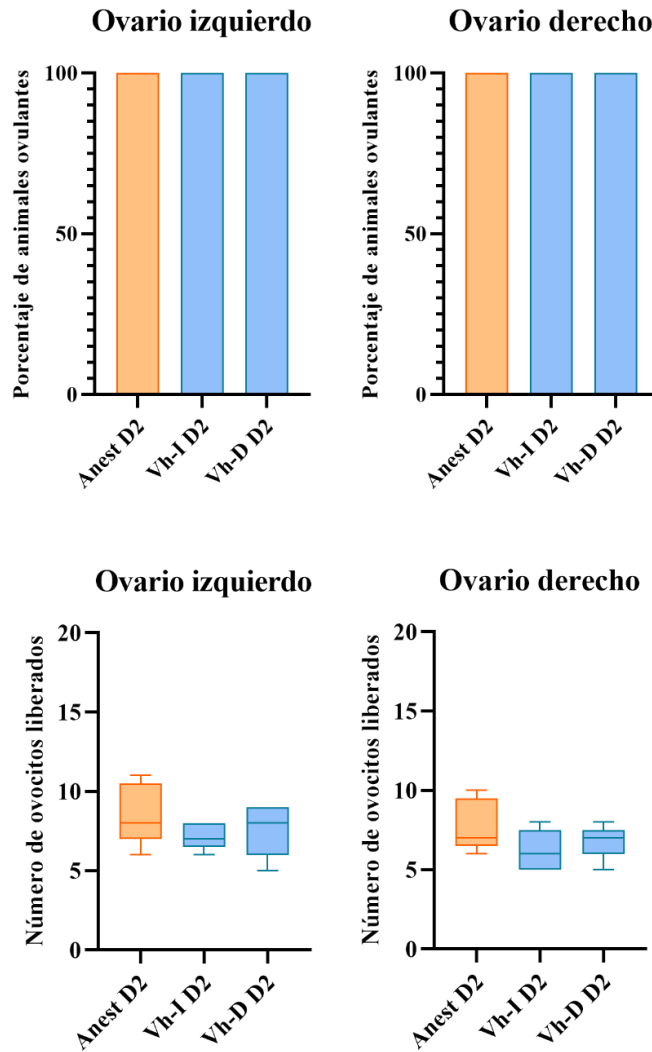
La microinyección del vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral no modificó el porcentaje de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados (**Gráficas 3 – 6**).



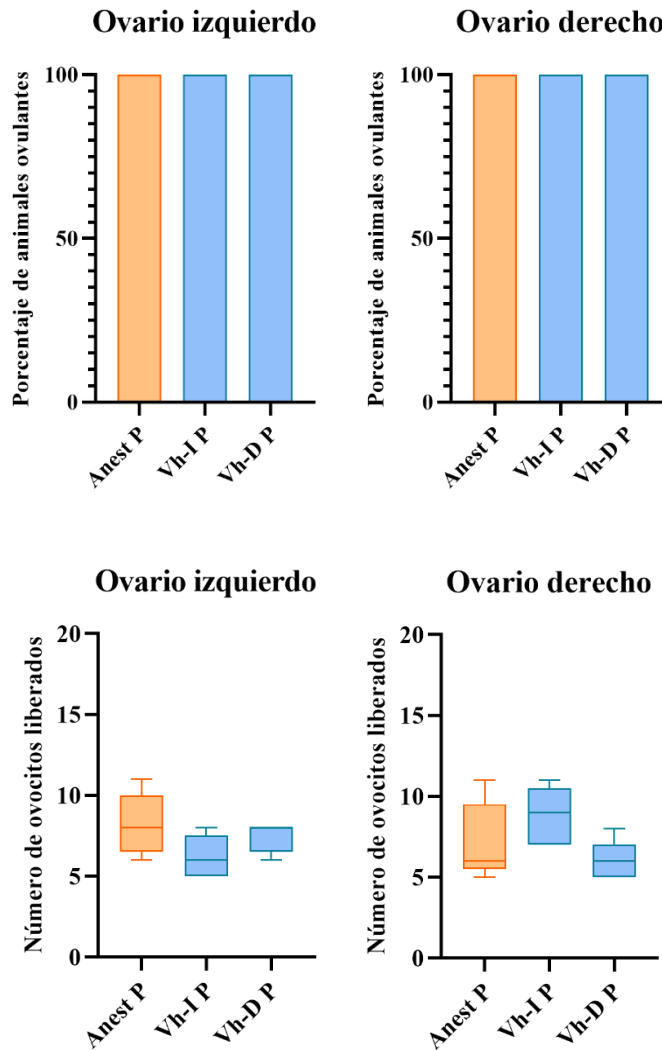
Gráfica 3. Microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h en la etapa de *estro*. Paneles superiores: porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho. Paneles inferiores: número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuartiles 1 y 3. **Anest**: anestesia. **E**: *estro*. **Vh - I / D**: vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha.



Gráfica 4. Microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h en la etapa diestro 1. Paneles superiores: porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho. Paneles inferiores: número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuartiles 1 y 3. **Anest:** anestesia. **D1:** diestro 1. **Vh - I / D:** vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha.



Gráfica 5. Microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h en la etapa diestro 2. Paneles superiores: porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho. Paneles inferiores: número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuartiles 1 y 3. **Anest:** anestesia. **D2:** diestro 2. **Vh -I / D:** vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha.



Gráfica 6. Microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h en la etapa del proestro. Paneles superiores: porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho. Paneles inferiores: número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuartiles 1 y 3. **Anest:** anestesia. **P:** proestro. **Vh - I / D:** vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha.

Además, la microinyección del vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda en la etapa de estro resultó en el incremento de la masa corporal y la disminución de la masa del ovario izquierdo cuando se comparó con su respectivo grupo control (**Cuadros 12 y 13**). También se observó el incremento de la masa ovárica respecto a su grupo control, cuando se llevó a cabo el mismo tratamiento en la etapa de proestro (**Cuadro 14**).

Cuadro 12. Media \pm E. E. M. de la masa corporal de animales del grupo bajo anestesia con *isoflurano* (Anest) o con microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % en la cavidad bursal ovárica izquierda (Vh – I) o derecha (Vh – D) a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral.

Grupo	Etap	n	Masa corporal en la cirugía	Masa corporal en la eutanasia	Diferencia de medias
				g	
Anest			286.4 \pm 3.41	288.4 \pm 2.61	-2.0 \pm 1.37
Vh – I	Estro		263.6 \pm 4.54	276.0 \pm 1.76	-7.0 \pm 0.54*
Vh – D			248.4 \pm 11.61	252.6 \pm 11.63	-4.2 \pm 1.20
Anest			284.0 \pm 2.70	286.2 \pm 1.53	-2.2 \pm 2.51
Vh – I	Diestro 1	5	268.0 \pm 7.69	264.8 \pm 6.60	3.2 \pm 1.65
Vh – D			278.8 \pm 4.17	280.4 \pm 4.23	-1.6 \pm 2.63
Anest			279.0 \pm 2.79	276.0 \pm 2.38	3.0 \pm 2.07
Vh – I	Diestro 2		268.6 \pm 2.76	267.2 \pm 1.49	1.4 \pm 2.08
Vh – D			266.8 \pm 6.06	265.8 \pm 4.48	2.4 \pm 3.89
Anest			279.4 \pm 3.98	276.6 \pm 4.82	2.80 \pm 2.41
Vh – I	Proestro		275.2 \pm 4.36	273.8 \pm 4.03	1.4 \pm 1.66
Vh – D			259.2 \pm 9.19	262.0 \pm 8.53	-2.8 \pm 1.39

* $p = 0.0098$ vs. anestesia correspondiente (prueba “t” de Student).

Cuadro 13. Media \pm E. E. M. de la masa de los órganos de animales del grupo bajo anestesia con *isoflurano* (Anest) o con microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % en la cavidad bursal ovárica izquierda (Vh – I) o derecha (Vh – D) a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral.

Grupo	Etap	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Adrenal izquierda	Adrenal derecha
				mg / 100 g de masa corporal		
Anest			14.22 \pm 0.66	12.74 \pm 0.65	12.09 \pm 0.61	10.89 \pm 0.21
Vh – I	Estro		11.75 \pm 0.57*	13.41 \pm 0.86	13.67 \pm 0.43	12.26 \pm 0.57
Vh – D			13.13 \pm 0.74	12.56 \pm 0.52	14.85 \pm 0.86	13.02 \pm 0.48
Anest			12.54 \pm 0.48	12.81 \pm 1.10	12.46 \pm 0.89	11.93 \pm 0.76
Vh – I	Diestro 1	5	13.17 \pm 0.83	13.16 \pm 0.86	14.36 \pm 1.19	12.31 \pm 1.08
Vh – D			14.04 \pm 0.79	12.42 \pm 0.86	13.74 \pm 1.16	12.13 \pm 0.81
Anest			13.49 \pm 0.35	13.21 \pm 0.89	14.58 \pm 1.53	12.89 \pm 1.17
Vh – I	Diestro 2		12.59 \pm 1.01	12.57 \pm 1.11	14.84 \pm 0.79	13.58 \pm 0.82
Vh – D			12.57 \pm 0.87	12.11 \pm 1.39	11.86 \pm 0.53	10.21 \pm 0.14
Anest			11.93 \pm 0.66	11.80 \pm 0.24	13.57 \pm 0.70	11.66 \pm 0.72
Vh – I	Proestro		14.01 \pm 0.65	13.74 \pm 0.64	13.90 \pm 0.70	12.69 \pm 1.08
Vh – D			14.14 \pm 0.70	13.84 \pm 1.32	13.99 \pm 0.46	12.69 \pm 0.47

* $p = 0.0226$ vs. anestesia correspondiente (prueba “t” de Student).

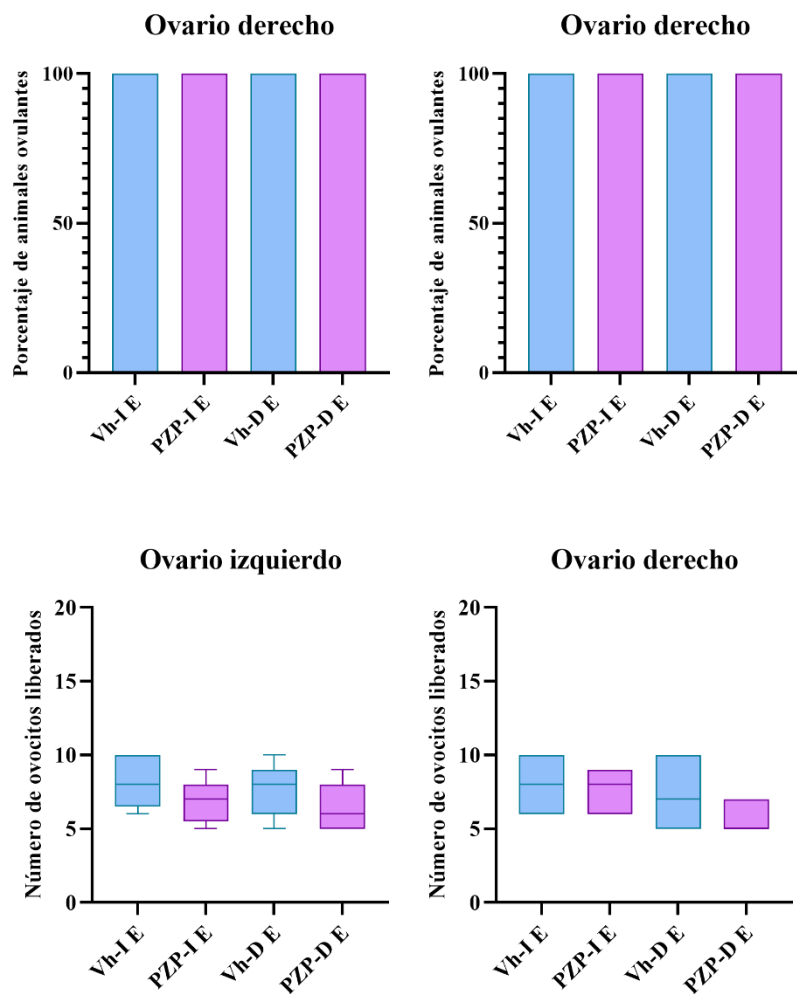
Cuadro 14. Media \pm E. E. M. de la masa ovárica, uterina y adrenal de animales del grupo bajo anestesia con *isoflurano* (Anest) o con microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % en la cavidad bursal ovárica izquierda (Vh – I) o derecha (Vh – D) a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral.

