

51281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

1
Lej

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UN ESTUDIO SOBRE LA PARTICIPACION DEL SISTEMA COLINERGICO EN LA REGULACION DE LA SECRECION DE GONADOTROPINAS Y HORMONAS OVARICAS Y SU INTERACCION CON LOS SISTEMAS MONOAMINERGICOS DE POA-AHA. LA RATA COMO MODELO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

Alejandro Daniel Domínguez-González



DIVISION DE INVESTIGACION

DIRECTORAS DE TESIS:

DRA. REBECA CHAVEZ GENARO

DRA. MARIA ESTHER CRUZ BELTRAN

MEXICO. D. F.

ABRIL DE 1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

21/1931



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.

RESUMEN

La inyección única de sulfato de atropina a las 13:00 horas de los diferentes días del ciclo estral bloquea la liberación preovulatoria de LH a las 17:00 horas del proestro, sin que se presenten cambios en las concentraciones séricas de FSH, 17 β -estradiol y progesterona. La inyección de este fármaco a las 13:00 horas del día de diestro 1 induce la liberación de progesterona y 17 β -estradiol y el aumento de la actividad dopaminérgica de POA-AHA una hora después del tratamiento. Estos incrementos parecen ser un efecto directo sobre los ovarios, ya que el tratamiento no indujo modificaciones en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas. Los animales inyectados con sulfato de atropina mostraron un segundo incremento de la actividad neural dopaminérgica de POA-AHA en la mañana del día de diestro 2. Los animales tratados con sulfato de atropina presentaron un retraso en la ovulación espontánea de entre 15 y 24 horas, y las liberaciones preovulatorias de 17 β -estradiol y LH se presentaron el día del estro esperado.

Los resultados del estudio sobre los cambios dinámicos que se suceden en los actividades monoaminérgicas de POA-AHA e HMB durante el día del proestro no mostraron una relación temporal entre las actividades neurales monoaminérgicas de POA-AHA y la liberación preovulatoria de LH. En el HMB se presentan incrementos de las actividades neurales noradrenérgicas y dopaminérgicas entre las 09:00 y 15:00 horas, cuando las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol se encuentran altas, lo que permite sugerir que estos sistemas de neurotransmisión modulen la liberación de la GnRH de modo estimulante.

La estimulación unilateral del pedículo ovárico izquierdo en diestro 2 bloquea la ovulación en todos los animales, sin alterar la tasa de cornificación vaginal. La hemiovariectomía reduce las tasas ovulatoria y de cornificación vaginal, cuando se realiza en los días de diestro 1 y 2, independientemente del ovario extirpado.

En suma, los resultados muestran que el bloqueo farmacológico del sistema colinérgico disocia la secreción de las gonadotropinas e induce alteraciones asimétricas en la actividad dopaminérgica del hipotálamo. Además, en los días de diestro 1 y 2 la información neural de la innervación ovárica es crucial para el desarrollo normal de la cascada de eventos neuroendócrinos que culminan con la ovulación en el estro siguiente.

ABSTRACT

The injection of atropine sulphate (ATR) at 13:00 h of estrus (300mg/kg), diestrus 1 (100mg/kg), diestrus 2 (100mg/kg) or proestrus (700mg/kg) blocks ovulation. In those animals the preovulatory surge of LH was arrested, without changes in FSH, estradiol nor progesterone plasma levels. One hour after the injection of 100mg/kg of ATR at 13:00 h of diestrus 1 there was a subit increase of 17β -estradiol and progesterone plasma level and a significant increase in dopaminergic and serotonergic neural activity in POA-AHA, without changes in gonadotropin serum levels nor in norepinephric activity, in comparison with saline injected group. Animals injected with 100 mg/kg of ATR showed an increase in dopaminergic neural activity in the morning of diestrus 2 (atropine 0.471 ± 0.7 *vs.* saline 0.241 ± 0.03 , $p < 0.01$). In this group of animals the time of spontaneous ovulation was delay 15-24 h and the preovulatory surge of 17β -estradiol and LH does not occurs until the expected day of estrus. Present results suggest that during diestrus day 1 there is a functional relationship between the cholinergic and dopaminergic systems in POA-AHA, which regulate the gonadotropin release resulting in ovulation.

In POA-AHA there is not an evident temporal relationship between monoaminergic neural activity and LH preovulatory surge. In the MBH there is an increase of NE and DA neural activity from 09.00 to 15.00, with high concentration of 17β -oestradiol prior to LH peak. The increase in NE and DA neuronal activity in MBH previous to LH serum level peak, suggests that such monoamines could modulate GnRH release in a stimulatory way.

The unilateral stimulation of the left ovarian pedicle on dioestrus 2 blocks ovulation in all the animals without altering the vaginal cornification rate. In these animals, the norepinephric neural activity in POA-AHA was below the sensitivity of the detection method. The hemiovariectomy reduces both the ovulation as well as the vaginal cornification rate when performed on dioestrus 1 and dioestrus 2, despite the remaining ovary. Present results support the idea of the participation of ovarian innervation in the control of mechanisms that regulate the ovulation process.

In sum, the results shows that pharmacological blockade of cholinergic system splits gonadotrophin secretion and induce asymmetric alterations in hypothalamic dopaminergic activity. Also, neural information from the ovaries in diestrus 1 and 2 is important for the occurrence of normal neuroendocrine events that ends with ovulation.

AGRADECIMIENTOS

por su amistad, a mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción

por el cuidado de los animales, al personal del bioterio

por su ayuda en la cuantificación de hormonas, a los investigadores Pablo Damián Matsumura, Carlos Timossi y Roberto Chavira

por su tiempo y por las valiosas aportaciones que hicieron al escrito, a los miembros del jurado:

Dr. Raúl Aguilar Roblero

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Rebeca Chávez Genaro

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos

por su ayuda en la revisión del manuscrito, a Sol Álvarez Sánchez

y muy especialmente a mis directoras de tesis, Rebeca y Esther

DEDICATORIA

a mi madre, Gretchen

a mi padre, Roberto

a mi hermano, Álvaro

a mis seres queridos

y con todo mi amor, para Sol

ÍNDICE

	páginas
Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Índice	iv
Aclaraciones	v
Abreviaturas utilizadas	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Presentación	9
Antecedentes históricos	10
Marco teórico	11
El ciclo estral de la rata	14
Las neuronas GnRHérgicas	17
Biosíntesis de la GnRH	14
Evolución de la molécula GnRH	15
Regulación de la actividad de la neurona GnRHérgica por los sistemas colinérgico y monoaminérgicos	18
Inervación del ovario	31
Asimetría	35
Planteamiento del problema	40
Hipótesis	41
Metas	42
Objetivos	42
Materiales y métodos	43
Resultados	48
Apéndice: Asimetrías	77
Discusión general	83
Referencias	91

ACLARACIONES

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Neuroendocrinología de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Se basa en los resultados publicados en los siguientes artículos:

Domínguez-González A, Damian-Matsumura P, Timossi C, Cruz ME, Domínguez R. (1998). Characterisation of monoamine neural activity of the preoptic anterior hypothalamic area and medial basal hypothalamus during, proestrus day, and its relation with gonadotrophin and sexual steroid hormone plasma levels. *Medical Science Research*; **26**:275-278.

Domínguez-González A, Cruz ME, Domínguez R. (1998). Effects of hemiovariectomy and unilateral mechanical stimulation of the rat ovarian pedicle on ovulation rate and monoamine neural activity in the preoptic-anterior hypothalamic area. *Medical Science Research*; **26**:545-547.

Cruz ME, Villegas G, Domínguez-González A, Domínguez R.(1998). The delay of ovulation induced by the blockade of cholinergic system on dioestrus 1 is related to changes in catecholamine activity of the preoptic-anterior hypothalamic area of the rat. *Brain Research Bulletin* (en revision).

Para la realización de esta tesis se contó con apoyos financieros del Programa Universitario en Investigación en Salud (PUIS- becas de maestría y doctorado), del Programa de Apoyo a las Divisiones de Posgrado- Tesis Doctoral (PADEP-TD- 500306 y 500307), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA- IN208996 y IN208796) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT- IN1719).

ABREVIATURAS UTILIZADAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indol-3-acético
5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análisis de varianzas
ATR	Sulfato de atropina
B_{max}	Unión específica
CAT	Colín-acetiltransferasa
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
D1	Diestro 1
D2	Diestro 2
DA	Dopamina
DHPG	3,4-dihidroxifenilglicol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
E	Estro
EM	Eminencia media
FSH	Hormona estimulante del folículo
FSH-RH	Hormona liberadora de la FSH
GABA	Ácido gama amino butírico
GAP	Proteína asociada a GnRH
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
H-H-G	Eje hipotálamo-hipófisis-gónada
HMB	Hipotálamo medio basal
HRP	Peroxidasa del rábano
K_d	Constante de disociación
LH	Hormona luteinizante
LH-RH	Hormona liberadora de la LH
MHPG	4-hidroxi-3-metoxifenilglicol
mPOA	Área preóptica medial
NA	Noradrenalina
NE	Norepinefrina (Noradrenalina)
NOS	Nervio ovárico superior
NPY	Neuropéptido Y
P	Proestro
POA	Área preóptica
POA-AHA	Área preóptica-hipotalámica anterior
PRL	Prolactina
RIA	Radioinmunoanálisis
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
SS	Solución salina
SP	Sustancia P
TIDA	Neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VLMO	Porción ventrolateral de la médula oblongata

RESUMEN

La inyección única de sulfato de atropina a las 13:00 horas de los diferentes días del ciclo estral bloquea la liberación preovulatoria de LH a las 17:00 horas del proestro, sin que se presenten cambios en las concentraciones séricas de FSH, 17 β -estradiol y progesterona. La inyección de este fármaco a las 13:00 horas del día de diestro 1 induce la liberación de progesterona y 17 β -estradiol y el aumento de la actividad dopaminérgica de POA-AHA una hora después del tratamiento. Estos incrementos parecen ser un efecto directo sobre los ovarios, ya que el tratamiento no indujo modificaciones en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas. Los animales inyectados con sulfato de atropina mostraron un segundo incremento de la actividad neural dopaminérgica de POA-AHA en la mañana del día de diestro 2. Los animales tratados con sulfato de atropina presentaron un retraso en la ovulación espontánea de entre 15 y 24 horas, y las liberaciones preovulatorias de 17 β -estradiol y LH se presentaron el día del estro esperado.

Los resultados del estudio sobre los cambios dinámicos que se suceden en los actividades monoaminérgicas de POA-AHA e HMB durante el día del proestro no mostraron una relación temporal entre las actividades neurales monoaminérgicas de POA-AHA y la liberación preovulatoria de LH. En el HMB se presentan incrementos de las actividades neurales noradrenérgicas y dopaminérgicas entre las 09:00 y 15:00 horas, cuando las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol se encuentran altas, lo que permite sugerir que estos sistemas de neurotransmisión modulen la liberación de la GnRH de modo estimulante.

La estimulación unilateral del pedículo ovárico izquierdo en diestro 2 bloquea la ovulación en todos los animales, sin alterar la tasa de cornificación vaginal. La hemiovariectomía reduce las tasas ovulatoria y de cornificación vaginal, cuando se realiza en los días de diestro 1 y 2, independientemente del ovario extirpado.

En suma, los resultados muestran que el bloqueo farmacológico del sistema colinérgico disocia la secreción de las gonadotropinas e induce alteraciones asimétricas en la actividad dopaminérgica del hipotálamo. Además, en los días de diestro 1 y 2 la información neural de la inervación ovárica es crucial para el desarrollo normal de la cascada de eventos neuroendócrinos que culminan con la ovulación en el estro siguiente.

ABSTRACT

The injection of atropine sulphate (ATR) at 13:00 h of estrus (300mg/kg), diestrus 1 (100mg/kg), diestrus 2 (100mg/kg) or proestrus (700mg/kg) blocks ovulation. In those animals the preovulatory surge of LH was arrested, without changes in FSH, estradiol nor progesterone plasma levels. One hour after the injection of 100mg/kg of ATR at 13:00 h of diestrus 1 there was a subit increase of 17 β -estradiol and progesterone plasma level and a significant increase in dopaminergic and serotonergic neural activity in POA-AHA, without changes in gonadotropin serum levels nor in norepinephric activity, in comparison with saline injected group. Animals injected with 100 mg/kg of ATR showed an increase in dopaminergic neural activity in the morning of diestrus 2 (atropine 0.471 ± 0.7 vs. saline 0.241 ± 0.03 , $p < 0.01$). In this group of animals the time of spontaneous ovulation was delay 15-24 h and the preovulatory surge of 17 β -estradiol and LH does not occurs until the expected day of estrus. Present results suggest that during diestrus day 1 there is a functional relationship between the cholinergic and dopaminergic systems in POA-AHA, which regulate the gonadotropin release resulting in ovulation.

In POA-AHA there is not an evident temporal relationship between monoaminergic neural activity and LH preovulatory surge. In the MBH there is an increase of NE and DA neural activity from 09.00 to 15.00, with high concentration of 17 β -oestradiol prior to LH peak. The increase in NE and DA neuronal activity in MBH previous to LH serum level peak, suggests that such monoamines could modulate GnRH release in a stimulatory way.

The unilateral stimulation of the left ovarian pedicle on dioestrus 2 blocks ovulation in all the animals without altering the vaginal cornification rate. In these animals, the norepinephric neural activity in POA-AHA was below the sensitivity of the detection method. The hemiovariectomy reduces both the ovulation as well as the vaginal cornification rate when performed on dioestrus 1 and dioestrus 2, despite the remaining ovary. Present results support the idea of the participation of ovarian innervation in the control of mechanisms that regulate the ovulation process.

In sum, the results shows that pharmacological blockade of cholinergic system splits gonadotrophin secretion and induce asymmetric alterations in hypothalamic dopaminergic activity. Also, neural information from the ovaries in diestrus 1 and 2 is important for the occurrence of normal neuroendocrine events that ends with ovulation.

PRESENTACIÓN

El «éxito» evolutivo de la organización de las células individuales en organismos pluricelulares brindó la oportunidad de conquistar nuevos ambientes y una explosión de la diversidad biológica. Las células de los organismos pluricelulares se diferenciaron, especializaron y agruparon constituyendo tejidos, órganos, aparatos y sistemas, los cuales, al actuar de modo coordinado mantienen estables las condiciones del medio interno donde se desarrollan; lo que permitió adecuarse con mayor éxito al ambiente, además de la conquista de nuevos nichos ecológicos.

El medio interno es el fluido donde están presentes todos los nutrientes (iones, oxígeno, glucosa, agua, hormonas, etc.) que necesitan las células para vivir y sirve de vertedero para el catabolismo celular (CO_2 , desechos nitrogenados). El concepto del medio interno lo definió Claude Bernard a mediados del siglo pasado como el *milieu intérieur*, y el mantenimiento de las condiciones fisiológicas del medio interno en un estado estabilizado lo definió Walter B. Cannon como homeostasis.

Para que un organismo mantenga la homeostasis requiere de un sistema de comunicación intercelular que garantice la estabilidad del medio extracelular. Actualmente se reconoce la existencia de un sistema de bioinformación que integra y coordina, de modo ininterrumpido, todas las funciones del organismo, incluyendo las diferentes respuestas adaptativas que el organismo despliega frente a las fluctuaciones y demandas de su medio ambiente.²¹¹ Este sistema de bioinformación, está constituido por subsistemas interdependientes conocidos como sistemas nervioso, endocrino e inmune, los cuales regulan la estabilidad del ambiente interno por medio de ejes de información que se autoregulan.

Los sistemas neuroendócrinos registran, traducen e integran efectivamente informaciones de tipo neural y humoral a partir de lo cual toman acciones fisiológicas apropiadas, con base en el monitoreo y la evaluación de estas señales fisiológicas. En la mayoría de los sistemas neuroendócrinos, el mantenimiento de la homeostasis se realiza, predominantemente, a partir de señales de retro-regulación negativa. Sin embargo, el eje hipotálamo-hipófisis-óvario, que regula la fisiología reproductiva de las hembras, también posee un sistema de retro-regulación positiva, que es el responsable de inducir la liberación masiva de las gonadotropinas a la circulación periférica y la ovulación.

La producción de gametos fértiles está regulada principalmente por lo que se conoce como el eje hipotálamo - hipófisis - gónada (H-H-G). En el hipotálamo se localiza un grupo de neuronas especializadas, que integran una variedad de estímulos externos y propios del organismo y como respuesta secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), la que estimula la secreción de las gonadotropinas por la hipófisis. Las gonadotropinas, la hormona

luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) y la hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés), actúan sobre el ovario estimulando el crecimiento y maduración de los folículos ováricos y contribuyen a la maduración de los gametos, así como a la secreción de las hormonas sexuales. A su vez, las hormonas sexuales regulan la actividad del eje reproductor y estimulan el comportamiento reproductivo.

Aunque mucho se ha avanzado, son tareas pendientes conocer los mecanismos moleculares que se suceden en la integración de esta red neuronal que permite la secreción periódica de la GnRH así como desentrañar el ensamblado de esta red, poniendo de manifiesto el origen de cada una de estas informaciones y establecer la jerarquía de cada una de ellas.

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La década de los años treinta trajo consigo cambios en la interpretación de los mecanismos que regulan las funciones endocrinas. Hasta estos momentos, el consenso entre los investigadores era que la hipófisis funcionaba como la «glándula maestra» y «conductora de la orquesta endocrina» del organismo.

En 1932, Hohlweg y Junkmann encontraron las primeras evidencias de que las hormonas gonadales podrían estar actuando sobre un «centro sexual» del cerebro para inducir la ovulación, y no sobre la hipófisis, como se sostenía anteriormente. Basados en esta idea, Flerko y Szentagothai ubicaron, veinte años más tarde, en las áreas preóptica y anterior del hipotálamo este «centro sexual».

Otro de los grandes avances de la década de los treinta fue el descubrimiento de la existencia de un sistema de pequeños vasos porta venoso que comunicaban al hipotálamo con la hipófisis por desPopa y Fielding. Más tarde, otros investigadores demostraron la importancia de este sistema portal en la regulación de la secreción hormonal de la hipófisis anterior.

Ya para los años 30 y 40 el número de investigadores que sugerían que el hipotálamo regula la función de la hipófisis anterior vía una transmisión humoral iba en aumento, aunque la naturaleza de las sustancias humorales secretadas por el hipotálamo era desconocida.

Dado que los principales agentes neurohumorales conocidos y disponibles para entonces eran la adrenalina, la noradrenalina y la acetilcolina buscaron en ellos la respuesta.

Sawyer, en 1952, mostró que la inyección intraventricular de estas sustancias era capaz de inducir la ovulación y que la inyección de fármacos como la atropina, una droga anticolinérgica, o la dibenamina, droga antiadrenérgica, bloqueaban la ovulación cuando se administraba en un momento

apropiado previo a la ovulación. Hoy parece claro que tanto la noradrenalina como la acetilcolina tienen un papel importante en la inducción de la ovulación por sus efectos moduladores sobre la liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas por el hipotálamo.

Las primeras evidencias del control hipotalámico sobre la liberación de las gonadotropinas fueron los experimentos realizados por McCann y otros en la década de los años sesenta, quienes mostraron que extractos hipotalámicos inducen la liberación de la hormona luteinizante. Sin embargo, la caracterización estructural de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH, por sus siglas en inglés) como un polipéptido de 10 aminoácidos fue realizada por el grupo de Matsuo al inicio de los 70. Por su parte, Schally, miembro del grupo de Matsuo, reportó que la LHRH no sólo estimulaba la secreción de LH sino también de la FSH, lo que constituyó la primera evidencia de una hormona hipotalámica que estimula la liberación de más de una hormona hipofisiaria.

A partir de éstos y otros hallazgos se estableció el concepto de que la regulación de la fisiología reproductiva está basada en el eje H-H-G, donde el hipotálamo secreta una hormona que estimula a células de la hipófisis, las cuales secretan otras hormonas llamadas gonadotropinas, que actúan sobre el ovario estimulando el crecimiento y la maduración de los gametos, así como la secreción de las hormonas sexuales, las que a su vez actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis regulando su actividad, cerrando el circuito de retro-regulación negativa.

MARCO TEÓRICO

EL CICLO ESTRAL DE LA RATA

La etapa fértil de la vida de las hembras se caracteriza por cambios periódicos en la intensidad de la secreción de las hormonas femeninas que resulta en el crecimiento, maduración y liberación de ovocitos fértiles, así como cambios en la conducta sexual que aseguran la máxima receptividad de la hembra durante la etapa ovulatoria. Esta conducta rítmica que presentan las hembras se llama ciclo del estro o ciclo estral.

El término «estro» proviene del latín *oestrus* y éste a su vez del griego *oistros*, que significa tábano, aguijón o frenesí. Este término lo acuñó Heape en el año 1900 para describir el periodo de deseo sexual de la hembra y distinguirlo del celo del macho.⁹⁰

La rata es un mamífero que presenta ciclos estrales durante todo el año cuya duración promedio es de cuatro o cinco días. En el ciclo estral de la rata se reconocen cuatro etapas: diestro 1, diestro

2, proestro y estro; este último, día de la ovulación. La duración promedio de cada una de estas etapas es la siguiente: diestros 1 y 2 de 61 a 65 horas, proestro de 12 a 14 horas y estro de 25 a 27 horas.⁷³

Durante los días de estro, diestro 1, diestro 2 y la mañana del proestro, las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas, LH y FSH se mantienen en concentraciones basales, principalmente por las acciones de retro-regulación negativa que ejercen los estrógenos^{76,129} y hormonas proteicas, tales como la inhibina.¹⁹¹ Las cantidades de LH y FSH circulantes, si bien son bajas, son suficientes para estimular el crecimiento folicular y la secreción de estrógenos, los cuales aumentan conforme crecen y maduran los folículos en desarrollo (Figura 1).

Bajo la influencia del incremento de los estrógenos circulantes secretados por los folículos en maduración, en la tarde del proestro se presenta una liberación masiva de ambas gonadotropinas, que induce la ovulación en la mañana del siguiente día de estro. Posteriormente, se presenta una segunda liberación de FSH que se prolonga hasta la mañana del estro, que al parecer participa en el reclutamiento de los folículos ováricos para el siguiente ciclo.

Las acciones conjuntas de la retro-regulación positiva de los estrógenos, junto con señales neurales circadianas,⁶⁵ son los eventos más importantes en la estimulación de la liberación preovulatoria de las gonadotropinas.

Las liberaciones tónica y fásica de la LH presentan un patrón de secreción pulsátil. Estas pulsaciones se presentan cada 55 ó 60 minutos y liberan entre 15 y 40 ng/ml/pulso. Durante la tarde del proestro aumenta la frecuencia de los pulsos, 6 pulsos en 3 horas, y la cantidad de LH liberada por pulso, alcanzando valores de 600 ng/ml/pulso.⁷⁵ La secreción de la FSH presenta pulsos similares a los descritos para la LH, pero con menor frecuencia (4 pulsos en 3 horas).¹⁴¹

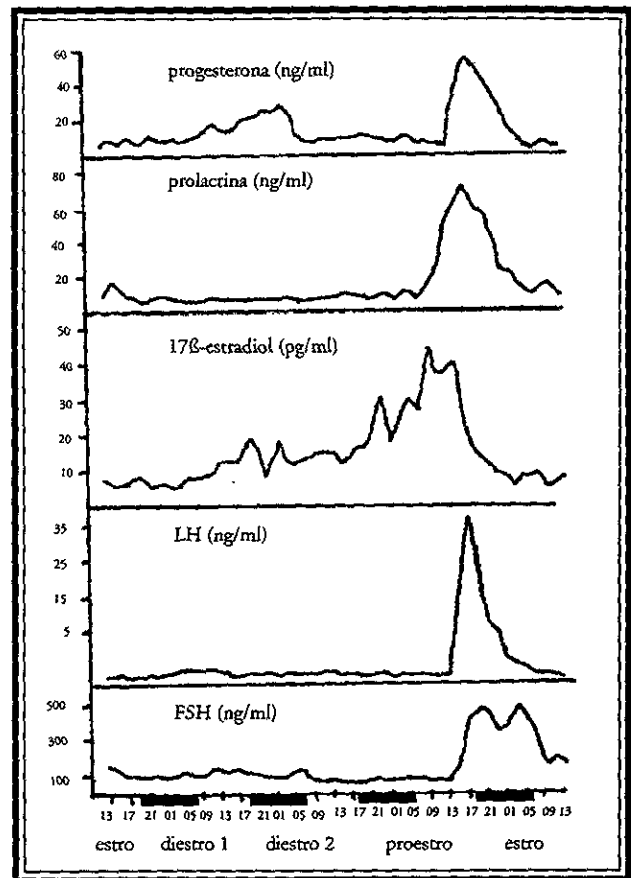


Figura 1. Perfil de las concentraciones plasmáticas de progesterona, prolactina, 17β-estradiol, LH y FSH durante los cuatro días del ciclo estral de la rata. Tomado de Freeman, 1994 (adaptado de Smith y col., 1975).

La secreción pulsátil de las gonadotropinas es el reflejo directo de los pulsos de liberación que la neurona GnRHérgica vierte al sistema portahipofisiario. La pulsatilidad de la neurona GnRHérgica parece ser una característica intrínseca de estas células o las redes neuronales formadas por éstas. El “centro generador de pulsos de GnRH” es la propia neurona GnRHérgica, sin embargo, la amplitud y frecuencia de los pulsos de secreción pueden ser modulados por las aferencias sinápticas que inervan estas células.

LAS NEURONAS GnRHÉRGICAS

Las neuronas GnRHérgicas son células muy especializadas que representan la salida de una red neuronal integrada que el cerebro utiliza para generar la secreción pulsátil de las gonadotropinas por la hipófisis.

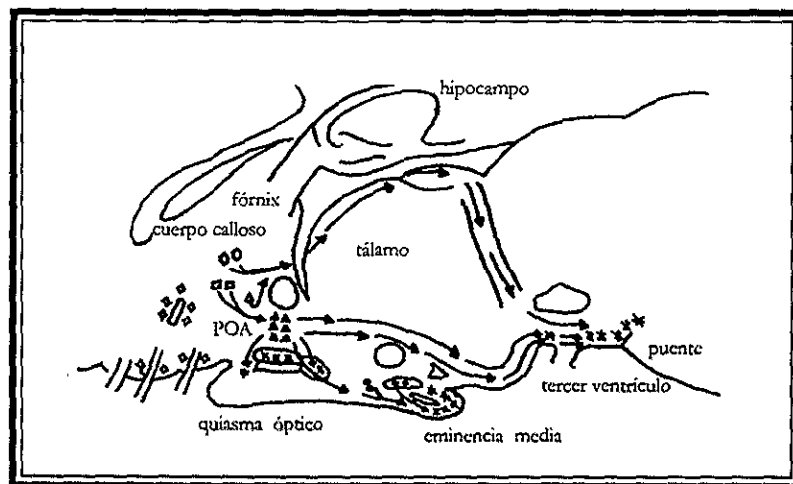


Figura 2. Plano sagital medial del cerebro de un cobayo que abarca desde el septum hasta el puente. Los diferentes tipos de neuronas GnRHérgicas están indicados con símbolos geométricos, las rutas de las fibras están indicadas por flechas y los campos terminales por asteriscos. La ruta subquiasmática no está indicada. Adaptado de Silverman y col., 1994.

Localización

Mediante técnicas de histofluorescencia e inmunocitoquímica se han identificado a los núcleos preóptico medial, anterior y arcuato, así como el septo y la estría terminal como las áreas donde se concentran las neuronas secretoras de GnRH. Estas neuronas no forman agregados neuronales compactos, sino redes laxas y difusas. La red principal, por su participación directa en el control de

la secreción de las gonadotropinas, se extiende desde la banda diagonal de Broca hasta el área septal, atravesando el núcleo de la estría terminal y las áreas preóptica medial y lateral, hipotalámica anterior, el núcleo periventricular y la zona retroquiasmática del diencéfalo. También forman parte de este continuo las neuronas secretoras de GnRH ubicadas en el hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico (Figura 2).

Las neuronas GnRHérgicas de esta red principal proyectan sus axones hacia la eminencia media por las vías septo-preóptica infundibular y septo preóptica.¹⁹⁸ Las neuronas ubicadas en el área septal-preóptica proyectan sus axones por el fascículo retroflexo hacia áreas extrahipotalámicas como la amígdala, el complejo mamilar, el área tegmental ventral, el cerebro medio, el rafé y la región periacueductal. Al parecer, estas proyecciones participarían en la regulación del comportamiento sexual de los roedores, ya que la administración de GnRH directamente al área preóptica (POA, por sus siglas en inglés) potencia el reflejo de lordosis.

