



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA  
DE LA REPRODUCCIÓN

LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA, ESTUDIO DE  
LOS EFECTOS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES  
MUSCARÍNICOS  $M_1$  DEL OVARIO IZQUIERDO O  
DERECHO SOBRE LA OVULACIÓN ESPONTÁNEA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTAN

ALVARADO NAVARRO BLANCA ESTELA  
HERNÁNDEZ VÁZQUEZ GÉNESIS CHANTAL

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN



Financiada por CONACyT (Convenio 81898) y DGAPA-PAPIIT  
(IN-220014-3)

MÉXICO, D.F. a 17 de Junio del 2014.

# Agradecimientos Chantal

*A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi casa durante tantos años, por permitirme tener una formación profesional y proporcionarme tantos aprendizajes y enseñanzas de vida.*

*A todos los profesores por su tiempo y dedicación para conmigo, ¡¡muchísimas gracias!!*

*A mi directora de tesis, Dra. **María Esther Cruz Beltrán** muchas gracias por todo su apoyo, dedicación y dirección en esta tesis, por todas sus palabras de aliento y por motivarme a continuar trabajando a pesar de cualquier circunstancia. La quiero mucho.*

*A cada uno de los miembros del jurado:*

*M. en IBSH **Angélica Ramírez***

*Dr. **José Luis Morán Perales***

*Dra. **Leticia Morales Ledezma***

*Dra. **María Elena Ayala Escobar***

*Dra. **María Esther Cruz Beltrán***

*Gracias por dedicar su valioso tiempo en la revisión y corrección de este trabajo y por compartir sus conocimientos para enriquecerlo.*

*Al Dr. Román, la Dra. Adriana y todo el personal del bioterio de la FES Zaragoza por proporcionarnos los animales para este trabajo y por todo su cuidado a las ratitas.*

*A **Aidée** por todos tus consejos y tu paciencia, por ser mi amiga y estar conmigo*

*A **Marian** por motivarme a seguir y poner todo mi empeño al trabajar, por tu amistad y tu compañía dentro y fuera de la escuela*

***Melani** gracias por hacerme reír y hacerme sentir como en casa todo el tiempo, por todo lo que vivimos y seguiremos viviendo. ¡¡Te quiero!!*

***Reynoso** por ser mi confidente durante mi estancia en el laboratorio y por tu amistad*

*A **Karlita**, por ser la amiga más maravillosa del mundo por todos los momentos buenos y malos, por las risas y las lágrimas, por tu apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida y por los que nos faltan amiga. ¡¡Te quiero mucho!!*

# Dedicatorias Chantal

---

A mi mamita hermosa, por estar conmigo en todo momento, de forma incondicional y a pesar de todas las adversidades. Gracias por darme la vida y educarme, por estar a mi lado todos estos años y confiar en mí siempre. Esto no sería posible sin ti ¡Te amo mami!!

A mi papá, por su apoyo incondicional y por todo lo que significa en mi vida. Nada sería igual sin tu apoyo ¡Te amo papito!!

A mi abuelita Teresa, gracias por creer en mí y darme tus valiosos consejos durante momentos difíciles

A mi abuelito Jorge por cuidar de mí, confiar en mí y estar siempre pendiente de mi vida y de que este bien. Te quiero muchísimo

A mis hermanitas Mitzy, Yosse y Pia para quienes espero ser el ejemplo que necesitan, ellas siempre están enseñándome cosas nuevas y enorgulleciéndome ¡las amo!!

A Gibrán por su amor incondicional, por todos los momentos que ha estado tendiéndome su hombro para mi desahogo, por todas las risas y lágrimas que hemos pasado, pero sobre todo gracias por ser mi amigo durante estos años y por dedicarme tu tiempo y darme todo tu amor y comprensión. Gracias por permitirme y ser parte de mi vida  
**¡TE AMO AMOR!**

A Sofia y Margarita por darme su cariño y su consejo, y por permitirme ser parte de su hermosa familia

"la inteligencia sin ambición es un pájaro sin alas"

Salvador Dalí

"La ignorancia genera confianza más frecuentemente que el conocimiento. Son los que saben poco, y no los que saben más, quienes afirman tan positivamente que este o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia"

Charles Darwin.

# Dedicatorias Blanca Estela

---

*A mis hijos:*

*Melisa:*

*Muchas Gracias mi niña por llegar a mi vida y enseñarme a amar incondicionalmente, por impulsarme siempre a salir adelante y enseñarme que aunque tenga miedo tengo que enfrentar la vida como venga. Gracias por aceptar mis ausencias y por hacer de mi vida una vida loca. Tu eres esa pequeña guerrera que me motiva todos los días a ser fuerte y a no dejarme caer, te amo hija mía.*

*Julio:*

*Mi pequeño Gracias simplemente por existir, por llegar a voltear todo de cabeza y por hacer de la vida un gran reto, Gracias mi amor por hacerme ver mi suerte y por ponerle sal y pimienta a mi vida, sin ti todo sería tan simple te amo latoso.*

*A mi esposo Julio:*

*Gracias amor por todo el apoyo y el esmero que has puesto en mí y en esta relación, porque tú has sido una de las personas en las que me he apoyado y te agradezco por ser una de las pocas o tal vez la única persona que creyó en mí y confió que lo lograría. Quiero agradecer tu paciencia con mi mal humor y las palabras necesarias en el momento justo que las he necesitado. Gracias por despertarme cuando me quedaba dormida, por tu compañía y por prepararme mi cafecito en esas madrugadas y también por levantarme el ánimo cuando decía: ya no quiero seguir. Mil Gracias Te Amo.*

*A mi Tía Socorrito:*

*A usted mi viejita linda, le debo la vida, no existen palabras para agradecerle todo lo que ha hecho por mí. Gracias por protegerme y cuidarme, por la educación y los valores que me ha inculcado, por darme el cariño y el amor necesario y por estar en las buenas y en las malas junto a mí, por sacar la casta, no es fácil y ahora lo comprendo.*

*Usted ha sido la segunda madre para mis hijos y ha dejado muchas veces de lado su vida para salvar la mía y eso lo agradezco de todo corazón, que Dios la bendiga y la deje muchos años para pagarle solo un poco de lo que ha hecho por mi familia, usted es mi ángel. La Quiero Mucho.*

*A mis Hermanos:*

*Rafa:*

*Gracias manito por todo el apoyo que me has brindado y por la protección que desde niños me has dado. Eres mi ejemplo a seguir espero algún día ser tan buena como tú. Gracias por tu cariño para mí y para mis hijos, tus consejos y porque no tus regaños. Te Adoro hermano.*

*Irene:*

*A ti hermanita quiero agradecerte por estar a mi lado, por cuidarme y protegerme, por tu apoyo y por estar siempre en los momentos que te he necesitado, admiro esa fuerza y ese valor tan tuyo se salir adelante. Te Adoro negrita.*

*A mis padres:*

*Mamá:*

*Mamita quiero darte Gracias por darme la vida, que por razones ajenas a ti no puedes estar a mi lado, pero sé que desde el cielo me mandas bendiciones y estas orgullosa de este pequeño logro, Te Amo Madre y siempre vivirás en mi mente y en mi corazón.*

*Papá:*

*A ti papá de igual manera te agradezco haberme dado la vida y enseñarme la fortaleza que hay que sacar frente a la vida y que aunque mil veces te caigas, esas mil veces te puedes levantar, que mejor ejemplo de valor y fuerza que el que tú me has enseñado, te Adoro papi.*

*A mis suegros:*

*Doña Anita:*

*Muchas Gracias por su apoyo, por sus consejos y por sus palabras de aliento, por su cariño y su confianza. Agradezco todos esos bonitos momentos que pasamos juntas y esa confianza que tuvo siempre en mí. Ya no logró ser parte de este bonito momento de mi vida, pero desde el cielo sé que está orgullosa, le doy Gracias a la vida y a Dios por haberla cruzado en mi camino, usted fue como una madre para mí y espero haber cumplido con usted. La Quiero Mucho.*

*Don Maguito:*

*Usted también contribuyo, para que lograré terminar este trabajo, y no quiero dejar pasar el momento sin agradecer su apoyo tanto moral como muchas veces económico. Gracias también por su cariño y su confianza y por nunca dejarme morir sola, que Dios lo bendiga y le permita muchos años más estar con nosotros, Gracias por ser el abuelito modelo, lo quiero mucho.*

*A mi mejor amiga:*

*Martha:*

*Amiga te quiero dedicar muy en especial este trabajo y agradecerte ser parte de mi vida. Gracias amiga por ser mi cómplice, por brindarme tu amistad, por escucharme y por muchas veces limpiar mis lágrimas, por tus regaños y por decirme que si podía, que lo lograría. Te Quiero Mucho.*

*A mis amigos de generación:*

*Quiero agradecer especialmente a ese grupo de personas que pasaron a ser parte de mi vida durante mi estancia en la facultad: Martha, Sandra, José Luis, Leonardo, Carmelo, Irán, Olivio, Itzel, Cristóbal, Pau, Muñe, Alfredo, Edgar. Gracias amigos por su cariño y su amistad nunca los voy a olvidar.*

*A mi segunda familia:*

*A todos mis amigos del Labo 6: Sandunga gracias por las charlas, Alex gracias por tus consejos, Yady me costó cuando te fuiste gracias por esas platicas, Esteban gracias por tus enseñanzas y tu paciencia, Jessy, Kayro, Vero gracias por tu amistad y tu cariño, Laura, Sandra Lety, Adriana gracias por tu apoyo y por tus consejos, Raúl gracias por tus enseñanzas y por el pancito, Luis, Miguel, Gaby. Los quiero mucho a todos y les debo mucho, Gracias por hacer del laboratorio un hogar por hacer del trabajo algo satisfactorio junto a ustedes, me llevo un pedacito de cada uno en el corazón, les deseo mucha suerte y mucho éxito, ojala que el destino algún día nos vuelva a reunir tal vez como colegas, Dios los bendiga y les de salud y trabajo.*

*A la Dra. María Esther:*

*Dra. Lo único que le puedo decir es Gracias por todo, por su apoyo, por su infinita paciencia, por sus enseñanzas, por hacerme sentir en casa.*

*Gracias por contribuir con su conocimiento y tiempo para esta Tesis, no tengo como agradecer tanto apoyo. Es usted una excelente persona, muy humana y de buen corazón que Dios la bendiga.*

*A mi segundo hogar la UNAM:*

*Agradezco por dejarme permanecer en la facultad hasta haber concluido, por haberme forjado como estudiante y ahora como profesionalista, es este lugar pase los mejores años de mi vida al lado de personas extraordinarias compañeros y profesores me llevo lo mejor de todos y cada uno de ustedes.*

*"Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres, abandonarlo todo por miedo, no convertir en realidad tus sueños".*

*Pablo Neruda*

*"Un hombre solo tiene derecho de mirar a otro hacia abajo, cuando ha de ayudarlo levantarse".*

*Gabriel García Márquez*

# Índice

---

Resumen.....	i
Introducción.....	iii
<b>Marco teórico.....</b>	<b>1</b>
Estructura y función de los ovarios.....	1
Desarrollo folicular.....	3
Atresia folicular.....	6
Ovulación.....	7
Hormonas esteroides.....	8
Esteroidogénesis.....	9
Ciclo estral.....	12
GnRH.....	14
Gonadotropinas.....	15
Inhibina y activina.....	17
Acetilcolina (ACh).....	18
Pirenzepina (PZP).....	20
Asimetrías ováricas.....	21
<b>Justificación del proyecto e Hipótesis.....</b>	<b>22</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>23</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>23</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>25</b>
<b>Discusión de resultados.....</b>	<b>35</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>38</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>39</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>50</b>

# Resumen

---

El ovario es el órgano principal del sistema reproductor. En él se producen los gametos femeninos y se sintetizan las hormonas que participan en la regulación de las funciones reproductivas y del metabolismo en general. La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor sintetizado por células de la granulosa de folículos pre-ovulatorios de rata y humano, que actúa dentro de la glándula afectando funciones específicas. La ACh unida al receptor muscarínico (RM) es considerada una molécula de señalización intra-ovárica importante, ya que afecta la proliferación celular, inhibe la comunicación celular y estimula la transcripción del factor egr-1 (factor responsable del crecimiento temprano).

En muchas especies de vertebrados cada ovario (izquierdo o derecho) funciona de manera distinta o en otras sólo uno es funcional. Dado que en la rata adulta, las células de la granulosa de folículos antrales, pero no otras células, son inmuno-reactivas a la enzima colino-acetil-transferasa y en fracciones de membrana de ovarios de rata, humanos y primates se ha mostrado la presencia de RM del subtipo M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> es posible que la ACh a través de alguno de estos receptores regule la ovulación.

**Objetivo:** Por lo que el propósito de este estudio fue analizar los efectos del bloqueo de los RM<sub>1</sub> del ovario izquierdo o derecho, a las 13:00 h de las distintas fases del ciclo estral, sobre la ovulación espontánea o inducida de la rata hembra adulta.

**Materiales y método:** Se utilizaron ratas hembra adultas, cíclicas, de la cepa CIIZ-V, entre las 12:30 y 13:30 h de cada fase del ciclo estral, grupos de 8 animales al azar, fueron laparatomizados por vía dorso-lateral, se exteriorizó el ovario izquierdo o el derecho y se micro-inyectó con 0.5 µL de agua inyectable (vehículo) o con 19 ng de pirenzepina (PZP) (antagonista muscarínico del RM<sub>1</sub>) en los 0.5µL. Los volúmenes antes descritos fueron inyectados durante 30 segundos. Un grupo de animales sin tratamiento se utilizó como grupo control.

Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del estro esperado. Durante la necropsia se diseccionaron los ovarios y el útero para registrar su peso húmedo y los oviductos para cuantificar los ovocitos liberados. Otros grupos micro-inyectados con PZP que no ovularon, fueron inyectados con 3.7 µg de GnRH sintética a las 14:00 h del proestro (reemplazo de la señal hipotalámica), con 25 u.i. de gonadotropina coriónica humana (hCG, señal hipofisiaria) o con 10 µg de benzoato de estradiol a las 14:00 h del diestro-2 (BE, señal ovárica).

**Resultados del ovario izquierdo:** La anestesia (mezcla de Ketamina-Xilazina) aplicada entre las 12:00 y las 12:30 h del diestro-1 provocó el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales. Este efecto no fue modificado al micro-inyectar el vehículo o la PZP en el ovario izquierdo. En las otras fases del ciclo, ni la anestesia ni el vehículo modificaron el porcentaje de animales ovulantes (%AO) en el día del estro esperado. El tratamiento con PZP en diestro-2, proestro y estro bloqueó la ovulación en el 75, 87.5 y 50% de los animales respectivamente. En los animales micro-inyectados con el vehículo o PZP que ovularon, el número de ovocitos liberados fue semejante al de los intactos.

La micro-inyección del vehículo a las 13:00 h del diestro-2 o del proestro provocó disminución del peso del ovario tratado. Mientras que cuando los animales fueron tratados en el día del estro, el peso de

ambos ovarios disminuyó. El peso del útero disminuyó únicamente en los animales micro-inyectados con PZP en el día del proestro.

El reemplazo de las señales endocrinas a grupos de ratas con bloqueo de los  $RM_1$  del ovario izquierdo (diestro-1, diestro-2, proestro y estro) indujeron la ovulación en el día del estro esperado.

*Resultados del ovario derecho:* La micro-inyección del vehículo en el ovario derecho, entre las 12:30 y 13:30 h del diestro-1, diestro-2, proestro o estro no provocó modificaciones en el porcentaje de animales ovulantes (%AO). En cambio, el tratamiento con PZP en diestro-1 o diestro-2 bloqueó la ovulación en el 100% de los animales. En los animales micro-inyectados con el vehículo o PZP el número de ovocitos liberados resultó semejante al porcentaje de animales ovulantes (%AO). La micro-inyección del vehículo a las 13:00 h del diestro-1 o diestro-2 provocó la disminución del peso del ovario tratado, efecto que no se modificó con la administración de PZP. La micro-inyección del vehículo a las 13:00 h del diestro-1 o diestro-2, provocó el aumento del peso del útero. En cambio La micro-inyección de PZP en diestro-2, resultó en la disminución del peso de este órgano.

El reemplazo de cada una de las señales endocrinas estimuló la ovulación en los animales que no ovularon por el bloqueo de los  $RM_1$ .

*Conclusiones:* La ACh unida a los  $RM_1$  del ovario izquierdo o del ovario derecho, en las etapas de diestro1, diestro-2 y proestro regula de manera estimulante la ovulación de ambos ovarios.

El papel estimulante de la ACh sobre la ovulación, al unirse a los  $RM_1$  estimula la secreción preovulatoria de la GnRH y de la LH del día del proestro.

En el día del diestro-2, la ACh unida a los  $RM_1$  del ovario izquierdo no altera la secreción de estradiol, sino que interfiere con el efecto de retrocontrol estimulante de los estrógenos en la secreción de GnRH. En cambio, la ACh unida a los  $RM_1$  del ovario derecho regula la secreción de estradiol.

# Introducción

---

En el ovario, las células de la granulosa de los folículos ováricos no están en contacto con las fibras nerviosas que llegan al órgano. Sin embargo, se ha demostrado que las células de la granulosa de folículos preovulatorios sintetizan acetilcolina (ACh) (Fritz y col., 2001; Mayerhofer y col., 2005), la enzima colino-acetil-transferasa (CAT) y el transportador vesicular de la ACh (Fritz y col., 1999).

En la rata adulta, las células de la granulosa de folículos antrales son inmuno-reactivas a la CAT (ir-CAT); lo que indica que en estos folículos son ellas la fuente de ACh. En fracciones de membrana de ovarios de humano y primates se ha mostrado la presencia de receptores muscarínicos del subtipo M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> (Batra y col., 1993). Por medio de RT-PCR e inmuno-histoquímica se mostró que el RM<sub>3</sub> se expresa en el ovocito, mientras que los genes para el RM<sub>1</sub> y RM<sub>5</sub> son expresados en las células de la granulosa (Fritz y col., 1999, 2001). Lo que sugiere que la ACh producida por estas células foliculares pueden actuar en formas autócrinas y parácrinas dentro del ovario sobre los ovocitos, las células de la granulosa, las luteales o todas a la vez (Fritz y col., 2001).

Por medio de RM<sub>1</sub>, la ACh estimula la proliferación de las células de la granulosa y en células de la granulosa luteinizadas, estos receptores estimulan la formación de nexos (Fritz y col., 2002).

Con base en esta información, se decidió analizar los efectos del bloqueo de los RM<sub>1</sub> del ovario izquierdo o derecho a las 13:00 h de cada día del ciclo estral sobre la ovulación, el peso de los ovarios y del útero.

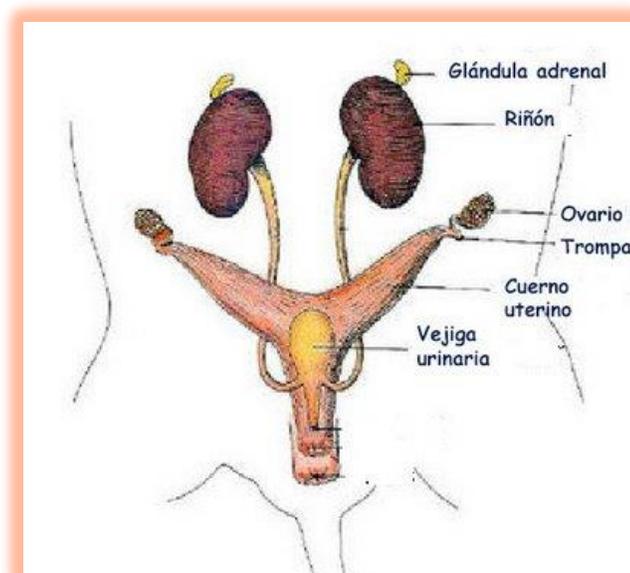
Para establecer que mecanismos endocrinos se encuentran involucrados en los efectos de los RM<sub>1</sub> de uno u otro ovario sobre la ovulación provocado por la micro-inyección de PZP a las 13:00 h en cada día del ciclo estral, se decidió reemplazar las señales hipotalámica (por la inyección de LHRH sintética), la señal hipofisaria (mediante la inyección de la gonadotropina Corionica Humana o hCG) y la ovárica (mediante la inyección de Benzoato de Estradiol).

# Marco teórico

---

## *Estructura y función de los ovarios*

El ovario es el órgano principal del sistema reproductor. En él se producen los gametos femeninos y se sintetizan las hormonas que participan en la regulación de las funciones reproductivas y del metabolismo en general (Fawcett, 1995; Yao y Bahr, 1998). La mayoría de los vertebrados desarrollan dos ovarios, sin embargo existen especies como las aves, reptiles y algunos mamíferos que solo desarrollan una gónada (Yao y Bahr, 1999). Los ovarios se ubican en relación con la pared lateral de la pelvis, a cada lado del útero, y están suspendidos por un pliegue del peritoneo y por el ligamento suspensorio (Bergman y col., 1998) (Figura 1). Las funciones de los ovarios son liberar ovocitos que puedan ser fecundados (ovulación) y secretar hormonas que estimulen el crecimiento y diferenciación del folículo y de los órganos del sistema reproductor (Yao y Bahr, 1999).



**Figura 1.** Estructura del sistema reproductor de los mamíferos (Tomada de: <http://anatobioterio.blogspot.mx/>)

Las funciones reproductiva y endocrina del ovario, aunque independientes están relacionadas entre sí. La función reproductiva garantiza la producción de ovocitos sanos en el momento de máxima probabilidad de ser fecundados, y la endocrina regula la función del eje hipotálamo-hipófisis, que a su vez es fundamental en la regulación de la función ovárica y la determinación de las características sexuales tanto, por sus acciones en los tejidos periféricos

(útero, mamas) como por sus acciones en el sistema nervioso central (SNC) (Tresguerres y col., 1999).

Histológicamente en el ovario se distinguen tres zonas: la medula, la corteza y el hiliium.

- La medula: se localiza en el interior del ovario y contiene tejido conjuntivo laxo, vasos linfáticos, fibras nerviosas y vasos sanguíneos (Yao y Bahr, 1999).
- La corteza: se encuentra en la pared periférica del ovario, por lo tanto se encuentra revestida por el epitelio germinal (Berne y Levy, 2001).
- El hiliium: es la zona por donde penetran al ovario fibras nerviosas, vasos linfáticos, la arteria y la vena ovárica.

En muchas especies de mamíferos, el ovario se encuentra recubierto por una delgada membrana peritoneal denominada bursa ovárica, que estructuralmente está conformada por tres capas (Martin y col., 1981). **1) Interna.** Es un epitelio discontinuo, orientado hacia el ovario, **2) Media.** Capa de tejido conjuntivo que contiene fibroblastos, células del músculo liso y vasos sanguíneos. **3) Externa.** Epitelio continuo que se encuentra en contacto con la cavidad peritoneal.

La cavidad que se forma entre el ovario y la bursa se denomina cavidad bursal (Li y col., 2007). Por medio del uso de trazadores, como el azul de Evans y el lantano, se demostró que la bursa impide el intercambio de moléculas entre la cavidad peritoneal y ella, y que haces de células musculares lisas dentro de la bursa, regulan el volumen y la presión del fluido dentro de la cavidad de la bursa, es decir, solo permite el intercambio de sustancias entre la cavidad bursal y los vasos sanguíneos que se encuentran dentro de ella (Martin y col., 1981).

En los roedores, la bursa del ovario participa en el paso de los ovocitos hacia el oviduto. Según Vanderhyden y colaboradores (1986), la remoción de la bursa ovárica resulta en un menor número de ovocitos observados en el oviducto. Los fluidos en la cavidad bursal tienen un bajo contenido proteico, que proveen a los ovocitos un microambiente adecuado durante su tránsito hacia el oviducto (Shalgí y col., 1977).

El folículo ovárico es la unidad anatómico-funcional del ovario, a partir del cual se originan: el compartimiento lúteal y el intersticial; sus funciones principales son liberar al ovocito capaz de ser fecundado y secretar las hormonas que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor (Domínguez y col., 1991).

- *Compartimiento folicular:* está formado por los folículos, en diferentes etapas de desarrollo y crecimiento, como son los primordiales, los primarios, los secundarios, y los pre-ovulatorios (Ross y col., 1997; Domínguez y col., 1991).

- *Compartimiento lúteal*: se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que expulsan al ovocito (Espey, 1999; Ross y col., 1997).
- *Compartimiento intersticial*: incluye tanto las células teco-intersticiales de los folículos en crecimiento y las células de la teca de los folículos atrésicos; representa la unidad endocrina productora de andrógenos (Sánchez-Criado, 2003; Yao y Bahr, 1999).

### Desarrollo folicular

El desarrollo folicular es el resultado de la acción combinada de gonadotropinas como la Hormona Folículo Estimulante (FSH), la Hormona Luteinizante (LH) y los esteroides ováricos sobre las células de la granulosa y tecales de los folículos (Tresguerres y col., 1999).

El folículo en general está formado por un ovocito I, una membrana basal que aísla a las células de la granulosa del resto de los componentes del ovario, y las células de la teca; estas últimas conforman la teca interna (Domínguez y col., 1991).

Además de las células de la granulosa y las de la teca interna, el folículo se encuentra rodeado de células de tejido conectivo y fibras musculares lisas que reciben el nombre de teca externa (Berne y Levy, 2001; Domínguez y col., 1991).

La formación y el crecimiento de los folículos primordiales es un evento independiente de las gonadotropinas (LH y FSH) (Domínguez y col., 1991; Van Voorhis, 1999a; Berne y Levy, 2006). A partir del estadio de folículo primario, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario inicia su participación en el proceso de maduración folicular (Van Voorhis, 1999a).

En las células de la granulosa de folículos en crecimiento, la FSH estimula la proliferación celular y el aumento del tamaño del folículo, así como la síntesis de sus propios receptores y de los receptores a LH. En tales eventos, los estrógenos actúan de manera sinérgica con la FSH. Asimismo, la FSH incrementa la actividad de la aromatasa, enzima que transforma la testosterona en estradiol. En las células de la granulosa, el estradiol aumenta la expresión de sus receptores. La LH estimula la diferenciación final del folículo pre-ovulatorio e induce la ovulación (Domínguez y col., 1991; Yao y Bahr, 1999; Carlson, 2009).

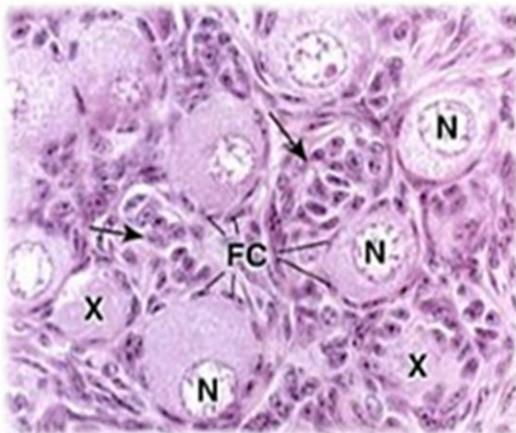
Las células de la granulosa del folículo ovárico sintetizan activina e inhibina, hormonas gluco-proteicas que participan en la regulación del desarrollo folicular (Carlson, 2009). La activina ejerce un efecto doble: actúa sobre los gonadotropos en la adenohipófisis, donde estimula la secreción de la FSH, y de forma autócrina, estimula la proliferación mitótica de las células de la granulosa (Van Voorhis, 1999a; Carlson, 2009). La inhibina en la adenohipófisis modula de manera inhibitoria la secreción de FSH (Sánchez Criado, 1999; Van Voorhis, 1999a; Carlson, 2009).