Grupo	Etapa	n	Masa ovárica	Masa uterina	Masa adrenal
			mg / 100 g de masa corporal		
Anest			26.96 \pm 0.89	146.8 \pm 9.03	22.98 \pm 0.74
Vh – I	Estró		25.16 \pm 0.97	145.0 \pm 5.15	25.93 \pm 0.87
Vh – D			25.69 \pm 0.88	151.6 \pm 6.73	27.87 \pm 1.18
Anest			25 \pm 0.88	148.3 \pm 7.91	24.39 \pm 1.57
Vh – I	Diestro 1		26.33 \pm 1.46	164.4 \pm 8.89	26.66 \pm 2.27
Vh – D		5	26.46 \pm 1.58	139.2 \pm 3.72	25.87 \pm 1.93
Anest			26.70 \pm 0.77	141.2 \pm 8.90	27.47 \pm 2.68
Vh – I	Diestro 2		25.16 \pm 1.85	143.2 \pm 5.91	28.42 \pm 1.51
Vh – D			24.68 \pm 1.77	162.7 \pm 9.21	22.07 \pm 0.67
Anest			23.73 \pm 0.54	144.2 \pm 5.10	25.23 \pm 1.34
Vh – I	Proestro		27.75 \pm 0.96*	154.7 \pm 6.53	26.59 \pm 1.78
Vh – D			27.98 \pm 1.83	162.1 \pm 7.04	26.67 \pm 0.80

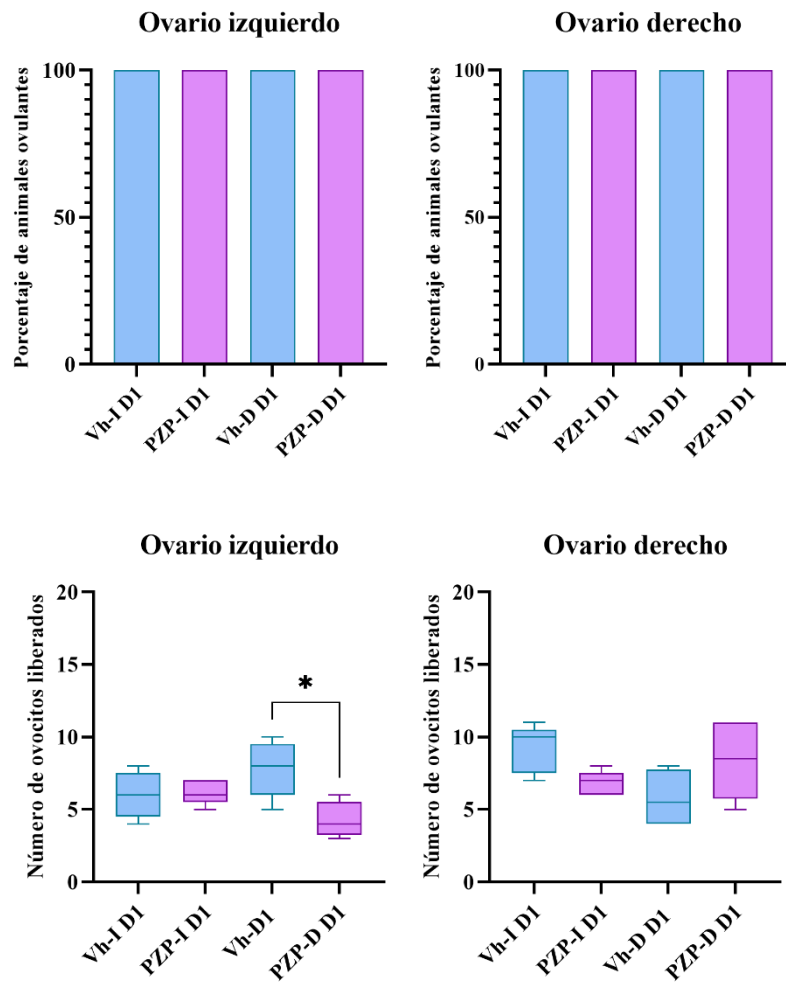
* $p = 0.0067$ vs. anestesia correspondiente (prueba “t” de Student).

Bloqueo unilateral de los m_1 AChR presentes en el ovario por la microinyección de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica

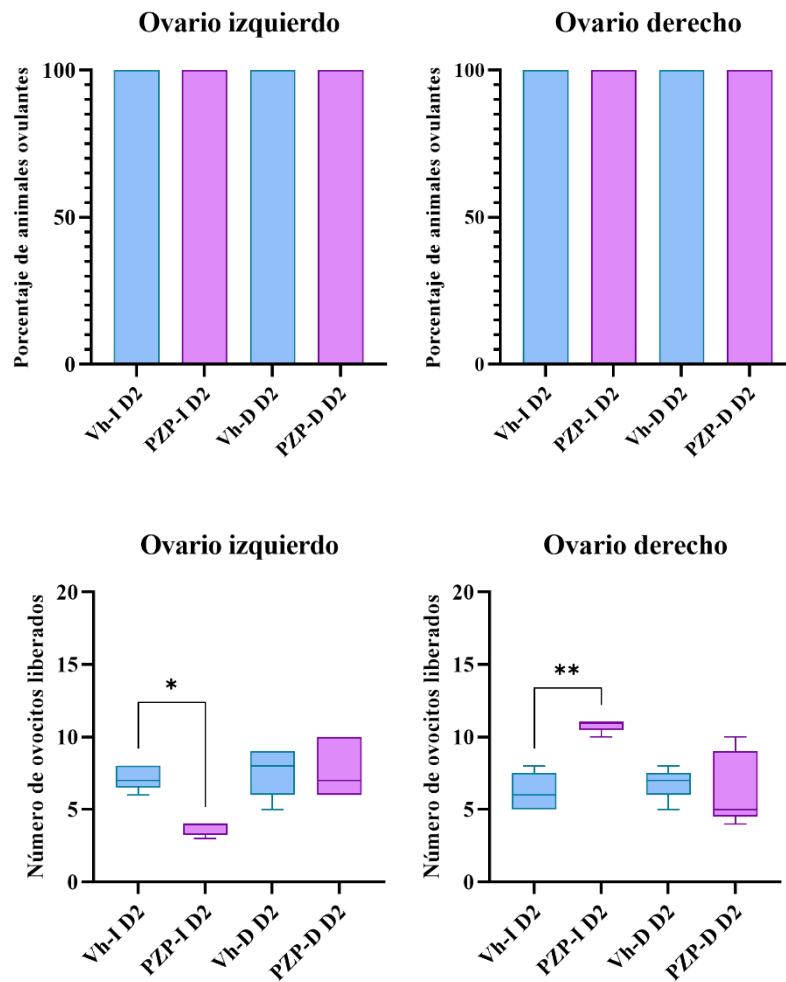
El bloqueo de los m_1 AChR en el ovario izquierdo o derecho no modificó el porcentaje de animales ovulantes (**Gráficas 7 – 10**). A diferencia de ello, cuando se llevó a cabo la microinyección en el lado derecho en la etapa de diestro 1, resultó en la disminución del número de ovocitos liberados por el ovario contralateral respecto a su grupo control (**Gráfica 8**), mientras que, cuando se realizó la microinyección en el lado izquierdo en la etapa de diestro 2, resultó en la disminución del número de ovocitos liberados por el ovario ipsilateral y el incremento subsecuente del mismo parámetro por el ovario contralateral, respecto a su grupo control (**Gráfica 9**).



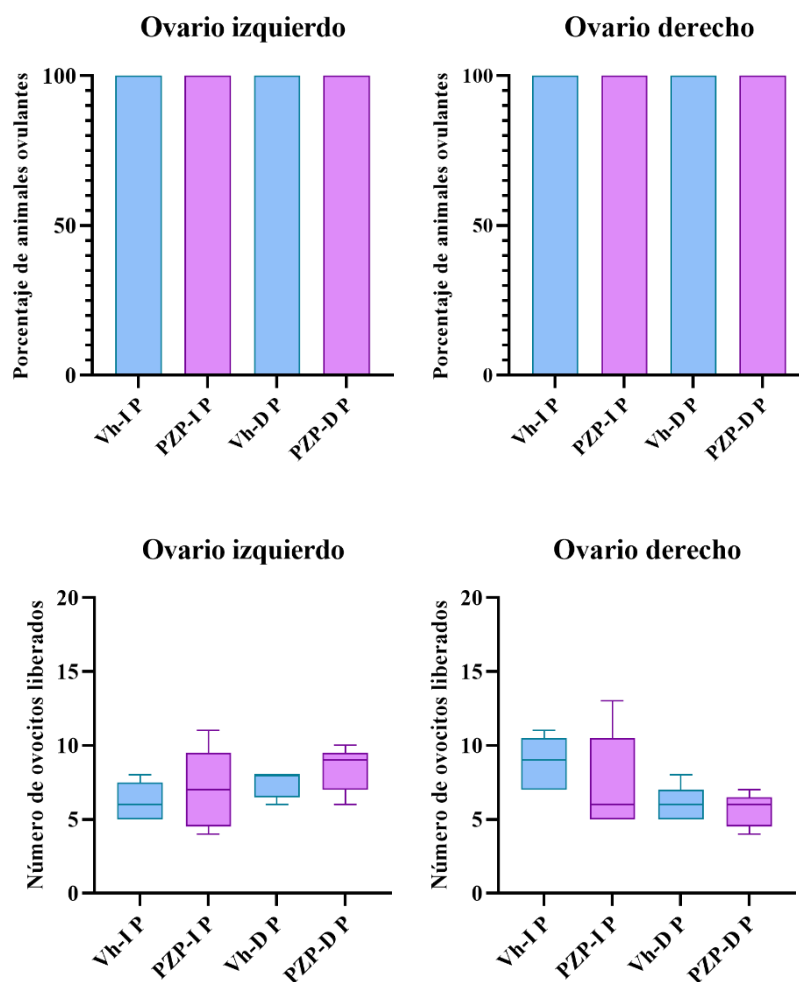
Gráfica 7. Microinyección de 1 μ L [4.5 μ mol / L] de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h en la etapa de estro. Paneles superiores: porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho. Paneles inferiores: número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuartiles 1 y 3. **E:** estro. **Vh - I / D:** vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha. **PZP - I / D:** dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha.



Gráfica 8. Microinyección de $1 \mu\text{L}$ [$4.5 \mu\text{mol} / \text{L}$] de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h en la etapa de diestro 1. Paneles superiores: porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho. Paneles inferiores: número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuatiles 1 y 3. * $p = 0.0317$ vs. respectivo grupo vehículo (prueba U de Mann – Whitney). **D1:** diestro 1. **Vh - I / D:** vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha. **PZP - I / D:** dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha.



Gráfica 9. Microinyección de $1 \mu\text{L}$ [$4.5 \mu\text{mol} / \text{L}$] de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h en la etapa de diestro 2. Paneles superiores: porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho. Paneles inferiores: número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuartiles 1 y 3. * $p = 0.0159$ vs. respectivo grupo vehículo. ** $p = 0.0079$ vs. respectivo grupo vehículo (prueba U de Mann – Whitney). **D2:** diestro 2. **Vh - I / D:** vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha. **PZP - I / D:** dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha.



Gráfica 10. Microinyección de $1 \mu\text{L}$ [$4.5 \mu\text{mol} / \text{L}$] de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha a las 13:00 h en la etapa de proestro. Paneles superiores: porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho. Paneles inferiores: número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho. Los valores se expresan en la mediana y los cuartiles 1 y 3. **P:** proestro. **Vh - I / D:** vehículo en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha. **PZP - I / D:** dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda o derecha.