Citología

En la mayoría de las especies, las neuronas GnRHérgicas tienen forma de huso o fusiformes, con un diámetro máximo entre 10 y 20 μm . El proceso dendrítico se extiende sin ramificarse desde uno o ambos polos de la célula y los axones emergen directamente del soma o de una dendrita.¹⁹⁸

Estudios ultraestructurales de las neuronas GnRHérgicas de la rata muestran la existencia de dos tipos principales de neuronas; las de contorno liso, como las descritas anteriormente, y las espinosas, estas últimas se subdividen a su vez por el número de espinas que presentan.^{104,115,135,221}

Se ha sugerido que las neuronas espinosas reciben mayor número de aferencias, pero los resultados de experimentos tendientes a cuantificar el número de inervaciones no lo ha confirmado.²²⁰

Las neuronas GnRHérgicas tienen el núcleo localizado en el centro del soma rodeado por un borde delgado de citoplasma, que se alarga y extiende dando origen a los conos de las dendritas principales. El núcleo contiene uno o dos nucleolos, y la membrana nuclear generalmente está indentada. El citoplasma tiene varios sáculos de retículo endoplásmico rugoso y uno o dos sáculos de Golgi y gránulos neurosecretores. En las terminales sinápticas, la GnRH se encuentra en gránulos de 40 a 120 nm unidos a la membrana plasmática.¹⁹⁸

La morfología de las neuronas GnRHérgicas es más compleja en animales estacionales como la oveja y el hámster, así como en la mona Rhesus. En la oveja, durante la estación reproductiva, las neuronas GnRHérgicas del área preóptica reciben más del doble de la media de aferencias sinápticas por unidad de membrana que durante el anacastro. Al parecer, este incremento en el

número de aferencias sinápticas no es debido a los cambios en las concentraciones plasmáticas de estrógenos, sino a cambios en el fotoperiodo, a la expresión de un ritmo circanual endógeno o ambos.²²²

Origen ontogénico

Las neuronas secretoras de GnRH, que controlan la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis anterior, se originan del epitelio de la placa olfatoria y migran durante la vida fetal hasta llegar al cerebro anterior y el hipotálamo. En la rata, las primeras células GnRHérgicas se aprecian para el día 15 de gestación, asociadas al bulbo olfatorio ventral. Para el día 17, las células GnRHérgicas se encuentran en el sistema nasal, a lo largo del nervio olfatorio, en el ganglio terminal, el bulbo olfatorio, el complejo septo-banda diagonal, el tubérculo olfatorio y el hipotálamo ventro-lateral.¹⁰⁴ Durante la migración por los fascículos olfatorio y vomeronasal, las neuronas GnRHérgicas mantienen sus membranas en aposición cercana con los axones y la glía que recubre los fascículos nerviosos, una vez en el cerebro anterior estas asociaciones membranales se pierden y las neuronas GnRHérgicas siguen su curso de modo independiente (Figura 3).¹³⁶

Junto con las neuronas GnRHérgicas migran células tirosina hidroxilasa inmunoreactivas²¹²;

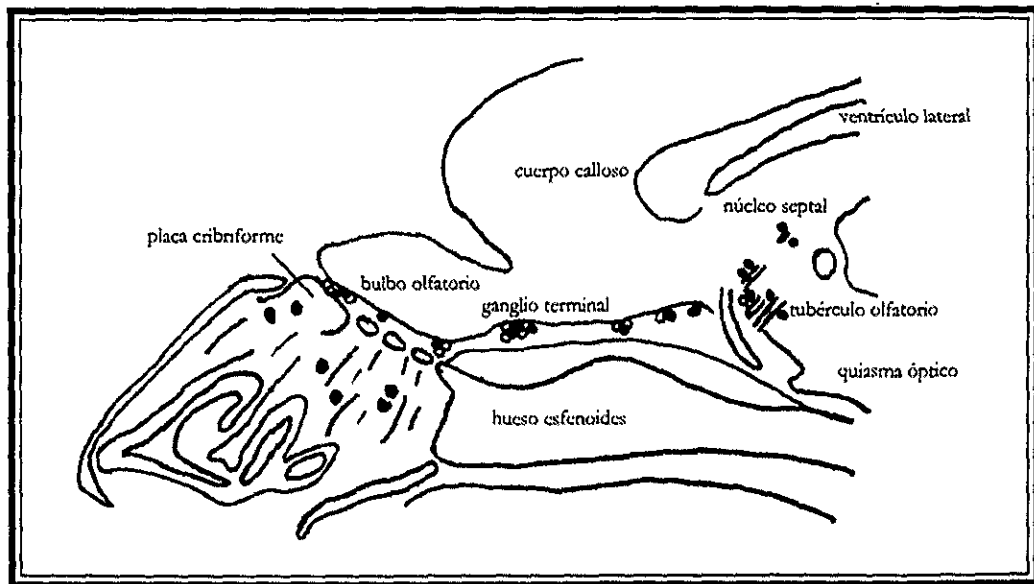


Figura 3. Esquema donde se representa la migración de las neuronas GnRHérgicas. Adaptado de Silverman y col., 1994.

neuronas que sintetizan ácido gama amino butírico (GABA, por sus siglas en inglés) y el neuropéptido Y (NPY).⁹⁸ Todas estas células co-expresan el péptido GnRH durante las primeras fases de la migración y se ha propuesto que el GABA podría estar actuando como un factor trófico que influya en la migración neuronal.²⁰⁹

BIOSÍNTESIS DE LA GnRH

La liberación pulsátil de GnRH al sistema portahipofisiario es crucial para el mantenimiento de la función reproductiva. La concentración del decapeptido GnRH disponible para este proceso es regulada, principalmente, a nivel transcripcional y postranscripcional y postraducciona.⁸⁶ Durante el ciclo estral de la rata, la expresión del gen de GnRH, estudiado por la cuantificación de reacción de la transcripción inversa de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). La concentración del RNA mensajero (RNAm) de GnRH no cambia entre diestro 1 y 2, después incrementa y alcanza el máximo a las 11:00h del proestro. En la tarde del proestro, el RNAm de GnRH disminuye rápidamente, con el nadir a las 16:00h, después de lo cual vuelve a aumentar y alcanza un nuevo «pico» a las 11:00 h del estro.²⁰⁴

En un estudio realizado con el ensayo cuantitativo de la protección de la ribonucleasa, donde se midieron las concentraciones de RNAm de GnRH citoplásmico y nuclear se observó que las concentraciones citoplásmicas de RNAm presentan dos picos, uno en diestro 2 y otro a las 11:00h del proestro, aunque las concentraciones de transcripción primaria fueron altas sólo a las 15:00h del proestro, por lo que el pico de RNAm en diestro 2 sea debido probablemente a mecanismos postranscripcionales.⁸⁵

La síntesis de GnRH durante el ciclo estral de la rata se estudió con base en el análisis celular del tiempo de traducción del RNAm de GnRH en proteína, utilizando una tinción inmunoreactiva al antisuero específico (Rb 1076) que reconoce tanto al pro-GnRH como al decapeptido. Sólo en la mañana del estro las neuronas de 5/6 animales estaban sintetizando el péptido, aunque la inmunotinción en muchas de las células fue muy débil, lo que permite sugerir una disminución previa. A todas las demás horas hubo gran heterogeneidad entre los animales de un mismo grupo. A las 17.30 del proestro 50% eran positivas en la mitad de los animales, mientras que en la otra mitad fue de 16-45%.¹⁹⁹

La galanina es un polipéptido de 29 aminoácidos ampliamente distribuido en el sistema nervioso central. En el hipotálamo, el sitio de mayor síntesis de galanina es la porción lateral del núcleo arcuato, la cual es coliberada junto con la GnRH, potenciando sus efectos.¹³⁸

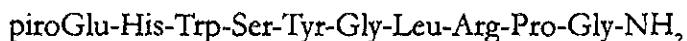
En la rata hembra, las neuronas GnRHérgicas incrementan la expresión de fos y galanina conjuntamente con la liberación preovulatoria de LH. Resultados de hibridización *in situ* muestran que en las neuronas GnRHérgicas la concentración de RNAm de c-fos es máxima al momento del «pico» preovulatorio de LH, mientras que la concentración de RNAm de galanina presenta un incremento dos horas después del «pico» preovulatorio de LH y que la concentración de RNAm de GnRH no presentaron cambios significativos durante este periodo.⁶⁷

EVOLUCIÓN DE LA MOLÉCULA GnRH

La GnRH es biosintetizada como parte de un precursor de mayor tamaño que contiene 92 restos aminoácidos y un peso aproximado de 10 kDa. Cuando el gen y el DNA complementario correspondiente a la pro-GnRH fueron clonados y la secuencia de aminoácidos deducida, se encontró que, como en el caso de casi todas las proteínas de secreción, la secuencia correspondiente a la GnRH, ubicada entre los aminoácidos 23-34, es precedida por un péptido de señal. En la porción carboxilo terminal de la pro-GnRH se localiza una secuencia que codifica para un péptido de 56 restos aminoácidos, al que se le denominó proteína asociada a GnRH (GAP, del inglés Gonadotropin Associated Peptide). El precursor proteínico pro-GnRH es procesado y recortado en el retículo endoplásmico, donde se separan los péptidos por una acción enzimática posterior a la traducción. La GnRH madura en el aparato de Golgi, donde se produce la ciclización enzimática de la glutamina N-terminal y la amidación de la glicina C-terminal.¹⁴⁵

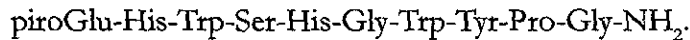
La GnRH pertenece a una familia de decapeptidos que se caracteriza por la conservación de sus residuos aminoácidos 1, 2, 4, 9 y 10.¹³⁹ Se han separado y caracterizado nueve diferentes formas de GnRH, que han conservado altamente su estructura.^{87,113,175,195} El origen filogenético de la GnRH se remonta a épocas anteriores al origen de los vertebrados. Se ha detectado la presencia de esta hormona en extractos del ganglio neural de la ascidia (*Chelyosoma productum*), un protocordado marino.¹¹⁰

En los mamíferos, la GnRH hipotalámica (GnRH-I) que estimula la secreción de gonadotropinas por la hipófisis tiene la secuencia de restos aminoácidos siguiente:



En el cerebro medio de los vertebrados existe una segunda forma de la molécula de GnRH (GnRH-II), cuya función se desconoce. A diferencia de la GnRH-I, la GnRH-II se encuentra en cantidades significativamente mayores fuera del cerebro, hasta 30 veces más, y se ubica principalmente en el riñón, la médula ósea y la próstata.²¹⁷

La secuencia de aminoácidos de la GnRH-II es la siguiente:



Esta forma de GnRH fue aislada originalmente del cerebro de la gallina, y junto con la GnRH-I regulan la liberación de las gonadotropinas en las aves. Al parecer, la GnRH-II es la isoforma más antigua identificadas hasta hoy y la más común entre los vertebrados.¹⁷⁵

Nombre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Animal
mGnRH	P-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂	Mamífero
cGnRH-I	P-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly-NH ₂	Pollo
sbGnRH	P-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly-NH ₂	Breña
cfGnRH	P-Glu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly-NH ₂	Pez gato
sGnRH	P-Glu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂	Salmón
cGnRH-II	P-Glu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH ₂	Pollo-II
dfGnRH	P-Glu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂	Pez perro
lGnRH-III	P-Glu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂	Lamprea
lGnRH-I	P-Glu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Tyr	Lys	Pro	Gly-NH ₂	Lamprea

Cuadro 1. Secuencia de restos aminoácidos de las isoformas de GnRH conocidas. Los péptidos de GnRH generalmente son nombrados por las especies de donde fueron originalmente purificados.

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA NEURONA GnRHÉRGICA POR LOS SISTEMAS COLINÉRGICO Y MONOAMINÉRGICOS

Sistema colinérgico

Los resultados experimentales sobre el papel del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas no son concluyentes. Las primeras evidencias de la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas fueron los experimentos realizados por Sawyer,¹⁸⁸ Markee¹⁴⁴ y Everett⁶⁴ hace más de 40 años, quienes mostraron que el bloqueo del sistema colinérgico, por la inyección subcutánea de atropina, interrumpe la ovulación, cuando se administra inmediatamente después del coito, en el caso de la coneja, un animal de ovulación refleja y en la rata, un animal de ovulación espontánea, cuando se inyecta en la mañana del proestro.

En la rata, la inyección subcutánea de sulfato de atropina (70 mg/100 g de peso) o su

aplicación directa al tercer ventrículo cerebral (250 µg) entre las 11 y 13 horas del proestro bloquea la secreción de LH, FSH y prolactina (PRL) horas más tarde. En estos animales, la inyección de LHRH sintético restablece la liberación preovulatoria de LH, por lo que se concluye que sus efectos son a nivel central, y que el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos altera la secreción normal de GnRH.¹³⁴

Aunque la acetilcolina fue la primera sustancia reconocida como mensajero químico, la falta de una técnica equivalente a

la fluorescencia inducida por las catecolaminas que revelara directamente la presencia de acetilcolina en las neuronas de los sistemas nerviosos central y periférico ha dificultado el estudio neuroanatómico de este sistema de neurotransmisión.

Aunado a la anterior, la colina y el acetato están involucrados en muchos otros procesos metabólicos,

por lo que se dificulta aún más la discriminación entre los sitios colinérgicos específicos y los sitios metabólicos inespecíficos. En la actualidad, el estudio de la neuroanatomía del sistema colinérgico se ha hecho con base en técnicas histoquímicas que revelan la presencia de enzimas de síntesis y desactivación de la acetilcolina¹⁶⁶ y apoyados posteriormente con el desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos poli-⁵⁸ y monoclonales,⁵⁹ así como con marcadores radioactivos (Figura 4).

Las neuronas colinérgicas se organizan principalmente como circuitos locales y neuronas de proyección.²⁸ En el cerebro anterior de la rata se han identificado dos vías colinérgicas principales. La vía tegmental dorsal contiene los somas neuronales colinérgicos del núcleo cuneiforme de la formación reticulada mesencefálica que proyectan sus fibras hacia el tectum, el área pretectal, los cuerpos geniculados, el tálamo y el sistema límbico. En la sustancia nigra y el núcleo tegmental ventral del cerebro medio existen neuronas colinérgicas cuyas proyecciones viajan a lo largo del haz tegmental ventral y atraviesan el hipotálamo y el subtálamo hasta llegar al tallo cerebral.¹⁶⁶

En el núcleo submamilar del hipotálamo se encuentra un núcleo denso de neuronas colinérgicas. Dispersas en las áreas posterior y lateral del hipotálamo existen otras neuronas

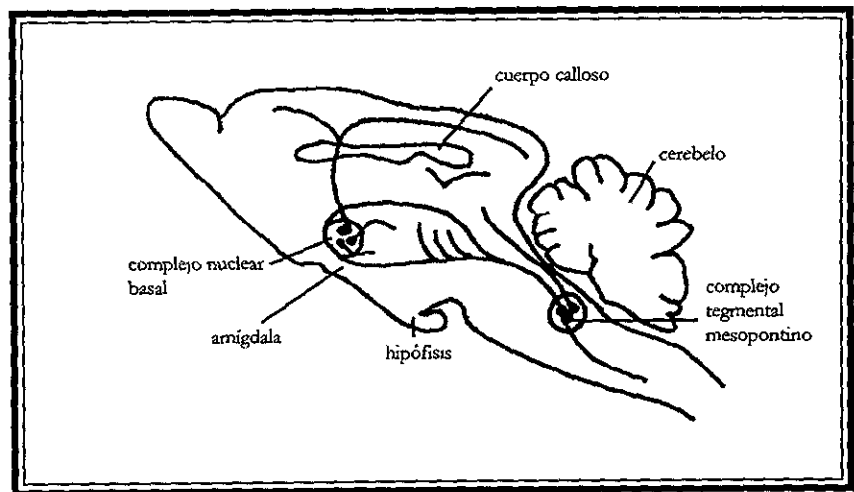


Figura 4. Esquema de un corte sagital de cerebro de rata donde se muestran los núcleos colinérgicos principales y sus proyecciones.

acetilcolinesterasa-positivas. El área preóptica lateral es rica en células acetilcolinesterasa-positivas, y aquellas que se ubican en la porción dorsal del área preóptica envía fibras hacia la amígdala, vía la estría terminal.

El hecho de que después del aislamiento del hipotálamo medio basal no existan cambios significativos en la actividad de la colín-acetiltransferasa (CAT) abre la posibilidad de la existencia de una vía colinérgica tuberoinfundibular semejante a la dopaminérgica.

Por otro lado, en el área preóptica existen diferencias sexuales en el número de sitios de unión de agonistas muscarínicos, siendo mayor en los machos que en las hembras. En ratas hembras cíclicas se observa que en el área preóptica la población de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos es mucho mayor en el día del proestro que en los demás días del ciclo estral (66 vs.38%). La lesión producida por la inyección de 6-hidroxi-dopamina intracisternal produce un decremento de 1/6 del número total de receptores en el hipotálamo, por lo que es posible pensar en la existencia de receptores muscarínicos presinápticos ubicados en las terminales catecolaminérgicas del hipotálamo.³

Estudios *in vitro* muestran que en el área preóptica de la rata hembra el número de receptores muscarínicos varía durante el ciclo estral. En el día del proestro se observa un aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos (60%), comparado a lo observado en diestro 2 o en la tarde del proestro (35%). Cuando porciones homogenizadas de POA se exponen a la presencia de 17 β -estradiol resulta en la conversión de los sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos a sitios de unión de baja afinidad. Este efecto de la hormona se observa únicamente en muestras de POA obtenidas en la mañana del proestro y puede ser bloqueado por clomifeno (antiestrógeno) o prevenido por la ocupación previa de los receptores muscarínicos por sus propios ligandos antes de la adición de la hormona. Los cambios significativos en los receptores muscarínicos de POA coinciden con el llamado «periodo crítico», caracterizado por altas concentraciones de estrógenos y gran número de receptores a estrogénicos en POA.⁶⁰

En el hipotálamo y la adenohipófisis de la rata, las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos, evaluado por ensayos de competencia con H³-N-metil-4-piperidil bencilato (antagonista muscarínico tritiado de alta afinidad) muestran que únicamente las hormonas sexuales (17 β -estradiol y progesterona) afectan las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos. Ambas hormonas provocan decremento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad y en la constante de disociación. Esto permite sugerir una vinculación entre el sistema colinérgico muscarínico y los mecanismos por los cuales los esteroides ováricos inducen la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis.^{2(x)}

Evidencias experimentales muestran que el sistema colinérgico del área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA, por sus siglas en inglés) presenta cambios cíclicos, durante el

ciclo estral, en el contenido de acetilcolina,³⁷ la actividad de las enzimas de síntesis (colín-acetiltransferasa)¹⁸⁴ y degradación (acetilcolinesterasa)³⁵ y el número y la afinidad de los receptores muscarínicos en POA-AHA.³⁷

Domínguez y colaboradores mostraron que la sensibilidad del sistema colinérgico al sulfato de atropina varía durante el ciclo estral y que la dosis necesaria para bloquear la ovulación en el 100 por ciento de los casos depende del día del ciclo y la hora en que se administre, siendo el diestro 1 el día más sensible, ya que para ello se requiere la dosis menor.⁵³

Durante el «periodo crítico» en el día de proestro la concentración de acetilcolina en POA cae y luego incrementa de modo abrupto.⁶¹

Durante el ciclo estral de la rata hembra, en el área preóptica anterior del hipotálamo existe un ritmo colinérgico endógeno. En el día de diestro 1 se presentan las concentraciones máximas de acetilcolina y en diestro 2 las mínimas. El número y la afinidad de receptores muscarínicos también varían durante el ciclo estral. El marcaje con el agonista muscarínico [³H]-N-metil escopolamina muestra que la unión específica (B_{max}) y la constante de disociación (K_d) para dicho fármaco son máximas en el día del estro y disminuyen progresivamente en los demás días del ciclo estral.⁵⁷ En los resultados obtenidos mediante el marcaje con el antagonista colinérgico muscarínico [³H] bencilato de quinuclidina se observan también cambios cíclicos en el marcaje, con un máximo en proestro y un mínimo en los días de diestro.¹⁷² La discrepancia aparente de estos resultados podría explicarse por el hecho de que los fármacos usados en los experimentos posiblemente tengan diferente afinidad a los subgrupos de receptores muscarínicos en POA-AHA, y abre la puerta a la especulación sobre la importancia de cada uno de estos subgrupos de receptores en la regulación del proceso reproductor.

El número y la afinidad de los receptores muscarínicos en el hipotálamo son regulados por las hormonas esteroideas ováricas. Experimentos *in vitro* con el área preóptica muestran que existe una relación directa entre la concentración de 17 β -estradiol y la proporción de receptores muscarínicos de alta y baja afinidad. Durante la mañana del proestro se observa un incremento significativo en la proporción de receptores muscarínicos de alta afinidad (60%), comparado con el día de diestro 2 o la tarde del proestro (35%). Es posible que estos cambios en la afinidad de los receptores muscarínicos reflejen variaciones en la actividad colinérgica en POA durante el ciclo estral.⁶⁰

En la rata hembra cíclica, la actividad máxima de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo se presenta en los días de estro y diestro 1 y la mínima en proestro.³⁵

En ratas ovariectomizadas, la administración sistémica de benzoato de estradiol aumenta significativamente el marcaje de los receptores muscarínicos por [³H] bencilato de quinuclidina en el hipotálamo medio basal y lo disminuye en el área preóptica medial de modo dosis dependiente.⁴⁹

En el hipotálamo y la hipófisis, las progestinas y sus metabolitos inhiben el marcaje de los receptores muscarínicos por [³H] bencilato de quinuclidina.¹¹⁶

Por otro lado, el sistema colinérgico a su vez regula la respuesta de las neuronas hipotalámicas a los estrógenos, ya que el tratamiento con betanecol, un agonista colinérgico muscarínico, incrementa en 38% el número de sitios de unión al estradiol en el citosol de neuronas hipotalámicas de ratas hembras ovariectomizadas y el pre-tratamiento con atropina bloquea los efectos del betanecol. En machos castrados, el betanecol no tuvo efectos sobre la concentración de sitios de unión al estradiol.¹²⁷

El sistema colinérgico interactúa con otros sistemas de neurotransmisión que participan en la regulación de la secreción de la GnRH. El sistema colinérgico modula la actividad neural de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA, por sus en inglés). En la rata hembra, las neuronas TIDA presentan cambios circádicos en su actividad, con alta actividad por las mañanas y bajas en las tardes.

En ratas ovariectomizadas, con o sin reemplazo estrogénico, la aplicación intra cerebro-ventricular de atropina o mecamilamina no tuvo efecto en la actividad de las neuronas TIDA cuando se realizó antes de las 12:00h, momento en el que la actividad endógena de las neuronas TIDA es alta. Sin embargo, ambas drogas produjeron una estimulación dosis dependiente en la actividad de las neuronas TIDA cuando se utilizaron en la tarde, periodo de actividad endógena baja.

En la rata, el «pico» de PRL inducido por los estrógenos fue bloqueado por la inyección de atropina o mecamilamina, un antagonista nicotínico, a las 13:00h. Los cambios diarios en la actividad de las neuronas colinérgicas pueden ser responsables de los cambios en la actividad de las neuronas TIDA de la rata hembra, prerrequisito para que se produzca el «pico» de PRL.¹⁹⁶ La administración central de mecamilamina, aumenta la actividad de TIDA si se aplica en la tarde y no tiene efectos si se aplica en la noche o en machos.¹⁹⁷

Existen evidencias de la interacción entre los sistemas monoaminérgicos y entre éstos y el sistema colinérgico en la regulación de la liberación de GnRH, así como en otros procesos fisiológicos.

La liberación de GnRH por la eminencia media en ratas cíclicas es estimulada significativamente por antagonistas muscarínicos 11[(2) (dietilamino) metil] [-1-piperidinil]-acetil-5, (AF-DX-116) y metoctramina. Dicha estimulación depende del día del ciclo estral en que se realice el tratamiento. Es posible que los efectos inducidos por la administración de estos fármacos sean mediado por receptores muscarínicos del subtipo m4. El bloqueo de los efectos de los antagonistas muscarínicos sólo fue posible en presencia de prazosin, un antagonista α_1 -adrenérgico. Una posible explicación para la estimulación de la liberación de GnRH por un antagonista

muscarínico es que los efectos son el resultado de un *cross-talk* o intercomunicación, entre los receptores muscarínicos y los receptores α_1 -adrenérgicos. Así, los agonistas muscarínicos inhiben la liberación de GnRH inducida por los agonistas α_1 -adrenérgico y los antagonistas muscarínicos, al cancelar este efecto inhibitorio permite los agentes α_1 -endógenos (noradrenalina) induzcan la liberación de GnRH.¹²¹

En ratas ovariectomizadas, la inyección en el tercer ventrículo de 20 a 100 μg de sulfato de atropina (2 μl) redujo significativamente las concentraciones plasmáticas de LH y PRL. La inyección intraventricular de 20 μg de acetilcolina indujo un incremento significativo de la concentración de LH y redujo la de PRL durante los 5 minutos siguientes a la inyección, mientras que la concentración de FSH se elevó 30 minutos después de la inyección. El bloqueo de los receptores dopaminérgicos con pimozide previene los incrementos en las concentraciones plasmáticas de LH y FSH así como la disminución de PRL inducidos por la inyección intraventricular de acetilcolina. La supresión de la liberación de LH inducida por la atropina fue revertida y ocurrió una elevación en los animales que fueron pretratados con el bloqueador de los receptores dopaminérgicos. La inyección de atropina no tuvo efectos sobre las altas concentraciones de PRL en los animales tratados con pimozide. Estos resultados apoyan la idea de los papeles estimulante de la acetilcolina sobre la liberación de las gonadotropinas e inhibitorio sobre la liberación de PRL e indican que el control colinérgico podría ser mediado por las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares.²¹⁴

El bloqueo de los receptores noradrenérgicos (fenoxibenzamina 20 mg/kg de peso), dopaminérgicos (pimozide 1 mg/kg de peso) o colinérgicos muscarínicos (atropina 700 mg/kg de peso) impide la liberación de gonadotropinas inducida por la inyección de 2 mg de progesterona a animales ovariectomizados tratados con estrógenos. El implante unilateral de dopamina o acetilcolina en el área preóptica medial (mPOA, por sus siglas en inglés) indujo un incremento significativo de las concentraciones plasmáticas de LH, 5 horas después, mientras que la noradrenalina redujo la concentración de LH.

Los implantes de noradrenalina o acetilcolina en la cama del núcleo de la estría terminal o en la amígdala medial incrementó la concentración sérica de LH, aunque en el caso de la noradrenalina este incremento no fue estadísticamente significativo. Sólo el implante de noradrenalina en el septo lateral indujo liberación de LH.¹⁰⁸

En mPOA, la noradrenalina y la acetilcolina regulan tónicamente el ciclo sueño-vigilia y la temperatura corporal. Las inyecciones combinadas de prazosin (antagonista α_1) y carbacol (agonista colinérgico) o de escopolamina (antagonista colinérgico) y metoxamina (agonista α_1) resultan en la sumatoria de los efectos de cada una de las drogas por separado, por lo que se sugiere una interacción e integración de las aferencias noradrenérgicas y colinérgicas en mPOA para la regulación del ciclo

sueño-vigilia y la temperatura corporal.¹⁴³ Además, existen evidencias que los receptores presinápticos $\alpha 2$ -adrenérgico de mPOA participan en la relación sueño-vigilia, vía los receptores $\alpha 1$ -adrenérgico (postsinápticos), y dado que la inyección de clonidina (agonista $\alpha 2$) no afecta la temperatura corporal es posible que existan grupos separados de terminales noradrenérgicas que controlen el sueño y la temperatura corporal de modo independiente.¹⁷⁸

Sistemas monoaminérgicos - ubicación

Como se mencionó anteriormente, en las células GnRH se integra la información de una red neuronal compleja usada por el cerebro para generar la secreción pulsátil de las gonadotropinas por la hipófisis. Entre los sistemas de neurotransmisión que integran esta red neuronal, los sistemas monoaminérgicos son unos de los que mayor atención han recibido. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de literatura escrita sobre el tema, aún no es claro el papel preciso de su participación, ya que la diversidad de modelos estudiados, el uso de drogas inespecíficas y la complejidad de la organización neuroanatómica ha hecho difícil la interpretación de resultados contradictorios.