En la rata el crecimiento del folículo dura alrededor de 19 días desde que sale del estado de reposo hasta que culmina con la ovulación. Esto indica que durante la vida del folículo en crecimiento, este se ve expuesto al menos a cuatro aumentos bruscos en la concentración plasmática de LH previo a la ovulación (“pico” preovulatorio de LH), de tal forma que después de cuatro ciclos estrales ocurre la ovulación (Domínguez y col., 1991).

Con base en su organización estructural, se pueden definir las siguientes fases del desarrollo folicular:

**Folículo primordial:** Son los más numerosos y constituyen la reserva de folículos en reposo. Son esféricos, con un diámetro de 20 a 30  $\mu\text{m}$  con un núcleo vesicular grande rodeado de una capa de células epiteliales planas y de la membrana basal (Domínguez y col., 1991; Bergman y col., 1998). Están conformados por un ovocito I que se origina a partir de las células germinales primordiales. Estas células son de origen extra-gonadal y durante su migración desde el epiblasto al ovario, comienzan una fase de proliferación mitótica, momento en el que reciben el nombre de ovogonias (Carlson, 2009). Al nacimiento la mayoría de las ovogonias de los mamíferos han iniciado la primera división meiótica que progresa hasta la etapa del diploteno (dictioteno en roedores) de la profase I. Las ovogonias que han iniciado la meiosis se denominan entonces, ovocitos I (Baker, 1982; Domínguez y col., 1991; Lorenzo, 1992; Carlson, 2009).

Alrededor del ovocito se encuentra una capa de células aplanadas, llamadas pregranulosas (Guyton, 1986; Greenwald y Roy, 1994). Aquellos ovocitos que no son rodeados y aislados por las células pregranulosas son destinados a la muerte y eliminados (Domínguez y col., 1991; Picton y Gosden, 1999) (Figura 2).

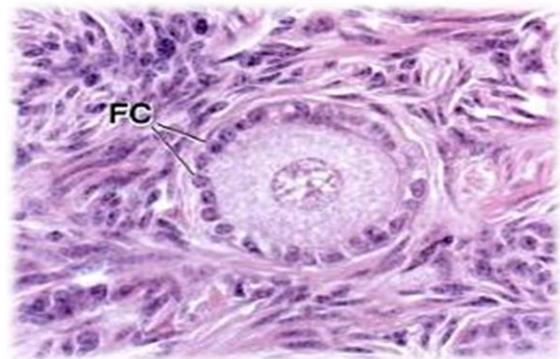


**Figura 2.** Microfotografía de folículos primordiales donde se ven los ovocitos rodeados por una capa simple de células foliculares aplanadas (FC). El núcleo del ovocito (N) suele tener una posición excéntrica. En la fotografía se señalan dos ovocitos en los que el núcleo no ha quedado incluido en el plano del córtex (X), de modo similar, se indican dos folículos que se cortaron tangencialmente y por eso solo se ven las células foliculares y no el ovocito, que ha quedado en otro plano (flechas). 640x. Tomada de Ross y Wojciech, 2008.

Los folículos presentan una lámina basal que durante el desarrollo folicular se hace más prominente y recibe el nombre de membrana basal. Dicha membrana rodea al estrato

granuloso y al ovocito y lo separa del compartimiento tecal y de los vasos sanguíneos (Greenwald y Roy, 1994; Berne y Levy, 2006); también actúa como una barra semipermeable a través de la cual difunden oxígeno, nutrientes y precursores esteroides (Domínguez y col., 1991; Oliver y col., 1999).

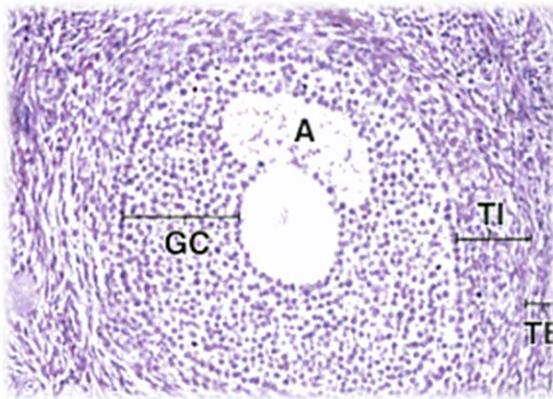
**Folículo primario:** el primer indicio de que los folículos primordiales han iniciado su proceso de crecimiento, es el aumento en el tamaño del ovocito (Goldfien y Monroe, 2000). El ovocito adquiere un tamaño mayor, que es de 100 a 150  $\mu\text{m}$ , lo que es seguido por la formación de la llamada membrana pelúcida (lamina homogénea acidófila y retráctil) y aparece rodeado de dos o más capas de células foliculares o epiteliales que tienen una forma cilíndrica y que ahora reciben el nombre de células de la granulosa (Domínguez y col., 1991; Fawcett, 1995; Goldfien y Monroe, 1998; Van Voohris, 1999) (Figura 3).



**Figura 3.** Microfotografía de un folículo primario. Este tipo de folículo se encuentra rodeado por las células foliculares o de la granulosa (FC). 640x Tomado de: Ross y Wojciech, 2008

**Folículo secundario:** la proliferación de la capa de células de la granulosa resulta en el aumento del diámetro del folículo, cuya medida promedio es de 260  $\mu\text{m}$ . Cuando la capa de células de la granulosa alcanza un espesor de entre 6 y 12 estratos celulares, aparecen espacios entre las células de la granulosa, llenos de líquido folicular que son llamados cuerpos de Call-Exner. Las células de la teca proliferan y se diferencian en dos capas, la interna, cuyas células cuboides reciben suministro sanguíneo y nervioso; y la teca externa, conformada por tejido conectivo, que contiene abundantes fibras de colágeno y fibras musculares lisas, que son importantes en la función contráctil (Domínguez y col., 1991; Yao y Bahr, 1999; Oliver y col., 1999) (Figura 4).

Conforme el líquido folicular continua acumulándose entre las células de la granulosa, los espacios se unen y forman un espacio llamado antro folicular, como resultado de esto el ovocito se coloca en una posición excéntrica, rodeado de células de la granulosa, estructura llamada *cumulus oophorus* (Domínguez y col., 1991; Ross y col., 2005).



**Figura 4.** Microfotografía de un folículo secundario. Dentro de la capa de células de la granulosa (GC) es visible el antro (A) lleno de líquido folicular. Por fuera de la lámina basal del folículo secundario pueden verse múltiples estratos de células de la teca interna (TI) y de la teca externa (TE). 85x. Tomada de Ross y Wojciech, 2008.

**Folículo pre-ovulatorio:** en la mujer, este folículo también es conocido como folículo de Graaf, el cual está constituido por el ovocito que alcanza su tamaño máximo, un antro desarrollado completamente y lleno de líquido folicular, y varias capas de células de la granulosa, así como la corona radiada que proporciona numerosos nutrientes y factores que son necesarios para el mantenimiento del ovocito. Los vasos sanguíneos al igual que los nervios solo llegan a la teca interna, ya que no penetran a la granulosa (Hirshfield, 1997). Algunas de las fibras nerviosas terminan en el músculo liso presente en la teca externa y estos nervios regulan la contractibilidad de las mismas, lo que influye en el mecanismo de la ovulación. En el ovario de la rata los folículos llegan a este estadio de desarrollo entre 17 y 19 días después de haber iniciado el crecimiento (Domínguez y col., 1991; Yao y Bahr, 1999).

Al terminar la fase folicular del ciclo ovárico ocurre la ovulación, se da inicio a la fase luteínica, las células de la granulosa y tecales del folículo roto cambian y se luteinizan, dando lugar a la formación del cuerpo lúteo, el cual produce predominantemente progesterona (P4) y estrógenos. El número de cuerpos lúteos dependerá del número de óvulos liberados (Sánchez-Criado, 1999).

### *Atresia folicular*

La atresia folicular es la degeneración de los folículos que no ovulan dentro del ovario, proceso que se presenta en cualquier etapa de desarrollo folicular. Las células de la granulosa pierden gradualmente los receptores a FSH y a LH, disminuyendo la capacidad de aromatización de los andrógenos, por lo que su concentración aumenta dentro del folículo (Domínguez y col., 1991; Wong y Adashi, 1998).

Aun no se han identificado las principales causas que inducen la atresia folicular. Hsueh y colaboradores (1994) sugieren que los factores que determinan este proceso son: deficiencias inherentes al ovocito (rompimiento de la vesícula germinal y alteración de la zona pelúcida) o a las células de la granulosa (disminución en la síntesis de estrógenos, incremento en la

producción de progesterona ( $P_4$ ) y disminución en el número de receptores a gonadotropinas); exposición de los folículos a factores inductores de la atresia (atretogénicos), entre los que se encuentran los andrógenos, GnRH-like, interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Kapia y Hsueh, 1997).

Los folículos atrésicos secretan una gran cantidad de androstenediona y disminuye la actividad de las aromatasas, por lo que la síntesis de estradiol ( $E_2$ ) es menor (Hsueh y col., 1994; Van Voorhis, 1999).

## Ovulación

La ovulación es la culminación del crecimiento y la diferenciación folicular. En la mayoría de los mamíferos, en el momento de la ovulación se libera uno o varios ovocitos secundarios, capaces de ser fecundados (Domínguez y col, 1991). Tanto la ovulación como el crecimiento y la diferenciación folicular están regulados por un complejo sistema de señales endocrinas, parácrinas y nerviosas (Espey, 1994).

La liberación del ovocito se produce una vez que éste ha alcanzado el tamaño y el grado de diferenciación adecuado, según la especie en estudio. La ovulación es considerada como el resultado de un proceso inflamatorio localizado, ya que antes que se produzca la salida del ovocito hay edema en la teca interna, muerte celular y aumento de las prostaglandinas  $E_2$  y  $F_2\alpha$  en esa zona (Domínguez y col., 1991).

Durante la ovulación el folículo preovulatorio se rompe y libera al ovocito secundario, detenido en metafase II (Bergman y col., 1998). El ovocito atraviesa la pared folicular y el epitelio superficial del ovario.

El resultado final de estos cambios es el crecimiento, la maduración y la liberación de los ovocitos fértiles, así como la manifestación de la conducta sexual que asegura la máxima receptividad de la hembra durante la etapa ovulatoria. Esta conducta rítmica que presentan las hembras se denomina ciclo reproductivo, el que según la duración del mismo se definen como estral, menstrual, etapa de celo (Mandl y col., 1963).

En la madurez sexual, la hembra comienza sus ciclos sexuales, resultado de la interacción rítmica entre el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios. El ciclo se inicia cuando el hipotálamo comienza a secretar la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) al sistema porta hipotalámico-hipofisiario, donde viaja a la hipófisis anterior y estimula a los gonadotropos a que secreten FSH y LH. Bajo la influencia de estas dos gonadotropinas, los folículos primordiales empiezan a crecer. Conforme el folículo crece, comienza a secretar estrógenos y andrógenos. El  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) promueve la expresión de receptores a gonadotropinas en las membranas

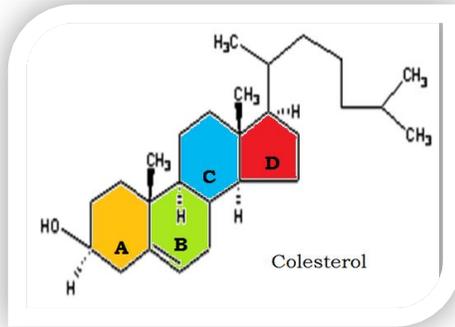
plasmáticas de las células foliculares. Se dice que un folículo es maduro cuando está dotado de una adecuada población de receptores que responden a la LH y a FSH. En este momento la elevada concentración de  $E_2$  circulante induce el incremento en la secreción de GnRH, y esto causa el aumento en la secreción de FSH y LH. Este incremento en las gonadotropinas inicia el proceso ovulatorio. Durante las siguientes horas la secreción de andrógenos y estrógenos es remplazada por un marcado incremento en la síntesis de  $P_4$  ovárica. El aumento en esta progestina indica el inicio de luteinización del folículo ovárico. Además la elevación de la  $P_4$  circulante inhibe la secreción de GnRH, LH y FSH. En el eje hipotálamo-hipófisis-ovario comienzan a secretarse estas hormonas otra vez, para comenzar el próximo ciclo sexual, solo después que empieza a deteriorarse el cuerpo lúteo (luteólisis) y la secreción de  $P_4$  disminuye (Knobil, 1999).

### *Hormonas esteroideas*

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son principalmente  $E_2$  y  $P_4$ , aunque también se produce estrona, androstenediona, testosterona,  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroideas, como inhibina, relaxina, activina, folistatina y algunos factores de crecimiento locales (Tresguerres, 1999).

Los estrógenos ejercen acciones directas sobre las células de la granulosa y el ovocito y otros difunden a la circulación general. La síntesis de los estrógenos es regulada por varias hormonas y neuro-hormonas, cada una de las cuales estimulan o inhibe algunos pasos específicos de la biosíntesis en la célula teco-intersticial, en la célula de la granulosa o en ambas (Domínguez y col., 1991).