Asimismo, el bloqueo de los $m_1\text{AChR}$ en el ovario izquierdo o derecho no resultó en alteraciones en la masa corporal, ni en las masas de los órganos (**Cuadros 15 - 17**).

Cuadro 15. Media \pm E. E. M. de la masa corporal de animales del grupo de animales con microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % (Vh – I / D) o con microinyección de 1 μ L [4.5 μ mol / L] de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda (PZP – I) o derecha (PZP – D) a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral.

Grupo	Etapas	n	Masa corporal en la cirugía	Masa corporal en la eutanasia	Diferencia de medias
				g	
Vh – I			263.6 \pm 4.54	276.0 \pm 1.76	-7.0 \pm 0.54
PZP – I			273.6 \pm 5.68	274.0 \pm 6.18	-0.4 \pm 1.60*
Vh – D	Estro		248.4 \pm 11.61	252.6 \pm 11.63	-4.2 \pm 1.20
PZP – D			255.6 \pm 7.32	260.0 \pm 7.31	-4.4 \pm 2.0
Vh – I			268.0 \pm 7.69	264.8 \pm 6.60	3.2 \pm 1.65
PZP – I			273.0 \pm 4.82	275.2 \pm 4.79	-2.2 \pm 2.10
Vh – D	Diestro 1		278.8 \pm 4.17	280.4 \pm 4.23	-1.6 \pm 2.63
PZP – D			275.4 \pm 4.09	274.4 \pm 5.35	1.0 \pm 2.5
Vh – I		5	267.8 \pm 3.59	266.2 \pm 1.59	1.60 \pm 2.4
PZP – I			268.6 \pm 2.76	267.2 \pm 1.49	1.4 \pm 2.08
Vh – D	Diestro 2		266.8 \pm 6.06	265.8 \pm 4.48	2.4 \pm 3.89
PZP – D			273.4 \pm 5.19	273.6 \pm 6.72	-0.2 \pm 1.93
Vh – I			275.2 \pm 4.36	273.8 \pm 4.03	1.4 \pm 1.66
PZP – I			273.0 \pm 6.12	270.6 \pm 5.46	2.4 \pm 1.36
Vh – D	Proestro		259.2 \pm 9.19	262.0 \pm 8.53	-2.8 \pm 1.39
PZP – D			271.8 \pm 4.74	271.0 \pm 3.17	0.8 \pm 2.81

* $p = 0.0045$ vs. respectivo grupo vehículo (prueba “t” de Student).

Cuadro 16. Media \pm E. E. M. de la masa de los órganos de animales del grupo de animales con microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % (Vh – I / D) o con microinyección de 1 μ L [4.5 μ mol / L] de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda (PZP – I) o derecha (PZP – D) a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral.

Grupo	Etapas	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Adrenal izquierda	Adrenal derecha
				mg / 100 g de masa corporal		
Vh – I			11.75 \pm 0.57	13.41 \pm 0.86	13.67 \pm 0.43	12.26 \pm 0.57
PZP – I			11.84 \pm 0.95	13.70 \pm 1.14	13.48 \pm 0.89	11.18 \pm 0.98
Vh – D	Estro		13.13 \pm 0.74	12.56 \pm 0.52	14.85 \pm 0.86	13.02 \pm 0.48
PZP – D			12.66 \pm 0.85	11.77 \pm 0.61	13.63 \pm 0.55	12.24 \pm 0.61
Vh – I			13.17 \pm 0.83	13.16 \pm 0.86	14.36 \pm 1.19	12.31 \pm 1.08
PZP – I			15.40 \pm 0.38	13.45 \pm 0.87	14.38 \pm 0.21	13.06 \pm 0.50
Vh – D	Diestro 1		14.04 \pm 0.79	12.42 \pm 0.86	13.74 \pm 1.16	12.13 \pm 0.81
PZP – D		5	12.10 \pm 1.47	13.20 \pm 1.17	13.89 \pm 1.34	12.68 \pm 0.76
Vh – I			12.59 \pm 1.01	12.57 \pm 1.11	14.84 \pm 0.79	13.58 \pm 0.82
PZP – I			13.0 \pm 0.96	13.63 \pm 0.77	13.80 \pm 0.33	12.66 \pm 0.84
Vh – D	Diestro 2		12.57 \pm 0.87	12.11 \pm 1.39	11.86 \pm 0.53	10.21 \pm 0.14
PZP – D			13.44 \pm 0.61	10.54 \pm 0.60	13.59 \pm 0.21	12.54 \pm 0.36
Vh – I			14.01 \pm 0.65	13.74 \pm 0.64	13.90 \pm 0.70	12.69 \pm 1.08
PZP – I			14.09 \pm 1.25	11.21 \pm 0.77	14.21 \pm 0.59	13.17 \pm 0.62
Vh – D	Proestro		14.14 \pm 0.70	13.84 \pm 1.32	13.99 \pm 0.46	12.69 \pm 0.47
PZP – D			12.50 \pm 1.07	12.61 \pm 1.02	13.53 \pm 0.69	14.21 \pm 2.30

Cuadro 17. Media \pm E. E. M. de la masa ovárica, uterina y adrenal de animales del grupo de animales con microinyección de 1 μ L de solución salina al 0.9 % (Vh – I / D) o con microinyección de 1 μ L [4.5 μ mol / L] de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda (PZP – I) o derecha (PZP – D) a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral.

Grupo	Etapa	n	Masa ovárica	Masa uterina	Masa adrenal
				mg / 100 g de masa corporal	
Vh – I	Estro		25.16 \pm 0.97	145.0 \pm 5.15	25.93 \pm 0.87
PZP – I			25.54 \pm 1.61	133.0 \pm 4.00	24.66 \pm 1.68
PZP – D			24.42 \pm 1.26	149.6 \pm 6.23	25.87 \pm 1.07
Vh – I	Diestro 1	5	26.33 \pm 1.46	164.4 \pm 8.89	26.66 \pm 2.27
PZP – I			28.85 \pm 1.22	166.5 \pm 8.72	27.44 \pm 0.47
PZP – D			25.29 \pm 2.40	150.1 \pm 6.98	26.57 \pm 2.05
Vh – I	Diestro 2		24.26 \pm 0.89	148.9 \pm 4.47	26.69 \pm 1.63
PZP – I			25.16 \pm 1.85	143.2 \pm 5.91	28.42 \pm 1.51
PZP – D			23.98 \pm 0.57	147.3 \pm 6.72	26.13 \pm 0.46
Vh – I	Proestro		27.75 \pm 0.96	154.7 \pm 6.53	26.59 \pm 1.78
PZP – I			25.30 \pm 1.84	155.3 \pm 0.55	27.38 \pm 1.18
PZP – D			25.11 \pm 1.93	153.3 \pm 6.33	27.75 \pm 2.57

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación muestran que la participación estimulante de los m_1 AChR ováricos en la regulación de la ovulación depende del ovario estudiado y de la etapa del ciclo estral.

Dado que la anestesia con *isoflurano* o la microinyección unilateral de solución salina en la cavidad bursal ovárica en cada etapa del ciclo estral no afectaron los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación, las diferencias en el número de ovocitos liberados por animales con bloqueo unilateral de los m_1 AChR ováricos se pueden atribuir a la falta de unión de la ACh a dichos receptores (Cuevas *et al.*, 2022).

Se ha descrito que la mayoría de los órganos endocrinos pareados presentan asimetría. Las diferencias entre el ovario izquierdo y el derecho se observan en los seres humanos y en los animales, y también se hacen presentes como consecuencias de condiciones patológicas o cuando los animales se someten a determinados procedimientos experimentales (Domínguez *et al.*, 2003); por ejemplo, en el presente estudio, se observó que los ovarios no responden de la misma manera aun cuando son sometidos al mismo tratamiento en la misma etapa. Respecto a lo anterior, Domínguez *et al.* (2003), mencionan que las asimetrías ováricas están vinculadas con la inervación extrínseca. Es claro que la clave para entender el control neural del ovario reside en saber qué núcleos de la médula espinal y del cerebro están ligados a esta glándula (Gerandai *et al.*, 2002).

Mediante el uso de trazadores retrógrados se han identificado las rutas por las cuales se comunica el sistema nervioso con el ovario. Los somas de las neuronas de las cuales se derivan las fibras nerviosas se localizan en el hipotálamo, en particular en el núcleo paraventricular, el núcleo arqueado, el hipotálamo anterior, lateral y dorsal. Las fibras descendentes del núcleo paraventricular terminan en las neuronas simpáticas de la columna intermediolateral de la médula espinal, además inervan neuronas en la médula ventromedial, el núcleo del tracto solitario, el *locus coeruleus* y la sustancia gris periacueductal (Gerandai *et al.*, 2002).

De manera alterna, otros grupos de somas neurales de los cuales también se derivan fibras nerviosas se ubican en el puente troncoencefálico, en los núcleos vagales (el núcleo del tracto solitario, el complejo vagal dorsal y el núcleo ambiguo), en el área postrema, el núcleo parapiramidal, los grupos caudales del núcleo del rafe (*raphe pallidus*, *raphe obscurus*, *raphe magnus*), los grupos de células noradrenérgicas A1, A5 y A7, el *locus coeruleus*, el núcleo de Barrington, el núcleo paragigantocelular, el *locus subcoeruleus* y en el núcleo Kölliker – Fuse. Las neuronas preganglionares simpáticas en la columna intermediolateral presentan proyecciones desde varias de estas estructuras (Gerandai *et al.*, 2002).

En la columna intermediolateral, particularmente en los segmentos espinales torácicos T4 – T13 y los segmentos lumbares L1 – L3, surgen las fibras simpáticas y parasimpáticas que inervan al ovario. En

paralelo, desde el complejo vagal dorsal se derivan fibras del nervio vago, las cuales también llegan al ovario a través de una ruta diferente (Burden *et al.*, 1983; Gerandai *et al.*, 2002).

Finalmente, el ovario recibe la innervación simpática vía NPO y NOS, y parasimpática vía el nervio vago (Dissen *et al.*, 2004; Lawrence & Burden, 1980; Strauss & Williams, 2019). Las fibras del NPO y del NOS provienen de los ganglios prevertebrales, del ganglio celiaco mesentérico superior (CSMG) y de otros pequeños ganglios situados cerca del origen de la arteria ovárica y renal. Además, el nervio vago tiene una cantidad importante de sinapsis con el CSMG (Berthoud & Poywly, 1996; Klein & Burden, 1988).

Adicionalmente, el ovario está dotado de innervación intrínseca. La mayoría de las neuronas son catecolaminérgicas (Strauss & Williams, 2019). Los somas de las neuronas en el ovario y sus procesos se encuentran en la corteza y la médula. En la corteza se observan en la región intersticial y dentro de la capa de células de la teca de los folículos en crecimiento, mientras que, en la médula, están asociadas a la vasculatura sanguínea (Dissen *et al.*, 2004).

¿Cómo se explica la disminución del número de ovocitos liberados por el ovario contralateral en la etapa de diestro 1?

Domínguez *et al.* (1982) mostraron que el sistema colinérgico participa en la regulación de la ovulación, lo cual depende de la hora y de la etapa del ciclo estral. La etapa más sensible al bloqueo de dicho sistema fue diestro 1. También se ha reportado la existencia de información necesaria para la ovulación que surge de los ovarios y llega al SNC a través de fibras nerviosas (Chávez *et al.*, 1987; Cruz *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 1992; Domínguez *et al.*, 1998). Por lo tanto, podríamos pensar que, a las 13:00 h en la etapa de diestro 1, se requiere de una señal que se origina en el ovario derecho y que regula de manera estimulante la ovulación del ovario contralateral (**Figura 36**).