Las monoaminas derivan de aminoácidos y también se les conoce como aminas biogénicas. Desde el punto de vista de su estructura química, las aminas biogénicas más importantes en el sistema nervioso se clasifican en dos grupos: las catecolaminas, llamadas así porque la base de su estructura es el núcleo catecol y las indolaminas cuya base es el indol.¹⁷⁴

Las catecolaminas se sintetizan a partir del aminoácido tirosina y son la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina. En el cerebro existen 19 grupos celulares que contienen catecolaminas, de los cuales siete son de naturaleza noradrenérgica (A1-A7), nueve dopaminérgicos (A8-A16) y los tres restantes adrenérgicos (C1-C3).^{17,210}

Los grupos noradrenérgicos y adrenérgicos se localizan en la porción caudal del cerebro y presentan fibras ascendentes que inervan el diencéfalo y el cerebro anterior y fibras descendentes que proyectan hacia la médula (Figura 5).¹⁴⁸

Las neuronas noradrenérgicas del grupo A1 están situadas en la porción ventrolateral de la médula oblongata y emiten proyecciones ascendentes que viajan por el tracto tegmental ventral, desde la médula (VLMO, por sus siglas en inglés) y el puente, e inervan POA-AHA.¹⁸² Se ha mostrado que neuronas vecinas a las del grupo A1, entre las que probablemente haya intercomunicación, también son de naturaleza catecolaminérgica, principalmente, y proyectan sus fibras hacia todos los niveles de la médula espinal.⁹¹ Los cuerpos celulares de las neuronas del grupo A2 se ubican en el núcleo caudal del tracto solitario, los cuerpos celulares de A5 en la

porción ventrolateral del puente, los cuerpos celulares de A6 en el locus coeruleus y los cuerpos celulares A7 en la formación reticulada mesencefálica.¹²⁰

La innervación noradrenérgica de mPOA, donde se concentran los somas neuronales GnRHérgicos, proviene principalmente de los grupos medulares A1 y A2. La inyección unilateral de peroxidasa del rábano (HRP, por sus siglas en inglés), un

trazador retrógrado, en mPOA revela la presencia de células HRP-positivas en ambos lados de la médula oblongata.⁴⁵ Si bien, las neuronas del grupo A1 proyectan a ambos lados del área preóptica, experimentos con estimulaciones eléctricas de mPOA y A1 muestran que las aferencias contralaterales son más eficaces para estimular la liberación de LH que las aferencias ipsilaterales.⁸²

Los somas neuronales del grupo adrenérgico C1 se ubican en la porción rostro ventral de la médula, el grupo C2 en la porción rostromedial del núcleo del tracto solitario y el grupo C3 en la porción rostro medial de la médula.⁹⁶

Los grupos neuronales dopaminérgicos que innervan el hipotálamo son A11, A12, A13 y A14.¹²⁰ Las neuronas del grupo A12 o neuronas tuberoinfundibulares conforman el grupo de mayor tamaño y proyectan sus axones a la eminencia media, donde se encuentran en aposición con los capilares del sistema portahipofisiario. Estas neuronas liberan grandes cantidades de dopamina al sistema portal¹¹ y regulan la liberación de prolactina al actuar directamente sobre los lactotropos hipofisiarios (Figura 6).²¹⁵

Los grupos A11, A13 y A14 conforman el sistema incertohipotalámico.²¹ Las neuronas del grupo A11 se ubican en el hipotálamo posterior y el tálamo ventral; son la fuente principal de innervación dopaminérgica espinal. Los somas dopaminérgicos de los grupos A13 y A14, localizados en la zona incerta medial y la porción rostral del núcleo periventricular proyectan sus axones hacia las áreas hipotalámicas que contienen somas de neuronas GnRHérgicas, por lo que podrían estar involucradas en el control de la secreción de las gonadotropinas.^{45,186}

Existen nueve grupos neuronales serotoninérgicos (B1-B9). Los grupos B1-B5 se encuentran situados caudalmente, en la porción del puente. Los grupos B6-B9 se distribuyen en el núcleo del rafe, el cual se subdivide en las porciones dorsal y medial. En el rafe dorsal, situado en la porción

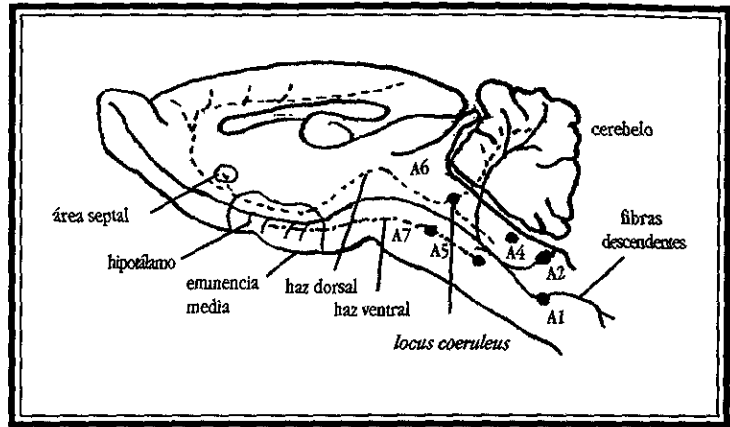


Figura 5. Esquema de un corte sagital de cerebro de rata donde se muestran los núcleos noradrenérgicos y sus proyecciones.

ventral de la sustancia gris periacueductal, se encuentran los grupos B6 y B7 y en la porción medial el grupo B8 y parte del B9. Las neuronas serotoninérgicas de las porciones dorsal y medial del rafe proyectan sus fibras hacia el hipotálamo, la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, áreas rostrales del sistema límbico, el órgano vasculoso de la lámina terminalis y la eminencia media. Las neuronas del puente, envían sus fibras hacia regiones caudales como el bulbo raquídeo y la médula espinal.^{72,206} Al parecer, existe una fuente de serotonina dentro del hipotálamo, en el núcleo dorsomedial, ya que la deafferentación hipotalámica reduce sólo parcialmente la concentración de serotonina (Figura 7).¹⁷³

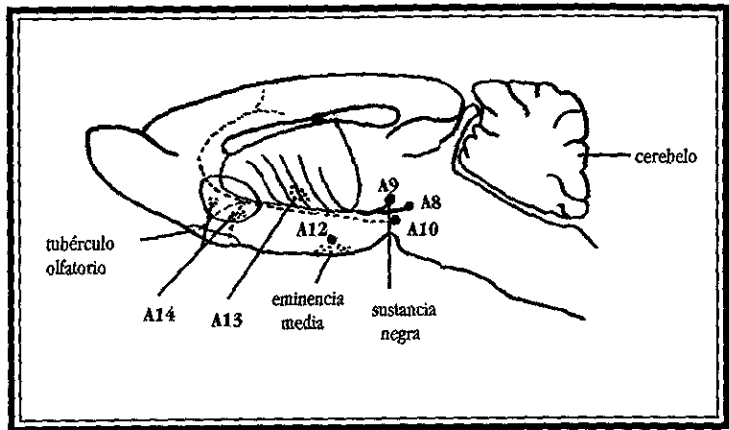


Figura 6. Esquema de un corte sagital de cerebro de rata donde se muestran los núcleos dopaminérgicos y sus proyecciones.

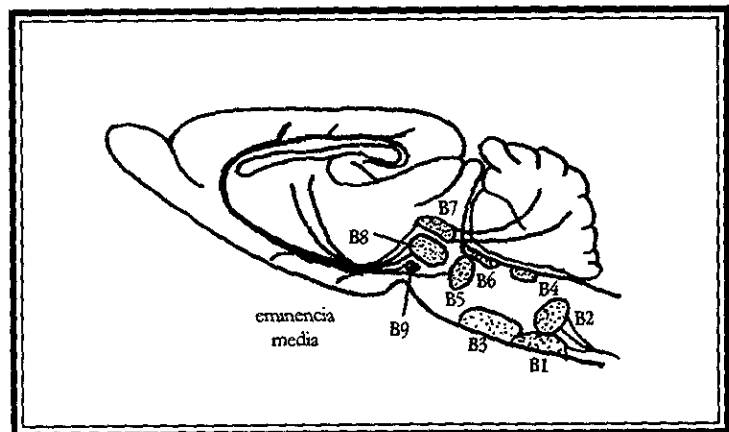


Figura 7. Esquema de un corte sagital de cerebro de rata donde se muestran los núcleos serotoninérgicos y sus proyecciones.

Sistema noradrenérgico

La regulación de la secreción de GnRH se realiza principalmente en POA-AHA, donde se localizan la mayoría de los somas neuronales GnRHérgicos y de la eminencia media, donde se ubican las terminales peptidérgicas que descargan sus productos de secreción a la circulación portal.^{8,164}

La participación del sistema noradrenérgico en la regulación de la liberación de las gonadotropinas ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la interpretación de los resultados ha sido difícil, dado que la diversidad de modelos experimentales y la complejidad intrínseca de la organización neuroanatómica en el hipotálamo han generado resultados, al parecer, contradictorios.

Los estudios sobre los cambios temporales de la concentración y la tasa de recambio de las catecolaminas en el hipotálamo permiten visualizar el perfil de liberación fisiológico y la participación

temporal de los diferentes sistemas catecolaminérgicos en la regulación de la liberación de las gonadotropinas que sucede en el animal.

Las tasas de recambio de las catecolaminas en las áreas preóptica, hipotalámica anterior y núcleo supraquiasmático incrementan significativamente entre las 15:00 y 17:00 del proestro, junto con las concentraciones plasmáticas de LH, FSH y prolactina.⁸ En particular, el recambio de noradrenalina se incrementa de modo marcado en aquellas áreas donde se localizan los somas (mPOA) o las terminales (eminencia media, EM) de las neuronas GnRH.^{179,219}

Estudios realizados con la técnica de *push-pull cannula* muestran que en los animales ovariectomizados, el ambiente neuroendócrino en el área preóptica se caracteriza por la liberación pulsátil de noradrenalina, adrenalina y dopamina y que la liberación masiva de la LH, inducida por el reemplazo hormonal con estrógenos, es precedida por un aumento abrupto en la secreción de estas aminas, entre 10 y 100 veces mayor a la tasa de liberación basal.⁴⁷ Estudios realizados en animales enteros con esta misma técnica en el hipotálamo medio basal (HMB) muestran que la tarde del proestro se caracteriza por un incremento gradual de la liberación de noradrenalina y simultáneamente un decremento gradual de la liberación de dopamina, y el cenit de la liberación de noradrenalina y el nadir de dopamina se presentan alrededor del momento en que se presentan los “picos” preovulatorios de LH y PRL.²⁰⁸

La lesión bilateral de la VLMO, donde se ubican los somas del grupo neuronal A1, bloquea la liberación de FSH, LH y PRL, mientras que el implante de dietil carbamato de sodio, un inhibidor de la dopamina β-hidroxilasa, en la misma zona bloquea la liberación preovulatoria de gonadotropinas y, en muchos de los casos, también la ovulación. Este bloqueo de la secreción de gonadotropinas se acompaña de un aumento en la concentración de dopamina en el hipotálamo medio posterior. Es posible que este incremento en la concentración de dopamina contribuya al bloqueo de la secreción preovulatoria de gonadotropinas.¹⁰⁹ Los animales con lesión bilateral del VLMO pueden recuperar la capacidad ovulatoria con la inyección intraventricular de noradrenalina o estimulando el núcleo supraquiasmático, por lo que se ha planteado que la liberación preovulatoria de gonadotropinas esta mediada por el efecto estimulante de la noradrenalina de las células A1 que inervan POA-AHA.¹⁰⁹

El estudio de la participación de los diferentes núcleos noradrenérgicos en la regulación de la liberación de las gonadotropinas incluye el empleo de modelos experimentales basados en la estimulación eléctrica o electroquímica de aquellos núcleos noradrenérgicos cuyas neuronas proyectan sus fibras a las áreas de regulación de la secreción de GnRH.

Los resultados de la estimulación eléctrica de los grupos neuronales noradrenérgicos o de sus vías muestran que en animales ovariectomizados con reemplazo hormonal de estrógenos, la

estimulación electroquímica del núcleo A5 disminuye la secreción de LH evocada por la estimulación eléctrica previa de POA, disminución que es proporcional a la cantidad de corriente aplicada. El mismo tratamiento realizado en proestro provoca bloqueo de la ovulación, cuando se estimula el locus coeruleus, A5 o A1.⁵⁷

En animales ovariectomizados, la estimulación eléctrica del haz ventral noradrenérgico no altera el patrón pulsátil de LH en sangre, típico de estos animales, mientras que la estimulación del haz dorsal provoca inhibición de la liberación pulsátil de LH por 1 hora.¹⁵ En animales ovariectomizados con reemplazo hormonal, la estimulación de los haces ventral o dorsal no afecta o altera mínimamente las concentraciones plasmáticas no pulsátiles de LH.¹⁵ Cuando la estimulación de los haces dorsal o ventral se realiza en la tarde provoca un decremento en la concentración de LH a las 17:00 horas.¹⁶

En animales ovariectomizados con reemplazo hormonal de estrógenos, la estimulación eléctrica de A1 amplifica la secreción de LH evocada por la estimulación electroquímica previa de POA.⁸² La administración intra peritoneal de dietilditiocarbamato (inhibidor de la dopamina- β -hidroxilasa) y fenoxibenzamina (antagonista α -adrenérgico) bloquean completamente la amplificación del pico de LH inducido por la estimulación eléctrica de A1.⁸²

La estimulación ipsilateral de mPOA y A1 no provoca incremento en la liberación de LH. Cuando se estimulan las proyecciones A1 contralaterales hay incremento en la liberación de GnRH.⁸² Al parecer, la inervación cruzada que llega a POA desde A1 es más importante que las aferencias ipsilaterales en el control de la secreción de GnRH.

Los efectos inhibitorios sobre la liberación de LH por la estimulación electroquímica del locus coeruleus pueden ser suprimidos por antagonistas β -adrenérgicos y no por antagonistas α -adrenérgicos. También pueden ser suprimidos por la destrucción ipsilateral del haz noradrenérgico dorsal. Al parecer, la inervación ipsilateral del haz dorsal que inerva POA participa de modo preponderante en el efecto inhibitorio de la noradrenalina sobre la liberación de LH.⁵⁷

La información presentada pone de manifiesto que en muchos casos, diferencias en los modelos experimentales causa resultados antagónicos, y la dificultad de precisar un modelo que explique la variedad de resultados.

Una hipótesis que explique esta diferencia en los resultados es que los efectos inhibitorios de la noradrenalina son consecuencia de una sobre estimulación del sistema que revierte su papel fisiológico estimulante, al actuar sobre receptores tipo β -adrenérgicos, ya que el efecto de altas dosis de noradrenalina se revierte con un antagonista β -adrenérgico, mientras que los efectos excitatorios se bloquean con un antagonista α -1-adrenérgico, como la fenoxibenzamina.

Existen pocos resultados sobre el número y la afinidad de los diferentes tipos de receptores adrenérgicos en POA. Al parecer, el número de receptores β -adrenérgicos en el hipotálamo es

los autores, la dopamina no estaría siendo capturada por las terminales noradrenérgicas y transformada en noradrenalina, ya que el trabajo se llevó en presencia de un inhibidor de la síntesis noradrenérgica. Al parecer, el tratamiento induce la liberación de noradrenalina por las terminales noradrenérgicas de la eminencia media.¹⁰¹

Sistema serotoninérgico

Existen evidencias experimentales que apoyan la idea de la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la liberación de las gonadotropinas, y que los efectos de la serotonina sobre la secreción de LH y la ovulación se expresan por cambios en la liberación de GnRH por las neuronas neurosecretoras del hipotálamo, mas que por una acción directa de la serotonina sobre la hipófisis.¹³⁰ Al parecer, las acciones estimulante o inhibitoria de la serotonina sobre la actividad de la neurona GnRHérgica dependen de la zona de estudio, el origen de las aferencias y del ambiente hormonal del animal.

Johnson y Crowley¹⁰⁵ observaron que la microinyección de 5,7-DHT, un inhibidor de la síntesis de serotonina (5-HT), en el HMB aumenta la concentración de LH, mientras que el mismo tratamiento en el área preóptica la disminuye, lo que apoyaría la idea propuesta por Kordon y Glowinski¹¹⁹ sobre la existencia de un centro serotoninérgico inhibitorio, ubicado en el HMB y otro estimulante o permisivo en la región preóptica-supraquiasmático.

Las acciones opuestas de la 5-HT en la liberación de LH pueden ser explicadas también con base en la participación de las diferentes vías que inervan el hipotálamo. La estimulación electroquímica del rafe medial o la lesión del núcleo dorsal del rafe bloquean la liberación preovulatoria de LH, lo que permite sugerir que el rafe medial juega un papel inhibitorio mientras que el rafe dorsal es estimulatorio.¹⁵⁶

El bloqueo de la ovulación por la lesión del rafe dorsal puede ser revertido por la inyección sistémica de propanolol (antagonista β -adrenérgico) o la microinyección de 5-HT en el locus coeruleus¹⁵⁷, mientras que el bloqueo de la ovulación inducido por la estimulación del rafe medial puede ser prevenidos por la inyección de antagonistas GABA_A como picrotoxina y bicuculina.¹⁵⁸

Los esteroides sexuales parecen ser un factor crítico en la expresión de la actividad de las neuronas serotoninérgicas sobre la secreción de las gonadotropinas. En el núcleo supraquiasmático⁹⁴ y en la eminencia media se presenta un “pico” serotoninérgico transitorio concomitante con el “pico” preovulatorio de LH, el cual no se expresa en ratas macho y ratas hembras ovariectomizadas. El tratamiento secuencial con hormonas sexuales produce un incremento significativo en la síntesis

y la concentración de serotonina en el núcleo dorsal del rafe,³¹ donde se ubican somas serotoninérgicas, y en la concentración de serotonina en la EM,^{32,161} POA-AHA¹¹⁴ y otras áreas hipotalámicas relacionadas.¹⁰⁵

En ratas ovariectomizadas, la inyección de estrógenos también aumenta la densidad de los receptores serotoninérgicos en POA-AHA, el septo lateral y la eminencia media.²⁰ La densidad de receptores a serotonina en el hipotálamo y el área preóptica presentan cambios durante el ciclo estral, con la menor densidad en proestro y estro.¹⁹

INERVACIÓN DEL OVARIO

El eje hipotálamo-hipófisis-gónada es regulado no sólo por hormonas, sino también por influencias neurales que al parecer proporcionan un control fino de su funcionamiento.¹⁷⁰ En el ovario se ha descrito la presencia de componentes neurales simpáticos, parasimpáticos y peptidérgicos que participan en la regulación de su actividad.

Las fibras del sistema simpático llegan al ovario por el plexo ovárico, cuyas fibras inervan la vasculatura ovárica y por el nervio ovárico superior (NOS), las que inervan el tejido esteroideogénico. Técnicas inmunocitoquímicas han revelado la presencia de fibras peptidérgicas reactivas a la sustancia P (SP), NPY y al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP, por sus siglas en inglés) en el plexo ovárico; mientras que en el NOS se encuentran fibras que contienen el péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés).⁴⁶ Estas fibras peptidérgicas inervan la vasculatura ovárica y el tejido intersticial, y están asociadas con las capas de la teca de los folículos en crecimiento.¹⁷⁰

La inervación parasimpática que recibe el ovario proviene del nervio vago,^{24,95} cuyos somas se localizan en el ganglio nodoso y en las células ganglionares de la raíz dorsal de los segmentos T10 a L2 y de las fibras originadas en los niveles S2-S4 de la médula espinal a través del plexo hipogástrico,¹⁵⁰ aunque existen autores que mencionan que este plexo no contribuye a la inervación del ovario.²⁶ Las fibras del nervio vago presentan también fibras peptidérgicas, principalmente SP, además de VIP y somatostatina.⁸¹

Existen numerosas evidencias que muestran la participación de los sistemas neurales en la modulación de los efectos de las gonadotropinas sobre la secreción hormonal.

Aunque aún falta por establecer la importancia fisiológica de los nervios ováricos, la mayoría de los estudios se han enfocado al posible papel de los neurotransmisores adrenérgicos en el control de la función folicular.⁸⁴

Estudios de Bhar y Ben-Johnathan han mostrado que la estimulación del ovario de rata con gonadotropinas reduce significativamente la cantidad de catecolaminas en el ovario¹⁸ y que la

FSH, más que la LH o la PRL es la hormona hipofisiaria responsable de la reducción de la cantidad de noradrenalina de los folículos.¹²

Existen evidencias de la posible participación de la inervación gonadal en la regulación de la actividad esteroidea de los ovarios. La inyección intra-ovárica de agonistas β -adrenérgicos, pero no de los α -adrenérgicos, incrementa la secreción de progesterona, sin modificar la tasa de secreción de estrógenos.⁵ Estudios *in vitro* donde se cultivan células luteales y de la granulosa han confirmado los efectos estimulantes de las catecolaminas sobre la secreción de progesterona,^{1,5,30} y que estos efectos pueden ser bloqueados con propanolol, un antagonista β -adrenérgico. Experimentos *in vitro* e *in vivo* muestran que el pre-tratamiento con FSH aumenta la respuesta esteroideogénica de los ovarios al tratamiento con noradrenalina e isoproterenol.¹ Existen evidencias que muestran que la sensibilidad de las células de la granulosa de folículos preovulatorios de la rata a las catecolaminas se desarrolla sólo después del “pico” preovulatorio de LH.⁹⁹

El autoinjerto de ovario en la rata o la cobaya hemiovariectomizada no presenta signos de ovulación, lo que sí sucede con el ovario *in situ*. En cambio, si se castra al animal y se le autoinjertan los ovarios, éstos presentan signos de ovulación de modo espontáneo. Además, si a una rata hemiovariectomizada con autoinjerto de ovario se le extirpa el ovario *in situ*, el autoinjerto crece rápidamente y muestra signos de ovulación.^{50,181}

En la rata prepúber, los resultados de experimentos similares al anterior dependen de cual sea el ovario que permanece *in situ*. Cuando el ovario derecho permanece con todas sus conexiones y el ovario izquierdo se extirpa y autoinjerta, el ovario injertado no ovula, resultados similares a los observados en el animal adulto. En cambio, cuando el ovario derecho es el que se extirpa y autoinjerta, presenta signos de ovulación; lo que indica diferencias en la capacidad de autorregulación de los ovarios izquierdo y derecho.⁴³ Estos resultados han sido interpretados como una manifestación de la existencia de vías de conexión entre el ovario y el sistema nervioso central, por medio de las cuales el ovario envía información sobre su funcionamiento a los centros neuronales que regulan la secreción de las gonadotropinas.

La desnervación simpática periférica provocada por la administración de guanetidina (GTD) en la rata hemiovariectomizada con autoinjerto de ovario no modifica la falta de crecimiento folicular y ovulación observada en los autoinjertos de animales hemiovariectomizados. Cuando a estos animales se les inyecta de modo secuencial FSH y LH se observan signos de ovulación en el autoinjerto, tal como cuerpos lúteos de formación reciente, con características morfológicas semejantes a la de los cuerpos lúteos de los ovarios *in situ*.⁴ Estos resultados indican que la inervación noradrenérgica del ovario juega un papel importante en la modulación de la respuesta del ovario a las gonadotropinas.

En la rata adulta, la sección bilateral de los nervios vagos resulta en el aumento del número de ovocitos liberados. En cambio, cuando se realiza la sección unilateral del nervio vago, los resultados dependen del nervio seccionado. La sección del nervio vago izquierdo produce una disminución significativa de la tasa de animales ovulantes, sin que se observen diferencias significativas en el número de ovocitos liberados por animal ovulante. Por otra parte, la sección del nervio ovárico derecho no modifica de modo significativo ninguno de estos parámetros.^{33,40}

La vagotomía en el día del proestro disminuye la concentración sérica de LH 48 horas y 8 días después y provoca el aumento de la concentración de FSH a las 24 horas, sin que se observen cambios en la concentración estradiol y testosterona.²⁷

Los efectos de la desnervación noradrenérgica de los ovarios por la inyección de GTD se evaluaron en dos diferentes cepas de ratas. En ambos casos, los efectos de la desnervación dependen de la edad del animal. En ratas cíclicas, el tratamiento con GTD provoca alteraciones en el ciclo estral. Cuando se interrumpe el tratamiento, los animales reanudan el ciclo estral, pero el número de ovocitos liberado por animal ovulante disminuye significativamente. En cambio, cuando se inyectaron ratas recién nacidas con el mismo fármaco y en la misma dosis (20 mg/kg) de lunes a viernes hasta el día del primer estro vaginal, el número de ovocitos liberados por animal ovulante fue significativamente mayor al normal.^{52,68}

La anestesia de los ovarios a las 13:00 horas del día del proestro, producida por la inyección intrabursal de Xilocaína provoca alteraciones en la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados por animal ovulante. Cuando se anestesia el ovario izquierdo y se inyecta salina en el derecho disminuye el número de ovocitos liberados por ambos ovarios. Las diferencias se hacen más notables cuando se anestesia un ovario y dos minutos después se extirpa el ovario no tratado. Cuando se anestesia el ovario izquierdo y se extirpa el derecho, ningún animal ovula. Cuando se anestesia el ovario derecho y se extirpa el izquierdo, o cuando se anestesian ambos ovarios no se observan cambios en los parámetros de estudio. Estos resultados permiten suponer que al comienzo de la tarde día del proestro se origina una señal nerviosa, al parecer en el ovario izquierdo, que actúa de modo sinérgico o que refuerza los mecanismos hormonales que regulan la liberación preovulatoria de la LH, ya que cuando el tratamiento se realiza después del llamado “periodo crítico” no produce cambios.⁵⁵

La ovariectomía unilateral es un procedimiento experimental útil para elucidar la cinética folicular en una variedad de especies.⁸⁹ El desarrollo folicular compensatorio (y por tanto, el mantenimiento del número de ovulaciones característico de la especie) depende del rápido reclutamiento de los folículos pequeños como respuesta rápida a la hemiovariectomía (Hovx). Hoy se ha establecido que la Hovx trae consigo un incremento temporal de la concentración de FSH y otro menor, no tan evidente de LH.²¹⁶

El incremento de FSH después de la Hovx es análogo al incremento preovulatorio que ocurre en la mayoría de los mamíferos y, al parecer, sería el que recluta a los folículos pequeños para el siguiente ciclo. Inmediatamente después de la Hovx no hay cambios en las concentraciones plasmáticas de estradiol en cricetos⁷ o ratas.²¹⁶ Por tanto, la remoción del feedback de los estrógenos parece no ser el factor principal que induzca el incremento transitorio de la concentración de FSH. En ratas castradas en diestro 2-cuando los folículos antrales están presentes, los efectos de la Hovx son revertidos por la administración de inhibina, por lo que esta puede ser el ingrediente clave removido por la Hovx. Si esto fuera así, ¿por qué se inhibe la liberación de inhibina cuando se hace la Hovx? Puede ser además de que se altere la secreción de GnRH, y que el tratamiento con inhibina sea la que abata la liberación de GnRH al internalizar los receptores a GnRH inducidos por la propia GnRH.

En la mona rhesus (*Macaca mulatta*), las fibras que contienen SP o CGRP representan la innervación sensorial.¹⁹⁰ Las fibras sensoriales son de diámetro pequeño y no mielinizadas, sus receptores son del tipo polimodal y se distribuyen alrededor del tejido conectivo y penetran al ovario.¹²⁵

Existen evidencias de la presencia de receptores a CGRP en el núcleo del tracto solitario.^{99,159,205} En esta zona, donde se ubica el grupo catecolaminérgico A2, las fibras CGRP inmunoreactivas hacen contactos sinápticos con neuronas tirosina hidroxilasa inmunoreactivas, lo que indica que estas fibras, las cuales acarrean señales sensoriales, podrían influenciar los mecanismos de regulación en el núcleo del tracto solitario mediante su acción sobre las neuronas del grupo A2.⁷⁰

Las neuronas catecolaminérgicas del grupo A2 reciben sinapsis de nervio vago, el cual, además de acetilcolina presentan CGRP, como lo revelan estudios con técnicas inmunohistoquímicas y de hibridización *in situ*.²⁰³

En el ovario de la mona se ha encontrado dentro de la médula ovárica y en la corteza una red de células semejantes a neuronas. Estas células presentan neurofilamentos y son inmunoreactivas a la enolasa específica de las neuronas. Al parecer, están densamente interconectadas y se ha visto que inervan la vasculatura ovárica, la capa celular de la teca de los folículos y ocasionalmente a los folículos primordiales. Entre estas células existe una subpoblación de naturaleza catecolaminérgica.¹⁹⁰

En el ovario de la rata se ha descrito la presencia de cuatro microganglios y de «neuronas» aisladas.⁴⁴ La función de estas células con características de neuronas aún está por definirse.

Los humanos y otros primates alternan la ovulación entre los ovarios izquierdo y derecho; se ha visto que la lagartija verde (*Anolis carolinensis*) también presenta esta alternancia en la ovulación y se ha mostrado que esta asimetría ovárica puede ser correlacionada con asimetrías en las concentraciones de catecolaminas hipotalámicas.¹⁰⁶

La actividad neural ([metabolito]/[neurotransmisor]) de las monoaminas en el diencefalo de *A. nolis* es significativamente mayor en el lado ipsilateral al ovario quiescente que en el lado del ovario activo.¹⁰⁶ Las asimetrías en las concentraciones hipotalámicas de 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (MHPG, por sus siglas en inglés) y 3,4-dihidrofenilglicol (DHPG, por sus siglas en inglés) parecen invertirse entre un lado y otro durante el ciclo ovárico, mientras que no se observan cambios asimétricos significativos en las concentraciones de dopamina o su metabolito ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC, por sus siglas en inglés).⁴⁸

La hemiovariectomía de cualquiera de los ovarios aumenta la asimetría en la concentración de DOPAC del lado ipsilateral a la Hovx y aumenta la asimetría de la concentración de MHPG a favor del lado del ovario activo. La hemiovariectomía del ovario activo provoca que la asimetría hipotalámica de noradrenalina se invierta desde el lado ipsilateral del lado del ovario inactivo hacia el otro.¹⁰⁷

La innervación ovárica no sólo regula la reactividad del ovario a las gonadotropinas sino también la actividad monoaminérgica del hipotálamo. Es posible pensar que las fibras sensoriales que innervan el ovario envíen información del estado funcional de este órgano al sistema nervioso central vía espino-talámica o por el nervio vago. Tanto las fibras de la vía espino-hipotalámico como las del vago innervan el núcleo del tracto solitario, donde se podría dar un relai de la información ovárica por las neuronas noradrenérgicas del grupo A2, las cuales proyectan sus axones hacia el hipotálamo y regulan la secreción de la GnRH.

ASIMETRÍA

La primer evidencia acerca de la existencia de una asimetría cerebral fue dada por Paul Broca,²⁰¹ al informar que las afasias cerebrales eran provocadas por malformaciones o lesiones en el lado izquierdo del cerebro. Posteriormente se mostró que la región temporal de la corteza del lado izquierdo (área de Wernike) es más grande que la del lado derecho.⁸⁰ Estas observaciones llevaron a plantear el concepto de lateralización cerebral y posteriormente el de dominancia cerebral. Este concepto fue también modificado con base en el hecho de que ambos hemisferios tienen la misma complejidad con funciones diferentes, es decir que cada hemisferio era dominante en funciones específicas.⁷⁹

En el hombre, el hemisferio izquierdo se especializa en la organización de la información en forma analítica, como el lenguaje y las habilidades matemáticas, mientras que el hemisferio derecho se especializa en procesar la información en forma holística, como la relacionada con el

reconocimiento espacial y las emociones.¹⁸³

El concepto de lateralización cerebral se extendió a otras especies, al mostrarse en algunas especies de aves, que ciertas conductas del canto son controladas por el lado izquierdo del cerebro y por el nervio hipogloso del mismo lado¹⁶⁸ y que en la rata, aspectos emocionales y de orientación espacial son controlados por el hemisferio derecho,⁵⁶ semejante a lo que ocurre en los humanos.

Estas asimetrías funcionales están relacionadas con asimetrías químicas y bioquímicas; por ejemplo, en la rata la conducta de giro producida por lesión unilateral de la sustancia negra o por la inyección de anfetamina, provoca un desbalance neuroquímico en el lado opuesto al que gira el animal.⁸³ El entrenamiento del uso de una de las patas conduce a un incremento en la concentración de la enzima acetilcolinesterasa¹²⁴ y alteraciones del árbol dendrítico en la corteza sensorio motora contralateral a la pata usada,⁸⁸ así como a cambios asimétricos en el metabolismo de la dopamina.^{192,223} Además, se mostró que sólo el receptor D1 dopaminérgico está asociado al control asimétrico de la actividad locomotora regulada por el núcleo acumbens.¹⁰

Algunas de estas asimetrías fisiológicas y conductuales varían con el sexo, lo que hace suponer que las hormonas sexuales establecen dichas diferencias. En la rata de cuatro días de vida, la asimetría en el contenido de receptores a estrógenos en la corteza cerebral depende del sexo: en el macho hay más receptores del lado izquierdo, mientras que en la hembra sucede lo contrario.¹⁸⁵

La asimetría en la concentración de receptores y los efectos de las hormonas gonadales en la etapa perinatal podrían repercutir en el establecimiento de patrones fisiológicos y de conducta en la etapa adulta. Nordeen y Yahr¹⁶⁷ mostraron que los implantes de estrógenos en el hipotálamo de la rata hembra recién nacida, inducen cambios conductuales diferentes en la edad adulta; estos cambios dependen del lado y del núcleo hipotalámico en el que se coloque el implante. Así, la implantación de estrógenos en el lado izquierdo del núcleo ventromedial disminuye la conducta sexual femenina (expresada como disminución del coeficiente de lordosis); mientras que el implante del lado derecho del área preóptica incrementa la conducta sexual masculina, la que se evidencia por la aparición de la conducta de monta.