La estructura química del núcleo básico del colesterol es el ciclopentanoperhidrofenantreno o "núcleo esteroide" (Figura 5), el cual está constituido por 27 átomos de carbono, dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono (ciclobencénicos) denominados A, B, C, y un anillo de cinco átomos (ciclopentano) denominado D, una cadena lateral de seis carbonos en el carbono 17, dos metilos en posición 10 y 13, un doble enlace  $\Delta 5$  y un grupo hidroxilo en el carbono 3 (O'Malley y Strott, 2001).



**Figura 5.** Estructura química del colesterol en la que se representa el “núcleo esteroideo” (en colores).

### Esteroidogénesis

Las hormonas esteroideas son derivadas del colesterol (**Figura 5**), el que proviene del sintetizado en la célula a partir del acetato, o de los depósitos de ésteres de colesterol que se encuentran en las vacuolas lipídicas intracelulares o a partir de la captación de lipoproteínas de baja densidad, que son ricas en colesterol. La reacción inicial de la esteroidogénesis es la conversión de colesterol a pregnenolona. La esteroidogénesis incluye la formación de más de 40 esteroides derivados del ciclopentano-perhidrofenantreno pero son sólo unos pocos los que tienen mayor importancia fisiológica. En todas estas transformaciones actúa el citocromo P<sub>450</sub>, y la reacción inicial (colesterol a pregnenolona) se realiza en la mitocondria gracias a la acción de una enzima de la membrana interna que se llama CYP11A1. En los pasos posteriores juegan un papel activador importante hormonas tróficas como la Hormona Corticotrópica (ACTH), que actúa en la corteza de la glándula adrenal; la FSH y la LH que modulan las funciones de las gónadas y la angiotensina II que actúa en el glomérulo renal para dar como resultado el esteroide final (Jácome, 2005).

En la mitocondria de las células foliculares, ocurre el proceso de esteroidogénesis por medio de la cooperación entre las células de la teca interna y las de la granulosa del folículo ovárico. Cuando la LH se une a su receptor, en las células de la teca interna, se activa la formación de adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosintrifosfato (ATP) lo cual desencadena una vía de señalización y la internalización de la pregnenolona a la membrana interna de la mitocondria, donde se transforma en progesterona, posteriormente en 17-hidroxiprogesterona, luego en androstenediona y después en testosterona; estas dos últimas atraviesan la membrana basal a las células de la granulosa; donde la FSH tiene su receptor que desencadena una vía de señalización por medio del AMPc que promueve la activación de la enzima aromatasa que transforma la testosterona en E<sub>2</sub>. La androstenediona por otro lado se transforma a estrona y después en estradiol por medio de la enzima 17β-hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (17β-HSD). Una vez sintetizada la pregnenolona, su metabolismo puede seguir dos vías alternas. En la primera vía, denominada Δ<sub>4</sub>, la pregnenolona es convertida a

progesterona por actividad de la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) localizada en el retículo endoplásmico liso de las células tecaes, granulosa y luteales. Por lo general esta ruta se realiza en el cuerpo lúteo (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999b; Sánchez-Criado, 1999).

La segunda ruta metabólica de la pregnenolona, nombrada vía  $\Delta 5$ , es utilizada en su mayoría por las células de la teca, y se lleva a cabo dentro del retículo endoplásmico liso. En esta ruta, las enzimas  $17\alpha$ -hidroxilasa y la  $17, 20$  liasa convierten la pregnenolona a dehidroepiandrosterona (DHEA), que por actividad de la  $3\beta$ -HSD, será transformada posteriormente en androstenediona. Por último, la  $17\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) interviene en la conversión de la androstenediona a testosterona (**Figura 6**) (Pedernera, 1993; Van Voorhis, 1999b).

Una vez que los andrógenos son sintetizados por las células de la teca interna, difunden a través de la membrana basal y son captados por las células de la granulosa, donde ingresan al retículo endoplásmico liso y por acción de las aromatasas son convertidos en estrógenos. Posteriormente son vertidos al torrente sanguíneo de la vena ovárica al líquido folicular (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Van Voorhis, 1999b; Sánchez-Criado, 1999).

En la mujer, el folículo dominante posee un gran número de células de la granulosa, de ahí su capacidad de secretar cerca del 90% del estradiol circulante (Van Voorhis, 1999b). En la rata, la síntesis de hormonas esteroides depende de la capacidad de biosíntesis de cada ovario, donde el ovario izquierdo secreta más cantidad de progesterona (Flores y col., 2005), testosterona (Flores y col., 2006) y estradiol (Cruz y col., 2006) que el ovario derecho. Durante el ciclo estral son las glándulas adrenales la principal fuente de progesterona, excepto en la etapa del diestro-1, donde su síntesis proviene principalmente del cuerpo lúteo (Flores y col., 2008).

Las hormonas esteroides que sintetiza el ovario ejercen diversos efectos tróficos sobre sus órganos o tejidos blanco (Sánchez-Criado, 1999). En la vagina causan cambios cíclicos en su citología (Feder, 1981; Sánchez-Criado, 1999; Kilen y Schwartz, 1999). Así el aumento en la concentración de estradiol que se presenta de la mañana al medio día del proestro se acompaña, aunque no de manera inmediata, de la presencia de células epiteliales escamosas. En ratas ovariectomizadas se ha observado que la administración de  $17\beta$ -estradiol induce cornificación vaginal evento que parece requerir entre 48 y 72 horas para que el epitelio vaginal proliferare y se presenten células escamosas (Feder, 1981).

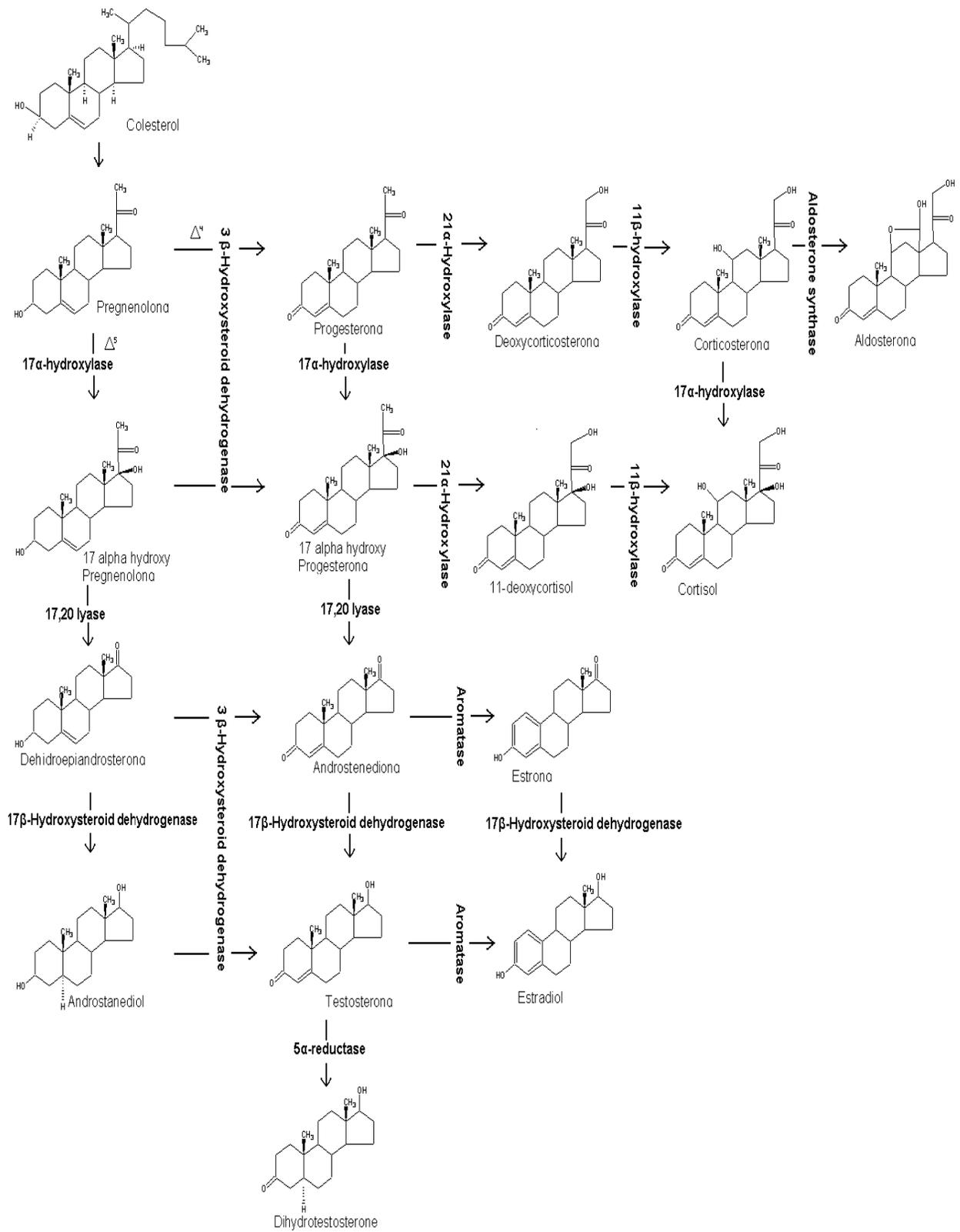
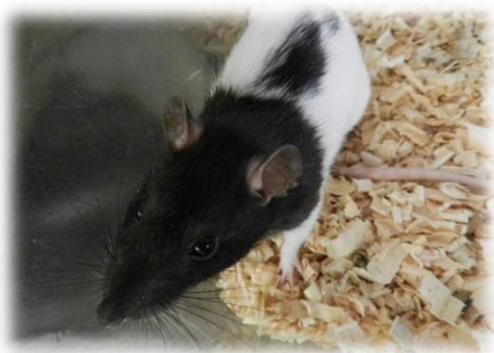


Figura 6. Principales vías biosintética de los esteroides ováricos. (Modificado de Sánchez-Criado, 2003).

## Ciclo estral

Las hembras de los mamíferos tienen ciclos reproductivos que pueden ser catalogados como menstruales o estrales. El ciclo estral se define como el tiempo que transcurre entre el inicio de un periodo de celo y el inicio del siguiente (Freeman, 2006).

En los roedores el ciclo estral implica una cascada de eventos conductuales y hormonales progresivos, sincronizados y repetitivos (Domínguez y col., 1991). El término estral se deriva de la palabra en latín “oistros” que significa frenesí y que corresponde a la etapa en la que la hembra acepta sexualmente al macho (Klein y Schwartz, 1998). Durante el ciclo estral ocurren diferentes interrelaciones de señales que provienen del medio ambiente, el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios y de los órganos sexuales accesorios que están bajo la regulación del sistema nervioso central (SNC) (Knobil, 1980).



**Figura 7.** Fotografía de la rata de la cepa CIIZ-V utilizada en esta tesis.

En la rata (Figura 7), se han descrito diferentes etapas del ciclo estral, el cual se ha dividido para su estudio en cuatro fases: proestro, estro, diestro-1 (que en algunos documentos es referido como Metaestro) y diestro-2. Según Freeman (2006), el proestro se caracteriza por ser el día en el que la rata entra en “calor” o celo. La siguiente etapa es el estro, durante la madrugada de esta etapa ocurre la ovulación, si después de ésta, no sucede la fertilización del ovocito, inicia la fase del diestro-1. La siguiente etapa es el diestro-2, cuya duración puede variar en diferentes especies. Durante el diestro-2, el ovario secreta diferentes hormonas que tienen la función de regular la secreción de la GnRH, la LH y la FSH, la de mayor importancia es el  $E_2$ , que en esta tesis denominaremos como “señal ovárica”.

La rata es un animal policíclico, es decir, que tiene varios ciclos estrales durante todo el año, cuya duración promedio es de 4 a 5 días. El análisis de la duración de las diferentes etapas del ciclo estral está basado en el monitoreo diario del frotis vaginal. Según Freeman (2006), el proestro tiene una duración de 12 a 14 horas, el estro de 25 a 27 horas, el diestro-1 de 6 a 8 horas y el diestro-2 de 55 a 57 horas.

El tipo y la cantidad de células del epitelio vaginal que se observan bajo el microscopio de luz en el frotis de este epitelio, indican la etapa del ciclo estral en el que se encuentra la rata: en

el día del proestro, las células epiteliales que predominan son células redondas nucleadas que aparecen en grupos. Ocasionalmente, algunas células epiteliales escamadas suelen estar presentes en el frotis. En el día del estro, las células epiteliales predominantes son las escamadas (en las que no se aprecia la presencia del núcleo, contienen una gran cantidad de citoplasma granular y son de forma irregular). Durante el diestro-1, las células predominantes son los leucocitos, pero se pueden observar ocasionalmente algunas células epiteliales nucleadas. Los leucocitos son pequeños con citoplasma granular y usualmente contienen un núcleo vesicular. En el diestro-2, se observan leucocitos y células nucleadas en menor número que en cualquiera de las etapas anteriores (**Figura 8**).



**Figura 8.** Muestras del epitelio vaginal en los diferentes días o etapas del ciclo estral de la rata. En el proestro podemos observar células epiteliales nucleadas. En el estro se ven solamente células escamadas y sin núcleo. Para el diestro-1 hay un gran número de leucocitos y ocasionalmente células epiteliales nucleadas. El diestro-2 tiene una menor cantidad de células nucleares y leucocitos.

Desde el punto de vista endocrino, en la etapa del proestro existe un “periodo crítico” durante el cual se puede inhibir la secreción preovulatoria de la LH y de la FSH. Durante este intervalo de tiempo, se libera de manera masiva LH y FSH desde la hipófisis, evento que induce la ovulación. El momento en el que este fenómeno ocurre puede ser alterado al modificar los periodos de luz- oscuridad, la ingesta de alimento, el estrés, la temperatura ambiental, entre otros ([Freeman, 2006](#)). También durante esta fase ocurre la secreción masiva o preovulatoria de  $E_2$ , la cual estimula la secreción de GnRH, secretada por neuronas localizadas en la parte anterior y media del hipotálamo, que constituyen la “señal hipotalámica”. A su vez, la GnRH estimula la secreción fásica o preovulatoria de LH y FSH, que denominaremos “señal hipofisaria”. Ambas hormonas junto con la prolactina son conocidas como gonadotropinas ([Freeman, 2006](#)).