La innervación ovárica modula la respuesta de los folículos y del tejido intersticial a las gonadotropinas a través de la liberación de neurotransmisores. El circuito se cierra cuando algunas de las neuronas del ovario registran cambios en varios parámetros de la función ovárica, dichos cambios se traducen en modificaciones en la liberación de moléculas locales, como las neurotrofinas (NT), las cuales son secretadas por las células ováricas diana de las fibras nerviosas y actúan a través de receptores específicos expresados en las mismas fibras. De esta manera, el ovario envía una señal al otro ovario a través de la innervación que surge de las neuronas presentes en el ovario, viaja a través de la columna intermediolateral, por medio de los nervios simpáticos y llega al otro ovario a través del NOS. El ovario también envía señales neurales al SNC vía el nervio vago (Dissen *et al.*, 2004; Domínguez *et al.*, 2003; Morán *et al.*, 2005).

Los factores neurotróficos se dividen en las siguientes familias principales: 1) las NT, y 2) el factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (GDNF). Las NT son una familia de factores de crecimiento que incluyen cinco miembros: 1) el factor de crecimiento nervioso (NGF), 2) el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), 3) la neurotrofina – 3 (NT – 3), 4) la neurotrofina – 4 (NT – 4, también conocida como NT – 4 / 5 o NT – 5), y 5) la neurotrofina 6 (NT – 6). Ambas familias y sus receptores afines se expresan en las células de la granulosa, las células de la teca y el ovocito (Chang *et al.*, 2019).

Las NT, así como el GDNF, participan y regulan el desarrollo folicular en cada una de las etapas definidas a lo largo de la foliculogénesis, incluido el ensamblaje folicular, la activación del folículo primordial, el crecimiento folicular, la esteroidogénesis, la maduración de los ovocitos, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Chang *et al.*, 2019).

En las células de la granulosa de los folículos preantrales y antrales del ovario de los mamíferos se expresan los componentes del sistema colinérgico, con especial énfasis en los m_1 AChR, así como las NT y el GDNF (Chang *et al.*, 2019; Cuevas *et al.*, 2022; Fritz *et al.*, 1999; Mayerhofer *et al.*, 2006). ¿Existirá alguna conexión entre ambos sistemas?

La secreción de los factores neurotróficos consiste en el incremento de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, tales incrementos son también resultado de la activación de los m_1 AChR en las células de la granulosa (Al – Qudah & Al – Dwairi, 2016; Fritz *et al.*, 1999). Lo que nos lleva a pensar, ¿la activación de los m_1 AChR conlleva a la liberación de los factores neurotróficos?

El bloqueo de los m_1 AChR ováricos puede resultar en numerosas consecuencias, ya que su activación implica la estimulación de la fosfolipasa C, la inhibición de la hidrólisis del AMPc, la activación de los canales de K^+ y Cl^- y la inhibición de la corriente M en neuronas simpáticas (Enz, 2007). Tales consecuencias podrían estar relacionadas directamente con el bloqueo de la señal ovárica, es decir, se requiere de una señal que inicie en el ovario derecho, con la activación de los m_1 AChR y la subsecuente cascada de señalización, que su objetivo sea la estimulación de la ovulación en el ovario izquierdo. Lo anterior podría implicar la síntesis de factores locales (¿factores neurotróficos?) y de esta manera la señal llegaría a la gónada izquierda (Figura 36).

Morán *et al.* (2005), mostraron que al inyectar el marcador True Blue en la cavidad bursal ovárica derecha, únicamente se marcaron neuronas ipsilaterales del CSMG, al contrario, cuando se inyectó el mismo marcador en el lado izquierdo, se marcaron neuronas tanto ipsi como contralaterales de dicho complejo. Lo que indica que el ovario derecho recibe información unilateral, mientras que el ovario izquierdo recibe información bilateral.

Aunado a ello, *Tóth et al. (2007)* reportaron asimetría morfológica en la inervación supraespinal del ovario izquierdo y derecho. Sus datos indicaron que las conexiones neurales entre el ovario izquierdo y las estructuras cerebrales, como el núcleo del tracto solitario, el núcleo dorsal del vago, el grupo de células noradrenérgicas A5, los núcleos caudales del rafe, el núcleo paraventricular hipotalámico y el hipotálamo lateral son más abundantes que las que se encuentran entre estos grupos celulares y el ovario derecho.

Tomando en conjunto ambos antecedentes, podríamos pensar que la información que proviene del ovario derecho se deba integrar en el SNC, ya que existe el vínculo neural entre los ovarios y el hipotálamo. Ejemplo de la relevancia del hipotálamo en las funciones ováricas, particularmente en la ovulación, es el trabajo realizado por *Cruz et al. (1989)*, ya que mostraron que el implante unilateral de cristales de atropina en POA – AHA izquierda o derecha a las 13:00 h en diestro 1 bloqueó la ovulación.

El hecho de que se haya presentado la disminución del número de ovocitos liberados y no el bloqueo de la ovulación podría deberse a la atenuación de la señal ovárica, en otras palabras, se estaría liberando una concentración baja de factores neurotróficos (**Figura 37**), por ende, sí hay una señal que se transmite y que proviene del ovario derecho, probablemente producto de la FSH, ya que tal gonadotropina vía los FSHR3 estimula el incremento de Ca^{2+} intracelular (*Haldar et al., 2022*). Considerando lo anterior, podríamos pensar que tanto la FSH como la ACh actúan en sinergia con el objetivo de liberar moléculas de señalización y enviar la señal al ovario izquierdo.

También existe la posibilidad de que la señal se haya iniciado y transmitido antes y durante las 13:00 h, por lo tanto, el bloqueo de los m_1 AChR cesó tal señal. En este contexto, el ovario izquierdo recibió parcialmente la información, por ende, el desarrollo folicular se vio interrumpido (**Figura 38**). *Ramírez et al. (2020)* reportaron que la laparotomía derecha y la sección del NOS derecho a las 11:00 h en la etapa de diestro 1 resultó en la disminución del número de folículos antrales grandes y preovulatorios respectivamente. Estos resultados apoyan nuestra idea de la interrupción de la señal ovárica iniciada, y con ello, surgen las siguientes preguntas ¿desde qué hora se presenta el envío de señales desde el ovario derecho? ¿Este envío de información neural en la etapa de diestro 1 es continuo desde la mañana hasta las 13:00 h o es intermitente?

Los propuestos anteriores son factibles dado que *Chávez et al. (1987)* mostraron que, la extirpación del ovario derecho resulta en la disminución de la tasa de animales ovulantes (16 / 38 animales, 42 %), *ergo*, bloqueo de la ovulación, mientras que no se presentan diferencias significativas en el mismo parámetro cuando se extirpó el ovario izquierdo (27 / 32 animales, 84 %).

No podríamos asegurar que el NOS es la única vía por la cual se envía dicha información al ovario contralateral, también se podría enviar vía nervio vago al SNC, se procesaría y sería devuelta a los ovarios por vías simpáticas y parasimpáticas, sin descartar el envío de la información por ambas rutas.

En resumen, las consecuencias mencionadas debido al bloqueo de los m₁AChR efecto de la microinyección de 1 μL [4.5 μmol / L] de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica derecha, podrían derivar en la disminución o el bloqueo de la liberación de los factores neurotróficos en la gónada derecha, tales alteraciones resultarían en la interrupción de la señal ovárica necesaria y, por ende, el ovario izquierdo no recibiría la información completa, lo cual se traduce en la disminución del número de ovocitos liberados (**Figura 37 y 38**).

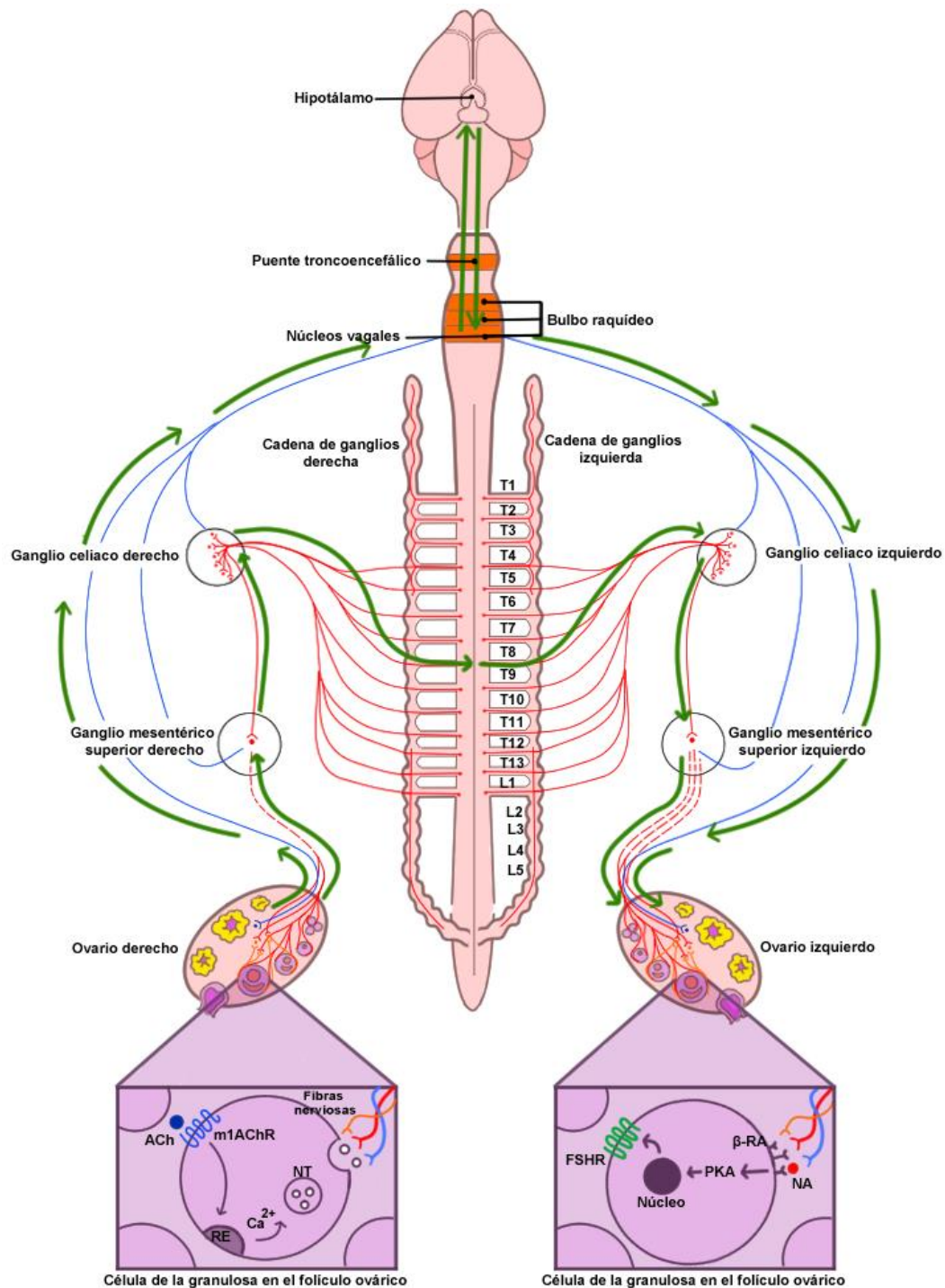


Figura 36. Vías de comunicación entre los ovarios en animales del grupo intacto. De color azul se representa la innervación parasimpática (nervio vago), de color rojo la innervación simpática (nervio ovárico superior y plexo del nervio ovárico) y de color naranja las neuronas ováricas. Las líneas continuas representan las neuronas preganglionares, las líneas discontinuas a las neuronas posganglionares y las líneas verdes indican la ruta y la dirección del envío de la información (ver texto para más información). **ACh:** acetilcolina. **β-RA:** receptor betaadrenérgico. **FSHR:** receptor a la hormona estimulante de los folículos. **L:** segmento lumbar. **m₁AChR:** receptor muscarínico M1. **NA:** noradrenalina. **NT:** neurotrofinas. **T:** segmento torácico. **PKA:** proteína cinasa A. **RE:** retículo endoplasmático.