Neuroendócrinas

La primera observación que sugirió la existencia de asimetrías en la regulación de las funciones neuroendócrinas fue dada por Gerendai,⁷⁷ al indicar que en la rata hembra, la concentración de la GnRH era el doble en el hipotálamo medio basal del lado derecho respecto al izquierdo. Dicha asimetría también se presenta en la rata macho, pero además, ésta se observa en horas específicas del día.⁶

En el ratón macho, el número de células inmunoreactivas a GnRH es mayor del lado derecho del cerebro que del lado izquierdo. La orquidectomía bilateral o la extirpación del testículo izquierdo disminuye el número de células GnRHérgicas, en tanto que la extirpación de la gónada derecha no cambia este hecho.¹⁰⁰ En la rata macho, la deaferentación del lado derecho del hipotálamo y la extirpación del testículo derecho, bloquea el incremento en la concentración plasmática de FSH que normalmente ocurre después de la hemicastración.¹⁶²

Diferentes estudios llevan a considerar que el hipotálamo regula en forma asimétrica la función de los ovarios. En la rata hemiovariectomizada, la lesión del lado derecho del hipotálamo anterior (por radiofrecuencia) inhibe la hipertrofia compensadora del ovario *in situ*, mientras que la lesión del lado izquierdo no la modifica.²⁰⁶ La falta de una gónada incrementa el contenido de GnRH en el hipotálamo medio basal del mismo lado que se extirpa la gónada: la Hovx derecha incrementa el contenido de GnRH del lado derecho del hipotálamo (haciendo más marcada la asimetría), mientras que la extirpación del ovario izquierdo aumenta el contenido del decapeptido en el lado izquierdo del hipotálamo (anulando la asimetría).⁷⁷ La lesión del lado derecho del área retroquiasmática con ácido kaínico, bloquea el desarrollo de hipertrofia compensadora cuando se extirpa el ovario del mismo lado de la lesión.¹⁶³ La lesión del lado derecho de POA en el día del estro, disminuye el número de animales ovulantes.¹⁵³

Los receptores muscarínicos localizados en POA-AHA regulan en forma asimétrica la secreción de la GnRH y la ovulación. Dicha asimetría cambia durante el ciclo estral.^{34,36} El implante de atropina del lado derecho POA-AHA (colocado a las 13:00 horas del día del estro) bloquea la ovulación, mientras que el implante del lado izquierdo no lo hace. Cuando el implante se realiza en el día del diestro 1, ambos implantes bloquean la ovulación; en el día del diestro 2, sólo los implantes del lado izquierdo bloquean la ovulación. En el día del proestro los implantes en uno u otro lado POA-AHA no la alteran.³⁴

La falta de ovulación en animales con implante unilateral de atropina en POA-AHA resulta de modificaciones en la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de LHRH sintético a las 14:00 horas de este día, induce la ovulación.³⁴

Esta modificación en la secreción fásica de la GnRH parece ser el resultado de una alteración en el efecto de *feed-back* estimulante de los estrógenos, ya que al restablecer la señal ovárica en el día del diestro 2, sólo ovulan aquellos animales con el implante de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA.³⁶

Los resultados experimentales de los que disponemos permiten sugerir que en el día del estro, los receptores muscarínicos del lado derecho de POA-AHA tienen un efecto estimulante en la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, ya que la estimulación del sistema (por medio del implante de pilocarpina) no modifica la ovulación, mientras que el bloqueo (por el implante de

atropina) la interrumpe. En cambio, los receptores del lado izquierdo de POA-AHA inhiben la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, ya que su estimulación inhibe la ovulación, mientras que su bloqueo no la modifica.^{34,137}

La función asimétrica que ejerce el sistema colinérgico de POA-AHA, sobre la secreción de las gonadotropinas y la ovulación sería consecuencia de una actividad intrínseca y asimétrica del propio sistema. La actividad de la enzima de síntesis de acetilcolina, la colino-acetil-transferasa (CAT) del lado derecho de POA-AHA varía durante el ciclo estral; sus valores máximos se observan en el día del estro y sus mínimos en el día del diestro 2. En cambio, la actividad de la CAT del lado izquierdo no varía. En el día del estro, la actividad de la CAT en la POA-AHA derecha fue significativamente mayor que en el lado izquierdo. En el día del diestro 2, esta relación se invierte.¹⁸⁴

La actividad de la enzima CAT del lado derecho de POA-AHA varía durante el ciclo estral; sus valores máximos se observan en el día del estro y sus mínimos en el día del diestro 2. En cambio, la actividad de la CAT del lado izquierdo no varía. En el día del estro, la actividad de la CAT en la POA-AHA derecha fue significativamente mayor que en el lado izquierdo. En el día del diestro 2, esta relación se invierte.¹⁸⁴ La concentración de acetilcolina en POA-AHA varía durante ciclo estral: la concentración máxima se detectó en el día del diestro-1 y la menor en diestro-2. Solamente en los días del diestro-1 y del proestro, se observaron diferencias asimétricas; es decir, el lado derecho de POA-AHA tiene más acetilcolina que el izquierdo. La cantidad de sitios de unión (B_{max}) para la [³H]N-metilescopolamina en membranas de tejido de POA-AHA cambia durante el ciclo estral. La mayor cantidad se midió en el día del estro y la menor en el proestro.³⁷ En los días del diestro-2 y proestro existe asimetría en la cantidad de sitios de unión entre los lados izquierdo y derecho de POA-AHA. En diestro 2, la B_{max} del lado derecho fue menor que la del izquierdo y en proestro es indetectables. La actividad funcional del sistema colinérgico (medida por la actividad de la CAT, por el contenido o la liberación de la acetilcolina y por la densidad o la afinidad de sus receptores), está regulada por las hormonas esteroideas.^{61,126,140,149,160,177}

La administración de estradiol incrementa la actividad de la CAT en la vía colinérgica septo-hipocampo y el sistema baso-cortical,⁷¹ la concentración de la CAT en POA,¹⁴⁰ la densidad de receptores muscarínicos en el hipotálamo medio basal y los sitios de unión a la α -bungarotoxina en el núcleo supraquiasmático.

MORFOLÓGICAS Y FUNCIONALES EN LOS OVARIOS

Es bien conocido que en las aves sólo el ovario izquierdo es funcional; la gónada derecha se reduce a una capa de tejido localizado por debajo de la vena cava. La ovariectomía provoca que la gónada

derecha se diferencie en una glándula semejante a un testículo, en la cual se pueden observar espermatozoides,¹³ en un ovario o en un ovotestes.¹⁴ En los murciélagos, la ovulación ocurre predominantemente en la gónada derecha; el ovario contralateral tiene la capacidad de funcionar, sólo si se extirpa el ovario dominante.²³ En la cerda se han observado diferencias bioquímicas entre el ovario derecho e izquierdo.¹⁸⁰ La sangre venosa del ovario derecho llega a la vena cava inferior, mientras que la vena del ovario izquierdo entra en la vena renal izquierda.⁷⁹ El ovario derecho se desarrolla más temprano que el izquierdo.¹⁵¹

En cuanto a la inervación del ovario, se ha mostrado por estudios histológicos que el ovario derecho es más rico en inervación simpática que el izquierdo.¹¹⁷ En ratas hemiovariectomizadas del lado derecho, la sección del nervio vago izquierdo incrementa la proporción de animales ovulantes, la hipertrofia compensadora del ovario y el número de ovocitos liberados; la sección de este nervio vago en ratas hemiovariectomizadas del lado izquierdo disminuye los parámetros antes indicados.³⁹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el hipotálamo, la interacción entre los sistemas colinérgico y monoaminérgico que participan en la regulación de la secreción de las gonadotropinas durante el ciclo estral no se encuentra bien documentada; ni tampoco la participación de la información neuroendócrina eferente del ovario en este mecanismo.

Con el propósito de ampliar la información existente y de profundizar en la comprensión de la participación de los sistemas monoaminérgico y colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas se estudiaron los efectos del bloqueo sistémico del sistema colinérgico muscarínico, provocado por la inyección de sulfato de atropina en los diferentes días del ciclo estral sobre la secreción de gonadotropinas y las hormonas ováricas y la actividad del sistema monoaminérgico del hipotálamo a las 17:00 horas del proestro.

Dado que el día de diestro 1 parece ser clave para que se presente la ovulación de ese ciclo se estudiaron los efectos del bloqueo del sistema colinérgico a las 13:00 horas del diestro 1, sobre la secreción de gonadotropinas y las hormonas ováricas y la actividad del sistema monoaminérgico del hipotálamo a la hora de la inyección, así como en los días posteriores del ciclo estral, hasta que se presentara la ovulación de modo espontáneo.

A partir de evidencias farmacológicas y de estudios sobre cambios en la tasa de recambio de las monoaminas entre la mañana y la tarde del día del proestro se afirman que el sistema monoaminérgico interviene de manera sustancial en los mecanismos de regulación de la liberación preovulatoria de la GnRH y por ende de las gonadotropinas. Con el fin de estudiar el papel temporal que juegan estos sistemas de neurotransmisión se analizaron las modificaciones de la actividad neural de los sistemas monoaminérgicos del hipotálamo durante el día del proestro.

La participación de la información neuroendócrina eferente del ovario en la regulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario se analizó por los efectos de la castración, hemicastración (pérdida parcial de la información proveniente de un ovario) o estimulación mecánica de los pedículos ováricos en cada uno de los días del ciclo estral sobre la actividad del sistema monoaminérgico del hipotálamo y la ovulación por parte del ovario remanente.

Dada la existencia de numerosos reportes de nuestro y otros laboratorios acerca de la presencia de mecanismos de regulación asimétricos en la modulación de la actividad neural hipotalámica, así como en la inervación ovárica, la cuantificación de las monoaminas se hizo por separado entre las porciones izquierda y derecha del hipotálamo.

HIPÓTESIS

Dada la posible existencia de una vinculación funcional directa entre los sistemas colinérgico y monoaminérgico del hipotálamo que regule de la secreción de las gonadotropinas, el bloqueo de los receptores muscarínicos modificará la actividad de los sistemas monoaminérgicos hipotalámicos que participan en la regulación de la secreción de GnRH y por ende la secreción preovulatoria de gonadotropinas y la ovulación.

Si la información neuroendócrina eferente del ovario regula la actividad neural hipotalámica que participa en el proceso ovulatorio, la manipulación de los ovarios provocará alteraciones en la respuesta ovulatoria, por sus efectos sobre la actividad neural hipotalámica y la secreción de gonadotropinas.

OBJETIVOS

1. Conocer la vinculación funcional entre los sistemas colinérgico y monoaminérgicos que regulan la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.
2. Estudiar si existe una organización asimétrica en los sistemas colinérgico y monoaminérgicos vinculados con la regulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.
3. Conocer la relevancia de la inervación periférica ovárica en la regulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar los efectos de la inyección única de la dosis mínima efectiva de sulfato de atropina en cada día del ciclo estral sobre las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y hormonas sexuales, y la actividad monoaminérgica en el área preóptica hipotalámica anterior en la tarde del día de proestro.
2. Estudiar los efectos de la inyección única de la dosis mínima efectiva de sulfato de atropina en el día de diestro 1 sobre las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y hormonas sexuales, y la actividad monoaminérgica en el área preóptica hipotalámica anterior en los días subsiguientes del ciclo estral.
3. Cuantificar la concentración y la actividad de las monoaminas en el área preóptica hipotalámica anterior y en el hipotálamo medio basal en el día del proestro.
4. Estudiar los efectos de la castración y de la hemicastración derecha e izquierda en los diferentes días del ciclo estral sobre la ovulación compensadora (excepto en los animales castrados) y la actividad monoaminérgica en el área preóptica hipotalámica anterior en la mañana del estro esperado siguiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas hembras adultas vírgenes de la cepa C II Z-V, de 90 a 120 días de edad (200-250 g) mantenidas en grupos de seis animales por caja, bajo condiciones controladas de bioterio, con fotoperiodo constante de 14 horas de luz (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas) y con agua y alimento (Purina rat chow) *ad libitum*. El ciclo estral de los animales se estudió por medio de la toma diaria de frotis vaginal y sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron, al menos, dos ciclos consecutivos de cuatro días.

INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS

Las intervenciones quirúrgicas, hemicastración y castración, fueron realizadas bajo anestesia con éter, entre las 9:00 y 10:00 am.

AUTOPSIA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los animales fueron sacrificados por decapitación, se colectó la sangre del tronco, la que se dejó coagular a temperatura ambiente durante 1 hora, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y el suero se guardó a -20 °C hasta la cuantificación de hormonas por radioinmunoanálisis (RIA). El cerebro fue removido rápidamente y colocado en solución salina helada por un minuto. Con base en el atlas estereotáxico de la rata de Köning y Klippel¹¹⁸ y con ayuda de un juego de navajas paralelas se obtuvieron un par de rebanadas coronales del cerebro, la primera que incluía a POA-AHA (A7190 a A6360) (Figura 8) y la segunda al hipotálamo medio basal (A4890 a A3390) (Figura 9). Las áreas de estudio fueron extraídas con un sacabocados de acero inoxidable con diámetro interno de 0.8 mm y guardadas en papel aluminio a -70°C. La disección del cerebro y la extracción de las muestras tomaron entre 60 y 120 segundos.

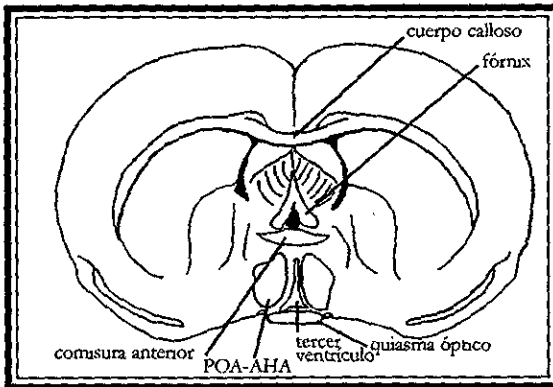
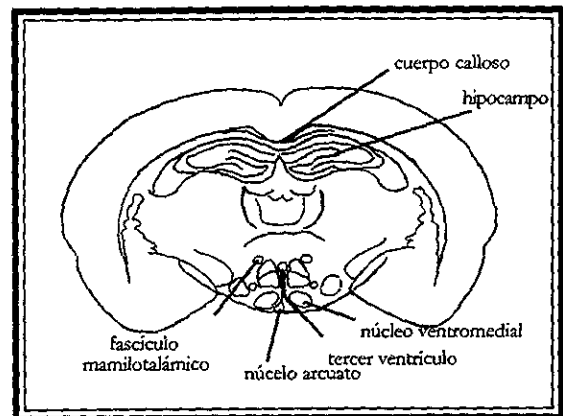


Figura 8. Esquema de un corte coronal de cerebro de rata donde se ubica POA-AHA.

Figura 9. Esquema de un corte coronal de cerebro de rata donde se ubica HMB.



CUANTIFICACIÓN HORMONAL.

Las concentraciones séricas de LH y FSH se cuantificaron por radioinmunoanálisis específicos, con la técnica de doble anticuerpo. Los reactivos y el protocolo usados nos fueron proporcionados por el *National Hormone and Pituitary Program* (Baltimore, MD). Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron de 5.1% y 6.5% para LH y 4% y 7.9% para FSH, respectivamente. Los resultados se expresaron como ng/ml de los estándares internacionales de referencia NIH LH-RP3 y FSH-RP2.

Las concentraciones séricas de progesterona y 17 β -estradiol fueron cuantificados por RIA, utilizando estuches comerciales suministrados por *Diagnostic Products* (Los Angeles, CA). Los coeficientes de variación inter e intra ensayo fueron de 2.0% y 5.4% para progesterona y 6.1% y 7.4% para 17 β -estradiol, respectivamente.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO ENCEFÁLICO

Las muestras de tejido hipotalámico fueron pesadas en una balanza de precisión (0.01 mg) y colocadas en tubos *Eppendorf*. A los tubos con la muestra de tejido se les añadieron 300ml de ácido perclórico (HClO_4 0.1N) y se homogeneizó el tejido (en frío) por sonicación, después se centrifugaron las muestras a -4°C , 13000 r.p.m., por 30 minutos. Se inyectaron 50ml del sobrenadante al sistema de cromatografía.

CUANTIFICACIÓN DE MONOAMINAS

La cuantificación de monoaminas se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión acoplada a un detector electroquímico.

El equipo utilizado se compone de una bomba isocrática (modelo L-250, Perkin Elmer Co., Norwalk, CT, USA); una válvula de inyección de seis puertos (modelo 7125, Rheodyne, Cotati, CA, USA) con un *loop* de 20ml; una columna de fase reversa C_{18} con relleno de Pecosil de 10mm (Perkin Elmer Co.) y un detector amperométrico (LC-4C, Bioanalytical systems Inc., USA) con un electrodo de trabajo de carbón vidriado y un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata (Ag/AgCl). El potencial del electrodo de trabajo se ajustó a 0.85V y la ganancia del detector a 5nA. Para mantener alta la sensibilidad del equipo, el electrodo de carbón vidriado se pulió cuando se consideró necesario.

La fase móvil se preparó a partir de agua químicamente pura ($>10\text{MW/cm}$). Se preparó una solución tampón de citratos (Merck-México, SA., Art.244) 0.15M, a la que se le ajustó el $\text{pH}=3.0$ con solución saturada de hidróxido de sodio, después de lo cual se adicionaron 0.46mM de detergente (1-octane-sulfonic acid, Sigma Chemical Co. USA O-8380). La solución tampón se filtró a través de una membrana con diámetro de poro de 0.22mm (Millipore, Bedford, MA, USA) y se burbujeó con helio durante 10 minutos y se degaseó por vacío por una hora. Finalmente, se adicionaron los solventes orgánicos (4% de acetonitrilo y 2% de tetrahidrofurano para cromatografía, E. Merck, Darmstadt, F.R. Germany). La fase móvil se bombeó a través del sistema de cromatografía a un flujo de 1.0 ml/min.)

El equipo se calibró utilizando el método de estándar externo, para lo cual se construyó una curva de concentración de tres puntos (2, 1 y 0.5 ng) y el origen para cada una de las

sustancias analizadas. En todos los casos, el coeficiente de regresión de las curvas de calibración fue mayor de $r=0.97$. El límite de sensibilidad del equipo se ubicó en los 100 pg.

Las soluciones estándares utilizadas para la calibración del equipo fueron noradrenalina ((-)-Artenerol free base), MHPG (4-Hydroxy-3-Metoxyphenyl Glycol), dopamina (3-Hydroxy Tiramine Hydrochloride), DOPAC (3-4-Dihydroxy-phenylacetic Acid), serotonina (5-Hydroxytryptamine) y 5-HIAA (5-Hydroxyindole-3-acetic Acid).

Todas las sustancias fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Las soluciones estándar se preparaban diariamente y en todos los casos las sustancias fueron disueltos en ácido perclórico (HClO_4) 0.1N.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La tasa de cornificación vaginal se calculó utilizando la siguiente fórmula:³⁹

número de animales con cornificación vaginal / número de animales usados

La actividad neural se calculó utilizando la siguiente ecuación:^{111,193}

actividad neural=[metabolito]/[amina]

Los datos de concentración de monoaminas, actividad neural y concentración hormonal fueron analizados por el análisis de varianzas multivariado (ANOVA), seguido por la prueba de Tukey.

El número de ovocitos liberados fue analizado por las pruebas no-paramétricas de Kruskal-Wallis, seguida de la "U" de Mann-Whitney.

Las tasas ovulatoria y de cornificación vaginal por la prueba de probabilidad exacta de Fisher.

En todos los casos, un valor de $P<0.05$ fue considerado como significativo.

EFFECTOS DE LA DOSIS EFECTIVA DE SULFATO DE ATROPINA
INYECTADA A LAS 13:00 HORAS DE CADA DÍA DEL CICLO
ESTRAL SOBRE LA LIBERACIÓN PREEVULATORIA DE
GONADOTROPINAS.

Efectos de la dosis efectiva de sulfato de atropina inyectada a las 13:00h de cada día del ciclo estral sobre la liberación preovulatoria de gonadotropinas

INTRODUCCIÓN

Las primeras evidencias sobre el papel del sistema colinérgico central en la regulación de la ovulación fueron los experimentos realizados por Sawyer, Everett and Markee en la década del 50, quienes mostraron que la ovulación refleja de la coneja puede ser bloqueada cuando se inyecta por vía intravenosa atropina u otro antagonista colinérgico muscarínico dentro del minuto posterior al coito. En la rata, un ovulador espontáneo, la inyección de atropina en el día del proestro, previo al “periodo crítico”, también bloquea la ovulación.

El papel del sistema colinérgico muscarínico en la regulación de la ovulación varía durante el ciclo estral, Domínguez y col. mostraron que se puede bloquear la ovulación con una inyección única de sulfato de atropina en los diferentes días del ciclo estral y que los resultados dependen de la hora y la dosis aplicada.

Hoy se reconoce que tanto en los ovuladores espontáneos como los ovuladores reflejos presentan un incremento abrupto en las concentraciones circulantes de LH y FSH que inducen la ovulación. La liberación masiva de ambas gonadotropinas parece ser el resultado de la estimulación de la hipófisis por el incremento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH.

En el presente estudio se evalúan los efectos de la inyección única de la dosis mínima efectiva de sulfato de atropina en los diferentes días del ciclo estral sobre la ovulación, las concentraciones séricas de LH, FSH, 17 β -estradiol y progesterona, así como las concentraciones hipotalámicas de monoaminas y la actividad neural de estos sistemas de neurotransmisión.

MATERIALES Y MÉTODOS

A las 13:00 horas de cada día del ciclo estral, grupos de 10-12 ratas cíclicas fueron inyectadas con sulfato de atropina (estro y diestro 2, 300mg/kg de peso; diestro 1, 100 mg/kg; proestro 700 mg/kg) o solución salina y sacrificadas a las 17:00 horas del día del proestro. Como testigos absolutos se utilizó un grupo de ratas sin tratamiento que fueron sacrificadas a las mismas horas que los animales tratados.

A la autopsia se colectó la sangre del tronco y se disecó el área preóptica hipotalámica anterior para la cuantificación de monoaminas y sus metabolitos. Detalles en el método general.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro se muestran las concentraciones plasmáticas de LH, FSH, 17 β -estradiol y progesterona de los grupos de animales tratados con solución salina fueron similares a las del grupo testigo absoluto.

Tratamiento	N	FSH	LH	17 β -estradiol	progesterona
Testigo absoluto	12	33.8 \pm 2.1	19.61 \pm 4.68	64.18 \pm 6.9	8.79 \pm 1.2
SS-P	12	30.7 \pm 5.0	13.47 \pm 5.98	72.10 \pm 4.7	7.72 \pm 1.0
ATR- P	11	31.3 \pm 2.9	3.74 \pm 3.27*	62.33 \pm 3.7	4.86 \pm 0.6
SS-E	11	31.2 \pm 2.6	17.39 \pm 4.83	55.65 \pm 2.7	10.76 \pm 1.0
ATR- E	9	23.7 \pm 2.3	2.33 \pm 1.49*	44.50 \pm 3.0	10.44 \pm 2.5
SS-D1	11	30.8 \pm 3.7	14.48 \pm 5.09	66.39 \pm 4.9	5.07 \pm 0.5
ATR-D1	11	22.7 \pm 3.1	0.36 \pm 0.07*	46.18 \pm 3.9	6.86 \pm 1.9
SS-D2	11	47.2 \pm 0.1	11.26 \pm 3.5	63.79 \pm 5.4	7.45 \pm 0.7
ATR- D2	10	51.0 \pm 23.9	4.49 \pm 1.64*	54.51 \pm 3.6	7.20 \pm 0.6

Cuadro. Concentraciones séricas de FSH, LH, 17 β -estradiol y progesterona de animales testigo e inyectados con la dosis efectiva de sulfato de atropina (ATR) o solución salina (SS) en los diferentes días del ciclo estral (P, proestro; E, estro; D1, diestro 1; D2, diestro 2), sacrificados a las 13:00 horas del proestro. * $p < 0.05$ vs. solución salina.

La inyección de la dosis efectiva de sulfato de atropina, aplicada a las 13:00h de los diferentes días del ciclo estral, bloqueó, en todos los casos, la liberación preovulatoria de LH observada a las 17:00h del proestro en los grupos tratados con solución salina o testigo absoluto.

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de FSH entre los grupos tratados con sulfato de atropina y el grupo testigo absoluto.

Las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol de los animales tratados con sulfato de atropina en estro o diestro 1 fueron significativamente menores a las de los grupos tratados con

solución salina, en los mismos días, y a las del grupo testigo absoluto.

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol entre los grupos de animales inyectados con sulfato de atropina en diestro 2 y proestro y el grupo testigo absoluto.

Los animales tratados con sulfato de atropina en el día de proestro presentaron concentraciones plasmáticas de progesterona menores a la de los animales tratados con solución salina el mismo día. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales tratados con sulfato de atropina en estro, diestro 1 y diestro 2 y los grupos de animales tratados con solución salina correspondientes y el grupo de testigo absoluto.

El tratamiento con sulfato de atropina no modificó las actividades neurales noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica de POA-AHA ni del HMB.

Los resultados de este estudio confirman interpretaciones previas de que el bloqueo colinérgico en los diferentes días del ciclo estral resultan en el arresto de la secreción masiva preovulatoria de LH, y por ende de la ovulación. Al parecer estos efectos no tienen una relación directa con cambios globales en las actividades de los sistemas monoaminérgicos, aunque se presentan variaciones significativas en los lados izquierdo y derecho que podrían estar vinculadas con la liberación preovulatoria de las gonadotropinas (ver apéndice).

THE DELAY OF OVULATION INDUCED BY THE BLOCKADE OF CHOLINERGIC SYSTEM ON DIOESTRUS 1 IS RELATED TO CHANGES IN DOPAMINERGIC ACTIVITY OF THE PREOPTIC-ANTERIOR HYPOTHALAMIC AREA OF THE RAT.

The Delay of Ovulation Induced by the Blockade of the Cholinergic System on Dioestrus 1 is Related to Changes in Dopaminergic Activity of the Preoptic Anterior Hypothalamic Area of the Rat.

María Esther Cruz¹, Gerardo Villegas¹, Alejandro Domínguez-González¹, Roberto Chavira² and Roberto Domínguez¹

1. Laboratorio de Neuroendocrinología. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, U.N.A.M., México D.F.

2. Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán". México D.F.

running head: ovulation delay and dopamine in POA-AHA

María Esther Cruz: UIBR.

Neuroendocrinology Laboratory, FES Zaragoza.

AP 9-020, CP 15000, México DF, México

FAX (525) 773-01-51

email casala@puma2.zaragoza.unam.mx

FALTA PAGINA

No. **2**

Abstract.

One hour after the injection of 100 mg/kg of atropine sulphate at 1300 h of dioestrus 1, there was an abrupt increase of 17β -oestradiol plasma level and a significant increase in dopaminergic neural activity in preoptic anterior hypothalamic area, without changes in luteinizing hormone serum level, in comparison with the saline injected group. Animals injected with atropine sulphate showed an increase in dopaminergic neural activity on the morning of dioestrus 2 (atropine sulphate 0.471 ± 0.7 vs. saline 0.241 ± 0.03 , $p < 0.01$). In this group of animals, the time of spontaneous ovulation was delayed 15-24 h and the preovulatory surge of 17β -oestradiol and luteinizing hormone did not occur until the expected day of oestrus. Present results suggest that during dioestrus day 1, there is a functional relationship between the cholinergic and dopaminergic systems in preoptic anterior-hypothalamic area which regulate the LH release resulting in ovulation.

Keywords: atropine sulphate; luteinizing hormone; 17β -estradiol; oestrous cycle.

Introduction

There is evidence that in the rabbit (a reflex ovulator) and the rat (a spontaneous ovulator), the cholinergic system plays a stimulatory role in the regulation of the secretion of the luteinizing hormone (LH) leading to ovulation [3, 9, 10, 11].

Gonadotropin secretion is controlled by the hypothalamic neurohormone gonadotrophin releasing hormone (GnRH). In turn, the activity of GnRHergic neurones is modulated by several neurotransmitters [7].

There is pharmacological evidence of the participation of dopaminergic and cholinergic systems in the regulation of gonadotropin and GnRH secretion [2, 7]. Anatomical data indicates that the dopaminergic fibres makes synaptic contact with GnRH containing neurones, but there is no evidence on the existence of direct communication between GnRH neurones and cholinergic fibres [15]. There is biochemical evidence supporting a functional relationship between cholinergic and the tuberoinfundibular dopaminergic (TIDA) neurones [13, 14]. There is also structural evidence of cholinergic and dopaminergic interactions in other regions of the central nervous system [8]. Therefore, the mechanisms triggered by the cholinergic system modulating the gonadotropin release necessary for ovulation, could be mediated by its interaction with the dopaminergic neurones that have direct contacts with the GnRH neurones.

The aim of the present study was to assess the effects of blocking the cholinergic system at 1300 h dioestrus 1, on the activity of dopamine neurones in the preoptic-anterior hypothalamic area (POA-AHA), luteinizing hormone (LH) and 17β -oestradiol throughout the oestrous cycle.

Materials and methods

Animals

Virgin adult female rats, 195-225 g body weight, of the CIIZ-V strain from our own stock, kept under controlled lighting conditions (lights on from 0500 to 1900 h), with free access to food (Purina S.A., Mexico) and tap water were used. Oestrous cycles were monitored by daily vaginal smears, and only those rats showing at least two consecutive 4-day cycles were used.