En la mañana del estro ocurre un segundo incremento en la concentración de FSH, que al parecer participa en el reclutamiento de los folículos ováricos que ovularan en el siguiente ciclo ([Freeman, 2006](#)).

## GnRH

La GnRH es un péptido constituido por diez residuos de aminoácidos (Matsuo y col., 1971). Su estructura primaria es:



Este decapeptido es sintetizado por neuronas del área preóptica y del hipotálamo medio y liberado a la eminencia media, donde pasa a la sangre del sistema porta-hipotalámico-hipofisario. Una vez en los gonadotropos, induce la síntesis de FSH y LH. Su acción se logra mediante su unión a receptores específicos de alta afinidad, localizados sobre las membranas plasmáticas de estas células hipofisarias (Charly y col., 1990; Silverman y col., 1994).

En el hipotálamo se localizan las neuronas que secretan GnRH, denominadas GnRHérgicas; se ubican en el área preóptica, los núcleos preóptico medial, anterior, ventromedial y arcuato, así como en el órgano vasculoso de la estría terminal y la banda diagonal de Broca (Silverman y col., 1994; Roth y col., 2001; Yen, 2001). Estas neuronas se originan del epitelio olfatorio. En la rata estas células están presentes desde el día 10 de vida fetal y durante los días 13 al 17, dichas neuronas migran por el septo nasal y continúan hasta llegar al cerebro anterior del hipotálamo (Halász, 2000). Las neuronas GnRHérgicas son células muy especializadas que representan la salida de información de una red neuronal integrada, que genera la secreción pulsátil de las gonadotropinas por la hipófisis (Jennes, 1985).

En todos los mamíferos estudiados, el número de neuronas GnRH-érgicas es escaso (en la rata es alrededor de mil). En la rata, aproximadamente el 70% de las neuronas GnRH del septo y de las áreas preoptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) proyectan sus terminales nerviosas hacia la eminencia media (Herde y col., 2011; Jennes y col., 1985). El resto de neuronas de este tipo se proyecta a otras células blanco de la GnRH dentro del cerebro, o están involucradas en circuitos locales. También envían sus axones hacia áreas fuera del hipotálamo como la amígdala, el área tegmental ventral, el cerebro medio, el rafe y la región periacueductal (Silverman y col., 1994). Pueden estar en contacto con fibras colinérgicas, catecolaminérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas, glutamatérgicas, dopaminérgicas, GABAérgicas, así como axones que contienen neuropéptido Y (NPY), sustancia P (SP), neurotesina, CRH, vasopresina y galanina (Halász, 2000; Herbison, 2008; McCann y col., 2011; Turi y col., 2008).

En las terminaciones nerviosas, la GnRH se encuentra dentro de gránulos de secreción y su liberación se produce en respuesta a un potencial de acción que inicia la entrada de calcio a la célula a través de canales de Ca<sup>++</sup> dependientes de voltaje. La liberación de la GnRH se realiza

por excitosis, por un mecanismo que pudiera involucrar la activación de la proteína-cinasa C (Charly y col., 1990).

La secreción de la GnRH es de tipo pulsátil. La amplitud y frecuencia de los pulsos dependen de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre el animal, su liberación pulsátil está regulada por un conjunto de señales neurales en las que participan los neurotransmisores ya señalados (Kordon y col., 1994).

La experiencia clínica ha puesto de manifiesto su importancia en la regulación de la respuesta hipofisaria. En el momento en el que se dispuso de GnRH sintética se comprobó que su administración crónica tan solo producía una respuesta transitoria en la actividad de las células gonadotropas de la hipófisis. Knobil (2006), en estudios clásicos con primates, a los que se había destruido el núcleo arcuato, demostró que la pulsatilidad del mensaje hipotalámico es imprescindible para una función adecuada de la respuesta gonadotropa. La fijación de la molécula de GnRH a su receptor da lugar a un proceso de agregación de los receptores que están ocupados y la creación de invaginaciones que finalmente se internalizan en el citoplasma de la célula gonadotropa.

La ausencia temporal de los receptores de la superficie celular disminuye su capacidad para recibir el mensaje hormonal y “neutraliza” temporalmente la capacidad de secreción. Este proceso de regulación fisiológica ha sido aprovechado para bloquear terapéuticamente la función gonadotropa. Los análogos agonistas son sustancias que evitan la degradación enzimática y aumentan la afinidad por el receptor que permanece fijo durante más tiempo. Con ello se induce una sensibilización de larga duración de las células hipofisarias, mientras que los antagonistas ocupan el receptor con gran afinidad desplazando a la GnRH nativa y evitando que ejerza su función (Knobil, 2006)

### ***Gonadotropinas***

Las gonadotropinas son miembros de la familia de hormonas glicoproteicas. Estas son sintetizadas en la hipófisis y se encuentran en la mayoría de los vertebrados (Bousfield, 1999).

La FSH estimula la síntesis de estrógenos al actuar en las células de la granulosa, al unirse a su receptor en la membrana celular. El complejo receptor-hormona actúa sobre el sistema de la adenilato ciclasa que provoca el aumento AMPc y estimula la síntesis y la actividad de enzimas aromatasas. Estudios *in vitro* muestran que existe un lapso de 18 horas entre el estímulo de las células de la granulosa con FSH y el aumento en la secreción de estrógenos, además que este aumento de estrógenos es inhibido al bloquear la síntesis del ARN mensajero y de proteínas (Domínguez y col., 1991).

En las gónadas la LH estimula la esteroidogénesis e induce la ovulación y la luteinización. (Bousfield, 1999). La LH juega un papel central en la regulación del sistema reproductivo por lo que en muchas especies, el ciclo reproductivo es dividido en dos partes: una preovulatoria a la secreción de LH, caracterizada por el desarrollo folicular, que conduce a la ovulación, y una post-ovulatoria caracterizada por el cuerpo lúteo (Bousfield, 1999).

La LH regula la síntesis de estrógenos por sus efectos sobre la producción de andrógenos por las células tecales y por la estimulación de la síntesis y la actividad de la aromatasas, en las células de la granulosa (Domínguez y col., 1991).

Los efectos de la LH sobre la síntesis de estrógenos son amplificados por su liberación pulsátil, ya que la respuesta secretora es controlada tanto por la amplitud como por la frecuencia de los pulsos de la misma (Domínguez y col., 1991).

Según Hsueh y colaboradores (1983), la LH es la hormona más importante en la regulación de la producción de estrógenos, ya que estimula la síntesis de andrógenos, la de sus propios receptores en las células de la teca y la actividad aromática de las células de la granulosa. Después del “pico o secreción preovulatoria de LH”, esta hormona inhibe a sus propios receptores en las células de la granulosa lo que resulta en una disminución en la síntesis de estrógenos.

La FSH y LH están compuestas por dos cadenas de aminoácidos, denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ , que están unidas entre sí por uniones no covalentes. En estas cadenas se encuentran unidas moléculas de hidratos de carbono de naturaleza ácida, en particular el ácido siálico. La cadena  $\alpha$  es común para la FSH y la LH, mientras que la  $\beta$  es la que confiere especificidad de efectos a la molécula, por ser ésta la que se une al receptor (Bousfield y col., 1994).

Los estudios experimentales realizados por Knobil (2006) en primates comprobaron que la secreción del gonadotropo, se modificaba en función de la frecuencia de los pulsos de GnRH sintética que se administraba. Cuando se administraba pulsos a intervalos de aproximadamente una hora, se restablecía la secreción de ambas gonadotropinas a concentraciones similares, con una ligera ventaja para la LH. Sin embargo, si el intervalo entre pulsos se prolongaba, las concentraciones de ambas gonadotropinas descendían y se producía una cantidad relativamente superior de FSH.

Este fenómeno puede explicarse conociendo que la secreción de las subunidades implicadas en el proceso está regulada de forma independiente. De esta forma se comprende la posibilidad de añadir a la subunidad común  $\alpha$  cantidades relativamente distintas de subunidad  $\beta$ , ya sea de la LH o de la FSH, y modificar con ello las concentraciones de estas hormonas en la circulación.

Teniendo en cuenta que el objetivo de la secreción hipofisaria, (como indica su nombre de gonadotropía) es modular la función gonadal, parece racional que la información que la regula tenga su origen en el ovario. El sistema inhibina-activina se basa en la combinación de tres subunidades de carácter proteico segregadas por las células de la granulosa:  $\alpha$ ,  $\beta_a$  y  $\beta_b$ . La cantidad de estos péptidos producidos por la gónada depende de la actividad del folículo o del cuerpo lúteo, a lo largo del ciclo (Knobil, 2006).

Un descenso importante en la concentración de estrógenos circulantes da lugar a una secreción elevada de gonadotropinas, especialmente FSH. Inversamente, el incremento de estrógenos circulantes bien sea por su administración o por el desarrollo folicular, reduce la concentración circulante de gonadotropinas. Esta regulación se denomina retroalimentación o “feed-back” negativo y su activación al final de cada ciclo es esencial para aumentar la producción de FSH y LH, y favorecer los procesos de reclutamiento y selección folicular. Durante la etapa reproductiva y posterior a la menopausia, el mecanismo de “feed-back” negativo se encuentra operando continuamente (Knobil, 2006).

El incremento progresivo en la concentración  $E_2$  provoca el aumento de la capacidad de las células gonadotropas, en la síntesis y limitar la liberación. Llega un momento en el que los depósitos celulares son tan abundantes que cada pulso de GnRH da lugar a una liberación masiva de las gonadotropinas sintetizadas, especialmente LH, pero también en menor cantidad FSH que se traduce en un incremento brusco e importante de las concentraciones circulantes conocido como “pico” preovulatorio. Este mecanismo en el que los estímulos periféricos crecientes dan lugar a una respuesta hipofisaria aguda y positiva se denominan “feed-back” positivo. A diferencia del negativo que solo está activo de forma puntual, cuando lo permite el estado de impregnación de las células gonadotropas hipofisarias (Knobil, 2006).

### *Inhibina y activina*

La inhibina es una hormona glucoproteica consistente en dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) unidas por puentes disulfuro. En la hembra la inhibina es producida fundamentalmente por las células de la granulosa de los folículos ováricos. Aunque puede actuar sobre el hipotálamo y otras estructuras, su principal órgano diana es la hipófisis. La inhibina ejerce una acción inhibitoria específica sobre la síntesis y liberación de FSH tanto basal como en respuesta a la GnRH. A su vez la producción de inhibina es estimulada por la FSH. Esta acción diferencial de la inhibina podría ser responsable de la disociación de la secreción de las gonadotropinas encontrada en algunas situaciones fisiológicas (pubertad) y patológicas (síndrome de ovario poliquístico) (Tresguerres, 1999).

La activina es un dímero de la subunidad  $\beta$  de la inhibina, es producida por células de la granulosa y ejerce una acción sobre la FSH opuesta a la de la inhibina, es decir, estimula su secreción (Tresguerres, 1999).

### Acetilcolina (ACh)

La ACh es un neurotransmisor constituido por la unión de la colina y el acetato (Mendoza, 2008). Es un compuesto de amonio cuaternario unido a un grupo éster por un etilo de la colina (Figura 9).

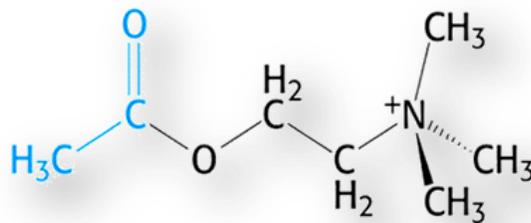


Figura 9. Estructura química de la ACh (Tomada de Mendoza, 2008).

La síntesis de la ACh se realiza en fibras colinérgicas a partir de la colina que es capturada por la membrana pre-sináptica, a través de un mecanismo de transporte activo; en el interior del botón terminal, se conjuga con el acetato, proveniente de la acetil coenzima A (Acetil-CoA), que sirve como donador de acetilos. El proceso de síntesis está catalizado por la enzima colinoacetil-transferasa (CAT) (Mendoza, 2008).

El catabolismo de la ACh ocurre en la hendidura sináptica, en ese sitio se localiza la enzima acetil-colinesterasa (AChE) que hidroliza en fracciones de segundo a la ACh en colina y acetato. La colina es recapturada nuevamente por la membrana pre-sináptica para iniciar un nuevo ciclo de síntesis del neurotransmisor (Mendoza, 2008).

- Almacenamiento y liberación de la ACh

Una vez sintetizada la ACh, se almacena en vesículas pre-sinápticas, las cuales son llevadas al botón pre-sináptico en respuesta a un potencial de acción que se propaga hasta la terminal sináptica, lo que indica el ingreso de  $\text{Ca}^{++}$  y de esta forma por el mecanismo de exocitosis, se libera la ACh al espacio sináptico, la que se une a los receptores post-sinápticos localizados en las estructuras efectoras (Mendoza, 2008).