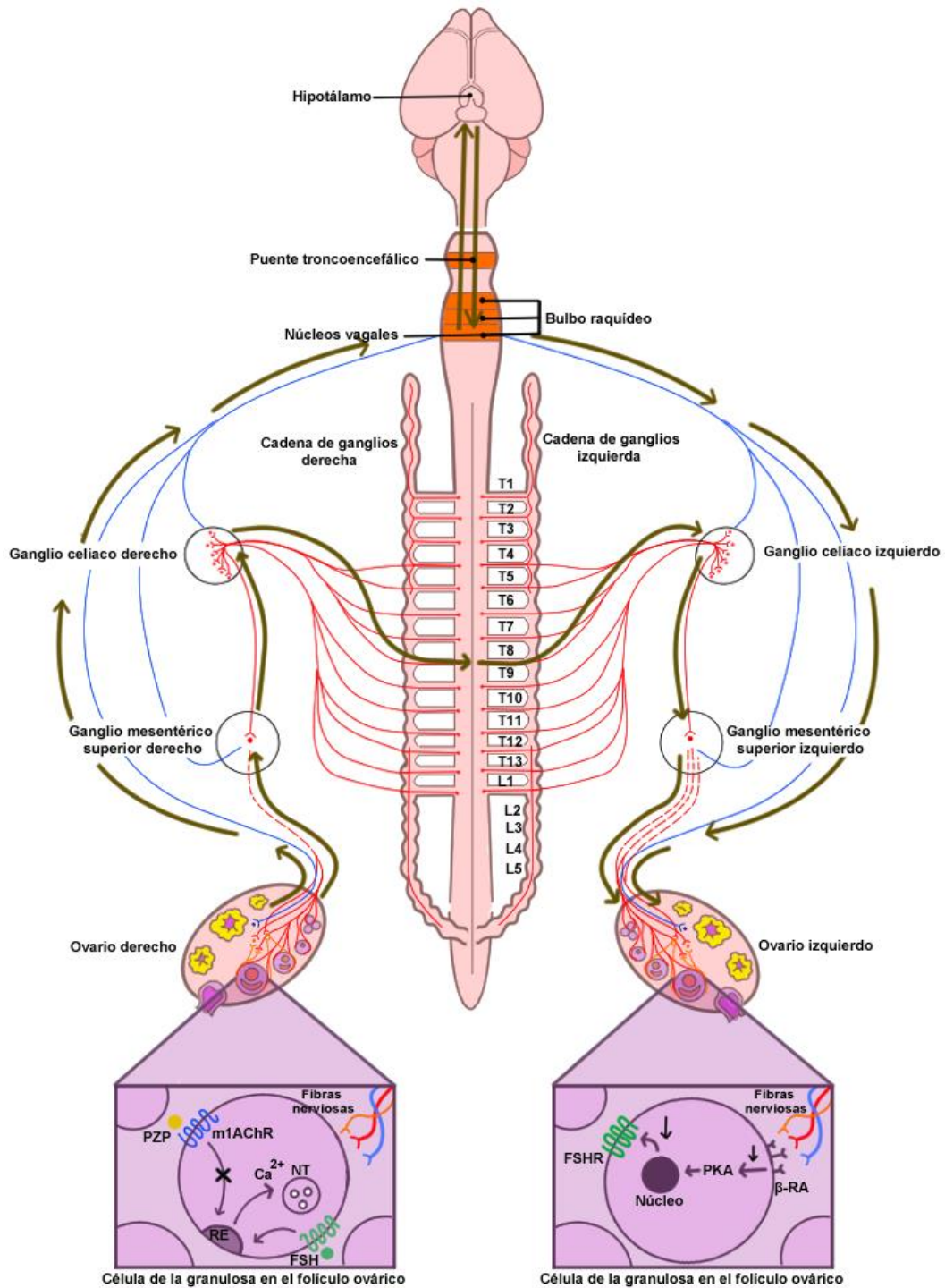


Figura 37. Respuesta ovulatoria en animales con bloqueo unilateral de los receptores muscarínicos M1. De color azul se representa la inervación parasimpática (nervio vago), de color rojo la inervación simpática (nervio ovárico superior y plexo del nervio ovárico) y de color naranja las neuronas ováricas. Las líneas continuas representan las neuronas preganglionares, las líneas discontinuas a las neuronas posganglionares y las líneas café indican la ruta y la dirección del envío de la información atenuada (ver texto para más información). **β-RA:** receptor betaadrenérgico. **FSHR:** receptor a la hormona estimulante de los folículos. **L:** segmento lumbar. **m₁AChR:** receptor muscarínico M1. **NA:** noradrenalina. **NT:** neurotrofinas. **T:** segmento torácico. **PKA:** proteína cinasa A. **PZP:** pirenzepina. **RE:** retículo endoplasmático.

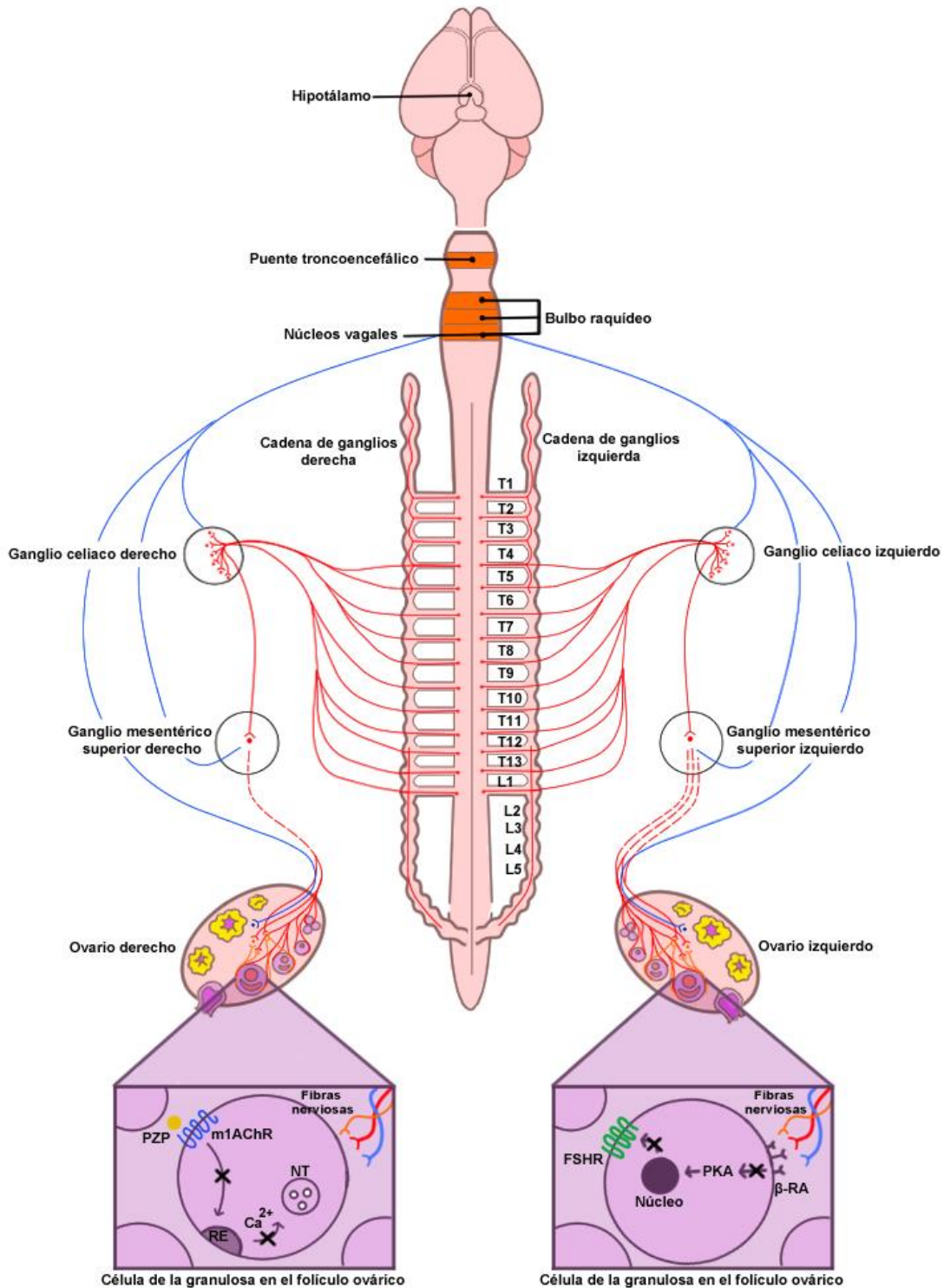


Figura 38. Respuesta ovulatoria en animales con bloqueo unilateral de los receptores muscarínicos M1. De color azul se representa la inervación parasimpática (nervio vago), de color rojo la inervación simpática (nervio ovárico superior y plexo del nervio ovárico) y de color naranja las neuronas ováricas. Las líneas continuas representan las neuronas preganglionares y las líneas discontinuas a las neuronas posganglionares. **β -RA:** receptor betaadrenérgico. **FSHR:** receptor a la hormona estimulante de los folículos. **L:** segmento lumbar. **m₁AChR:** receptor muscarínico M1. **NA:** noradrenalina. **NT:** neurotrofinas. **T:** segmento torácico. **PKA:** proteína cinasa A. **PZP:** pirenzepina. **RE:** retículo endoplasmático.

¿Cómo se explica la disminución del número de ovocitos liberados por el ovario ipsilateral y el incremento subsecuente del mismo parámetro por el ovario contralateral en la etapa de diestro 2?

La ACh actúa mediante sus mAChR en las células de la granulosa y los ovocitos (Mayerhofer & Kunz, 2005).

Las células de la granulosa en los folículos en crecimiento están acopladas mediante uniones gap. Dichas células proliferan a un ritmo elevado, en los folículos antrales grandes las células de la granulosa aumentan hasta aproximadamente 60 millones antes de la ovulación. No se comprende cómo, la proliferación y el acoplamiento gap pueden coexistir en tales células, ya que las células en proliferación, por regla general, no presentan uniones gap (la comunicación gap activa generalmente es inversamente relacionada con la proliferación celular) (Fritz *et al.*, 2002; Mayerhofer & Kunz, 2005).

Ante esta interrogante, Fritz *et al.* (2002) mostraron que la adición de carbacol; un agonista muscarínico, resultó en la fosforilación del residuo de la serina de la conexina 43 (Cx43), la principal proteína de unión gap en las células de la granulosa y, por lo tanto, un desacoplamiento de esta comunicación. La fosforilación de la Cx43 en los residuos de serina es una consecuencia de la acción de la PKA o PKC. En las células de la granulosa, la estimulación de los mAChR aumenta las concentraciones de Ca²⁺ intracelular y activa a la PKC. Es probable que el desacoplamiento anteceda a la proliferación celular (Figura 39).

En el contexto del folículo, lo anterior podría indicar que, a través de la acción local en las células de la granulosa adyacentes, la ACh inhibe el acoplamiento y, por lo tanto, permita que las células de la granulosa escapen del sincitio funcional del folículo y proliferen, de esta manera, la ACh actúa como un factor trófico en las células de la granulosa en crecimiento (Mayerhofer & Kunz, 2005).

Con el fin de reforzar la idea anterior, el estudio realizado por Urra *et al.* (2016), en donde administraron huperzina A; un inhibidor de la AChE, en la cavidad bursal ovárica izquierda en ratas hemiovariectomizadas durante cuatro semanas resultó en el aumento de las concentraciones de ACh en el ovario y una tendencia a un mayor número de folículos secundarios preantrales, sin cambios en el número de folículos primordiales y primarios. Además, el mismo tratamiento incrementó el número de cuerpos lúteos y, por ende, el número de crías nacidas. Con estos resultados, los autores sugieren que el efecto de la ACh se centra en la promoción del crecimiento de los folículos primarios.

Aunado a ello, Cuevas *et al.* (2022) mostraron que la administración de atropina, en la cavidad bursal ovárica izquierda en ratas con hemiovariectomía después de cuatro semanas resultó en el incremento de folículos antrales atrésicos. De esta forma, se reafirma la función trófica de la ACh en células de la granulosa.