At 1300 h of dioestrus-1, groups of 8-10 rats were injected with saline or atropine sulphate (100 mg/kg body weight, sc.). Groups of animals were killed at 1400 and 1700 h of the day of treatment; at 1100 and 1700 h of dioestrus-2, proestrus and oestrus; and at 1100 h of the next dioestrus-1 day. For comparison, groups of 8-10 untouched control animals were sacrificed at the same hours.

The animals were killed by decapitation. The blood of the trunk was collected, allowed to coagulate at room temperature for 30 min., centrifuged at 3000 r.p.m. for 15 min. and the serum stored at -20°C, until 17- β estradiol and LH were measured by radio immunoassay (RIA).

Dopamine measurement

After decapitation, the brain was quickly removed and placed on a dry ice-cooled plate. A slice was cut (0.8 to 1.0 mm) following the König y Klippel [6] rat's stereotaxic atlas (A-7190 to A-6360) parameters, and the POA-AHA region was punched out. The samples were stored at -70°C. On the day of analysis, the samples were placed in a centrifuge tube and weighed on a precision balance (Mettler AT 261-0.01 mg). The samples were diluted in 150 μ l of cold perchloric acid (0.01 N), homogenised by sonication and centrifuged (12,500 r.p.m.) at -4°C for

30 min. The supernatants were collected and 50 μ l injected into the high performance liquid chromatography (HPLC) system for analysis.

HPLC was carried out using a isocratic pump (L-250 model, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA), a six-pot injection valve (7125 model, Rheodyne, Cotati CA, USA) with a 20 μ l loop, a 10 μ m C18 Pecosil reverse phase column (Perkin-Elmer Co.) and an amperometric detector (LC-4C, Bioanalytical System Inc., West Lafayette, IN, USA) with a dual glassy carbon working electrode set to a potential of 0.85V *versus* an Ag/AgCl reference electrode. The glassy carbon electrode was polished when necessary to ensure high sensitivity. The detector gain was set at 5.0 nA.

The mobile phase was prepared with highly purified water (>10M Ω /cm). A citrate buffer (Merck-México, S.A., Art. 244) 0.15 M, pH=3.0 was prepared and 0.46 mM of L-octane-sulfonic acid (Sigma Chemical Co., USA, O-8380) was added. Before the addition of organic compounds (4% acetonitrile and 2% tetrahydrofuran for chromatography, E. Merck, Darmstadt, F.R. Germany), the buffer was filtered (0.22 μ m gauze, Millipore, Bedford, MA, USA) and degassed for 1 h under vacuum. The mobile phase was pumped at a flow rate of 1.0 ml/min.

Standard solutions of 3-hydroxy tiramine hydrochloride (Dopamine) and 3-4-dihydroxy-phenylacetic-acid (DOPAC) were prepared the day of the experiment in 0.1 N-perchloric acid. Drugs were purchased from Sigma. The sensitivity of the assay was 100 pg.

The dopaminergic neural activity was calculated following Shannon, *et. al.* [12] and Kerdelhué, *et. al.* [5] criteria, using the formula:

$$\text{neural activity} = [\text{DOPAC}] \div [\text{Dopamine}]$$

Hormone Assay

The serum luteinizing hormone (rLH-¹²⁵I-RP3) concentration was measured by specific RIA, using the double antibody technique with reagents and protocol supplied by the National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD). The intra- and inter-assay coefficients of variations were 5.1% and 6.5%. The results were expressed in ng/ml, based on the NIH international reference standards for LH-RP-3. Serum concentrations of 17 β -oestradiol were measured by RIA, using a kit purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA). The intra- and inter-assay coefficients of variations were 6.1% and 7.4%.

Statistical analysis

The hormonal serum levels and dopaminergic activity data were analysed using the multivariate analysis of variance (MANOVA) followed by Tukey's test. The number of ova shed was analysed by the Kruskal Wallis test, followed by the Mann-Whitney U-test. Ovulation rate (number of ovulating animals \div number of treated ones), was analysed using Fisher's exact probability test or the chi square test. A probability value of less than 5% was considered significant.

Results

Ovulation rate

In comparison with untouched control animals, saline injection at 1300 h of dioestrus 1 did not modify the ovulation rate occurring at the expected day of oestrus (12/16 vs. 14/15, non-significant, n.s.).

Only one out of eight rats injected with atropine sulphate on dioestrus 1 ovulated at 1100 h of the expected day of oestrus, with a single ova shed. Three out of 11 rats sacrificed at 1700 h of the same day ovulated, with a normal quota of ova shed. When the animals were killed on the morning of the expected day of dioestrus 1, four out of seven animals ovulated. When the atropine-treated animals were killed on the morning of the expected day of dioestrus 1, the number of ova recovered was similar to those in untouched-control rats sacrificed on the morning of the expected day of oestrus (13.2 ± 1.9 vs. 12.0 ± 0.6). All ovulating animals had oestrous vaginal smears.

Luteinizing hormone and 17 β -oestradiol plasma levels and dopaminergic neural activity in POA-AHA

The peak of LH observed at 1700 h of proestrus in the untouched group of animals was not affected by saline injection. In atropine sulphate treated animals the LH preovulatory surge presented a 2400 h delay (Fig. 1).

One hour after atropine sulphate injection, there is a three-fold increase in 17 β -oestradiol plasma level (Fig. 2). The preovulatory 17 β -oestradiol peak normally occurring at 1100 h of proestrus was not observed in atropine sulphate treated animals, such an increase was observed 30 h later (1700 h of oestrus) (Fig. 2).

In the untouched group, there is a spontaneous high dopaminergic neural activity at 1300 hours of dioestrus 1, time of the treatment (Fig.3).

The dopaminergic neural activity in atropine sulphate treated animals sacrificed one hour after injection was significantly higher than in saline injected and control animals. A second

increase in the dopaminergic neural activity was also observed at 1100 h of dioestrus 2 which is similar in magnitude to the one observed at 1300 hours of the untouched group (Fig. 3).

Discussion

Experimental manipulations on dioestrus 1 have pronounced effects on the ovulatory process on the oestrous cycle. The present results shows how the temporal blockade of muscarinic receptors, by a single injection of atropine sulphate at 1300 h of dioestrus 1, affects the normal profile of 17β -oestradiol secretion along the oestrous cycle, and the preovulatory LH surge, resulting in a 24 hour delay in the time of ovulation, and confirms the importance of the functional integrity of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis.

Present results suggest that the cholinergic system directly regulates the secretion of 17β -oestradiol in an inhibitory way, since the systemic blockade of muscarinic receptors on the day of dioestrus-1 resulted in an increase of 17β -oestradiol serum levels one hour later, without changes in LH serum levels. Results obtained by *in vitro* studies indicate that in the male rat, the steroidogenesis by Leydig cells is regulated in an inhibitory way by the cholinergic system [4].

The increase in 17β -oestradiol plasma concentration could be related to the rise in dopaminergic neural activity in POA-AHA observed one hour after the injection of atropine sulphate, and the subsequent increase at 1100 h of dioestrus 2. These changes in dopaminergic neural activity could explain the subsequent alterations in normal gonadotropin profiles that arrest ovulation.

The spontaneous increase in dopaminergic neural activity in POA-AHA observed at 1300 hours of dioestrus 1 could be a signal that triggers the cascade events ending in the preovulatory

secretion of gonadotropins and ovulation. There is evidence that the blockade of dopaminergic receptors induced by haloperidol injection at 1300 h of dioestrus 1, results in the blockade of FSH and LH secretion in the afternoon of the expected day of proestrus and ovulation [1]. Then, the peak in dopaminergic activity observed at dioestrus 2 in atropine sulphate-injected rats could be the signal necessary for restart the neuroendocrine mechanisms resulting in a 24 hour-delay of ovulation. These results suggest that the cholinergic system could regulate the dopaminergic system in an inhibitory way, at least at 1300 h of dioestrus 1. The increase in TIDA activity induced by the blockade of cholinergic muscarinic and nicotinic receptors, supports such interpretation. [13, 14]

In summary, the present results suggest that during dioestrus 1 there is a functional relationship between the cholinergic and dopaminergic systems in POA-AHA, regulating the release of gonadotropin resulting in ovulation.

References

1. Domínguez, R.; Gaitán, C.M.; Méndez, S.A.; Ulloa-Aguirre, A. Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *J. Endocrinol.* 113:37-44; 1987.
2. Domínguez, R.; Riboni, L.; Zipitria, D.; Revilla, R. Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat? *J. Endocrinol.* 95:175-180; 1982.
3. Everett, J.W.; Sawyer, Ch.; Markee, J.E. A neurogenic timing factor in control of the ovulating discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 44:234-250; 1949.
4. Favaretto, A.; Valenca, M.M.; Picanco-Diniz, D.; Antunes-Rodrigues, J.A. Inhibitory role of cholinergic agonists on testosterone secretion by purified rat Leydig cells. *Arch. Int. Fisiol. Biochem. Biophys.* 101:333-335; 1993.
5. Kerdelhué, B.; Bojna, F.; Lesieur, P.; Pasqualini, C.; El Abad, A.; Lenoir, V.; Doviller, P.; Chiueh, M.C.; Palkovits, M. Median eminence dopamine and serotonin neuronal activity. *Neuroendocrinology* 49:176-180; 1989.
6. Köning, J.F.; Klippel, R.A. The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system. Baltimore: Williams and Wilkins Co.; 1963.
7. Kordon, C.; Drouva, S.V.; Martinez de la Escalera, G.; Weiner, I.R. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. In: Knobil, E.; Neill, J. eds. *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed, New York: Raven Press; 1994:1621-1682.

8. Lehmann, J.; Langer, S.Z. The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals? *Neuroscience* 10:1105-1120, 1983.
9. Markee, J.E.; Everett, J.W.; Sawyer, Ch. The relationship of the nervous system to the release of gonadotropin and the regulation of the sex cycle. *Rec. Prog. Hor. Res.* 7:139-163; 1952.
10. Sawyer, Ch.; Everett, J.W. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 47:198-218; 1950.
11. Sawyer, Ch.; Markee, J.E.; Townsend, B.F. Cholinergic and adrenergic components in the neurohumoral control of the release of LH in the rabbit. *Endocrinology* 44:18-37; 1949.
12. Shannon, N.J.; Gunnet, J.W.; Moore, K.E. A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptamine neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *J. Neurochem.* 47:958-965; 1986.
13. Shieh, K.R.; Pan, J.T. Sexual differences in the diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in the rat: role of cholinergic control. *Biol. Reprod.* 54(5):987-992;1996.
14. Shieh, K.R.; Pan, J.T. An endogenous cholinergic rhythm may be involved in the circadian changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in ovariectomized rats treated with or without estrogen. *Endocrinology* 136(6):2383-2388;1995.
15. Silverman, A.J.; Livne, I.; Witkin, J.W. The gonadotropin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. In: Knobil, E.; Neill, J. eds. *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed, New York: Raven Press; 1994:1683-1701.

Fig. 1. The effect of atropine sulphate injection at 1100 h of dioestrus 1 on LH serum level during oestrous cycle. Values expressed as mean \pm SEM (n = 8-10 rats/group). * Difference significant versus saline (p<0.01).

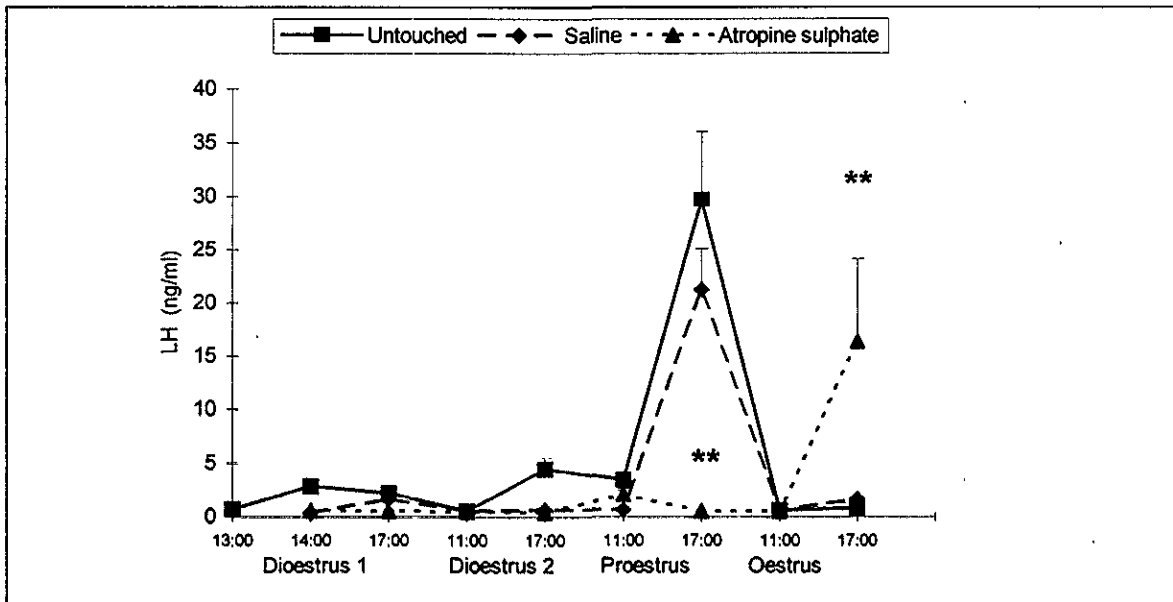


Fig. 2. The effect atropine sulphate injection at 1100 h of dioestrus 1 on 17β -oestradiol serum level during oestrous cycle. Values expressed as mean \pm SEM (n = 8-10 rats/group). * Difference significant versus saline (p<0.01).

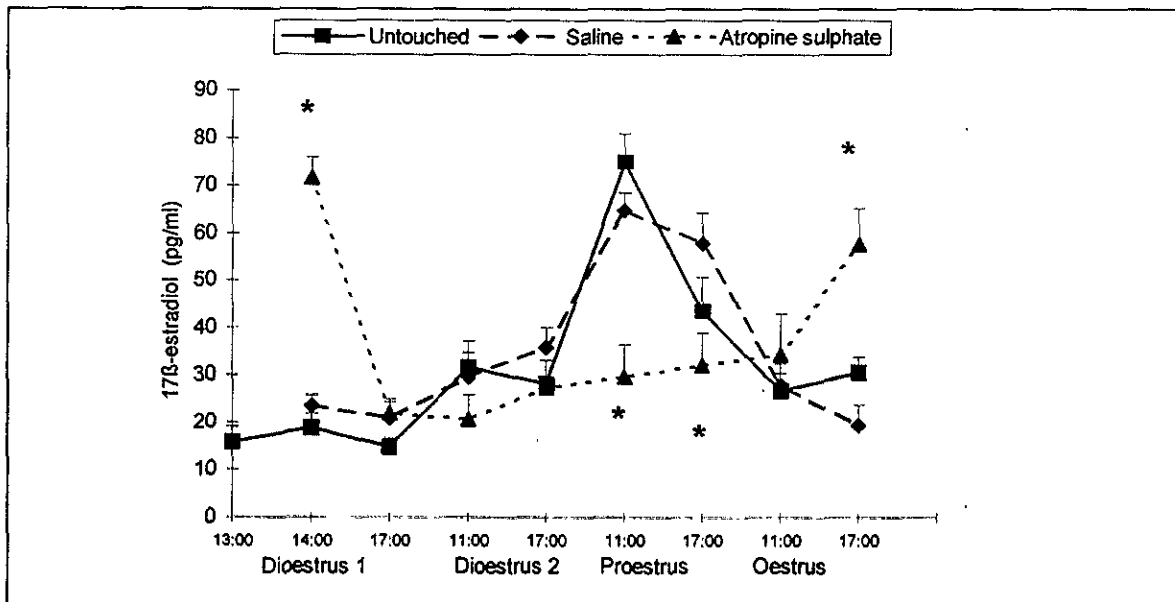
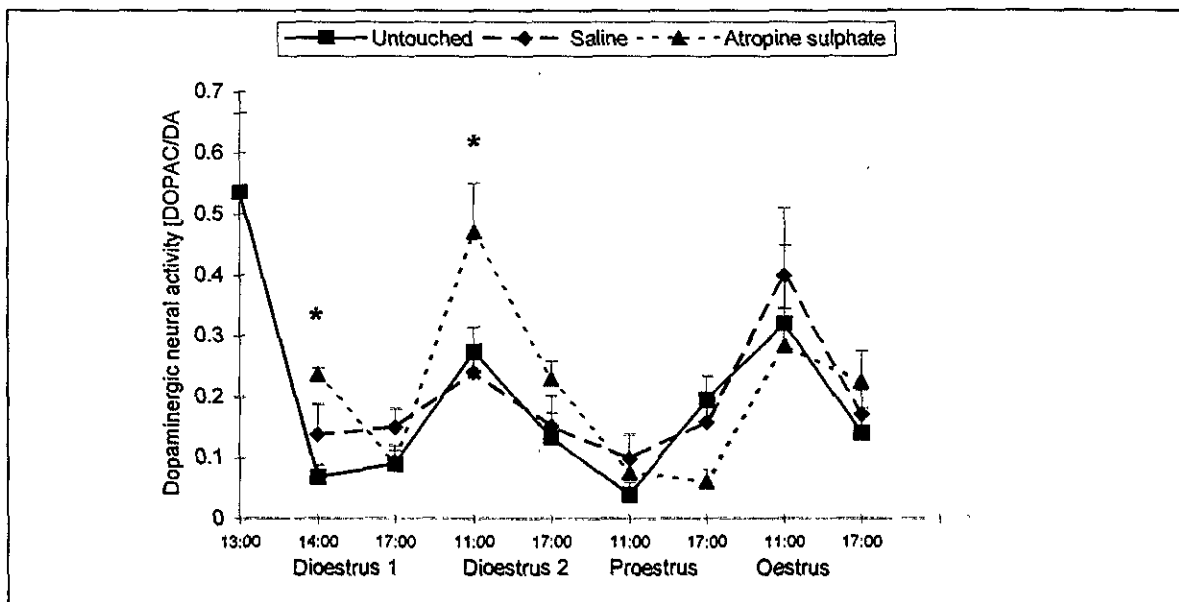


Fig. 3. The effect atropine sulphate injection at 1100 h of dioestrus 1 on dopaminergic activity in POA-AHA. Values expressed as mean \pm SEM (n = 8-10 rats/group). * Difference significant versus saline (p<0.01).



CHARACTERISATION OF MONOAMINE NEURAL ACTIVITY IN
THE PREOPTIC ANTERIOR HYPOTHALAMIC AREA AND
MEDIAL BASAL HYPOTHALAMUS IN RATS DURING THE DAY
OF PRO-OESTRUS AND ITS RELATION TO GONADOTROPHIN
AND SEXUAL STEROID HORMONE PLASMA LEVELS

Characterization of monoamine neural activity in the preoptic anterior hypothalamic area and medial basal hypothalamus in rats during the day of pro-oestrus and its relation to gonadotrophin and sexual steroid hormone plasma levels

A. Domínguez-González^a, P. Damian-Matsumura^b, C. Timossi^c, M.E. Cruz^a and R. Domínguez^a

^aUnidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

^bDepartamento de Biología de la Reproducción, UAM Iztapalapa. ^cDepartamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional, Autónoma de México, México DF, México

Requests for reprints to Dr Roberto Domínguez, Oriente 259, Malzana 4 118, Col. Agrícola Oriental, CP 08500, México DF, México.

Received 12 February 1998; accepted 22 February 1998

Abstract: We have investigated the dynamic changes in monoamine concentration and monoaminergic neural activity in the preoptic-anterior hypothalamic area (POA-AHA) and medial basal hypothalamus (MBH) in rats during the day of pro-oestrus and their relationship with serum levels of luteinizing hormone, follicle stimulating hormones, oestradiol and progesterone. In the POA-AHA there was no evident temporal relationship between monoaminergic neural activity and the LH pre-ovulatory surge. In the MBH NE and DA neural activity increased from 09:00 to 15:00, with high concentrations of 17 β -oestradiol prior to the LH peak. The rise in NE and DA neuronal activity in the MBH prior to the LH serum level peak suggests that such monoamines could modulate gonadotrophin releasing hormone release in a stimulatory way.

Med Sci Res 26:275-278 © 1998 Lippincott-Raven Publishers

Keywords: monoamine, hypothalamus, oestrogen, pro-oestrus, luteinizing hormone

Introduction: The pre-ovulatory surge of gonadotrophins in the day of pro-oestrus is preceded by an increase in the plasma level of oestrogen. This triggers the massive release of gonadotrophin releasing hormone (GnRH) from the hypothalamus, which in turn stimulates the secretion of gonadotrophins by the pituitary gland to act on ovarian follicles to induce ovulation [1]. This steroid ovarian signal apparently cannot be achieved directly by the GnRH cells. Very few GnRH neurones with nuclear localization of either ³H-oestradiol [2] or oestrogen receptors [3,4], have been identified.

The pre-ovulatory luteinizing hormone (LH) surge in the afternoon of pro-oestrus is the result of a GnRH pre-ovulatory surge. This is released from GnRH neuronal axon terminals in the median eminence [5] as a result of neurotransmitters acting either at the perikaryal and/or the terminal levels of the GnRH neurones [6].

According to Honma and Wuttke [7], at 16:00-17:00 h of the pro-oestrus day, the turnover rate of norepinephrine (NE) in the preoptic area (POA-AHA) and in the posterior medial

basal hypothalamus (MBH) increases in comparison to animals in dioestrus NE turnover in the POA-AHA and median eminence rises in the afternoon or the pro-oestrus day [7].

In order to understand the dynamic changes in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis occurring in the pro-oestrus day that leads to the pre-ovulatory surge in gonadotrophins, we assessed, every 2 h, the temporal relationship between sexual steroid and gonadotrophin serum levels and monoamine activity in the POA-AHA and MBH.

Materials and methods: Adult (190-225 g body weight) virgin rats of the CIIZ-V strain from our own stock were kept under controlled lighting conditions (lights on from 05:00 to 19:00 h), with free access to food and tap water. Oestrous cycles were monitored by daily examination of vaginal smears, and only those animals with three consecutive 4-day cycles were used.

Groups of 6-8 animals that showed pro-oestrus vaginal smears were killed by decapitation every 2 h from 09:00 to 23:00. Blood was then collected from the trunk and the brain rapidly removed and placed on an ice-cooled plate and frozen in liquid nitrogen. Two slices were cut. The first one included the POA-AHA (A7190 to A6360) and the second, the medial basal hypothalamus (A4890 to A3390) [8]. The areas of study were punched out with sharpened needles (inner diameter 0.8 mm). Brain removal and dissection took 1-2 min. The tissue samples taken for monoamine determination were stored at -70°C.

The serum luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) were measured by specific radioimmunoassay (RIA) using the double antibody technique with reagents and protocol supplied by the National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). The intra- and inter-assay coefficients of variations were 5.1% and 6.5% for LH and 4% and 7.9% for FSH, respectively. The results were expressed in ng/ml as the international references standards NIH LH-RP3 and FSH-RP-2.

Serum concentrations of progesterone (P4) (ng/ml) and oestradiol (E2) (pg/ml) were measured by RIA, using kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). The intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.0% and 5.4% for P4 and 6.1% and 7.4% for E2, respectively.

High performance liquid chromatography (HPLC) was carried out using a LC-4C system (Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, USA). It was equipped with an

Table 1. Serum levels of 17 β -oestradiol (pg/ml), progesterone (ng/ml), LH (ng/ml) and FSH (ng/ml) during the pro-oestrus day (means \pm SEM)

	9:00 (12)	11:00 (10)	13:00 (10)	15:00 (8)	17:00 (10)	19:00 (12)	21:00 (12)	23:00 (10)
17 β -oestradiol	40.09 \pm 4.9	54.683 \pm 5.4	41.698 \pm 4.4	60.90 \pm 16.6	35.367 \pm 4.0	14.74 \pm 4.5	0.002 \pm 0.01	22.1 \pm 2.77
Progesterone	6.64 \pm 2.28	5.578 \pm 1.47	5.423 \pm 2.46	4.778 \pm 1.31	30.14 \pm 5.18	63.52 \pm 10.9	48.05 \pm 4.46	33.013 \pm 2.7
LH	0.108 \pm 0.03	0.153 \pm 0.04	0.052 \pm 0.01	0.938 \pm 0.47	136.6 \pm 35.6	57.75 \pm 9.77	12.31 \pm 1.5	1.2 \pm 0.44
FSH	14.33 \pm 0.49	11.91 \pm 0.77	12.79 \pm 0.43	12.43 \pm 1.17	15.54 \pm 1.26	20.95 \pm 1.62	17.42 \pm 0.51	20.40 \pm 1.09

isocratic pump (L-250 model Perkin Elmer Co., Norwalk, CT, USA) and a six-port injection valve (7125 model, Rheodyne, Cotati, CA, USA) with a 20 μ l loop, a 10 μ m C18 Pecosil reverse phase column (Perkin Elmer Co.) and an amperometric detector (LC-4C, Bioanalytical Systems Inc.) with a dual glassy carbon working electrode set to a potential of 0.85V versus an Ag/AgCl reference electrode. The gain of the detector was set to 5.0 nA V.

The mobile phase was prepared with high purity water (> 10M). A citrate buffer (Merck-México, SA.) 0.15M, and after adjusting with NaOH solution to pH = 3.0, 0.46mM of 1-octane-sulfonic acid (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. USA) was added. Before the addition of organic compounds (4% acetonitrile and 2% tetrahydrofuran for chromatography, E. Merck, Darmstadt, Germany) the buffer was filtered (0.22 m gauze, Millipore, Bedford, MA, USA) and degassed for 1 h under vacuum. The mobile phase was pumped at a flow rate of 1.0 ml/min.

Standard solutions of NE ((-)-artenerol free base), 4-hydroxy-3-methoxyphenyl glycol (MHPG), 3-hydroxy tiramine hydrochloride (DA), 3-4-dihydroxy-phenylacetic acid (DOPAC), serotonin and 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) were prepared the day of the experiment in 0.1N-perchloric acid. Drugs were purchased from Sigma. The assay sensitivity for each compound was 100 pg.

Neural activity was calculated using the following equation:

$$\text{neuronal activity} = \frac{[\text{metabolite}]}{[\text{amine}]} [9,10].$$

Data for monoamine concentration, neural activity and hormonal concentrations were analysed by multivariate analysis of variance (MANOVA) followed by Tukey's test. A *P* value < 0.05 was considered to be significant.

Results and discussion: Table 1 shows the FSH, LH, E2 and P4 serum levels and monoamine concentrations. The highest concentration of FSH was observed at 19:00 and 23:00 h. LH levels were basal from 9:00 to 13:00 h, at 15:00 h there was a small increase and the pre-ovulatory surge occurred at 17:00 h. The LH concentration then diminished gradually,

and at 23:00 h returned to basal levels. The E2 concentration was high during the morning with two peaks at 11:00 and 15:00 h. P4 levels were low during the morning and early afternoon, began to rise at 17:00 h, reached a maximum at 19:00 h and decreased thereafter.

In the POA-AHA region, the concentration of NE diminished from 09:00 to 15:00 when the minimum level occurred, and increased thereafter, reaching the highest point at 23:00. The NE concentration in the MBH did not change significantly during the pro-oestrus day. The concentration of DA in the MBH was higher than in the POA-AHA; in both regions, the highest concentration occurred at 19:00 h, coincident with the peak in P4. The level of serotonin was higher in the POA-AHA than in the MBH. In both regions, the lowest values were observed at 15:00. In the POA-AHA, the highest value occurred at 23:00 h and in the MBH at 21:00 h (Tables 2 and 3).

Figure 1 shows the monoaminergic activity in the POA-AHA and MBH and the changes in E2 and LH levels during pro-oestrus. NE activity was higher in the MBH than in the POA-AHA. In the POA-AHA, the highest activity was observed at 11:00 h, and in the MBH at 15:00 h; both were coincident with the highest E2 levels (Figure 1A).

The activity of DA neurones in the POA-AHA showed a very discrete increase from 09:00 to 15:00 h. In the MBH it decreased significantly from 09:00 to 13:00 h, with a sharp increase at 15:00. This rise was coincident with the highest E2 level (Figure 1C).

Serotonergic activity in the POA-AHA and MBH presented an inverse pattern. While it increased from 09:00 to 15:00 h in the MBH and then decreased in the POA-AHA it decreased from 09:00 to 15:00 h, with a posterior rise from 17:00 to 23:00. The second peak in oestradiol level coincided with the highest serotonergic activity in the MBH (Figure 1E).