La ACh está ampliamente distribuida en el SNC y el sistema nervioso periférico. La ACh se libera al espacio sináptico, viaja hasta la estructura post-sináptica y se une a dos tipos de receptores específicos. Los receptores nicotínicos ( $R_n$  y  $R_m$ ) y los receptores muscarínicos ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_5$ ), estos últimos pertenecen a la super-familia de receptores acoplados a proteínas G (Mendoza, 2008). Los subtipos,  $RM_1$ ,  $RM_3$  y  $RM_5$ , están acoplados a la proteína que activa a la fosfolipasa C, e inicia una respuesta que involucra la formación del fosfatidilinositol. Los subtipos  $RM_2$  y  $RM_4$  inhiben la actividad de la adenilato-ciclase al activar la proteína  $G_i$ . Ambos tipos de receptores son conocidos por mediar diversas acciones de la ACh en el sistema nervioso, así como en todo el tejido no nervioso inervado por el sistema nervioso parasimpático. La ACh puede ser producida y ejercer acciones específicas en tejidos periféricos que no son inervados por fibras colinérgicas (Fritz y col., 2001).

La existencia de la enzima biosintética CAT y de la misma ACh ha sido demostrada en células epiteliales, mesoteliales, endoteliales y musculares, así como en células del sistema inmune en la placenta (Fritz y col., 2001).

Una forma de participación del sistema colinérgico en los mecanismos de regulación de las funciones del ovario son las células de la granulosa de los folículos ováricos. En cultivos de células de la granulosa derivadas de folículos preovulatorios de ovarios humanos se ha mostrado la presencia CAT (Mayerhofer y col., 2006).

Las células de la granulosa de los folículos ováricos no están en contacto con las fibras nerviosas que llegan al ovario, ya que no cruzan la membrana basal que separa las células de la teca de las de la granulosa. Sin embargo, se ha demostrado que las células de la granulosa de folículos preovulatorios sintetizan ACh (Fritz y col., 2001; Mayerhofer y col., 2005), y el transportador vesicular de la ACh (Fritz y col., 1999). En la rata adulta, las células de la granulosa de folículos antrales, pero no otras células, son inmuno-reactivas a la CAT (ir-CAT); lo que indica que en estos folículos, son ellas la fuente de ACh. En fracciones de membrana de ovarios de humanos y primates se ha mostrado la presencia de receptores muscarínicos del subtipo  $M_1$ ,  $M_3$  y  $M_5$  (Batra y col., 1993). Por medio de la técnica de RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) e inmuno-histoquímica se mostró que el  $RM_3$  se expresa en el ovocito, mientras que los genes para el  $RM_1$  y  $RM_5$  son expresados en las células de la granulosa (Fritz y col., 1999, 2001). Lo que sugiere que la ACh producida por estas células foliculares pueden actuar en forma autócrina y parácrina en el ovario, particularmente los ovocitos, las células de la granulosa, las luteales o todas a la vez (Fritz y col., 2001).

Además de actuar como un clásico neurotransmisor, la ACh regula una variedad de funciones celulares, incluyendo la mitosis, diferenciación celular, contacto célula-célula, secreción de hormonas y funciones inmunes (Fritz y col., 2001).

La ACh que es producida localmente en el ovario actúa dentro de la misma glándula afectando funciones específicas, como la proliferación celular, inhibe la comunicación celular y estimula la transcripción del factor egr-1 (factor responsable del crecimiento temprano) (Mayerhofer y col., 2006).

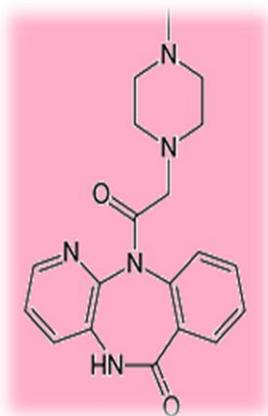
La ACh al unirse al RM<sub>1</sub> estimula la proliferación de las células de la granulosa y en células de la granulosa luteinizadas, también estos receptores estimulan la formación de nexos (Fritz y col., 2002).

A la fecha se considera que la ACh es una molécula de señalización muy importante en el folículo con antro, es decir en aquellos folículos que ya sintetizan receptores a FSH y LH; y es la FSH la hormona que estimula la síntesis de ACh (Mayerhofer y col., 2006). Con base en este conjunto de evidencias, se plantea una vía de señalización intra-ovárica entre el complejo ACh-receptor muscarínico, que es utilizada por las gonadotropinas en las células de la granulosa (Richard y col., 2002).

### Pirenzepina

Entre los diferentes fármacos sintéticos que antagonizan con el RM<sub>1</sub>, está la pirenzepina.

La pirenzepina (PZP) (Figura 10) es un fármaco que compite por el receptor celular del neurotransmisor acetilcolina en el sistema nervioso parasimpático. En el sistema digestivo, la PZP provoca reducción de los espasmos musculares, el incremento en la motilidad gástrica y aumenta la digestión, por lo que es usado en el tratamiento de las úlceras pépticas. Se ha investigado el uso de la PZP para el control de la miopía (Czepita, 2005), con gran efectividad y pocos efectos secundarios (Siatkowski y col., 2008).



Nombre según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC)	11-[(4-Metilpiperazin-1il)acetil]6,11-dihidro-5H-pirido[2,3-b][1,4]benzodiazepin-6-on
Formula	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>
Peso Molecular	351.402 g/mol

**Figura 10.** Estructura química de la pirenzepina, formula y peso molecular

## Asimetrías Ováricas

Aunque en general se considera que los órganos pares son fisiológica y patológicamente muy similares, hay evidencias que sugieren que endocrinológicamente estos órganos no son idénticos en su función y control (Hunter y col, 1985).

Existen evidencias de la participación de la innervación gonadal en la regulación de la actividad esteroideogénica de los ovarios. La inyección intra-ovárica de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, pero no de  $\alpha$ -adrenérgicos, incrementa la secreción de  $P_4$ , sin modificar la tasa de secreción de estrógenos (Bakalkin y col., 1984).

La inyección de xilocaina en el ovario izquierdo y solución salina en el derecho resulta en la disminución del número de ovocitos liberados por ambos ovarios. Este efecto no es observado cuando el ovario derecho es inyectado con xilocaina y el izquierdo con solución salina. Estos resultados llevaron a proponer que la señal inicial que induce la ovulación se origina en el ovario izquierdo, ya que si el derecho es inyectado con xilocaina no hay modificaciones en el número de ovocitos liberados (Domínguez y col. 1998). Cuando ambos ovarios fueron inyectados con solución salina o xilocaina, la ovulación fue normal en ambos ovarios sugiriendo que otros mecanismos son capaces de cerrar el circuito necesario para la ovulación normal, ya que en animales hemicastrados, la ovulación se vio afectada solo en aquellos animales en los que se inyectó el ovario izquierdo con xilocaina y el ovario derecho fue extirpado (Domínguez y col. 1998).

Los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación en animales con ovariectomía unilateral son diferentes a los que ocurren en animales con ambas gónadas, y estos mecanismos participan de forma diferente en el ovario izquierdo que en el derecho, lo que depende de la innervación del ovario (Chávez y col, 1987c; Domínguez y col, 1989). Mediante estudios histológicos se ha mostrado que el ovario derecho presenta mayor innervación simpática que el izquierdo (Klein y Burden 1988).

En la mujer la ovulación ocurre en el ovario derecho dos veces más que en el izquierdo (Potashnik y col., 1987). Una diferencia similar ha sido descrita en los monos (Morse y Van Wagenen, 1936).

También en la mujer, el ovario derecho se desarrolla más temprano que el izquierdo (Mittwoch, 1975); 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 (Gerendai y Halász, 1997).

Kawakami y colaboradores en 1981 mostraron que la estimulación eléctrica del área pre-quiasmática basal medial, el hipotálamo ventro-medial, y las áreas del mesencéfalo de ratas hembras hipofisectomizadas y adrenalectomizadas resulta en un incremento en las concentraciones de  $E_2$  y  $P_4$  en la sangre del ovario contralateral a la zona cerebral estimulada. En

cambio, la estimulación del hipocampo dorsal, la amígdala lateral, y las áreas mesenfálicas resulta en la disminución de las concentraciones de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>. La denervación ovárica de las ratas en el día del proestro bloquea la secreción de estradiol inducida por la estimulación del área prequiasmática media basal.

La inyección en el ovario del virus de la pseudorabia, utilizado como trazador retrógrado, evidenció la presencia de neuronas marcadas en la médula ventrolateral, en el núcleo magnocelular, en el área postrema, en el núcleo vagal (núcleo del tracto solitario y dorsal del vago), grupos celulares noradrenérgicos A1 y A5, núcleo caudal del rafe, núcleo paraventricular hipotalámico y en el hipotálamo lateral, comprobando de esta manera la existencia de conexiones entre los ovarios y el SNC (Gerendai y col., 2009; Toth y col., 2007).

## Justificación

---

Las funciones del ovario y su respuesta a las gonadotropinas están moduladas por factores sintetizados en el propio ovario, por las diferentes moléculas que actúan en el ovario a través de la inervación que recibe, o ambos procesos. Una de estas moléculas, la ACh, originalmente fue identificada como un neurotransmisor liberado por terminales colinérgicas en el SNC y el periférico. La ACh no sólo llega al ovario por medio de su inervación, sino que en la mujer y la rata, las células de la granulosa de folículos preovulatorios la sintetizan y expresan el ARNm para RM<sub>1</sub> y RM<sub>5</sub>. Poco se conoce acerca de las funciones que desempeña este sistema “no neural” en el ovario, por lo que en esta tesis se decidió analizar la participación de los RM<sub>1</sub> en la ovulación.

Por otra parte, se ha mostrado que cada ovario funciona de manera diferente en cada fase del ciclo estral, por lo que en el presente estudio se analizó si los RM1 regulan de manera diferente la ovulación en función del ovario y del día del ciclo estral.

Finalmente se decidió conocer cuál de las señales endócrinas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es alterada por el bloqueo de los receptores RM1 del ovario izquierdo o derecho en cada fase del ciclo estral.

## Hipótesis

---

Dado que en el ovario de la rata, las células de la granulosa de los folículos pre-ovulatorios expresan el ARNm de la CAT y sintetizan ACh, entonces el bloqueo de los RM1 modificará la ovulación. Además ya que algunas de las funciones del ovario y su inervación son diferentes entre un ovario y otro, entonces los efectos del bloqueo de los RM1 dependerá del ovario y cambiará con la fase del ciclo estral.

# Objetivos

---

## *Objetivo general:*

Analizar los efectos del bloqueo de los RM<sub>1</sub> del ovario izquierdo o del derecho a las 13:00 h en los distintos días del ciclo estral, sobre la ovulación de la rata hembra adulta.

## *Objetivos particulares:*

Evaluar el efecto del bloqueo de los RM<sub>1</sub> del ovario izquierdo o del derecho sobre:

- La tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados.
- El peso del útero y de los ovarios.

Evaluar la respuesta del ovario contralateral (no inyectado) a los mismos parámetros.

Cuantificar la respuesta ovulatoria al remplazo de la señal hipotalámica, hipofisaria y ovárica en aquellos animales que no ovulen por el bloqueo de los RM<sub>1</sub> durante el ciclo estral.

# Materiales y métodos

---

*Experimento 1: Estudio de los efectos del bloqueo de los RM<sub>1</sub> del ovario izquierdo o derecho, a las 13:00 h de cada fase del ciclo estral, sobre la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados y el peso de los ovarios.*

Se utilizaron ratas adultas de la cepa CIIZ-V, cíclicas (tres a cuatro meses de edad), con un peso de 200-280 g, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h, con libre acceso al alimento (Harlan) y al agua. El ciclo estral fue monitoreado mediante la toma diaria de frotis vaginal y sólo se utilizaron los animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días.

En cada fase del ciclo estral, 8 animales cíclicos fueron tomados al azar y anestesiados entre las 12:00 y 12:30 h de cada fase del ciclo estral, mediante la inyección intraperitoneal (ip) de una mezcla de Ketamina-Xilazina (dosis: 80/12 mg/kg peso corporal) (Green y col., 1981).

Entre las 12:30 y las 13:30 h de cada fase del ciclo estral, los animales fueron laparotomizados por vía dorso-lateral, se expuso el ovario izquierdo o derecho, se introdujo en la bursa del ovario una aguja de acero inoxidable de 29G (0.50mx5/8") conectada a una bomba de micro-inyección (CMA 402, Bioanalytical Systems Inc., West Lafayette, IN, USA). Por medio de ella se administró:

- 0.5  $\mu$ L de agua estéril (con un pH de 5.29) durante 30 segundos, estos animales fueron asignados al grupo vehículo.
- 19ng/0.5  $\mu$ L de PZP (antagonista específico para el  $RM_1$ ) (SIGMA Chemical Co., St. Louis MO, USA) durante 30 segundos, que correspondió al grupo PZP.

Animales cíclicos sin tratamiento, sacrificados en la mañana del estro vaginal fueron clasificados como el grupo intacto.

Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del estro esperado por una sobredosis de éter, se disectaron los ovarios y el útero, se pesaron en una balanza de precisión (marca ESJ SERIES, modelo: ESJ200-4). Tanto del ovario inyectado como el contralateral (no inyectado) se separó el oviducto, donde se contó el número de ovocitos liberados con ayuda de un estereoscopio (Olympus SZ2-LGCL).

### *Experimento 2.- Análisis de los mecanismos que provocaron la falta de ovulación, como resultado del bloqueo de los $RM_1$ del ovario.*

Grupos de ratas micro-inyectadas con vehículo o PZP que no ovularon, se les reemplazó la señal hipotalámica, hipofisaria y ovárica de la siguiente manera:

- Reemplazo de la señal hipotalámica: se inyectaron por vía subcutánea (sc) 3.7  $\mu$ L/kg de hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) sintética a las 14:00 h del día del proestro esperado.
- Reemplazo de la señal hipofisaria: se administraron sc 25 ui de gonadotropina coriónica humana (hCG) a las 14:00 h del día del proestro esperado.
- Reemplazo de la señal ovárica: se administraron 10  $\mu$ g de Benzoato de Estradiol (BE) sc a las 14:00 h del diestro-2 esperado.

Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del estro esperado por una sobredosis de éter, una vez sacrificados se realizó el mismo procedimiento que en el experimento 1.

### *Análisis estadístico*

Los resultados del número de animales ovulantes fueron analizados por la prueba de la probabilidad exacta de Fisher, el número de ovocitos liberados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. En todos los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de "U" Mann-Withney o de "t" de Student. Los valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

Los resultados del peso de los ovarios y del útero se analizaron utilizando la prueba de Analisis de Varianza Multiple, seguida de la prueba de Tukey.

## Resultados

Efectos de la micro-inyección del vehículo o la pirenzepina (PZP) en el ovario izquierdo o derecho a las 13:00 h de cada fase del ciclo estral

### *Diestro-1*

#### Animales ovulantes y ovocitos liberados

Cuando se comparan los resultados con el grupo de animales intactos, observamos que la micro-inyección del vehículo a las 13:00 h del diestro-1 en el ovario izquierdo, resultó en el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales. En cambio, la micro-inyección del vehículo en el ovario derecho provocó que el 75% de los animales ovularan, sin modificaciones en el número de ovocitos ( $8.0 \pm 1.6$  vs.  $14.5 \pm 2.3$ ).

Con respecto al grupo vehículo, la micro-inyección de PZP en el ovario izquierdo o derecho resultó en la falta de ovulación en todos los animales tratados.

#### Peso de ovarios y útero

El peso de los ovarios, tratados o no, no se modificó por la micro-inyección del vehículo, cuando se compara con los animales intactos. La PZP no modificó el peso de este órgano, cuando se compara con los grupos inyectados con vehículo (**Tabla 1**).

GRUPO EXPERIMENTAL	PESO (mg/100 g peso corporal)			
	OVARIO IZQUIERDO		OVARIO DERECHO	
INTACTAS	Inyectado $17.9 \pm 1.0$	No inyectado $16.8 \pm 1.2$	Inyectado $16.8 \pm 1.2$	No inyectado $17.9 \pm 1.0$
VEHÍCULO	$16.32 \pm 1.0$	$16.71 \pm 1.0$	$14.4 \pm 1.2$	$15.0 \pm 0.7$
PIRENZEPINA	$15.0 \pm 0.8$	$15.0 \pm 0.9$	$14.6 \pm 0.6$	$14.3 \pm 0.8$

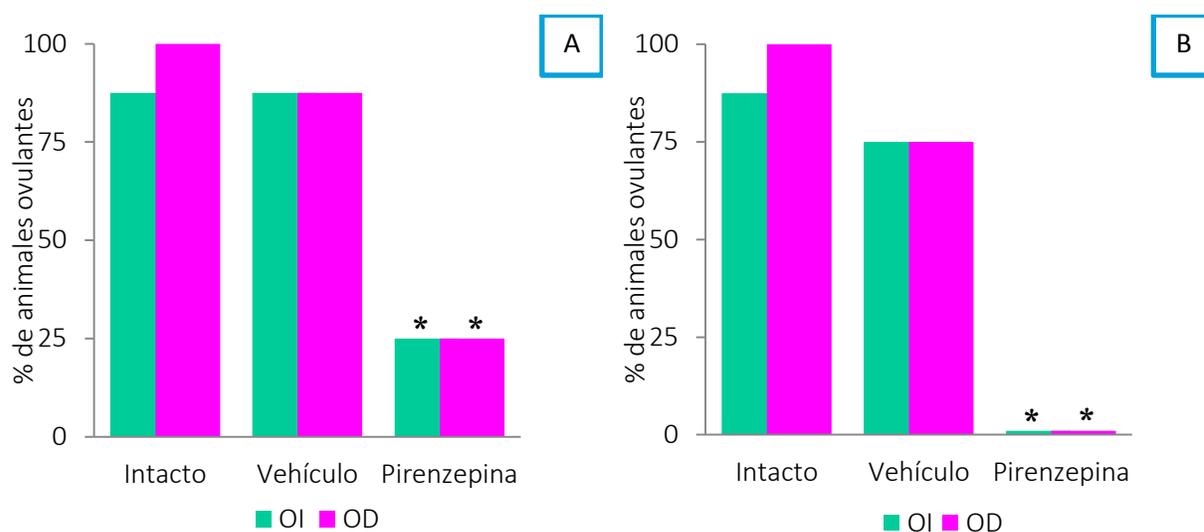
**Tabla 1.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del ovario izquierdo o del ovario derecho micro-inyectados con vehículo o pirenzepina (ovarios inyectado), y su correspondiente contralateral (no inyectado) en la fase del diestro-1, sacrificados la mañana del estro esperado.

Con respecto al peso del útero, observamos que en los animales micro-inyectados con el vehículo en el ovario izquierdo, el peso de éste órgano aumentó con respecto al grupo de animales intactos ( $174.0 \pm 8.0$  vs.  $134.4 \pm 8.0$ ,  $p < 0.05$ ). La micro-inyección de PZP no modificó este resultado ( $160.0 \pm 13.0$  vs.  $174.0 \pm 8.0$ ). En los animales micro-inyectados con el vehículo o con la PZP en el ovario derecho, el peso de éste órgano no se modificó por ninguno de los tratamientos (intacto:  $134.4 \pm 8.0$ , vehículo:  $163.0 \pm 12.8$ , PZP:  $168.6 \pm 11.3$ ).

## Diestro-2

### Animales ovulantes

Cuando se comparan los resultados con el grupo de animales intactos, observamos que la micro-inyección del vehículo a las 13:00 h del diestro-2 en el ovario izquierdo o derecho, no provocó modificaciones en el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado. El tratamiento con PZP en el ovario izquierdo o derecho resultó en la disminución del porcentaje de animales ovulantes (**Gráfica 1**).



\* $p < 0.05$  vs. Grupo Vh (Prueba de probabilidad exacta de Fisher)

**Gráfica 1.** Porcentaje de animales que ovularon del ovario izquierdo (OI) o del derecho (OD) en el día del estro esperado, después de la micro-inyección del vehículo o la pirenzepina en el ovario izquierdo (A) o en el derecho (B), a las 13:00 h del diestro-2.

## Número de ovocitos liberados

En los animales micro-inyectados con vehículo en el ovario izquierdo o en el derecho, el número de ovocitos fue semejante al de los animales intactos (ovario izquierdo:  $10.6 \pm 1.0$ , ovario derecho:  $13.6 \pm 1.4$  vs.  $14.5 \pm 2.3$ ).

Los dos animales que ovularon al micro-inyectar el ovario izquierdo con PZP, el ovario inyectado liberaron nueve y uno ovocitos, y el no inyectado liberó cinco y siete ovocitos. En los animales micro-inyectados el ovario derecho con PZP no se cuantificó el número de ovocitos porque ninguno ovuló.

## Peso de ovarios y útero

La micro-inyección del vehículo en el ovario izquierdo provocó la disminución del peso del ovario inyectado, sin modificar el no inyectado. La micro-inyección del vehículo en el ovario derecho, también provocó disminución del peso del ovario inyectado, sin alterar el del no inyectado. La micro-inyección de PZP no modificó los efectos de la administración del vehículo (**Tabla 2**).

GRUPO EXPERIMENTAL	PESO (mg/100 g peso corporal)			
	OVARIO IZQUIERDO		OVARIO DERECHO	
DÍA DEL CICLO	Inyectado	No inyectado	Inyectado	No inyectado
INTACTAS	$17.0 \pm 1.1$	$18.1 \pm 1.0$	$18.1 \pm 1.0$	$17.0 \pm 1.1$
VEHÍCULO	$13.1 \pm 0.4^*$	$15.2 \pm 1.3$	$14.3 \pm 1.1^*$	$14.8 \pm 1.4$
PIRENZEPINA	$12.7 \pm 0.7$	$11.5 \pm 0.9$	$13.4 \pm 0.6$	$13.4 \pm 1.0$

\*  $p < 0.05$  vs grupo Intacto (ANOVA seguida de Tukey)

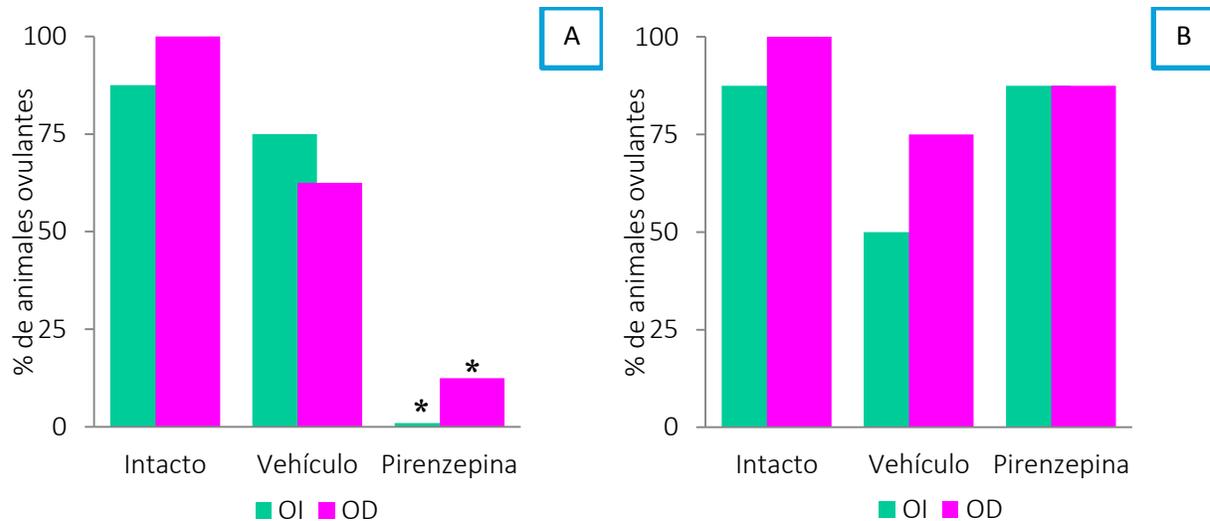
**Tabla 2.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del ovario izquierdo o del ovario derecho micro-inyectados con vehículo o pirenzepina (ovarios inyectado), y su correspondiente contralateral (no inyectado) en la fase del diestro-2, sacrificados la mañana del estro esperado.

Con respecto al peso del útero, observamos que en los animales micro-inyectados con el vehículo en el ovario izquierdo, el peso de éste órgano aumentó con respecto al grupo de animales intactos ( $174.0 \pm 8.0$  vs.  $134.4 \pm 8.0$ ,  $p < 0.05$ ). La micro-inyección de PZP no modificó este resultado ( $160.0 \pm 13.0$  vs.  $174.0 \pm 8.0$ ). En los animales micro-inyectados con el vehículo o con la PZP en el ovario derecho, el peso de éste órgano fue semejante en los tres tratamientos (intacto:  $134.4 \pm 8.0$ , vehículo:  $163.0 \pm 12.8$ , PZP:  $168.6 \pm 11.3$ ).

## Proestro

### Animales ovulantes

La micro-inyección del vehículo en el ovario izquierdo o derecho a las 13:00 h del proestro no provocó modificaciones en el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado. El tratamiento con PZP en el ovario izquierdo resultó en la disminución del número de animales ovulantes, mientras que en el ovario derecho no alteró la ovulación (**Gráfica 2**).

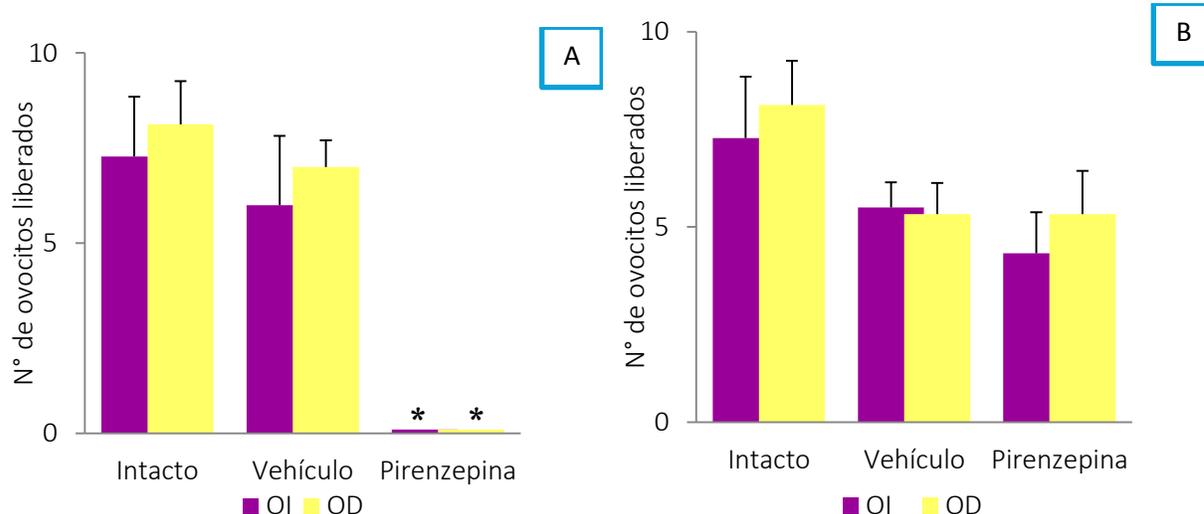


**Gráfica 2.** Porcentaje de animales que ovularon del ovario izquierdo (OI) o del derecho (OD) en el día del estro esperado, después de la micro-inyección del vehículo o la pirenzepina en el ovario izquierdo (A) o en el derecho (B), a las 13:00 h del proestro.

### Numero de ovocitos liberados

En los animales que ovularon después de ser micro-inyectados con el vehículo a las 13:00 h del proestro en uno u otro ovario, el número de ovocitos liberados resultó semejante al de los animales del grupo intacto.