Tomando en conjunto los estudios mencionados, es posible que el bloqueo de los m_1 AChR en el ovario izquierdo impida la fosforilación del residuo de serina de la proteína Cx43 de las uniones gap en las células de la granulosa. Sin el desacoplamiento, estas células no son capaces de proliferar y por lo tanto los folículos ováricos en crecimiento no llegarían a la etapa preovulatoria. La razón por la cual se presenta la disminución de la ovulación y no el bloqueo, podría ser porque la FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa vía FSHR3 (Haldar *et al.*, 2022).

La respuesta adyacente a la disminución fue el incremento de ovocitos liberados por el ovario derecho; en el contexto reproductivo, lo que quiere decir es que la afectación de la ovulación en un ovario resulta en la comunicación y la compensación de esta por el ovario contrario (**Figura 40**).

La compensación del ovario derecho ha sido reportada por Chávez & Domínguez (1994), ya que mostraron que el ovario derecho presentó hipertrofia compensatoria cuando se extirpó el ovario izquierdo en la etapa de diestro 2. Aunado a ello, los mismos autores indican que la hipertrofia ovárica compensatoria en animales con sección del NOS que inervaba al ovario derecho *in situ* disminuyó cuando la cirugía se realizó de igual manera en diestro 2. Con los resultados anteriores, surge la pregunta, si se realiza la sección unilateral del NOS en animales con microinyección de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda, ¿disminuiría la respuesta ovulatoria observada en el presente estudio? Es decir, ¿la información que se origina en el ovario izquierdo viaja particularmente por el NOS con la finalidad de llegar al ovario derecho?

¿Cómo se compensa la ovulación por el ovario derecho? Las fibras nerviosas simpáticas son la principal fuente de noradrenalina en el ovario (Cuevas *et al.*, 2022), dicho neurotransmisor estimula la expresión de los FSHR en las células de la granulosa (Mayerhofer *et al.*, 1997); de esta manera, la señal que se enviaría vía NOS podría culminar en la estimulación de la expresión de tal receptor y el reclutamiento de más folículos para la próxima ovulación (**Figura 40**).

En resumen, nuestros resultados concuerdan con la función trófica de la ACh propuesta por diversos autores (Cuevas *et al.*, 2022; Fritz *et al.*, 2002; Urra *et al.*, 2016). El bloqueo de los m_1 AChR producto de la microinyección de 1 μ L [4.5 μ mol / L] de dicloruro de pirenzepina en la cavidad bursal ovárica izquierda interrumpe la proliferación celular, *ergo*, se presenta menor número de folículos preovulatorios, lo que conlleva a una menor liberación de ovocitos. Adicionalmente, inferimos que estas alteraciones en el desarrollo folicular se registrarían por las neuronas del mismo ovario, lo que implicaría la síntesis de factores locales (¿factores neurotróficos?) y dicha respuesta se enviaría al ovario derecho. No obstante, persiste la incógnita de la ruta por la cual viaja esta información de un ovario a otro, aunque, de acuerdo con estudios anteriores (Chávez & Domínguez, 1994), podríamos proponer que es a través del NOS, sin descartar el nervio vago o ambos (**Figura 40**).

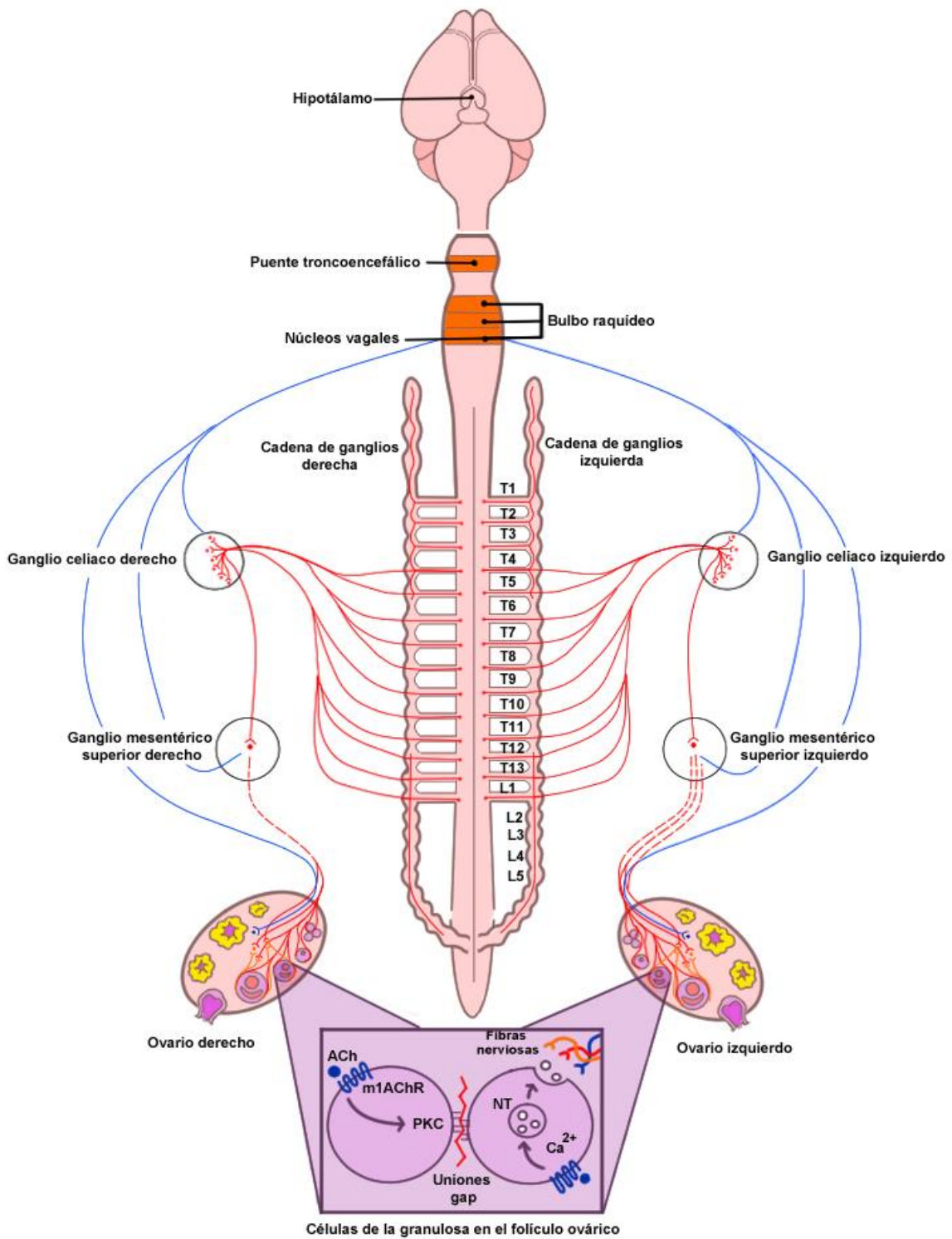


Figura 39. Vías de comunicación en los animales del grupo intacto. De color azul se representa la inervación parasimpática (nervio vago), de color rojo la inervación simpática (nervio ovárico superior y plexo del nervio ovárico) y de color naranja las neuronas ováricas. Las líneas continuas representan las neuronas preganglionares y las líneas discontinuas a las neuronas posganglionares. **ACh:** acetilcolina. **L:** segmento lumbar. **m₁AChR:** receptor muscarínico M1. **NT:** neurotrofinas. **T:** segmento torácico. **PKC:** proteína cinasa C.

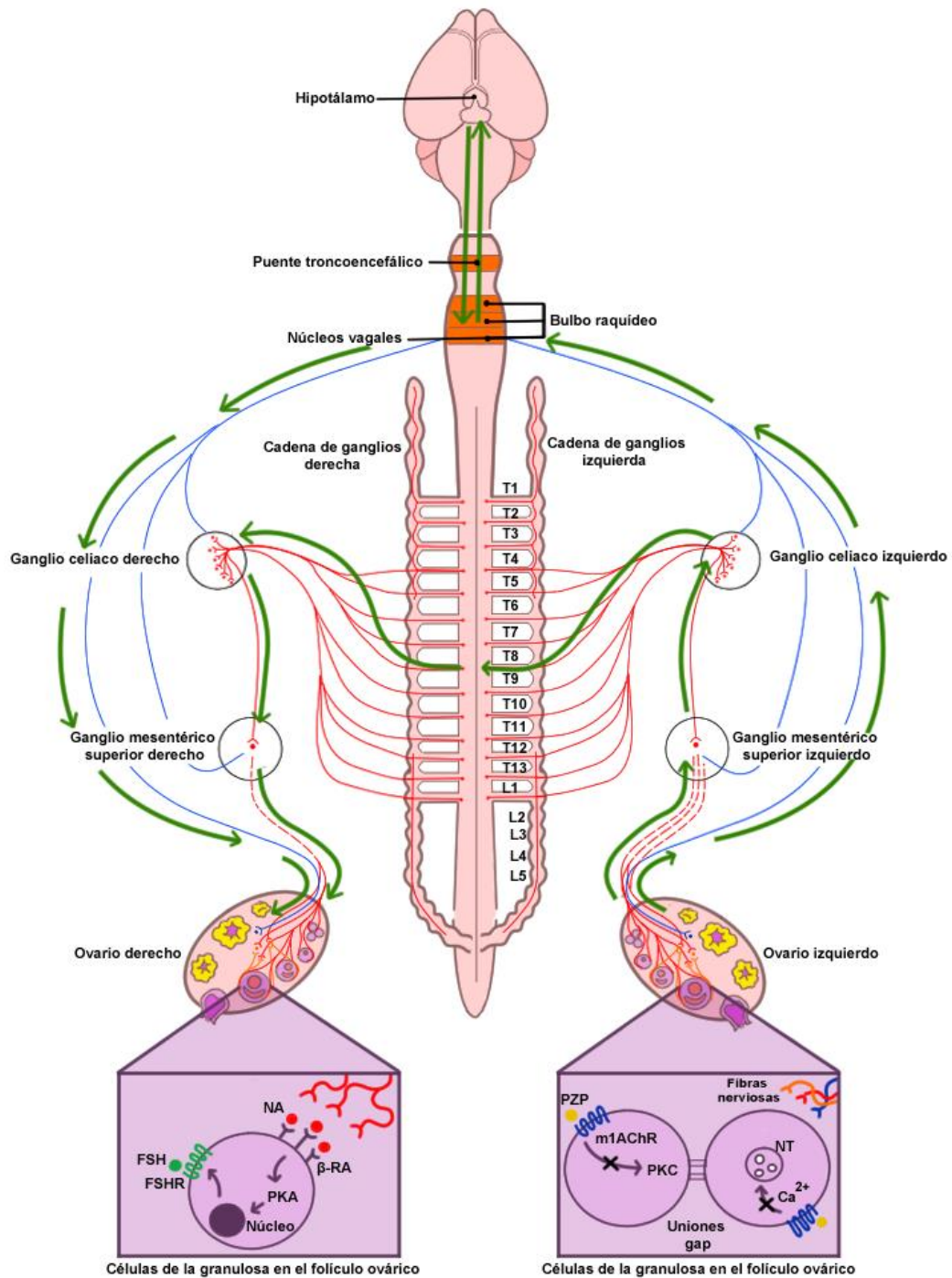


Figura 40. Respuesta ovulatoria en animales con bloqueo unilateral de los receptores muscarínicos M1. De color azul se representa la inervación parasimpática (nervio vago), de color rojo la inervación simpática (nervio ovárico superior y plexo del nervio ovárico), de color naranja las neuronas ováricas. Las líneas continuas representan las neuronas preganglionares y las líneas discontinuas a las neuronas posganglionares y las líneas verdes indican la ruta y la dirección del envío de la información (ver texto para más información). **β-RA:** receptor betaadrenérgico. **FSH:** hormona estimulante de los folículos. **FSHR:** receptor a la hormona estimulante de los folículos. **L:** segmento lumbar. **m₁AChR:** receptor muscarínico M1. **NA:** noradrenalina. **NT:** neurotrofinas. **T:** segmento torácico. **PKA:** proteína cinasa A. **PKC:** proteína cinasa C. **PZP:** pirenzepina.

CONCLUSIONES

El uso del *isoflurano* a las 13:00 h no altera los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación, independientemente de la etapa del ciclo estral en el que se utilice.