The increase in P4 levels was preceded by an increase in the activity of NE and DA neurones in the MBH, while the peak of P4 coincided with the highest value for serotonergic activity observed in the POA-AHA. The pre-ovulatory

Table 2. Norepinephrine (ng/mg), MHPG (ng/mg), norepinephrine neural activity, dopamine (ng/mg), DOPAC (ng/mg), dopamine neural activity, serotonin (ng/mg), 5-HIAA and serotonin neural activity in the medial basal hypothalamus during the pro-oestrus day (means \pm SEM)

	9:00 (15)	11:00 (8)	13:00 (6)	15:00 (6)	17:00 (7)	19:00 (8)	21:00 (4)	23:00 (7)
Norepinephrine	2.711 \pm 0.27	1.867 \pm 0.33	2.62 \pm 0.53	1.297 \pm 0.05	2.43 \pm 0.3	2.047 \pm 0.38	2.233 \pm 0.6	2.457 \pm 0.49
MHPG	0.584 \pm 0.11	0.472 \pm 0.09	0.683 \pm 0.16	0.755 \pm 0.11	0.27 \pm 0.11	0.608 \pm 0.12	0.70 \pm 0.22	0.337 \pm 0.12
NE-neural activity	0.241 \pm 0.05	0.302 \pm 0.07	0.376 \pm 0.13	0.58 \pm 0.06	0.142 \pm 0.06	0.328 \pm 0.07	0.324 \pm 0.07	0.214 \pm 0.1
Dopamine	1.023 \pm 0.2	1.061 \pm 0.15	0.348 \pm 0.21	0.549 \pm 0.36	0.828 \pm 0.18	1.157 \pm 0.11	0.995 \pm 0.28	0.805 \pm 0.2
DOPAC	0.093 \pm 0.02	0.089 \pm 0.3	0.029 \pm 0.02	0.044 \pm 0.04	0.051 \pm 0.03	0.099 \pm 0.06	0.091 \pm 0.06	0.071 \pm 0.03
DA-neural activity	0.168 \pm 0.05	0.082 \pm 0.03	0.032 \pm 0.02	0.232 \pm 0.232	0.065 \pm 0.04	0.068 \pm 0.04	0.083 \pm 0.04	0.109 \pm 0.05
Serotonin	1.863 \pm 0.31	1.997 \pm 0.15	1.597 \pm 0.3	1.086 \pm 0.27	1.424 \pm 0.143	2.087 \pm 0.45	2.197 \pm 0.4	1.871 \pm 0.16
5-HIAA	0.993 \pm 0.12	0.994 \pm 0.08	1.097 \pm 0.27	1.426 \pm 0.7	1.027 \pm 0.23	0.99 \pm 0.31	1.533 \pm 0.62	1.13 \pm 0.22
5-HT-neural activity	0.421 \pm 0.06	0.486 \pm 0.05	0.785 \pm 0.19	1.575 \pm 1.1	0.71 \pm 0.18	0.555 \pm 0.22	0.628 \pm 0.13	0.615 \pm 0.12

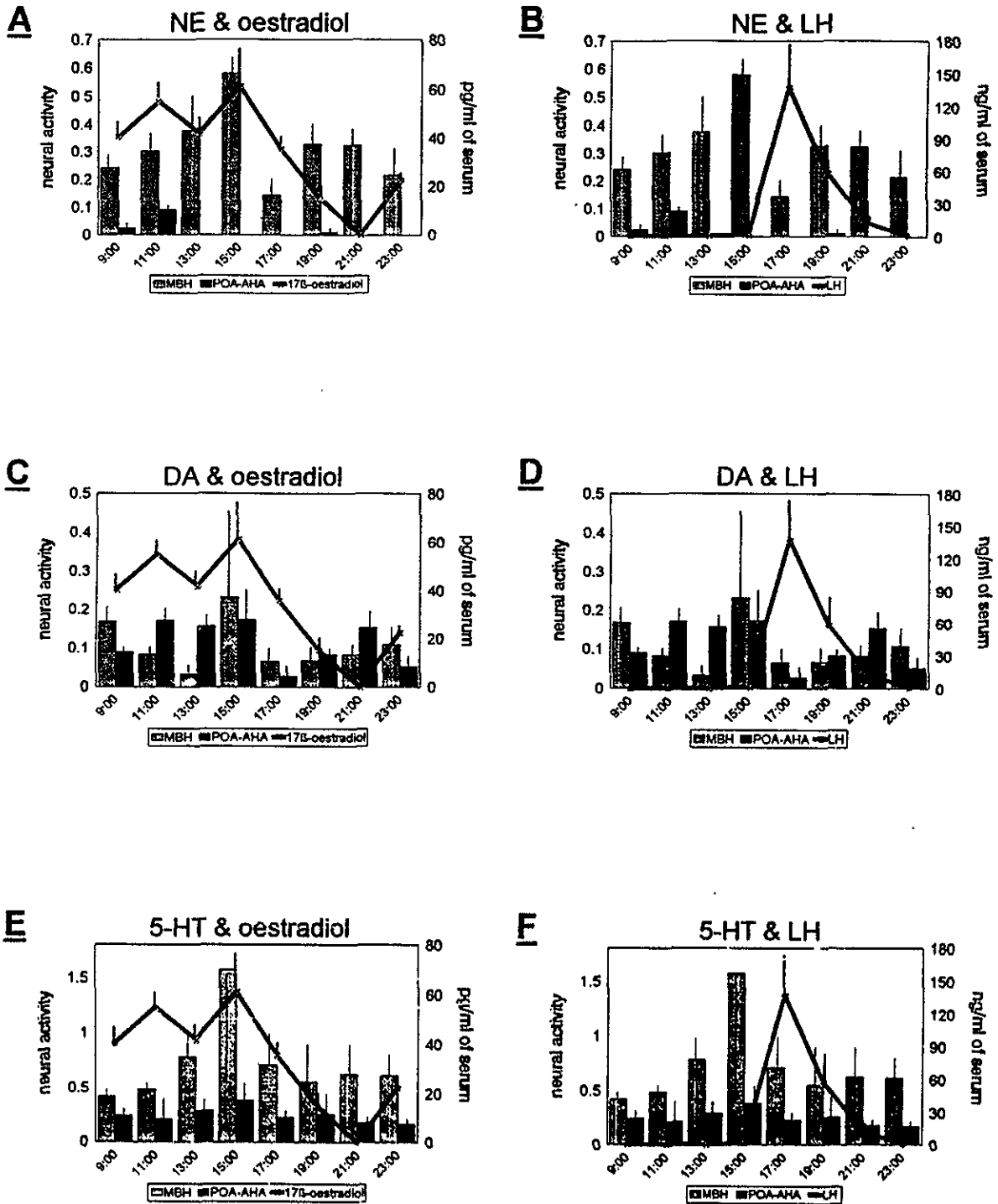


Figure 1. Noradrenergic, dopaminergic and serotonergic neural activity in the POA-AHA and MBH and their relationship with oestradiol and LH serum levels during pro-oestrus day (means \pm SEM).

LH peak at 17.00 h was preceded by the highest activity of NE and DA neuronal systems in the MBH (Figure 1 B,D). No clear relationship with serotonergic activity was evident in either region (Figure 1F). There was also no clear relationship between the changes in FSH levels during the day of pro-oestrus and monoaminergic activity in the POA-AHA or MBH.

Our results show that in the POA-AHA there was no temporal relation between the monoaminergic neural activity, while in the MBH it reached its maximum at 15.00 h, 2 h prior to the LH peak. There was also a clear difference in catecholaminergic activity in the POA-AHA and MBH regions in comparison with 5-HTergic activity, serotonergic activity being higher in both regions.

Table 3. Norepinephrine (ng/mg), MHPG (ng/mg), norepinephrine neural activity, dopamine (ng/mg), DOPAC (ng/mg), dopamine neural activity, serotonin (ng/mg), 5-HIAA (ng/mg) and serotonin neural activity in the preoptic anterior hypothalamic area (POA-AHA), during the pro-oestrus day (means \pm SEM)

	9:00 (12)	11:00 (10)	13:00 (10)	15:00 (8)	17:00 (10)	19:00 (12)	21:00 (12)	23:00 (10)
Norepinephrine	2.921 \pm 0.3	2.276 \pm 0.25	2.233 \pm 0.2	1.677 \pm 0.36	2.515 \pm 0.13	2.639 \pm 0.34	2.236 \pm 0.21	5.937 \pm 0.54
MHPG	0.064 \pm 0.03	0.205 \pm 0.03	0	0	0	0.024 \pm 0.01	0	0
NE-neural activity	0.023 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0	0	0	0.01 \pm 0.01	0	0
Dopamine	0.412 \pm 0.05	0.271 \pm 0.04	0.363 \pm 0.05	0.197 \pm 0.07	0.387 \pm 0.04	0.582 \pm 0.08	0.181 \pm 0.04	0.413 \pm 0.06
DOPAC	0.038 \pm 0.01	0.047 \pm 0.01	0.055 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	0.014 \pm 0.01	0.045 \pm 0.01	0.021 \pm 0.01	0.022 \pm 0.01
DA-neural activity	0.09 \pm 0.01	0.171 \pm 0.04	0.157 \pm 0.02	0.174 \pm 0.09	0.028 \pm 0.02	0.083 \pm 0.01	0.153 \pm 0.04	0.052 \pm 0.02
Serotonin	2.719 \pm 0.21	2.475 \pm 0.29	2.224 \pm 0.18	0.998 \pm 0.22	2.37 \pm 0.18	2.976 \pm 0.34	1.586 \pm 0.2	3.185 \pm 0.34
5-HIAA	0.657 \pm 0.05	0.530 \pm 0.07	0.668 \pm 0.09	0.329 \pm 0.15	0.537 \pm 0.06	0.806 \pm 0.12	0.275 \pm 0.04	0.54 \pm 0.06
5-HT-neural activity	0.245 \pm 0.01	0.215 \pm 0.02	0.293 \pm 0.02	0.386 \pm 0.16	0.229 \pm 0.01	0.257 \pm 0.02	0.184 \pm 0.03	0.172 \pm 0.01

The rise in neural activity of the NE system observed in the MBH from 09.00 to 15.00 h, with a high concentration of E2 followed two hours later by the LH peak, suggests that the E2 could be acting on those NE-neural nucleus innervating the MBH to trigger GnRH release. The relative unresponsiveness of the POA-AHA-GnRH neurones in their normal resting state to norepinephrine [11] supports such interpretation. The higher NE-activity in the POA-AHA observed at 11.00 h, coincident with the first "peak" in E2 level, could be related to the control of GnRH synthesis, rather than to its release. There is evidence that catecholamines regulate the messenger RNA of GnRH in a stimulatory way [12,13].

The profiles of dopaminergic and serotonergic neural activity in the MBH region are like those described previously [10]. The increase in NE and DA neuronal activity in the MBH before the LH serum level suggests that such monoamines could modulate GnRH release in a stimulatory fashion.

Acknowledgements: Supported by DGAPA IN 208996, IN208796, PUIS and CONACYT IN1719.

1. Freeman ME. In: Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction* New York: Raven Press; 1994. pp. 613–658.
2. Herbison AE, Theodosis DT. *Neuroendocrinology* 1992; 56:761–764.
3. Sullivan KA, Witkin JW, Ferin M, Silverman AJ. *Brain Res* 1995; 685: 198–200.
4. Silverman AJ, Livne Y, Witkin JW. In: Knobil E, Neill JD (editors) *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994. pp. 1683–1710.
5. Levine JE, Ramirez VD. *Endocrinology* 1980; 107:1782–1790.
6. Jarry H, Loenhardt S, Sennert B, et al. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1995; 103:317–323.
7. Honma K, Wuttke W. *Endocrinology* 1980; 106:1849–1853.
8. König JFR, Klippel RA. *The rat brain. A stereotaxic atlas of the fore-brain and lower parts of the brain stem*. Baltimore: Williams and Wilkins Co.
9. Shannon NJ, Gunnet JW, Moore KE. *J Neurochem* 1986; 47:958–965.
10. Kerdelhue B, Bojda F, Lesiur P et al. *Neuroendocrinology* 1989; 49: 176–180.
11. Barraclough CA. *CIBA Symposium* 1992; 168:233–251.
12. Kim K, Lim IS, Cho BN et al. *Neuroendocrinology* 1993; 58:146–152.
13. Leonhardt S, Seong JY, Kim K et al. *Neuroendocrinology* 1995; 61: 655–662.

EFFECTS OF HEMIOVARIECTOMY AND UNILATERAL
MECHANICAL STIMULATION OF THE RAT OVARIAN PEDICLE
ON OVULATION RATE AND MONOAMINE NEURAL ACTIVITY
IN THE PREEPTIC-ANTERIOR HYPOTHALAMIC AREA.

APÉNDICE: ASIMETRÍA

EFFECTOS DE LA DOSIS EFECTIVA DE SULFATO DE ATROPINA, INYECTADA A LAS 13:00H DE CADA DÍA DEL CICLO ESTRAL SOBRE LA LIBERACIÓN PREOVULATORIA DE GONADOTROPINAS Y DE LA ACTIVIDAD MONOAMINÉRGICA EN POA-AHA.

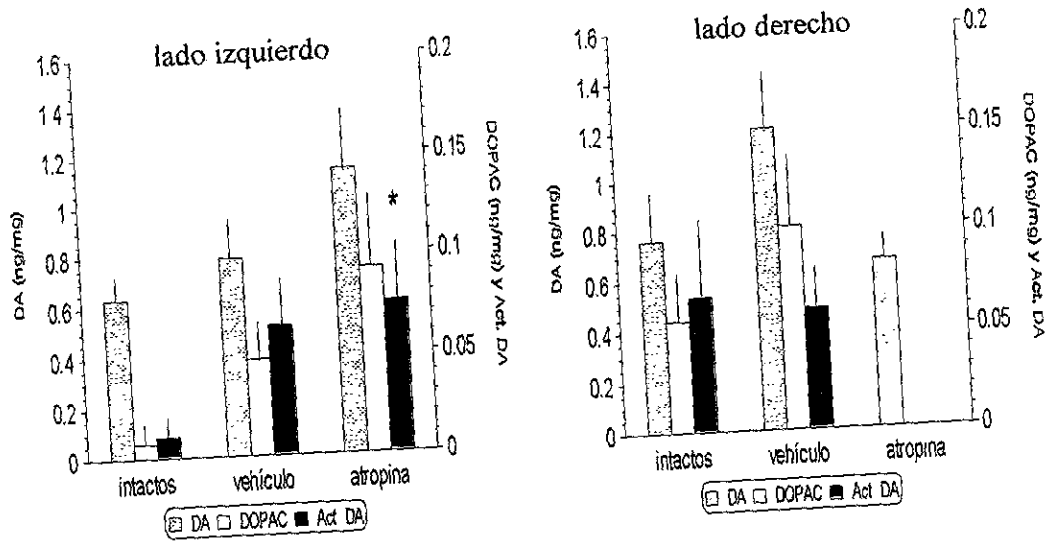
En las figuras 1-4 se muestran los efectos de la inyección de sulfato de atropina sobre el sistema dopaminérgico de POA-AHA, de ratas tratadas a las 13:00 horas de los diferentes días del ciclo estral, sacrificadas a las 17:00 horas del día del proestro.

La concentración de dopamina en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA no es alterada por el bloqueo de los receptores colinérgicos muscarínicos, ni presenta diferencias significativas entre los lados izquierdo y derecho.

La inyección de sulfato de atropina en los días de proestro, estro y diestro 1 incrementó la concentración de DOPAC en el lado izquierdo de POA-AHA, y la disminuyó en el lado derecho a valores por debajo de la sensibilidad del método utilizado (50 pg). Es importante aclarar que para el día del proestro el aumento en la concentración de DOPAC en la porción izquierda de POA-AHA se encuentra en el límite de significancia ($p=0.052$).

Como consecuencia de los resultados anteriores, los cambios en la actividad dopaminérgica, en los días de proestro, estro y diestro 1 son semejantes a los observados en la concentración de DOPAC; alta en el lado izquierdo de POA-AHA y ausente en el lado derecho.

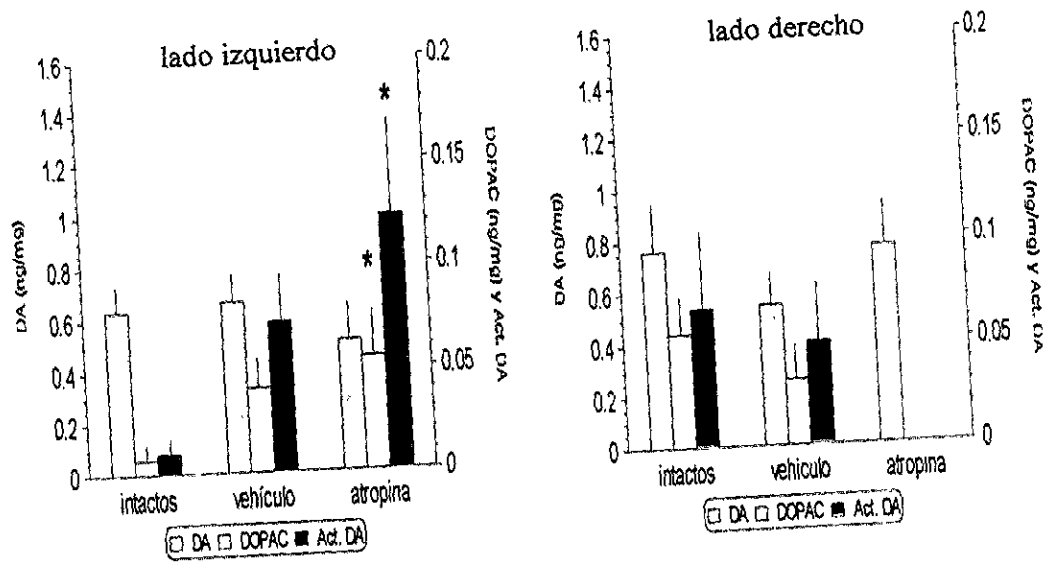
La inyección de sulfato de atropina en el día del diestro 2 no induce cambios asimétricos en ninguna de las variables estudiadas.



* $p < 0.05$ vs. grupo intactos

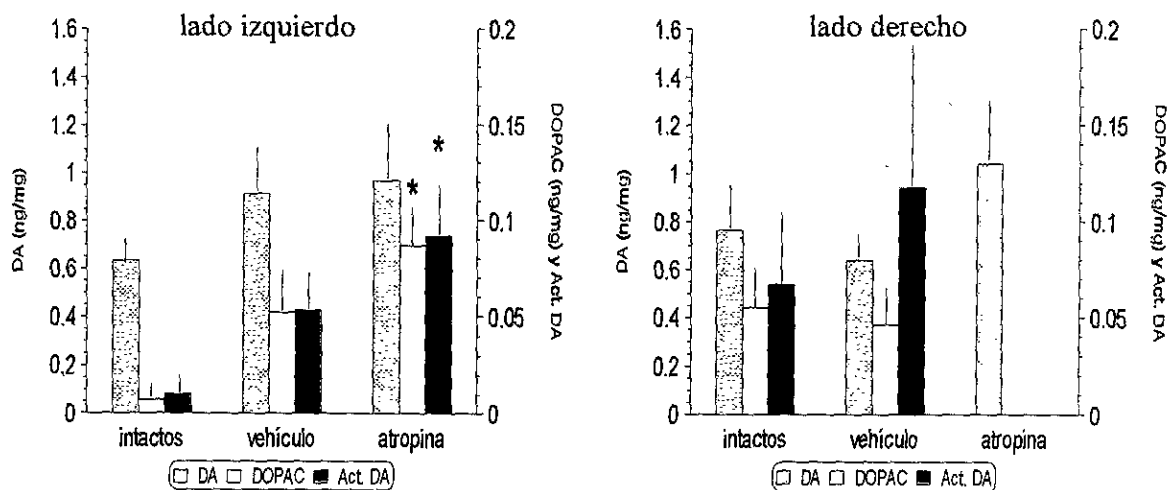
Figura 1. Concentración de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y actividad dopaminérgica (Act. DA) en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA de animales testigo e inyectados con vehículo o sulfato de atropina a las 13:00 h del día del proestro, sacrificados a las 17:00h del mismo día.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA



* $p < 0.05$ vs. grupo intactos

Figura 2. Concentración de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y actividad dopaminérgica (Act. DA) en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA de animales testigo e inyectados con vehículo o sulfato de atropina a las 13:00 h del día del estrus, sacrificados a las 17:00h del proestro.



* $p < 0.05$ vs. grupo intactos

Figura 3. Concentración de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y actividad dopaminérgica (Act. DA) en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA de animales testigo e inyectados con vehículo o sulfato de atropina a las 13:00 h del día del diestro 1, sacrificados a las 17:00h del proestro.

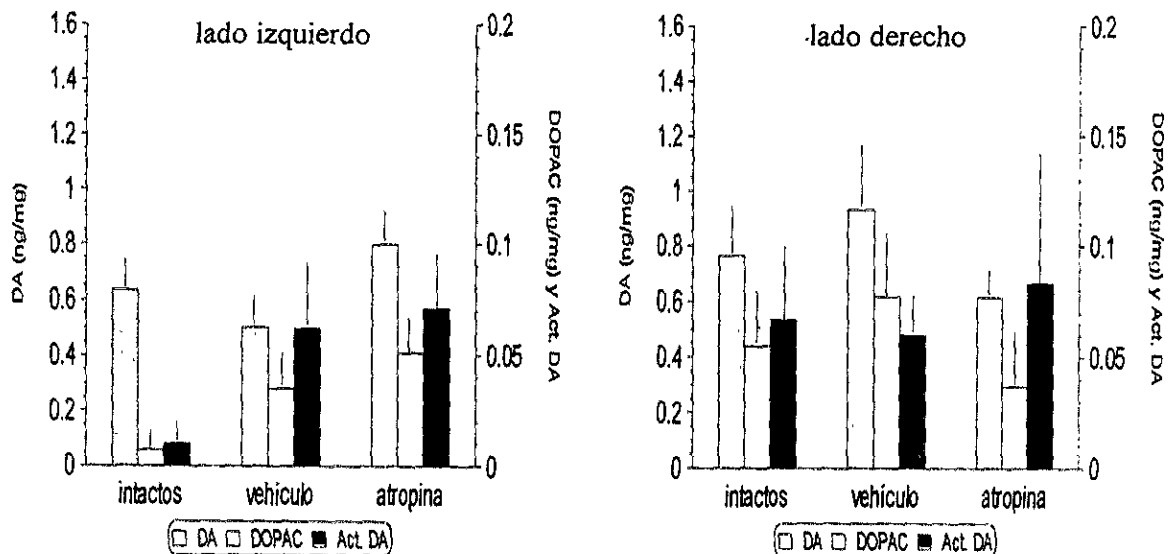


Figura 4. Concentración de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y actividad dopaminérgica (Act. DA) en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA de animales testigo e inyectados con vehículo o sulfato de atropina a las 13:00 h del día del diestro 2, sacrificados a las 17:00h del proestro.

CHARACTERISATION OF MONOAMINE NEURAL ACTIVITY IN THE PREOPTIC ANTERIOR HYPOTHALAMIC AREA AND MEDIAL BASAL HYPOTHALAMUS IN RATS DURING THE DAY OF PRO-OESTRUS AND ITS RELATION TO GONADOTROPHIN AND SEXUAL STEROID HORMONE PLASMA LEVELS.

El único sistema monoaminérgico que presenta un patrón de actividad asimétrico espontáneo en POA-AHA es el dopaminérgico.

A excepción de las 9:00 horas, la concentración de dopamina en uno y otro lado es semejante durante el día del proestro (figura 5). En cambio, durante la mañana y el medio día, la concentración de DOPAC es más alta en el lado izquierdo que en el lado derecho de POA-AHA. De tal forma que a las 11:00 y 15:00 horas la actividad de este sistema es significativamente mayor en el lado izquierdo que en el derecho.

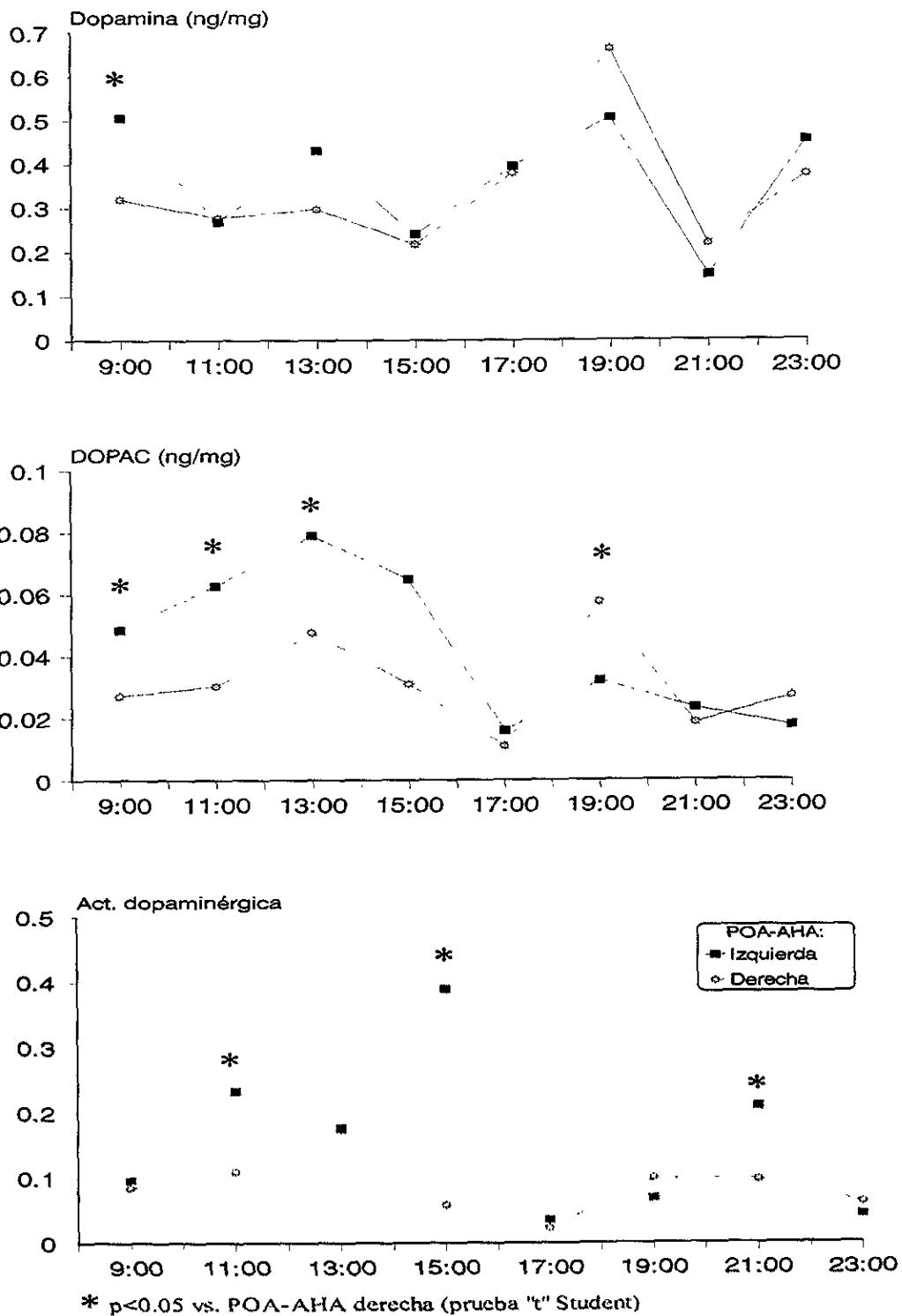


Figura 5. Concentración de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxiifenilacético (DOPAC) y actividad dopaminérgica (Act. DA) en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA durante el proestro.

DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio se presentan evidencias de la interacción entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico en el área preóptica hipotalámica anterior en la regulación neuroendócrina de la fisiología reproductiva durante el ciclo estral. Aporta pruebas indirectas que apoyan la hipótesis planteada por Blake sobre la posible existencia de dos factores liberadores de las gonadotropinas. Muestra la importancia de la innervación periférica ovárica en la regulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y proporciona evidencias que indican la presencia de componentes asimétricos en la regulación de la secreción de las gonadotropinas.

Los resultados obtenidos por la inyección de sulfato de atropina en los diferentes días del ciclo estral muestran claramente que la falta de activación de los receptores muscarínicos, a las 13:00 horas de cualquier día del ciclo estral, resulta en el bloqueo de la secreción fásica de LH y no de FSH, lo que explica la falta de ovulación en animales con el mismo tratamiento.

Estudios realizados por otros investigadores descubren que existen circunstancias donde la liberación de FSH y LH se encuentran dissociadas: 1) La estimulación electroquímica de mPOA estimula únicamente la liberación de LH, mientras que la estimulación puntual del área hipotalámica anterior dorsal estimula únicamente la liberación de FSH;¹⁴⁶ 2) La inyección de suero de ovino anti-LHRH a ratas castradas suprime los pulsos de LH, sin afectar la amplitud ni la frecuencia de los pulsos de FSH.³⁸ 3) La inyección de un antagonista LHRH provoca una supresión rápida y marcada de la concentración de LH, sin afectar la concentración sérica de FSH, tanto en animales ovariectomizados como en ratas cíclicas normales; en estas últimas, además, se interrumpe el ciclo ovárico y la ovulación.¹²²

El hecho que la inyección de sulfato de atropina haya bloqueado únicamente la liberación de LH permite pensar que el sistema colinérgico regula exclusivamente la liberación del factor LHRH (Figura 1) y apoya la hipótesis propuesta por Blake²² sobre la existencia de dos diferentes factores liberadores de

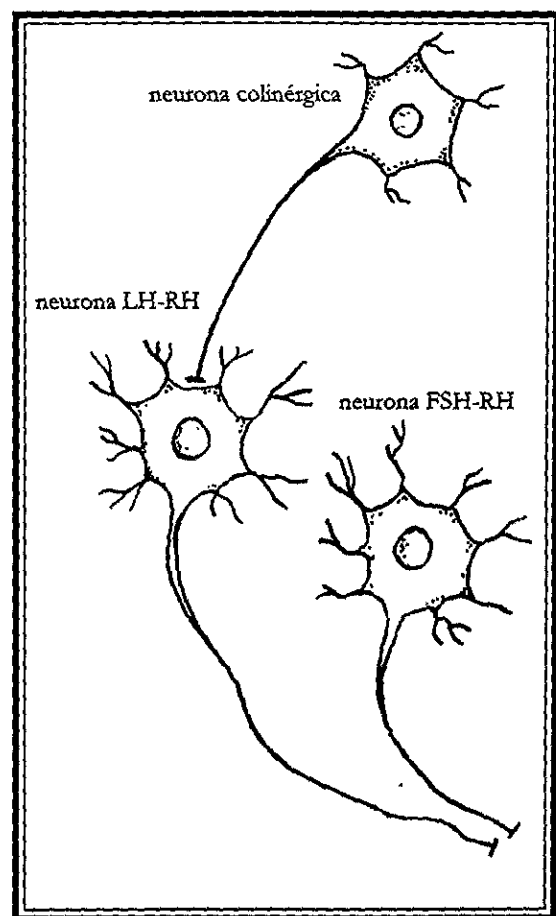


Figura 1. Esquema donde se muestra la interacción acetilcolina-LHRH

las gonadotropinas, uno para la LH (LH-RH) y otro para la FSH (FSH-RH). Sin embargo, la elución de extractos hipotalámicos a través de una columna de Sephadex G-25 si bien muestra la presencia de una sustancia FSH-RH bioactiva, previa a la salida de la LHRH,^{142,147,152} aún no ha sido posible aislarla.²²⁴

El sistema colinérgico hipotalámico presenta un ritmo circadiano, donde la mayor sensibilidad al sulfato de atropina ocurre a las 13:00 horas de cada día y un ritmo infradiano que se repite en cada ciclo estral, caracterizado por cambios del contenido de acetilcolina en POA-AHA; la actividad de las enzimas de síntesis y degradación; y el número y afinidad de los receptores muscarínicos colinérgicos.^{37,60,61,184}

La existencia de estos ritmos en la actividad colinérgica hipotalámica podrían explicar las diferencias en la actividad del sistema dopaminérgico de POA-AHA como respuesta a la inyección de sulfato de atropina. La presencia de una relación funcional entre ambos sistemas se ha descrito con anterioridad para el complejo nigro-estriatal de los ganglios basales^{128,223} y en los mecanismos que regulan la secreción de PRL por las neuronas TIDA. Sin embargo, según la información revisada, no existen antecedentes sobre la vinculación de estos sistemas de neurotransmisión con la liberación de las gonadotropinas.