La microinyección unilateral de solución salina al 0.9 % en la cavidad bursal ovárica a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral no afecta la ovulación.

A las 13:00 h en la etapa de diestro 1, el sistema colinérgico del ovario derecho, vía m_1 AChR, regula de manera estimulante la ovulación del ovario contralateral.

A las 13:00 h en la etapa de diestro 2, la unión de la ACh a sus m_1 AChR en el ovario izquierdo estimula la ovulación. Adicionalmente, el ovario derecho es capaz de compensar la ovulación del ovario contralateral.

REFERENCIAS

- Adams, G. P. & Ratto, M. (2013). Ovulation – inducing factor in seminal plasma: a review. *Animal Reproduction Science*, 136, 148 – 156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.004>
- Al – Qudah, M. A. & Al – Dwairi, A. (2016). Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion. *Neurosciences*, 21(4). 306 – 313. <https://doi.org/10.17712/nsj.2016.4.20160080>
- Albertini, D. F. (2015). The mammalian oocyte. En. T. M. Plant & A. Zeleznik (eds.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (4.^a ed., vol. 1, pp. 59 - 97). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2011-1-07288-0>
- Aritonang, T. R., Rahayu, S., Sirait, L. I., Karo, M. B., Simanjuntak, T. P., Sinrang, A. W., Massi, M. N., Hatta, M. & Kamelia, E. (2017). The role of FSH, LH, estradiol and progesterone hormone on estrus cycle of female rats. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 35(1), 92 – 100.
- Bales, K. L. & Hostetler, C. M. (2011). Hormones and reproductive cycles in rodents. En David O. Norris & Kristin H. López (eds.), *Hormones and reproduction of vertebrates* (pp. 215 – 240). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374928-4.10011-2>
- Bernard, D. J. & Brûlé, E. (2020). Anterior pituitary: glycoprotein hormones from gonadotrope (FSH and LH) and thyrotrope (TSH) cells. En. G. Litwack (ed.), *Hormonal signaling in biology and medicine: comprehensive modern endocrinology* (pp. 119 - 144). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813814-4.00007-9>
- Berthoud, H. R. & Powley, T. L. (1996). Interaction between parasympathetic and sympathetic nerves in prevertebral ganglia: morphological evidence for vagal efferent innervation of ganglion cells in the rat. *Microscopy research and technique*, 35(1), 80 – 86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19960901\)35:1<80::AID-JEMT7>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19960901)35:1<80::AID-JEMT7>3.0.CO;2-W)
- Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Brinsko, S. P. & Rigby, S. L. (2003). *Manual of equine reproduction*. Mosby <https://doi.org/10.1016/B0-323-01713-4/X5001-8>
- Bliss, S. P., Navratil, A. M., Xie, J. & Roberson, M. S. (2010). GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(3), 322 – 340. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.04.002>
- Boyd, K. L., Muehlenbachs, A., Rendi, M., Garcia, R. L. & Gibson – Corley, K. N. (2018). Female reproductive system. En. P. M. Treuting., S. M. Dintzis & K. S. Montie (eds.), *Comparative anatomy and histology: a mouse, rat, and human atlas* (2.^a ed., pp. 303 - 334). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802900-8.00017-8>

-
- Burden, H. W., Leonard, M., Smith, C. P. & Lawrence, I. E. (1983). The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *The Anatomical Record*, 207(4), 623 – 627. <https://doi.org/10.1002/ar.1092070410>
- Cardona, E. F. (2000). Manejo de líquidos en el paciente quirúrgico. *IATREIA*, 13(4), 221 – 229.
- Chang, H. M., Wu, H. C., Sun, Z. G., Lian, F. & Leung, P. C. K. (2019). Neurotrophins and glial cell line – derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Human Reproduction Update*, 25(2), 224 – 242. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy047>
- Chávez, R. & Domínguez, R. (1994). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology*, 140(2), 197 – 201. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1400197>
- Chávez, R., Cruz, M. E. & Domínguez, R. (1987). Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: effect of ipsi – and contralateral vagus nerves on the remaining ovary. *Journal of endocrinology*, 113(3), 397 – 401. 1 <https://doi.org/0.1677/joe.0.1130397>
- Conti, M., & Chang, R. J. (2016). Folliculogenesis, ovulation, and luteogenesis. En. L. Larry Jameson., Leslie J. De Groot., David M. de Krestser., Linda C. Giudice., Ashley B. Grossman., Sholmo Melmed., John T. Potts & Gordon C. Weir (eds.), *Endocrinology: Adult and Pediatric*, (pp. 2179 – 2191.e3.). Saunders <https://doi.org/doi:10.1016/b978-0-323-18907-1.00125-6>
- Contreras, G., Gutiérrez, M. I. & Flores, A. (2021). La anestesia con *isoflurano* a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral no participa en la regulación de la ovulación en la rata adulta. XXVII Foro de investigación escolar en biología, en tiempos de pandemia.
- Counis, R., Laverrière, J. N., Garrel, G., Bleux, C., Cohen-Tannoudji, J., Lerrant, Y., Kottler, M. L. & Magre, S. (2005). Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. *Reproduction Nutrition Development*, 45(3), 243 - 254. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005017>
- Cruz, M. E., Castro, J. & Domínguez, R. (1992). A comparative análisis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic – anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Endocrinology*, 133(2), 205 – 2010. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1330205>
- Cruz, M. E., Flores, A. & Domínguez, R. (2014). The cholinergic system of the preoptic – anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way. *Endocrine* 47, 913 – 922. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0266-2>

-
- Cruz, M. E., Flores, A., Alvarado, B. E., Hernández, C. G., Zárata, A., Chavira, R., Cárdenas, M., Arrieta Cruz, I. & Gutiérrez – Juárez, R. (2015). Ovulation requires the activation on proestrus of M1 muscarinic receptors in the left ovary. *Endocrine*, 49, 809 – 819. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0524-3>
- Cruz, M. E., Flores, A., Palafox, M.T., Meléndez, G., Rodríguez, J.O., Chavira, R. & Domínguez, R. (2006). The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 43. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-43>
- Cruz, M. E., Jaramillo, L.P. & Domínguez, R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of Endocrinology*, 123(3), 437 – 439. <https://doi.org/0.1677/joe.0.1230437>
- Cruz, M. E., Villegas, G., Domínguez - González, A., Chavira, R. & Domínguez, R. (2001). Ovulation delay induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus - 1, is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior – hypothalamic area of the rat. *Brain Research Bulletin*, 54, 339 – 344.
- Cuevas, F. C., Bastias, D., Alanis, C., Benitez, A., Squicciarini, V., Riquelme, R., Sessenhausen, P., Mayerhofer, A. & Lara, H. E. (2022). Muscarinic receptors in the rat ovary are involved in follicular development but not in steroid secretion. *Physiological Reports*, 10(21), e.15474. <https://doi.org/10.14814/phy2.15474>
- Dissen, G. A., Paredes, A., Romero, C., Dees, W. & Ojeda, S. R. (2004). Neuronal and neurotrophic control of ovarian development. En. P. C. K. Leung & E. Y. Adashi, (eds.), *The ovary* (2.^a ed., pp. 3 – 23). Academic Press.
- Domínguez, R. & Cruz – Morales, S. E. (2011). The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinology & Metabolic Syndrome*, 5:4. <https://doi.org/10.4172/2161-1017.S4-001>
- Domínguez, R., Chávez, R., & Cruz, M. E. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: R. Domínguez. *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción* (pp. 160 – 188). México: Miguel Ángel Porrúa.
- Domínguez, R., Cruz, M. E. & Morán, C. (1998). Differential effects of ovarian local anaesthesia during pro – oestrus on ovulation by the right or left ovary in normal and hemi – ovariectomized adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 113(2), 185 – 190. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1130185>
- Domínguez, R., Morales, L. & Cruz, M. E. (2003). Ovarian Asymmetry. *Annual Review of Biomedical Data Science*, 5, 95 – 104.

-
- Domínguez, R., Riboni, L., Zipitria, D. & Revilla, R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *Journal of Endocrinology*, 95, 175 – 180. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0950175>
- English, B. A. & Jones, C. K. (2012). Cholinergic neurotransmission. En: D. Robertson, G. Burnstock, J. F. R. Paton, I. Biaggioni & P. A. Low, (eds.), *Primer on the autonomic nervous system* (3.^a ed., pp. 71 – 74). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00014-7>
- Enz, A. (2007). M1 muscarinic acetylcholine receptor. En: S. J. Enna & D. B. Bylund (eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp. 1 – 7). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60210-7>
- Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación, 22 de agosto de 2001.
- Everett, J. W. & Sawyer, C. H. (1953). Estimated duration of the spontaneous activation which causes release of ovulating hormone from the rat hypophysis. *Endocrinology*, 52, 83 – 92. <https://doi.org/10.1210/endo-52-1-83>
- Everett, J. W., Sawyer, C. H. & Markee, J. E. (1949). A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 44, 234 – 250. <https://doi.org/10.1210/endo-44-3-234>
- Findlay, J. K. (2003). Folliculogenesis. En: H. L. Henry & A. W. Norman (eds.), *Encyclopedia of hormones* (pp. 653 – 656). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-341103-3/00141-8>
- Flores, A., Meléndez, G., Palafox, M. T., Rodríguez, J. O., Barco, A. I., Chavira, R., Domínguez, R. & Cruz, M. E. (2005). The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian – adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine* 28, 145 – 151.
- Flores, A., Rodríguez, J., Palafox, M., Meléndez, G., Barco, A., Chavira, R., Cruz, M. E. & Domínguez, R. (2006). The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4,10. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-1>
- Flores, M. E. & Segura, J. E. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 6(4), 315 – 326.
- Fritz, S., Föhr, K. J., Boddien, S., Berg, U., Brucker, C. & Mayerhofer, A. (1999). Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline acetyltransferase and

vesicular acetylcholine transporter in human granulosa – luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(5), 1744 – 1750. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.5.5648>

Fritz, S., Grünert, R., Stocco, D. M., Hales, D. B. & Mayerhofer, A. (2001a). StAR protein is increased by muscarinic receptor activation in human luteinized granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171(1 – 2), 49 – 51. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(00\)00420-2](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(00)00420-2)

Fritz, S., Kunz, L., Dimitrijevic, N., Grünert, R., Heiss, C. & Mayerhofer, A. (2002). Muscarinic receptors in human luteinized granulosa cells: activation blocks gap junctions and induces the transcription factor early growth response factor – 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(3), 1362 – 1367. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.3.8326>

Fritz, S., Wessler, I., Breitling, R., Rossmanith, W., Ojeda, S. R., Dissen, G. A., Amsterdam, A. & Mayerhofer, A. (2001b). Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(1), 349 – 354. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.1.7146>

Gerandai, I., Kocsis, K. & Halász, B. (2002). Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. *Microscopy research and technique*, 59(6), 474 – 483. <https://doi.org/10.1002/jemt.10225>

Goodman, R. L., Coolen, L. M. & Lehman, M. N. (2014). Unraveling the mechanism of action of the GnRH pulse generator: a possible role for kisspeptin / neurokinin B / dynorphin (KNDy) neurons. En. A. Ulloa – Aguirre & P. M. Conn (eds.), *Cellular endocrinology in health and disease* (pp- 133 - 152). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-408134-5.00009-3>

Gore, A. C. (2013). Neuroendocrine systems. En. L. R. Squire, F. E. Bloom, A. Ghosh, D. Berg, S. du Lac & N. C. Spitzer (eds.), *Fundamental neuroscience* (4.^a ed., pp. 717 - 727). Academic Press.

Grando, S. A., Kawashima, K. & Wessler, I. (2003). Introduction: the non – neuronal cholinergic system in humans. *Life Sciences*, 72(18-19), 2009 – 2012. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00063-8)

Halász, B. (2004). Anatomy of hypothalamus. En. I. Huhtaniemi & L. Martini (eds.), *Encyclopedia of endocrine diseases* (2.^a ed., vol. 2, pp. 707 – 715). Academic Press.

Haldar, S., Agrawal, H., Saha, S., Straughn, A. R., Roy, P. & Kakar, S. (2022). Overview of follicle stimulating hormone and its receptors in reproduction and in stem cells and cancer stem cells. *International Journal of Biological Sciences*, 18(2), 675 – 692. <https://doi.org/doi/10.7150/ijbs.63721>

-
- Hannon, P. R. & Curry, T. E. (2018). Folliculogenesis. En. M. K. Skinner (ed.), *Encyclopedia of reproduction* (2^a ed., vol. 2., pp. 72 – 79). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64628-7>
- Henning, J. (2001). Hypothalamus. En. N. J. Smelser & P. B. Baltes (eds.), *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences* (pp. 7113 – 7118). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043076-7/03468-9>
- Herbison, A. E. (2015). Physiology of the adult gonadotropin releasing hormone neuronal network. En. T. M. Plant & A. Zeleznik (eds.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (4.^a ed., pp. 399 - 467). Academic Press.
- Herbison, A. E. (2020). A simple model of estous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 57, 2 - 9. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2020.100837>
- Hirshfield, A. N. & Midgley, A. R. (1978). Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology Of Reproduction*, 19(3), 597 – 605. <https://doi.org/10.1095/biolreprod19.3.597>
- Hosotani, M., Ichii, O., Nakamura, T., Namba, T., Islam, R., Eleva, Y. H. A., Watanabe, T., Ueda, H. & Kon, Y. (2021). Anatomy and histology of the foramen of ovarian bursa opening to the peritoneal cavity and its changes in autoimmune disease – prone mice. *Journal of Anatomy*, 238, 73 – 85. <https://doi.org/10.1111/joa.13299>
- Jewell, R. (2007). Pirenzepine. En. S. J. Enna & D. B. Bylund (eds.), *xPharm: the comprehensive pharmacology reference* (pp. 1 – 5). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-055232-3.62429-8>
- Jones, R. E. & López, K. H. (2014). *Human reproductive biology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382184-3.00001-5>
- Khazeni, S. & Varamini, P. (2018). Gonadotropin releasing hormone. *Reference Module in Biomedical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.98031-0>
- Klein, C. M. & Burden, H. W. (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters*, 85(2), 217 – 222. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90354-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90354-0)
- Lawrence, I. E. & Burden, H. W. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*, 196(1), 51 – 59. <https://doi.org/10.1002/ar.1091960106>

-
- Lee – Parritz, D. (2013). Animal surgery and care of animals. En. B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen & J. E. Lemons (eds.), *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine* (3.^a ed., pp. 635 – 652). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00056-5>
- Levine, J. E. (2015). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En. T. M. Plant & A. Zeleznik (eds.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (4.^a ed., vol. 1, pp. 1199 – 1267). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2011-1-07288-0>
- Lewis, R. & Downes, N. (2019). *Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research*. Academic Press.
- Martin, G. G., Sack, M. & Talbot, P. (1981). The structure of bursae ovaricae surrounding the ovaries of the golden hamster. *The Anatomical Record*, 201, 485 – 498. <https://doi.org/10.1002/ar.1092010306>
- Mayerhofer, A. & Kunz, L. (2005). A non – neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Annals of Anatomy*, 187(5 – 6), 521 – 528. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2005.06.005>
- Mayerhofer, A., Dimitrijevic, N. & Kunz, L. (2003). The expression and biological role of the non – neuronal cholinergic sistema in the ovary. *Life Sciences*, 72, 2039 – 2045. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00081-X)
- Mayerhofer, A., Dissen, G. A., Costam M. E & Ojeda, S. R. (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. <https://doi.org/10.1210/endo.138.8.5335>
- Mayerhofer, A., Kunz, L., Krieger, A., Proskocil, B., Spindel, E., Amsterdam, A., Dissen, G. A., Ojeda, S. R. & Wessler, I. (2006). FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4, 37. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-37>
- McCartney, C. R. & Marshall, J. C. (2014). Neuroendocrinology of reproduction. En. J. F. Strauss & R. L. Barbieri (eds.), *Yen & Jaffe's reproductive endocrinology* (7.^a ed., pp. 3 - 26. e8). Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2758-2.00001-9>
- Merino, P. (2019). *Chemical biology of neurodegeneration: a molecular approach*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527813421>
- Mescher, A. L. (2018). *Junqueira's basic histology: text and atlas* (15^a ed). McGraw – Hill Education.
- Millar, R. P. (2006). Gonadotropin releasing hormone. En. A. J. Kastin (ed.), *Handbook of biologically active peptides* (pp. 635 - 644). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012369442-3/50093-3>

-
- Monniaux, D., Cadoret, V., Clément, F., Dalbies - Tran, R., Elis, S., Fabre, S., Maillard, V., Monget, P., Uzbekova, S. (2019). Folliculogenesis. En. I. Huhtaniemi & L. Martini (eds.), *Encyclopedia of endocrine diseases* (2.^a ed., vol. 2., pp. 377 – 398). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64550-6>
- Morán, C., Franco, A., Morán, J. L., Handal, A., Morales, L. & Domínguez, R. (2005). Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac – superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*, 26(2), 147 – 152. <https://doi.org/10.1385/ENDO:26:2:147>
- Morán, J. L., Handal, A., Díaz, A. & Pavón, S. (2016). La mezcla anestésica Ketamina – Xilacina afecta la función ovárica e incide en el ciclo estral de la rata. *Revista de Sistemas Experimentales*, 3(6), 24 – 36.
- Ong – Sio, L. C., Varbanova, M. & Bautista, A. (2022). Isoflurane: mechanisms and applications. En. E. Rajendram, V. B. Patel, V. R. Preedy & C. R. Martin (eds.), *Treatments, mechanisms, and adverse reactions of anesthetics and analgesics* (pp. 101 – 108). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820237-1.00011-9>
- Pangas, S. A. & Rajkovic, A. (2015). Follicular development: mouse, sheep, and human models. En. T. M. Plant & A. Zeleznik (eds.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (4.^a ed., vol. 1, pp. 947 - 995). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2011-1-07288-0>
- Picciotto, M. R., Higley, M. J. & Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116 – 129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>
- Prado, M. A. M., Reis, R. A. M., Prado, V. F., Mello, M. C., Gomez, M. V. & Mello, F. G. (2002). Regulation of acetylcholine synthesis and storage. *Neurochemistry International*, 41(5), 291 – 299. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00044-X](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00044-X)
- Ramírez, D. A., Vieyra, E., Rosas, G., Linares, R., Espinoza, J. A., Chaparro, A., Domínguez, R. & Morales – Ledesma, L. (2020). Role of the superior ovarian nerve in the regulation of follicular development and steroidogenesis in the morning of diestrus 1. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(6), 1477 – 1488. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01787-6>
- Richards, J. S., Liu, Z. y Shimada, M. (2015). Ovulation. En. T. M. Plant, A. Zeleznik, D. F. Albertini, R. L. Goodman, A. E. Herbison, M. M. McCarthy, L. J. Muglia, J. S. Richards (Eds.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (4^a ed., Vol. 1, pp. 997 – 1021). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2011-1-07288-0>

-
- Ross, M. H. & Pawlina, W. (2015). *Histología, texto y atlas: correlación con biología molecular y celular* (7ª ed.). Wolters Kluwer.
- Russell, D. L. & Robker, R. L. (2019). Ovulation: the coordination of intrafollicular networks to ensure oocyte release. En. P. C. K. Leung & E. Y. Adashi (eds.), *The ovary* (2.ª ed., pp 217 – 234). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00014-5>
- Saper, C. B. & Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. *Current Biology*, 24(23), R1111 - R1116. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.10.023>
- Silverthorn, D. U. (2019). *Fisiología humana: un enfoque integrado*. (8.ª ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Simonneaux, V. & Bahougne, T. (2015). A multi – oscillatory circadian system times female reproduction. *Frontiers in Endocrinology*, 6(157). <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00157>
- Smith, M. S., Freeman, M. E. & Neill, J. D. (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 – 226. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-219>
- Strauss, J. F. & Williams, C. J. (2019). Ovarian life cycle. En. J. F. Strauss & R. L. Barbieri (eds.), *Yen & Jaffe's reproductive endocrinology* (8.ª ed., pp. 167 – 205.e9). Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00008-1>
- Stringer, J. L. (2011). *Basic concepts in pharmacology: what you need to know for each drug class*. (4.ª ed.). McGraw-Hill.
- Szmelskyj, I., Aquilina, L., & Szmelskyj, A. O. (2015). Anatomy and physiology of the reproductive system. *Acupuncture for IVF and Assisted Reproduction*, 23 – 58. <https://doi.org/doi:10.1016/b978-0-7020-5010-7.00002-3>
- Taylor, P. & Brown, J. H. (2006). Acetylcholine. En. G. Siegel, R. W. Albers, S. Brady & D. Price, (eds.), *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects* (7.ª ed., pp. 185 – 209). Academic Press.
- Tiwari, P., Dwivedi, S., Singh, M. P., Mishra, R. & Chandy, A. (2013). Basic and modern concepts on cholinergic receptor: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(5), 413 – 420. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60094-8](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60094-8)

-
- Tóth, I. E., Wiesel, O., Boldogkoi, Z., Bálint, K., Tapaszti, Z. & Gerandai, I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microscopy research and technique*, 70(8), 710 – 718. <https://doi.org/10.1002/jemt.20456>
- Tully, T. N. (2009). Mice and rats, En. Mark. A. Mitchell & Thomas N. Tully (eds.), *Manual of exotic pet practice* (pp. 326 – 344). Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-141600119-5.50015-9>
- Urta, J., Blohberger, J., Tiszavari, M., Mayerhofer, A. & Lara, H. E. (2016). In vivo blockade of acetylcholinesterase increases intraovarian acetylcholine and enhances follicular development and fertility in the rat. *Scientific Receptors*, 6, 30129. <https://doi.org/10.1038/srep30129>
- Vantman, D. & Vega, M. (2010). Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(3), 348 - 362. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70545-9](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70545-9)
- Ventura, A. L. M., Abreu, P. A., Freitas, R. C. C., Sathler, P. C., Loureiro, N. & Castro, H. C. (2010). Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Revista de Psiquiatria Clínica*, 37(2), 66 – 72. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832010000200007>
- Vidal, J. D. & Dixon, D (2018). Ovary. En. A. W. Suttie (ed.), *Boorman's pathology of the rat: references and atlas* (2.^a ed., pp. 523 - 536). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391448-4.00026-5>
- Wessler, I., Kilbinger, H., Bittinger, F., Unger, R. & Kirkpatrick, C. J. (2003). The non – neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sciences*, 72(18 – 19), 2055 – 2061. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00083-3)
- Westfall, T. C. (2009). Cholinergic neurotransmission in the autonomic and somatic motor nervous system. En. L. R. Squire, (ed.), *Encyclopedia of neuroscience* (pp. 827 – 834). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01133-5>
- Westwood, F. R. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375 - 384. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>
- Whitehouse, P. J. (2014). Acetylcholine. En. M. J. Aminoff & R. B. Daroff (eds.), *Encyclopedia of the neurological sciences* (2.^a ed., vol. 1, pp. 19 - 21). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00039>
- Wiedeman, A. M., Barr, S. I., Green, T. J., Xu, Z., Innis, S. M. & Kitts, D. D. (2018). Dietary choline intake: current state of knowledge across the life cycle. *Nutrients*, 10(10), 1513. <https://doi.org/10.3390/nu10101513>

Wilkinson, M. & Brown, R. E. (2015). *Neuroendocrinology* (2.^a ed.) Cambridge University Press.

Zaagsma, J. & Meurs, H. (2006). Acetylcholine. En. G. J. Laurent & S. D. Shapiro (eds.), *Encyclopedia of respiratory medicine* (pp. 1 – 5). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00002-8>

Zeleznik, A. J., & Plant, T. M. (2015). Control of the menstrual cycle. En. T. M. Plant & A. Zeleznik (eds.), *Knobil and Neill's physiology of reproduction* (4.^a ed., vol. 1, pp. 1307 – 1361). Academic Press. <https://doi.org/doi:10.1016/b978-0-12-397175-3.00028-4>

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