El análisis de los efectos del bloqueo colinérgico sobre el sistema dopaminérgico de las porciones izquierda y derecha de POA-AHA muestra que el bloqueo sistémico de los receptores colinérgicos muscarínicos en los días de proestro, estro y diestro-1 modifica de modo asimétrico la actividad del sistema dopaminérgico de POA-AHA. A las 17:00 horas del proestro, es decir a la hora en que ocurre la secreción preovulatoria de LH y FSH (ver apéndice). En el día de diestro-2, el tratamiento no produjo cambios en la actividad dopaminérgica de POA-AHA, si bien bloqueó la liberación preovulatoria de LH. Es posible que estas diferencias estén vinculadas a las concentraciones de estrógenos circulantes, ya que se ha descrito una relación funcional entre el sistema dopaminérgico y los estrógenos¹²⁰ y que la castración en la tarde del diestro 2 no impide la cornificación vaginal, la cual es dependiente de estrógenos. La importancia fisiológica de la vinculación entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico en las porciones izquierda y derecha de POA-AHA parece variar durante el ciclo estral.

Resultados de implantes realizados en el día del estro muestran que el implante unilateral de haloperidol (antagonista dopaminérgico) en la porción derecha de POA-AHA bloquea la ovulación, como resultado de la alteración de la secreción de GnRH;¹⁵⁴ mientras que el mismo tratamiento, realizado en el lado izquierdo, sólo es efectivo cuando se aplican dosis muy altas del fármaco.¹⁵⁵ De modo semejante, el implante de atropina en el lado derecho de POA-AHA bloquea la ovulación, en tanto que el implante izquierdo no la modifica. Además, la estimulación del sistema muscarínico

por el implante de pilocarpina en el lado derecho no altera la ovulación, mientras que el implante izquierdo la bloquea.¹³⁷

Tomando en conjunto, los resultados obtenidos en este estudio y aquellos de implantes de agonistas y antagonistas de los sistemas colinérgico y dopaminérgico (Figura 2A) realizados en el día del estro, parece evidente que la vinculación funcional entre estos sistemas es diferente para las porciones izquierda y derecha de POA-AHA y que la importancia fisiológica de esta asimetría radica en la necesidad de un tono dopaminérgico en el lado derecho de POA-AHA para que se produzca la liberación preovulatoria de LH.

El día del diestro 1 es muy sensible a las manipulaciones de estos sistemas de neurotransmisión, dado que los implantes unilaterales de haloperidol, atropina o pilocarpina, en una u otra porción de POA-AHA bloquean la ovulación. Para este día, los cambios de actividad de cualquiera de los sistemas y en cualquiera de las porciones de POA-AHA altera el proceso ovulatorio. Si bien se mantiene la respuesta asimétrica del sistema dopaminérgico al bloqueo inducido por el sulfato de atropina, parece no haber una preponderancia entre uno y otro lado de POA-AHA en el control de la ovulación, lo que significaría la necesidad de que ambas porciones mantengan su propio tono dopaminérgico (Figura 2B).

La inyección de sulfato de atropina en diestro 2 produjo bloqueo de la liberación preovulatoria de LH sin que se altere la actividad dopaminérgica de POA-AHA. En este día, el papel del sistema dopaminérgico parecería no ser determinante en dicho proceso. Al parecer, la señal colinérgica necesaria para que se produzca la ovulación se origina en el lado izquierdo de POA-AHA, que presenta la mayor actividad CAT y que sólo el implante izquierdo de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA bloquea la ovulación (Figura 2C).

En el día del proestro, el bloqueo unilateral de los sistemas colinérgico o dopaminérgico de POA-AHA no afecta el proceso ovulatorio, ya que los implantes derecho o izquierdo de atropina o haloperidol son incapaces de bloquear la ovulación. Sin embargo, en este día el implante derecho de pilocarpina es capaz de bloquear la ovulación (Figura 2D).

En suma, al parecer la dominancia que los lados izquierdo y derecho de POA-AHA ejercen en el control de los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación se alternan durante el ciclo estral y los sistemas colinérgico y dopaminérgico actúan en paralelo.

El día de diestro 1 es clave en la cascada de eventos que culminan con la ovulación 72 horas más tarde. En este día, la inyección de la dosis mínima de sulfato de atropina a las 13:00 h causa un retraso de 24 horas^{62,63} en la ovulación espontánea. Este retraso podría ser explicado, en parte, por el incremento transitorio de las concentraciones plasmáticas de progesterona y 17 β -estradiol que se observan una hora después de la inyección, dado que se ha mostrado que la inyección de

progesterona en el día de diestro 1 retrasa la ovulación por 24 horas, aunque la dosis de progesterona inyectada en esos estudios fueron farmacológicamente elevadas. Por otro lado, el incremento casi inmediato en la actividad dopaminérgica de POA-AHA observado en los animales tratados con sulfato de atropina permite sugerir que este incremento temporal podría estar relacionado con el bloqueo de la secreción preovulatoria de LH y el retraso en la ovulación; además de evidenciar una interrelación entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico, donde el sistema colinérgico podría estar regulando de modo directo e inhibitorio la actividad del sistema dopaminérgico, al menos a las 14:00 horas del día de diestro 1. Este efecto se observa en ambos lados, y cuando se evalúa a largo plazo se establece el efecto asimétrico señalado en párrafos anteriores.

El papel del sistema dopaminérgico en la regulación de la secreción de gonadotropinas es controversial;^{54,120} estudios *in vitro* donde co-incubaban fragmentos de hipófisis e hipotálamo medio basal de ratas sacrificadas a las 8:00 horas del día de diestro 1 mostraron que la incorporación de dopamina al medio de perfusión resulta en el bloqueo de la liberación de LH, efecto que puede ser prevenido por la incorporación previa de haloperidol al sistema de perfusión, lo que permite sugerir que el sistema dopaminérgico tiene un papel inhibitorio en la regulación de la secreción de las gonadotropinas.²⁰⁷ Asimismo, existen otros resultados que apoyan la idea del papel estimulante del sistema dopaminérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, como es el hecho de que la inyección de haloperidol a animales enteros a las 13:00 horas del día de diestro 1 resulta en el bloqueo de la liberación preovulatoria de FSH y LH en la tarde del proestro.⁵⁴ Clemens y colaboradores²⁹ propusieron que en la rata cíclica hay cuando menos dos subpoblaciones de neuronas dopaminérgicas que controlan la liberación de LH, una que actuaría de modo estimulante y la otra de modo inhibitorio. En el día del diestro 1 de la rata cíclica, el sistema colinérgico en POA-AHA suspendería la actividad de las neuronas dopaminérgicas que actúan de modo inhibitorio en la regulación de la liberación de gonadotropinas.

El día del proestro se caracteriza por grandes cambios neuroendócrinos. Bajo la influencia de concentraciones plasmáticas crecientes de estrógenos, secretados por los folículos en maduración, se presenta la liberación masiva de las gonadotropinas que inducirá la ovulación a la mañana siguiente. La liberación preovulatoria de las gonadotropinas depende de la activación de las neuronas que secretan los factores liberadores de las gonadotropinas, y las monoaminas tienen un papel clave en este evento crítico.

Los resultados obtenidos en ratas intactas sacrificadas a diferentes horas del proestro muestran que en la región donde se localizan los somas de las células GnRHérgicas (POA-AHA) no existe una relación temporal entre la actividad neural noradrenérgica y la secreción preovulatoria de LH que se produce en la tarde del proestro. Estos resultados se contraponen a lo mostrado por

Barraclough, quien evalúa la actividad noradrenérgica en función de la tasa de recambio de noradrenalina y no como el cociente de las concentraciones del metabolito (MHPG) y la noradrenalina.

El incremento en la actividad neural del sistema noradrenérgico observado en el HMB entre las 9:00 y las 15:00 horas, cuando las concentraciones de 17β -estradiol se encuentran elevadas y el hecho de que dos horas después se presente el pico preovulatorio de LH permiten sugerir que los estrógenos podrían estar actuando sobre los neuronas noradrenérgicas que inervan el HMB y estimular así la liberación preovulatoria de GnRH.

En los animales intactos sacrificados a las 17:00 h del diestro 2 (grupo testigo de ratas inyectadas con sulfato de atropina en el día del diestro 1) la máxima actividad noradrenérgica en POA-AHA ocurre a esta hora. En el día del proestro, la máxima actividad neural se presenta a las 11:00 h y coincide con un pico de concentración de estrógenos. Este incremento en la actividad noradrenérgica podría estar vinculado con la síntesis de GnRH necesaria para el mantenimiento de la liberación tónica de las gonadotropinas durante el siguiente ciclo, más que con su liberación preovulatoria del ciclo en estudio. La ovulación observada en las ratas tratadas con solución salina en el día del diestro 1, que no presentaron aumento en la actividad noradrenérgica a las 17:00 del diestro 2, apoyaría nuestra interpretación.

Los perfiles de actividad dopaminérgica y serotoninérgica en el HMB son semejantes a los descritos por Kerdelhué y col. (1989)¹¹¹ quienes observaron que la actividad neural dopaminérgica en eminencia media disminuye significativamente desde la mañana hasta la tarde del proestro y que la actividad serotoninérgica aumenta durante ese lapso. También se observa un incremento en la actividad noradrenérgica entre las 9:00 y las 15:00 horas. Los incrementos en las actividades neurales noradrenérgicas y serotoninérgicas en el HMB, previo a la liberación preovulatoria de LH nos permite sugerir que estas monoaminas regulan de modo estimulante la liberación de GnRH.

La concentración de GnRH en el HMB de la rata hembra es el doble en el lado derecho respecto al izquierdo y la extirpación de una de las gónadas o la destrucción de su inervación con 6-hidroxidopamina incrementa el contenido de GnRH en el HMB ipsilateral al lado del tratamiento. Los resultados de éste y otros experimentos donde se manipula la inervación ovárica resaltan el papel de la inervación ovárica en el control fino de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, tanto a nivel gonadal, donde regula su reactividad a las gonadotropinas, como a nivel hipotalámico regulando no sólo el contenido de GnRH, sino también la actividad neural de los sistemas monoaminérgicos diencefálicos.

La estimulación unilateral de los pedículos ováricos de la rata hembra cíclica produce cambios en la actividad monoaminérgica de POA-AHA, los que dependen del día del ciclo estral y del lado

en que se realice la manipulación. Los días de diestro 1 y 2 son los más sensibles a dichas manipulaciones y las estimulaciones de los pedículos ováricos del lado izquierdo tiene efectos más pronunciados sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada que las manipulaciones del pedículo derecho.

El hecho de que las estimulaciones de los pedículos ováricos no provoquen cambios en la tasa de cornificación vaginal muestra de modo indirecto que la secreción de estrógenos se mantuvo dentro de los rangos normales y permite pensar que los cambios observados en la actividad monoaminérgica de POA-AHA son consecuencia de la activación de una vía neural que vincula a los ovarios con núcleos hipotalámicos relacionados con el control neuroendócrino de la ovulación, alterando la actividad neural noradrenérgica de POA-AHA, la que a su vez modifica la secreción de GnRH.

Se ha reportado que en la rata cíclica la hemiovariectomía a largo plazo no afecta la tasa ovulatoria, independientemente del día en que se realice la operación.⁴¹ En el presente estudio se muestra que los efectos a corto plazo de la hemiovariectomía varían dependiendo del día del ciclo estral y del lado en que se realice la operación. Dicha manipulación afecta de modo significativo la tasa ovulatoria cuando se realiza en diestro 1 y 2. Flores y colaboradores⁶⁹ también observaron una reducción significativa en la tasa de animales ovulantes cuando extirparon el ovario derecho a las 7:00 horas de estos mismos días del ciclo estral.

La reducción en la tasa de cornificación vaginal de los animales Hovx en diestro 1 o diestro 2 permite sugerir que hubo una disminución en la liberación de estrógenos por los ovarios, aumentando así los efectos neurales observados por la estimulación del pedículo ovárico.

La magnitud de los cambios en las concentraciones de las monoaminas y sus metabolitos, así como de la actividad neural monoaminérgica en POA-AHA, observados en ratas hemiovariectomizadas no permiten clarificar el papel de estos sistemas de neurotransmisión en respuesta al tratamiento. Sin embargo, en otros modelos animales, caracterizados por la alternancia de la ovulación entre los ovarios izquierdo y derecho, la hemiovariectomía modifica la actividad neural de los sistemas monoaminérgicos hipotalámicos de modo asimétrico. Estos cambios en la actividad monoaminérgica podrían ser el resultado de la interrupción unilateral de información neural originada en el ovario. Al parecer, la inervación ovárica transmite información al hipotálamo por el tracto espino talámico o a través del nervio vago, el cual inerva el núcleo del tracto solitario, donde se encuentra el núcleo A2, cuyas neuronas, de naturaleza noradrenérgica, proyectan sus fibras al hipotálamo y regulan de la actividad de las neuronas GnRHérgicas.

En suma, los resultados obtenidos muestran que el bloqueo farmacológico del sistema colinérgico disocia la secreción de las gonadotropinas e induce alteraciones asimétricas en la actividad dopaminérgica del hipotálamo. Además, que en los días de diestro 1 y 2 la información neural de la inervación ovárica es crucial para el desarrollo normal de la cascada de eventos que culminan con la ovulación en el estro siguiente.

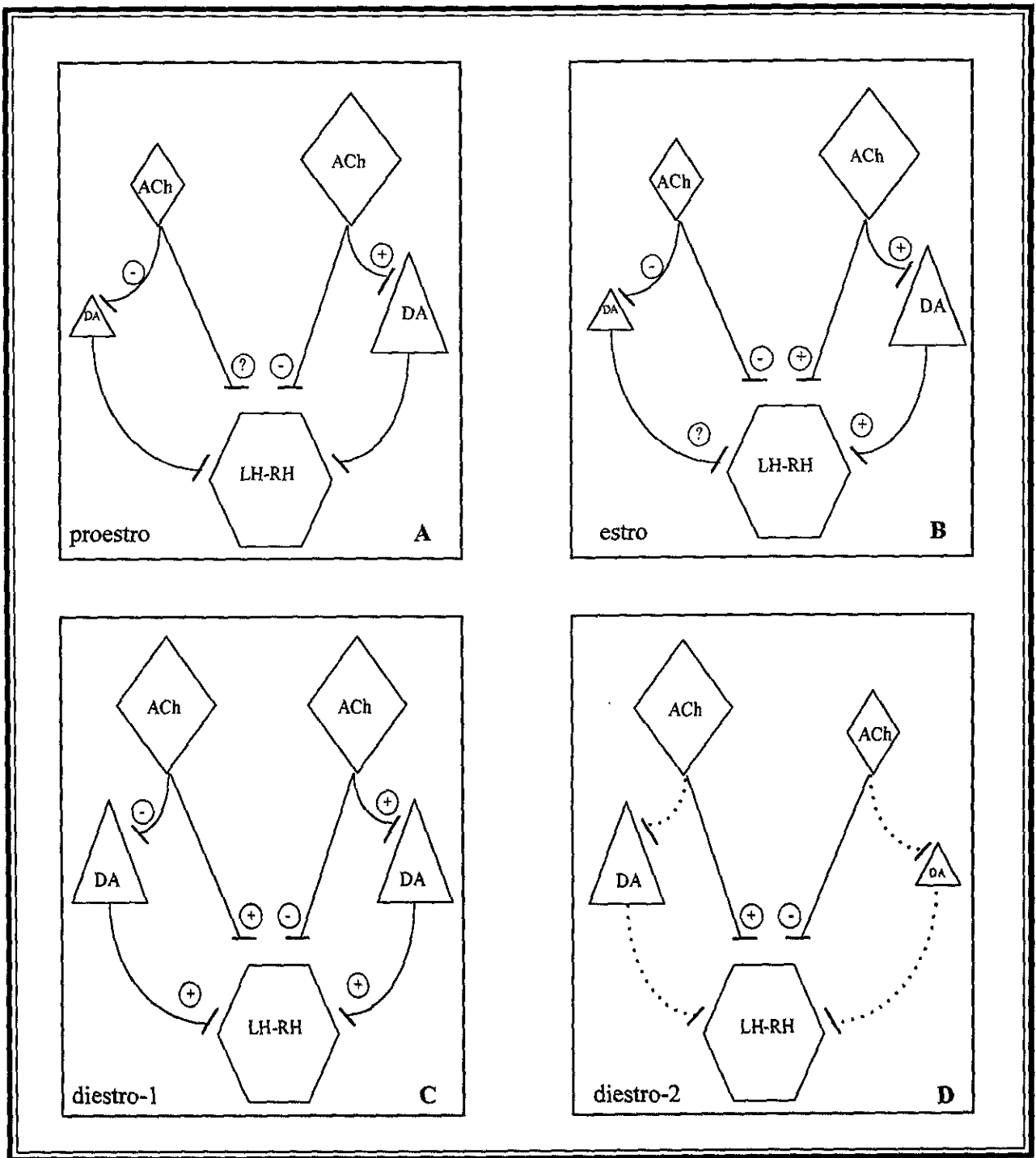


Figura 2. Modelo teórico donde se muestra la alternancia de las porciones izquierda y derecha de POA-AHA de los sistemas colinérgico y dopaminérgico en el control de los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación. El tamaño de la figuras indica la dominancia; el signo, el efecto. En los días de proestro y estró el lado derecho es dominante; en diestro-1, ambos son equivalentes y en diestro-2, el lado izquierdo es dominante.

REFERENCIAS

1. Adashi EY, Hsueh AJW. (1981). Stimulation of b-adrenergic responsiveness by follicle stimulating hormone in the rat granulosa cells *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*; **108**:2170-2178.
2. Avissar S, Egozi Y, Sokolovsky M. (1981). Studies on muscarinic receptors in mouse and rat hypothalamus: A comparison of sex and cyclical differences. *Neuroendocrinology*; **32**(5):295-302.
3. Ayala ME, Domínguez R. (1988). Ovulatory response to the sequential administration of follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotropin by autografted ovary in unilaterally ovariectomized adult rat with peripheral denervation induced by guanethidine treatment. *Revista de Investigación Clínica*; **40**:149- 155.
4. Bahr J, Kao L, Nalbandov AV. (1974). The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biology of Reproduction*; **10**:273-290.
5. Bakalkin GY, Tsibezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID, Krivosheev OG. (1984). Lateralization of LHRH in rat hypothalamus. *Brain Research*; **296**:361-364.
6. Barancuz R, Greenwald GS. (1973). Peripheral levels of estrogen in cyclic hamster. *Endocrinology*; **92**:805-812.
7. Barraclough CA. (1983). The role of catecholamines in the regulation of gonadotropin secretion. *Acta Morphologica Hungarica*; **31**:101-116.
8. Barraclough CA. (1992). Neural control of the synthesis and release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Ciba Symposium*; **68**:233-251.
9. Belcheva I, Bryer JB, Starkstein SE, Honig M, Moran TH, Robinson RG. (1990). Hemispheric asymmetry in behavioral response to D1 and D2 receptor agonist in the nucleus accumbens. *Brain Research*; **533**:286-291.
10. Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner H, Mical R, Porter J. (1977). Dopamine in the hypophysial portal plasma of the rat during the estrus cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology*; **100**:452-458.
11. Ben-Jonathan N, Brown RH, Laufer N, Reich R, Bahr JM. (1982). Norepinephrine in Graafian follicles is depleted by follicle stimulating hormone. *Endocrinology*; **110**:457-461.
12. Benoit J. (1923). Transformation expérimentale du sexe par ovariectomie précoce chez la poule domestique. *CR Academy of Science Paris*; **177**:1074-1077.
13. Benoit J. (1932). L'inversion sexuelle de la poule déterminée par l'ablation de l'ovaire gauche. *Archives Zoology Experimental Genetics*; **73**:11-12.
14. Bergen H, Leung PCK. (1987). Electrical stimulation of ventral versus dorsal mesencephalic tegmental areas in the conscious rat: Effects on luteinizing hormone release. *Neuroendocrinology*; **46**: 117-124.
15. Bergen H, Leung PCK. (1988). Electrical stimulation of ascending noradrenergic tracts in the midbrain: Suppression of steroid-induced luteinizing hormone release. *Endocrinology*; **122**(3): 899-905.
16. Berk, ML, Finkelstein JA. (1981). Afferent projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. *Neuroscience*; **6**:1601-1624.

17. Bhar JM, Ben-Johnathan N. (1981). Preovulatory depletion of ovarian catecholamine. *Endocrinology*; **108**:1815-1820.
18. Biegon A, Bercovitz H, Samuel D. (1980). Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. *Brain Research*; **187**:221-225.
19. Biegon A, Fischette CT, Rainbow TC, McEwen BS. (1983). Serotonin receptor modulation by estrogen in discrete brain nuclei. *Neuroendocrinology*; **35**:287-291.
20. Björklund A, Nobin A. (1973). Fluorescence histochemical and microspectrofluorometric mapping of dopamine and noradrenaline cells groups in the rat diencephalon. *Brain Research*; **51**:193-205.
21. Blake CA. (1974). Parallelism and divergence in luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone release in nicotine-treated rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; **145**:716-720.
22. Blejer WJ, Ehteshami M. (1981). Ovulation following unilateral ovariectomy in the California leaf-nosed bat (*Macrotus californicus*). *Journal of Reproduction and Fertility*; **63**:181-183.
23. Burden HW, Lawrence IE. (1977). The effects of denervation on compensatory hypertrophy. *Neuroendocrinology*; **23**:360-378.
24. Burden HW, Leonard M, Smith CP, Lawrence IE. (1983). The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *Anat Rec*; **207**(4):623-627.
25. Burden HW. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: *Catecholamines as hormone regulators*. Editores: N Ben-Johnathan *et. al.*, Raven Press, Nueva York, pp. 261-278.
26. Burden HW, Leonard MJ, Hodson CA, Louis TM, Lawrence IE. (1986). Effect of abdominal vagotomy at proestrus on ovarian weight, ovarian antral follicles, and serum levels of gonadotropins, estradiol, and testosterone in the rat. *Neuroendocrinology*; **42**(6):449-455.
27. Butcher LL, Wolf NJ. (1984). En: *Handbook of chemical neuroanatomy*. Editores: A Björklund, T Hökfelt, RJ Kujar. vol. 13, Elsevier, Amsterdam, pp. 1-50.
28. Clemens JA, Tinsley FC, Fuller RW. (1977). Evidence for a dopaminergic content in series of neural events that lead to the pro-oestrous surge of LH. *Acta Endocrinologica*; **85**:18-24.
29. Condon WA, Black DL. (1976). Catecholamine-induced stimulation of progesterone by the ovine corpus luteum in vitro. *Biology of Reproduction*; **15**:573-578.
30. Cone RI, Davis GA, Goy RW. (1981). Effects of ovarian steroids on serotonin metabolism within grossly dissected and microdissected brain regions of the ovariectomized rat. *Brain Research Bulletin*; **7**:639-644.
31. Crowley WR, O'Donohue TL, Muth EA, Jacobowitz DM. (1979). Effects of ovarian hormones on levels of luteinizing hormone in plasma and on serotonin concentrations in discrete brain nuclei. *Brain Research Bulletin*; **4**:571-574.
32. Cruz ME, Chávez R, Domínguez R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Revista de Investigación Clínica*; **38**: 167-171.

33. Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of Endocrinology*; **24**:739-742.
34. Cruz ME, Chávez R, Rosas P, Lujambio VM, Morán JL, Domínguez R. (1990). Diurnal changes in hypothalamic acetylcholinesterase activity during the oestrous cycle of the rat. *Medical Science Research*; **18**:137-138.
35. Cruz ME, Castro J, Domínguez R. (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Endocrinology*; **133**:205-210.
36. Cruz ME, Arteaga PR, De la Huerta M, Sánchez M, Domínguez R. (1998). Differences in acetylcholine content and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Medical Science Research*; **25**:823-825.
37. Culler MD, Negro-Vilar A. (1986). Evidence that pulsatile follicle-stimulating hormone secretion is independent of endogenous luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology*; **118**(2):609-612.
38. Chávez R, Cruz ME, Domínguez R. (1987). Differences in the ovulation rate of the right and left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effects of ipsi- and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *Journal of Endocrinology*; **113**:397-401.
39. Chávez R, Sánchez S, Ulloa-Aguirre A, Domínguez R. (1989). Effects on oestrous cyclicity and ovulation of unilateral section of the vagus nerve performed on each day of the oestrous cycle in the rat. *Journal of Endocrinology*; **123**:441-444.
40. 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**:197-201.
41. Choudhury S, Sharpe R, Brown P. (1974). The effect of pimozide, a dopaminergic antagonist, on pituitary gonadotrophin function in the rat. *Journal of Reproduction and Fertility*; **39**:275-283.
42. D'Albora H, Cassina MP, Barreiro JP, Sapiro R, Domínguez R. (1992). Differences in follicular growth and ovulation ability in the autografted right and left ovary of hemiovariectomised prepubertal rats. *Medical Science Research*; **20**: 755-757.
43. D'Albora H, Barcia JJ. (1994). La existencia de neuronas en el ovario de rata aporta nuevos elementos sobre su regulación nerviosa. Resúmenes del XVIII Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas, Montevideo, Uruguay, p-206.
44. Day TA, Blessing W, Willoughby JO. (1980). Noradrenergic and dopaminergic projections to the medial preoptic area of the rat. A combined horseradish peroxidase/catecholamine fluorescence study. *Brain Research*; **193**:543-548.
45. Dees WL, Ahmed CE, Ojeda SR. (1986). Substance P- and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology*; **119**(2):638-641.
46. Demling J, Fuchs E, Baumert M, Wuttke W. (1985). Preoptic catecholamine, GABA, and glutamate release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-primed rats using a push-pull cannula technique. *Neuroendocrinology*; **41**:212-218.

47. Desan PH, López KH, Austin HB, Jones RE. (1992). Asymmetric metabolism of hypothalamic catecholamines alternates with side of ovulation in a lizard (*Anolis carolinensis*). *Journal of Experimental Zoology*; **262**:105-112.
48. Dohanich GP, Witcher JA, Weaver DR, Clemens LG. (1982). Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Research*; **241**(2):347-350.
49. Domínguez R, Riboni L. (1971). Failure of ovulation in autografted ovary of hemispayed rat. *Neuroendocrinology*; **7**:164-170.
50. Domínguez R, Smith ER. (1974). Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology*; **14**:212-223.
51. Domínguez R, Zipitúa D. (1980). Longterm effects of guanethidine administration on the ovulatory response of the rat. *IRCS Medical Science*; **8**:352.
52. Domínguez R, Riboni L, Zipitúa D, Revilla R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat? *Journal of Endocrinology*; **95**:175-180.
53. Domínguez R, Gaitán CM, Méndez SA, Ulloa-Aguirre A. (1987). Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *Journal of Endocrinology*; **113**:37-44.
54. Domínguez R, Cruz ME, Morán JL. (1998). Differential effects of local ovarian anesthesia during proestrus, on ovulation in normal and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. (en prensa)
55. Donnenberg VH. (1981). Hemispheric laterality in animals and the effects of early experience. *Behavior Brain Science*; **4**: 1-49.
56. Dotti C, Taleisnik S. (1982). Inhibition of the release of LH and ovulation by activation of the noradrenergic system. Effect of interrupting the ascending pathway. *Brain Research*; **249**: 281-290.
57. Eckenstein F, Brade YA, Thoenen H. (1981). Production of specific antibodies to choline acetyltransferase purified from pig brain. *Neuroscience*; **6**:993-1000.
58. Eckenstein F, Thoenen H. (1982). Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: characterization and use for identification of cholinergic neurons *EMBO J*; **1**:363-368.
59. Egozi Y, Kloog Y. (1985). Muscarinic receptors in the preoptic area are sensitive to 17 beta-estradiol during the critical period. *Neuroendocrinology*; **40**(5):385-92.
60. Egozi Y, Kloog Y, Sokolovsky M. (1986). Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrous cycle. *Brain Research*; **383**:310-313.
61. Everett JW. (1948). Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*; **43**:389-405.
62. Everett JW, Sawyer CH. (1949). A neural timing factor in the mechanism by which progesterone advances ovulation in the cyclic rat. *Endocrinology*; **45**:581-594.
63. Everett JW, Sawyer CH, Markee JE. (1949). A neurogenic timing factor in the control of the ovulation discharge

of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology*; **44**:234-250.

64. Everett J, Sawyer CH. (1950). A 24h periodicity in the "LH release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*; **46**:198-216.
65. Favaretto AI, Valenca MM, Picanco-Diniz D, Antunes-Rodrigues JA. (1993). Inhibitory role of cholinergic agonists on testosterone secretion by purified rat Leydig cells. *Archives Int Physiology, Biochemistry and Biophysics*; **101**:333-335.
66. Finn PD, Steiner RA, Clifton DK. (1998). Temporal patterns of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), c-fos, and galanin gene expression in GnRH neurons relative to the luteinizing hormone surge in the rat. *Journal of Neuroscience*; **18**(2):713-719.
67. Flores A, Ayala ME, Domínguez R. (1990). Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation of ovulation in the pubertal and the adult rat?. *Medical Science Research*; **18**:817-818.
68. Flores A, Morales L, Ulloa-Aguirre A, Domínguez R. (1990). Acute changes in serum levels of luteinizing and follicle stimulating hormone, ovulation and follicular growth induced by stress, unilateral ovariectomy or mechanical stimulation of the ovarian pedicle at different stages of the oestrous cycle of the rat. *Medical Science Research*; **18**:819-821.
69. Fodor M, Gallatz K, Palkovits M. (1995). Calcitonin gene-related peptide innervation of A2-catecholamine cells in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Brain Research*; **690**:141-144.
70. Frankel AI, Chapman JC, Book B. (1989). Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *Journal of Endocrinology*; **122**:485-488.
71. Frazer A, Hensler JG. (1993). Serotonin, En: *Basic Neurochemistry*. Editores: GJ Sigel, BW Agranoff, RN Albers, PB Molinoff . Raven Press, Nueva York, pp. 283-308.
72. Freeman ME. (1994). The neuroendocrine control of the rat estrous cycle. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 2, cap. 46. Raven Press, Nueva York, pp. 613-658.
73. Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotrophic function: Unilateral hypothalamic lesion and compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroscience Letters*; **51**:367-370.
74. Gallo RV. (1981). Pulsatile LH release during the ovulatory surge on proestrus in the rat. *Biology of Reproduction*; **24**:100-104.
75. Gallo RV. (1981). Pulsatile LH release during periods of low-level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biology of Reproduction*; **24**:771-779.
76. Gerendai I, Rotsztejn W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U. (1978) Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neuroscience Letters*; **9**:333-336.
77. Gerendai I. (1986) Laterality in the neuroendocrine system. En: *Duality and unity of the brain*. Editor: O Ottonson. MacMillan, Estocolmo, pp.17-28.
78. Gerendai I, Halász B. (1997). Neuroendocrine asymmetries. *Frontiers in Neuroendocrinology*; **18**:354-381.

79. Geschwind N, Levitsky W. (1968). Left-right asymmetry in temporal speech region. *Science*, **161**:186-187.
80. Gilbert RFT, Emson PC, Fahrenkrug J, Lee CM, Penman E, Wass J. (1980). Axonal transport of neuropeptides in the cervical vagus nerve of the rat. *Journal of Neurochemistry*; **34**:108-113.
81. Gitler MS, Barraclough CA. (1988). Stimulation of the medullary A1 noradrenergic system augments luteinizing hormone release induced by medial preoptic stimulation. *Neuroendocrinology*; **48**:351-359.
82. Glick SD, Jerussi TO, Zimmerberg B. (1977). Behavioral and neuropharmacological correlates of nigrostriatal asymmetry in rats. En: *Lateralization In The Nervous System*. Editores: SE Harnard, RW Doty, L Goldstein, J Jaynes , G Krauthamer. Academic Press, Nueva York, pp. 213-240.
83. Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 2, cap. 11, Raven Press, Nueva York, pp.571-627.
84. Gore AC, Roberts JL. (1995). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*; **136**(3):889-896.
85. Gore AC, Roberts JL. (1997). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Frontiers in Neuroendocrinology*; **18**(2):209-245.
86. Gothilf Y, Muñoz-Cueto JA, Sagrillo CA, Selmanoff M, Chen TT, Kah O, Elizur A, Zohar Y. (1996). Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): Complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biology of Reproduction*; **55**:636-645.
87. Greenough WT, Larson JB, Withers GS. (1985). Effects of unilateral and bilateral training in a reaching task on dendritic branching of neurons in the rat motosensory forelimb cortex. *Behavior Neurology and Biology*, **44**:301-314.
88. Greenwald GS, Roy SK. (1994). Follicular development and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 1, cap. 12, Raven Press, Nueva York, pp. 629-724.1
89. Heape W. (1900). The "sexual season" of mammals and relation of the pro-oestrus to menstruation. *Q. J. Micr. Sci.* **44**: 1-70, citado en: Freeman ME (1994) The ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 2, cap. 46, Raven Press, Nueva York, pp. 613-658.
90. Herbison AE, Heavens RP, Dyer R. (1990). Oestrogen modulation of excitatory A1 noradrenergic inputs to rat medial preoptic gamma aminobutiric acid neurones demonstrated by microdialysis. *Neuroendocrinology*; **52**:161-168.
91. Herbison AE, Theodosis DT. (1992). Immunocytochemical identification of oestrogen receptors in preoptic neurons containing calcitonin gene-related peptide in the male and female rat. *Neuroendocrinology*; **56**:761-764.
92. Hery M, Faudon M, Dusticier G, Hery F. (1982). Daily variations in serotonin metabolism in the suprachiasmatic nucleus of the rat: Influence of oestradiol impregnation. *Journal of Endocrinology*; **94**:157-166.
93. Hill TR. (1962). Paradoxical effects of ovarian secretion. En: *The Ovary*. Editores: Zukerman, Weir. Academic Press, Nueva York, pp. 231-261.
94. Hökfelt T, Fuxe K, Goldstein M, Johansson O. (1974). Immunohistochemical evidence for the existence of

adrenaline neurons in the rat brain. *Brain Research*; **66**:239-251.

95. Honma K, Wuttke W. (1980). Norepinephrine and dopamine turnover rates in the medial preoptic area and the mediobasal hypothalamus of the rat brain after various endocrinological manipulations. *Endocrinology*; **106**(6):1848-1853.
96. Hosny S, Jennes L. (1998). Identification of gap junctional connexin-32 mRNA and protein in gonadotropin-releasing hormone neurons of the female rat. *Neuroendocrinology*; **67**(2):101-108.
97. Inagaki S, Kito, S, Kubota Y, Girigis S, Emson PC, Hillyard JC, MacIntyre I. (1986). Autoradiographic localization of calcitonin gene-related peptide binding sites in human and rat brains. *Brain Research*; **374**:287-298.
98. Inase Y, Machida T. (1992). Differential effects of right-sided and left-sided orquidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Research*; **580**:338-340.
99. Jarjour LT, Handelsman DJ, Raum WJ, Swerdloff RS. (1986). Mechanism of action of dopamine on the in vitro release of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*; **119**(4):1726-1732.
100. Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W. (1995). The inhibitory effect of beta-endorphin on LH release in ovariectomized rats does not involve the preoptic GABAergic system. *Experimental Clinical Endocrinology Diabetes*; **103**:317-323.
101. Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) producing neurons. *Journal of Comparative Neurology*; **232**:534-547.
102. Jennes L. (1989). Prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone-containing systems in rat brain. *Brain Research*; **482**(1):97-108.
103. Johnson MD, Crowley WR. (1983). Acute effects of estradiol on circulating luteinizing hormone and prolactin concentrations and on serotonin turnover in individual brain nuclei. *Endocrinology*; **113**:1934-1941.
104. Jones RE, Desan PH, López KH, Austin HB. (1990). Asymmetry in diencephalic monoamine metabolism is related to the side of ovulation in a reptile. *Brain Research*; **506**:187-191.
105. Jones RE, López KH, Maldonado TA, Summers TR, Summers CH, Propper CR, Woodling JD. (1997). Unilateral ovariectomy influences hypothalamic monoamine asymmetries in a lizard (*Anolis*) that exhibits alternation of ovulation. *Genetic of Comparative Endocrinology*; **108**(2):306-315.
106. Kawakami M, Arita J, Kimura F, Hayashi R. (1979). The stimulatory roles of catecholamines and acetylcholine in the regulation of gonadotropin release in ovariectomized estrogen-primed rats. *Endocrinologica Japonica*; **26**(2):275-284.
107. Kawakami M, Ando S, Nishihara M, Tadokoro Y. (1981). Participation of the lower brain stem in induction of preovulatory gonadotropin surge in female rats. *Endocrinologica Japonica*; **28**(6):809-818.
108. Kelsall R, Coe IR, Sherwood NM. (1990). Phylogeny and ontogeny of gonadotropin-releasing hormone: comparison of guinea pig, rat, and a protochordate. *Genetic of Comparative Endocrinology*; **78**(3):479-494.
109. Kerdelhué B, Bojda F, Lesiure P, Pasqualini C, El Abed A, Lenoir V, Douillet P, Chiuch MC, Palkovits M. (1989). Median eminence dopamine and serotonin neural activity. *Neuroendocrinology*; **49**:176-180.
110. Kim K, Lim IS, Cho BN, Kang SS, Lee BJ, Choi KH, Chung CH, Lee CC, Cho WK, Wuttke W. (1993). A partial

- blockade of catecholaminergic neurotransmission with 6-hydroxydopamine decreases mRNA levels of gonadotropin-releasing hormone in male rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*; **58**:146-152.
111. King JA, Millar RP. (1995). Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell Molecular Neurobiology*; **15**:5-23.
 112. King TS, Steger RW, Morgan WW. (1986). Effect of ovarian steroids to stimulate region-specific hypothalamic 5-hydroxytryptamine synthesis in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*; **42**: 344-350.
 113. Kirsch B. (1980). Two types of luteinizing hormone-immunoreactive perikarya in the preoptic area of the rat. *Cell Tissue Research*; **212**:443-455.
 114. Klangkalya B, Chan A. (1988). Inhibition of hypothalamic and pituitary muscarinic receptor binding by progesterone. *Neuroendocrinology*; **47**(4):294-302.
 115. Klein CM, Burden HW. (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters*; **85**:217-222.
 116. Köning JF, Klippel RA. (1963). The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
 117. Kordon C, Glowinski J. (1972). Role of hypothalamic monoaminergic neurons in gonadotropin release-regulating mechanisms. *Neuropharmacology*; **11**:153-162.
 118. Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G, Weiner RI. (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 1, cap. 27, Raven Press, Nueva York, pp. 1621-1677.
 119. Koren D, Egozi Y, Sokolovsky M. (1992). Muscarinic envelopment in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat. *Molecular Cell Endocrinology*; **90**(1):87-93.
 120. Kovacs M, Koppan M, Mezo I, Teplan Y. (1994). Diverse effects of a potent LH-RH antagonist on the LH and FSH release. *Acta Biologica Hungarica*; **45**(2-4):285-296.
 121. Krieg R, Sawyer C. (1976). Effects of intraventricular catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized-steroid-primed rats. *Endocrinology*; **99**:411-419.
 122. Krivoneck J, Buresova O. (1972). Cortical acetylcholinesterase and handedness in rat. *Experientia*; **28**: 291.
 123. Kumazawa T. (1986). Sensory innervation of the reproductive organs. En: *Progress in Brain Research*. Editores: F Cervero y FB Morrison, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 115-129.
 124. Lapchak PA, Araujo D.M, Quirion R, Beaudet A. (1990). Chronic estradiol treatment alters central cholinergic function in the female rat: effect on choline acetyltransferase activity, acetylcholine content, and nicotine autoreceptor function. *Brain Research*; **525**:249-255.
 125. Lauber AH, Whalen RE. (1988). Muscarinic cholinergic modulation of hypothalamic estrogen binding sites. *Brain Research*; **443**(1-2):21-26.
 126. Lehmann J, Langer SZ. (1983). The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals? *Neuroscience*; **10**:1105-1120.

127. Leipheimer RE, Bona-Gallo A, Gallo RV. (1984). The influence of progesterone and estradiol on the acute changes in the pulsatile luteinizing hormone release induced by ovariectomy in diestrus 1 in the rat. *Endocrinology*; **114**:1605-1612.
128. Leonardelli J, Dubois MP, Poulain P. (1974). Effect of exogenous serotonin on LH-RH secreting neurons in the guinea pig hypothalamus as revealed by immunofluorescence. *Neuroendocrinology*; **15**:69-72.
129. Leonhardt S, Seong JY, Kim K, Thorun Y, Wuttke W, Jarry H. (1995). Activation of central GABA_A-but not GABA_B-receptors rapidly reduces pituitary LH release and GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*; **61**:655-662.
130. Leranth C, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. (1988). Catecholaminergic innervation of luteinizing hormone-releasing hormone and glutamic acid decarboxylase immunopositive neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology*; **48**: 591-602.
131. Levine JE, Ramirez VD. (1980). In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannula from the mediobasal hypothalamus of ovariectomized, steroid-primed rats. *Endocrinology*. 107(6), 1782-1790.
132. Libertum C, McCann SM. (1973). Blockade of the release of gonadotropins and prolactin by subcutaneous or intraventricular injection of atropine in male and female rats. *Endocrinology*; **92**:1714-1724.
133. Lipostis Z, Setalo G, Flerko B. (1984). Application of the silver-gold intensified 3,3'-diaminobenzidine chromogen to the light and electron microscopic detection of the luteinizing hormone-releasing hormone system of the rat brain. *Neuroscience*; **13**:513-525.
134. Livne I, Gibson MJ, Silverman AJ. (1993). Biochemical differentiation and intercellular interactions of migratory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the mouse. *Development Biology*; **159**(2):643-656.
135. López E, Cruz ME, Domínguez R. (1997). Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the rat. *Archives of Medical Research*; **28**(3):343-348.
136. López FJ, Merchenthaler I, Ching M, Wisniewski MG, Negro-Vilar A. (1991). Galanin: a hypothalamic hypophysiotropic hormone modulating reproductive functions. *Proceedures of the National Academy of Science of USA*; **88**:4508-4512.
137. Lovejoy DA, Fischer WH, Ngamvongchon S, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM. (1992). Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. *Proceedures of the National Academy of Science of USA*; **89**(14):6373-6377.
138. Luine V, Park DJ, Reis D, McEwen B. (1980). Immunochemical demonstration of increased choline acetyltransferase concentration in rat preoptic area after estradiol administration. *Brain Research*; **191**:273-277.
139. Lumpkin MD, DePaolo LV, Negro-Vilar A. (1984). Pulsatile release of follicle-stimulating hormone in ovariectomized rats is inhibited by porcine follicular fluid (inhibin). *Endocrinology*; **114**: 201-206.
140. Lumpkin MD, Moltz JH, Yu WH, Samson WK, McCann SM. (1987). Purification of FSH-releasing factor: its dissimilarity from LHRH of mammalian, avian, and piscian origin. *Brain Research Bulletin*; **18**(2):175-178.

141. Mallick BN, Joseph MM. (1998). Adrenergic and cholinergic inputs in the preoptic area of rats interact for sleep-wake termoregulation. *Pharmacological Biochemistry Behavior*; **61**(2):193-199.
142. Markee JE, Everett JW, Sawyer CH. (1952). The relationship of the nervous system to the release of gonadotropin and the regulation of the sex cycle. *Recent Program in Hormone Research*; **7**:139-163.
143. Martínez de la Escalera G, Mendoza L, Ochoa A, Hol D. (1993). Nuevas tendencias en el análisis experimental de la comunicación neuroendócrina: las células GT₁. En: *Comunicación neuroendócrina. Bases celulares y moleculares*. Editores: C Clapp, G Martínez de la Escalera. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México DF, pp. 277-292.
144. McCann SM, Mizunuma H, Samson WK, Lumpkin MD. (1983). Differential hypothalamic control of FSH secretion: a review. *Psychoneuroendocrinology*; **8**(3):299-308.
145. McCann SM, Marubayashi U, Sun HQ, Yu WH. (1993). Control of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone release by hypothalamic peptides. *Annals of the New York Academy of Science*; **28**:687:55-59.
146. McKellar S, Loewy AD. (1982). Efferent projections of the A1 catecholamine cell group in the rat: An autoradiographic study. *Brain Research*; **241**: 11-29.
147. Miller MM, Silver J, Reinhart B. (1984). Effects of gonadal steroids on the *in vivo* binding of [¹²⁵I]α-bungarotoxin to the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*; **290**:67-75.
148. Mitchel GAG. (1988). The innervation of the ovary, uterine tube, testis and epididymus. *Journal of Anatomy*; **72**:508-517.
149. Mittwoch V. (1975). Lateral asymmetry and gonadal differentiation. *Lancet*; **1**:401-402.
150. Mizunuma H, Samson WK, Lumpkin MD, Moltz HJ, Fawcett CP, McCann SM. (1983). Purification of a bioactive FSH-releasing factor (FSHRF). *Brain Research Bulletin*; **10**(5):623-629.
151. Morán JL, Cruz ME, Domínguez R (1994). Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic and anterior hypothalamic area performed on each day of the oestrous cycle of adult rat. *Brain Research Bulletin*; **33**:663-668.
152. Morán JL, Domínguez R (1995). Effects of the unilateral implant of haloperidol at the preoptic anterior hypothalamic area, on ovulation. *Endocrine*; **3**:391-393.
153. Morán JL, Domínguez R (1997). Differences on the sensitivity of the right and left side of the preoptic anterior hypothalamic area to the effects of a unilateral implant of haloperidol performed on the day of oestrus, on spontaneous ovulation. *Medical Science Research*; **25**:465-466.
154. Morello H, Taleisnik S. (1985). Changes of the release of LH on the day of proestrus after lesions or stimulation of the raphe nuclei in rats. *Brain Research*; **360**:311 -317.
155. Morello H, Taleisnik S. (1988). The inhibition of proestrus LH surge and ovulation in rats bearing lesions of the dorsal raphe nucleus is mediated by the locus coeruleus. *Brain Research*; **440**:227-231.
156. Morello H, Caligaris L, Haymal B, Taleisnik S. (1989). Inhibition of proestrus LH surge and ovulation in rats evoked by stimulation of the medial raphe nucleus involves a GABA-mediated mechanism. *Neuroendocrinology*;

157. Morishima Y, Takagi H, Akai F, Tohyama M, Emson PC, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I. (1985). Light and electron microscopic studies of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactive neurons and axons terminals of the nucleus of the tractus solitarius of the rat. *Brain Research*, **344**:191-195.
158. Morley B, Rodríguez-Sierra J, Clough R. (1983). Increase in hypothalamic nicotinic acetylcholine receptors in prepuberal female rats administered estrogen. *Brain Research*, **278**:262-265.
159. Munaro NI. (1978). The effect of ovarian steroids on hypothalamic 5-hydroxytryptamine neuronal activity. *Neuroendocrinology*; **26**:270-276.
160. Nance DM, Moger WH. (1983). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemicastration. *Brain Research Bulletin*; **10**:353-355.
161. Nance DM, Bhargava M, Myatt GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Research Bulletin*; **13**: 651-655.
162. Negro-Vilar A, Ojeda SR, McCann S. (1979). Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone releasing hormone release by median eminence terminals *in vitro*. *Endocrinology*; **104**:1749-1757.
163. Negro-Vilar A. (1982). The median eminence as a model to study presynaptic regulation of neural peptide release. *Peptides*; **3**:305-310.
164. Nisticó G, Müller EE. (1989). Neurotransmitters, neuromodulators and neuromediators. En: *Brain messengers and the pituitary*, 2da. edición, Academic Press, Nueva York, pp. 15-228.
165. Nordeen EJ, Yahr P. (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science*, **218**:391-393.
166. Nottebohm F. (1977). Asymmetries in neural control of vocalization in the canary. En: *Lateralization In The Nervous System*. Editores: SE Harnard, RW Doty, L Goldstein, J Jaynes, G Krauthamer. Academic Press, New York, pp. 23-44.
167. Ojeda SR, Hamms P, McCann S. (1974). Possible role of cyclic AMP and prostaglandin E1 in the dopaminergic control of prolactin release. *Endocrinology*; **95**:1694-1703.
168. Ojeda SR, Urbanski HF. (1994). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 2, cap. 40, Raven Press, Nueva York, pp.636-409.
169. Okamoto MT, Nobunaga T, Suzuki Y. (1972). Delay in ovulation with pentobarbital anesthesia applied at various stages of the 4-day cyclic rat. *Endocrinologica Japonica*; **19**:11-17.
170. Olsen KL, Edwards E, Schochter N, Whalen RE. (1988). Muscarinic receptors in preoptic area and hypothalamus: effects of cyclicity, sex and estrogen treatment. *Brain Research*; **448**(2):223-229.
171. Palkovits M. (1979). Effects of surgical deafferentation on the transmitter and hormone content of the hypothalamus. *Neuroendocrinology*; **29**:140-148.
172. Pasantes-Morales H, Sánchez J, Tapia R. (1992). *Neurobiología celular*. Fondo de Cultura Económica, México DF,

173. Pérez, Naftolin, García-Segura (1993). *J. Neurocytology*, **22**:233-243.
174. Powell JF, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier J, Lovejoy DA, Sherwood NM. (1994). Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proceedures of the National Academy of Science of USA*; **91**(25):12081-12085.
175. Rainbow TC, Dejruff V, Luine V, McEwen B. (1980). Estradiol-17 β increase the number of mscarinic receptors in hypothalamic nuclei. *Brain Research*; **198**:239-243.
176. Ramesh V, Kumar VM. (1998). The role of alpha-2 receptors in the medial preoptic area in the regulation of sleep wakefulness and body temperature. *Neuroscience*; **85**(3):807-817.
177. Rance N, Wise PM, Selmanoff MK, Barraclough CA. (1981). Catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in the median eminence luteinizing hormone-releasing hormone and serum gonadotropins on proestrus and diestrus day 1. *Endocrinology*; **108**:1795-1802.
178. Rao CV, Edgerton LA. (1984). Dissimilarity of corpora lutea within the same ovary or those from right and left ovaries of pigs during the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*; **70**:61-66.
179. Riboni L, Escamilla C, Domínguez R. (1995). Advancement of puberty in ovariectomised and hemiovariectomised female guinea pigs after ovarian autograft and treatment with gonadotrophins. *Medical Science Research*; **23**:307-308.
180. Sakumoto T. (1978). Afferent fibers connections from the lower brainstem to hypothalamus studied by the horseradish peroxidase method with special reference to noradrenergic innervation. *Experimental Brain Research*; **197**: 291-317.
181. Sánchez MA, Domínguez R. (1994). Asimetrías en los sistemas nervioso, inmune y endócrino. *Archivos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (MEX)* **9**: 66-72.
182. Sánchez MA, López-García JC, Cruz ME, Tapia R, Domínguez R. (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrus cycle of the rat. *Neuroreport*; **5**: 433-434.
183. Sandhu S, Cooke P, Diamond MC. (1986). Rat cerebral cortical estrogen receptors: male-female, right-left. *Experimental Neurology*; **92**:186-196.
184. Sanhera MK, Anselmo-Franci J, McCann SM. (1991). Effects of medial zona incerta lesions on the ovulatory surge of gonadotrophins and prolactin in the rat. *Neuroendocrinology*; **54**:433-438.
185. Sawyer CH, Everett JW. (1949). A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*; **47**:198-218.
186. Sawyer CH, Markee JE, Townsend BF. (1949). Cholinergic and adrenergic components in the neurohumoral control of the release of LH in the rabbit. *Endocrinology*; **44**:18-37.
187. Schneider H, McCann S. (1970). Monoamine and indolamines and control of LH secretion. *Endocrinology*; **86**:1127-1133.

- 188.Schultheis TD, Dees WL, Ojeda SR. (1992). Postnatal development of sympathetic and sensory innervation of the rhesus monkey ovary. *Biology of Reproduction*; **47**(5):760-767.
- 189.Schwartz NB, Channing CP. (1977). Evidence of ovarian "inhibin" suppression of the secondary rise in serum follicle-stimulating hormone levels in proestrus rats by injection of porcine follicular fluid. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*; **74**:5721-5724.
- 190.Schwartz R, Nagel JA, Ilustro JP. (1987). Asymmetries of brain dopamine metabolism related to conditioned paw usage in the rat. *Brain Research*; **417**:75-84.
- 191.Shannon NJ, Gunnet JW, Moore KE. (1986). A comparison of biochemical indices of 5- hydroxytryptamine neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *Journal of Neurochemistry*; **47**:958-965.
- 192.Sheela-Rani CS, Nordenström K, Norjavaara E, Ahren K. (1983). Development of catecholamine responsiveness in granulosa cells from preovulatory rat follicles- dependence on preovulatory luteinizing hormone surge. *Biology of Reproduction*; **28**:1021-1031.
- 193.Sherwood NM, Parker DB, McRory JE, Lescheid DW. (1994). Molecular evolution of GHRH and GnRH. En: *Molecular endocrinology of fish*. Editores: MN Sherwood, CL Hew. Fish Physiology. Academic Press, Nueva York; **13**:29-66.
- 194.Shieh KR, Pan JT. (1995). An endogenous cholinergic rhythm may be involved in the circadian changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in ovariectomized rats treated with or without estrogen. *Endocrinology*; **136**(6):2383-2388.
- 195.Shieh KR, Pan JT. (1996). Sexual differences in the diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in the rat: role of cholinergic control. *Biology of Reproduction*; **54**(5):987-992.
- 196.Silverman AJ, Livne I, Witkin JW. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: Immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: *The Physiology of Reproduction*. Editores: E Knobil, JD Neill, 2da. edición, vol. 1, cap. 28, Raven Press, Nueva York, pp. 1638-1709.
- 197.Silverman AJ, Witkin JW. (1994). Biosynthesis of gonadotropin-releasing hormone during the rat estrous cycle: a cellular analysis. *Neuroendocrinology*; **59**(6):545-551.
- 198.Sokolovsky M, Egozi Y, Avissar S. (1981). Molecular regulation of receptors: interaction of beta-estradiol and progesterone with the muscarinic system. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*; **78**(9):5554-5548.
- 199.Springer SP, Deutsh G. (1985). Cerebro izquierdo, cerebro derecho, Gedisa, Barcelona, pp.1-235.
- 200.Sullivan KA, Witkin JW, Ferin M, Silverman AJ. (1995). Gonadotropin-releasing hormone neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Research*; **685**:198-200.
- 201.Sumal KK, Blessing WW, Joh TH, Reis DJ, Pickel VM. (1983). Synaptic interaction of vagal afferents and catecholaminergic neurons in the rat nucleus tractus solitarius. *Brain Research*; **277**:31-40.
- 202.Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M. (1995). Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression during rat estrous cycle. *Endocrine Journal*; **42**(6):789-796.
- 203.Sykes RM, Spyer KM, Izzo PM. (1994). Central distribution of substance P, calcitonin gene-related peptide and

- 5-hydroxytryptamine in vagal sensory afferents in the rat dorsal medulla. *Neuroscience*; **59**:195-210.
204. Takechi I. (1988). Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. En: *Neuronal serotonin*. Editores: MN Osborne, M Hamon. John Wiley & Sons, Nueva York, pp25-56.
205. Tasaka K, Miyake A, Sakumoto T, Aono T. (1985). Dopamine decreases release of luteinizing hormone releasing hormone from superfused rat mediobasal hypothalamus. *Journal of Endocrinology Investigation*; **8**:373-376.
206. ThyagaRajan S, MohanKumar PS, Quadri SK. (1995). Cyclic changes in the release of norepinephrine and dopamine in the medial basal hypothalamus: effects of aging. *Brain Research*; **689**:122-128.
207. Tobet SA, Chickering TW, King JC, Stopa EG, Kim K, Kuo-Leblank V, Schwarting GA. (1996). Expression of gamma-aminobutyric acid and gonadotropin-releasing hormone during neuronal migration through the olfactory system. *Endocrinology*; **137**(12):5415-5420.
208. Ungerstedt V. (1971). Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica Supplement*; **367**: 1-48.
209. Valverde C. (1993). Comunicación intercelular o la armonía de la irregularidad. En: *Comunicación neuroendócrina*. Editores: C Clapp, G Martínez de la Escalera. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México DF, pp. 87-97.
210. Verney C, el Amraoui A, Zecevic N. (1996). Comigration of tyrosine hydroxylase- and gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the nasal area of human embryos. *Brain Research Development Brain Research*; **97**(2):251-259.
211. Vijayán E, McCann SM. (1978). Re-evaluation of the role of catecholamines in control of gonadotropin and prolactin release. *Neuroendocrinology*; **25**:150-165.
212. Vijayán E, McCann SM. (1980). Effect of blockade of dopaminergic receptors on acetylcholine (ACh)-induced alterations of plasma gonadotropin and prolactin (Prl) in conscious ovariectomized rats. *Brain Research Bulletin*; **5**(1):23-29.
213. Weiner R, Ganong W. (1978). Role of brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiology Review*; **58**:905-976.
214. Welschen R, Dullaart J, deJong FH. (1978). Interrelationship between circulating levels of estradiol 17 β , progesterone, FSH y LH immediately after unilateral ovariectomy in the cyclic rat *Biology of Reproduction*; **18**:421-427.
215. White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD. (1998). Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proceedures of the National Academy of Science of USA*; **95**(1):305-309.
216. Wilkinson M, Herdon H, Pearce M, Wilson C. (1979). Radioligand binding studies on hypothalamic noradrenergic receptors during the estrous cycle or after steroid injection in ovariectomized rats. *Brain Research*; **168**:652-655.
217. Wise PM, Rance N, Barraclough CA. (1981). Effects of estradiol and progesterone on catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic regions in ovariectomized rats. *Endocrinology*; **108**:2186-2193.
218. Witkin JW, Demasio KA. (1990). Ultrastructural differences between smooth and thorny GnRH neurons. *Neuroscience*; **34**:777-783.

219. Wray S, Hoffman C. (1986). Post-natal morphological changes in the rat LHRH neurons correlated with sexual maturity. *Neuroendocrinology*, **43**:93-97.
220. Xiong JJ, Karsch FJ, Lehman MN. (1997). Evidence for seasonal plasticity in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in synaptic inputs onto GnRH neurons. *Endocrinology*, **138** (3):1240-1250.
221. Xu M, Yamamoto T, Kato T. (1990). In vivo striatal dopamine release by M1 muscarinic receptors in induced activation of protein kinase C. *Journal of Neurochemistry*, **54**:1917-1919.
222. Yamamoto BK, Freed CR. (1982). The trained circling rat: a model for indexing unilateral caudate dopamine metabolism. *Nature*, **298**:467-468.
223. Yu WH, Karanth S, Walczewska A, Sower SA, McCann SM. (1997). A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, **94**(17):9499-9503.