Únicamente los animales con bloqueo de los  $RM_1$  de ovario izquierdo, no ovularon en el día del estro esperado; el número de ovocitos que liberaron los animales inyectados con PZP en el ovario derecho fue semejante a los tratados con vehículo (**Gráfica 3**).



\* $p < 0.05$  vs grupo Intacto (ANOVA seguida de Tukey)

**Gráfica 3.** Media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI) o el derecho (OD) en el día del estro esperado, después de la micro-inyección del vehículo o la pirenzepina en el ovario izquierdo (A) o en el derecho (B), a las 13:00 h del proestro.

### Peso de los ovarios y del útero

La micro-inyección del vehículo en el ovario izquierdo o derecho a las 13:00 h del proestro no provocó cambios en el peso del ovario inyectado y el no inyectado. Solo la micro-inyección de PZP en el ovario izquierdo provocó la disminución del peso de este ovario (Tabla 3).

GRUPO EXPERIMENTAL	PESO (mg/100 g peso corporal)			
	OVARIO IZQUIERDO		OVARIO DERECHO	
	Inyectado	No inyectado	Inyectado	No inyectado
INTACTAS	17.0 $\pm$ 1.1	18.1 $\pm$ 1.0	18.1 $\pm$ 1.0	17.0 $\pm$ 1.1
VEHÍCULO	22.2 $\pm$ 3.3	16.5 $\pm$ 2.9	16.13 $\pm$ 1.8	18.3 $\pm$ 2.8
PIRENZEPINA	11.3 $\pm$ 0.7♥	12.4 $\pm$ 1.3	18.01 $\pm$ 1.0	14.5 $\pm$ 1.0

♥ $P < 0.01$  vs Vehículo (ANOVA seguida de Tukey)

**Tabla 3.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso del ovario izquierdo o del ovario derecho micro-inyectados con vehículo o pirenzepina (ovarios inyectado), y su correspondiente contralateral (no inyectado) en la fase del proestro, sacrificados la mañana del estro esperado.

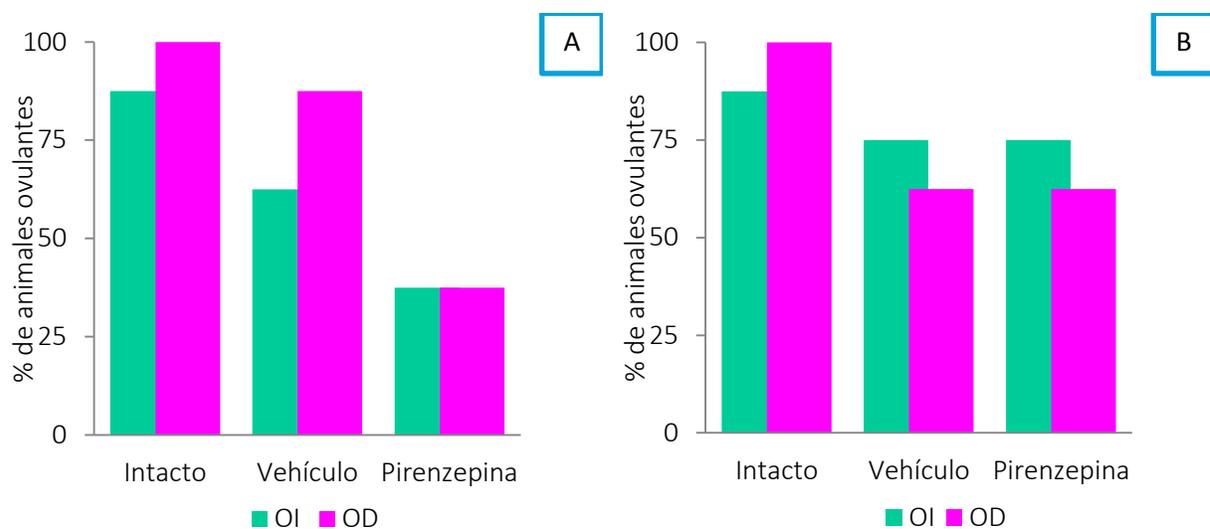
Con respecto al peso del útero, observamos que en los animales micro-inyectados con el vehículo en el ovario izquierdo (136.1  $\pm$  6.8 vs. 134.4  $\pm$  8.0) o en el ovario derecho (153.1  $\pm$  10.2 vs.

134.4±8.0), el peso de éste órgano no se modificó con respecto al grupo de animales intactos. La micro-inyección de PZP no modificó estos resultados (ovario izquierdo inyectado: 120.8 ±10.6 vs. 136.1 ±6.8; ovario derecho inyectado: 137.6 ±4.8 vs. 153.1±10.2).

## Estro

### Animales ovulantes

La micro-inyección del vehículo en el ovario izquierdo o en el derecho, a las 13:00 h del estro no provocó modificaciones en el porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado. El tratamiento con PZP no alteró este resultado (OI: p=0.2821, OD: p= 1.4308) (**Gráfica 4**).

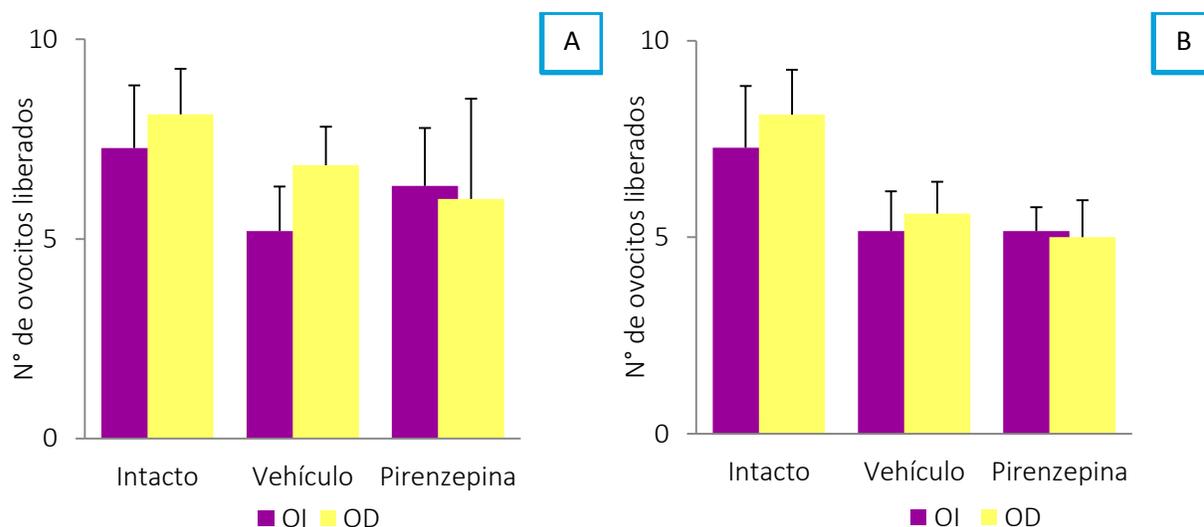


**Gráfica 4.** Porcentaje de animales que ovularon por el ovario izquierdo (OI) o el derecho (OD) en el día del estro esperado, después de la micro-inyección del vehículo o la pirenzepina en el ovario izquierdo (A) o en el derecho (B), a las 13:00 h del estro.

### Número de ovocitos liberados

En esta etapa del ciclo, la micro-inyección del vehículo o de la PZP en uno u otro ovario no provocó alteraciones en el número de ovocitos liberados por los ovarios (**Gráfica 5**).

En los animales micro-inyectados con vehículo en el ovario izquierdo (138.1 ±4.0 vs. 134.4±8.0) o derecho (94.5 ± 25.1 vs. 134.4±8.0), el peso del útero no fue modificado con respecto al grupo de animales intactos. La micro-inyección de PZP no modificó estos resultados (ovario izquierdo inyectado: 167.9 ±20.8 vs. 138.1 ±4; ovario derecho inyectado: 152.89 ± 6.0 vs. 94.5 ± 25.1).



**Gráfica 5.** Media ± e.e.m del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI) o el derecho (OD) en el día del estro esperado, después de la micro-inyección del vehículo o la pirenzepina en el ovario izquierdo (A) o en el derecho (B), a las 13:00 h del proestro.

### Peso de los ovarios y del útero

La micro-inyección del vehículo en el ovario izquierdo a las 13:00 h del estro provocó disminución del peso de ambos ovarios. La micro-inyección con PZP no modificó el efecto provocado por el vehículo. Ninguno de los tratamientos en el ovario derecho modificó el peso de los ovarios (Tabla 4).

GRUPO EXPERIMENTAL	PESO (mg/100 g peso corporal)			
	OVARIO IZQUIERDO		OVARIO DERECHO	
DÍA DEL CICLO	Inyectado	No inyectado	Tratado	No tratado
INTACTAS	17.0 ± 1.1	18.1 ± 1.0	18.1 ± 1.0	17.0 ± 1.1
VEHÍCULO	13.6 ± 0.5*	14.1 ± 0.8*	14.2±2.4	18.8±4.0
PIRENZEPINA	14.2 ± 0.8	13.6 ± 0.3	13.6±1.2	15.0±1.0

\*p<0.05 vs grupo Intacto (ANOVA seguida de Tukey)

**Tabla 4.** Media ± e.e.m. del peso del ovario izquierdo o del ovario derecho micro-inyectados con vehículo o pirenzepina (ovarios inyectado), y su correspondiente contralateral (no inyectado) en la fase del estro, sacrificados la mañana del estro esperado.

En los animales micro-inyectados con vehículo en el ovario izquierdo ( $138.1 \pm 4.0$  vs.  $134.4 \pm 8.0$ ) o derecho ( $94.5 \pm 25.1$  vs.  $134.4 \pm 8.0$ ), el peso del útero no fue modificado con respecto al grupo de animales intactos. La micro-inyección de PZP no modificó estos resultados (ovario izquierdo inyectado:  $167.9 \pm 20.8$  vs.  $138.1 \pm 4$ ; ovario derecho inyectado:  $152.89 \pm 6.0$  vs.  $94.5 \pm 25.1$ ).

---

Efectos del remplazo de la señal hipotalámica, hipofisaria y ovárica en animales que no habían ovulado por la micro-inyección de PZP en el ovario izquierdo o derecho a las 13:00 h en cada fase del ciclo estral.

## *Diestro-1*

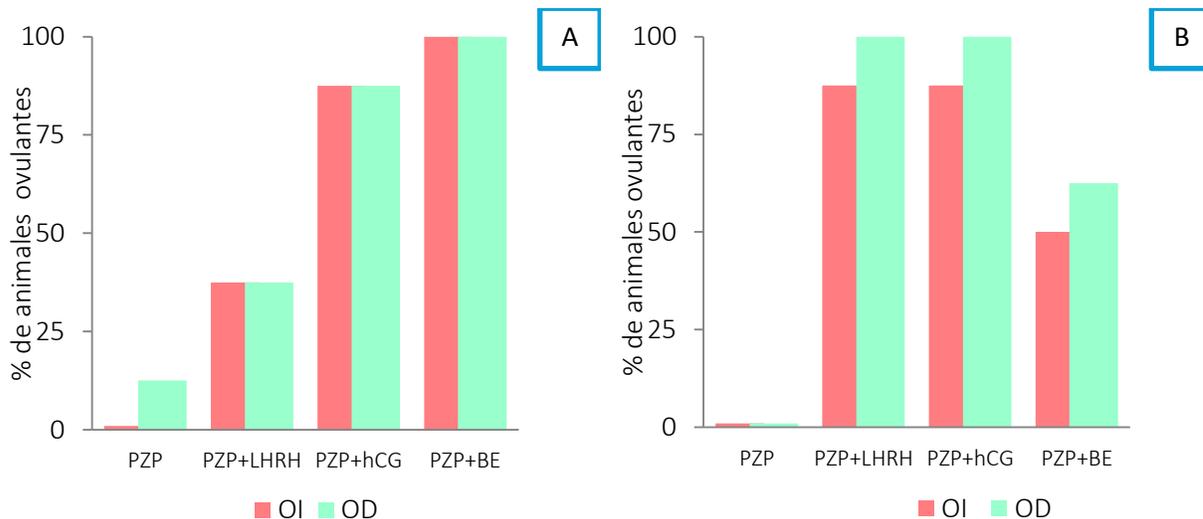
---

### Animales ovulantes

Dado que previamente se mostró que la anestesia en diestro-1 provoca el bloqueo de la ovulación (Min-Poblete y col., 2012), se procedió a estudiar cuál de las “señales” endócrinas fue modificada por el anestésico. El reemplazo de la “señal hipotalámica” no indujo la ovulación (**1/8 vs. 0/8**). La administración de hCG (“señal hipofisaria”) provocó la ovulación en todos los animales tratados (**8/8 vs. 0/8**,  $p < 0.001$ ), mientras que la inyección de benzoato de estradiol (“señal ovárica”) indujo la ovulación en el 50% de los animales (**4/8 vs. 0/8**, no significativa).

El remplazo de las señales hipotalámica e hipofisaria a ratas inyectadas con el vehículo en el ovario izquierdo indujo la ovulación (hipotalámica: 7/8, hipofisaria: 8/8 vs. vehículo: 0/0,  $p < 0.05$ ). En cambio, el remplazo de la señal ovárica no modificó los efectos de la inyección del vehículo (4/8 vs 8/8,  $p = 0.0769$ ).

En los grupos de ratas que no habían ovulado por la micro-inyección de PZP en el ovario izquierdo o derecho, el remplazo de la señal hipotalámica indujo la ovulación únicamente en el 40% de los animales tratados, en cambio en los animales micro-inyectados con el fármaco en el ovario derecho todos ovularon en el día del estro esperado (**Gráfica 6**).

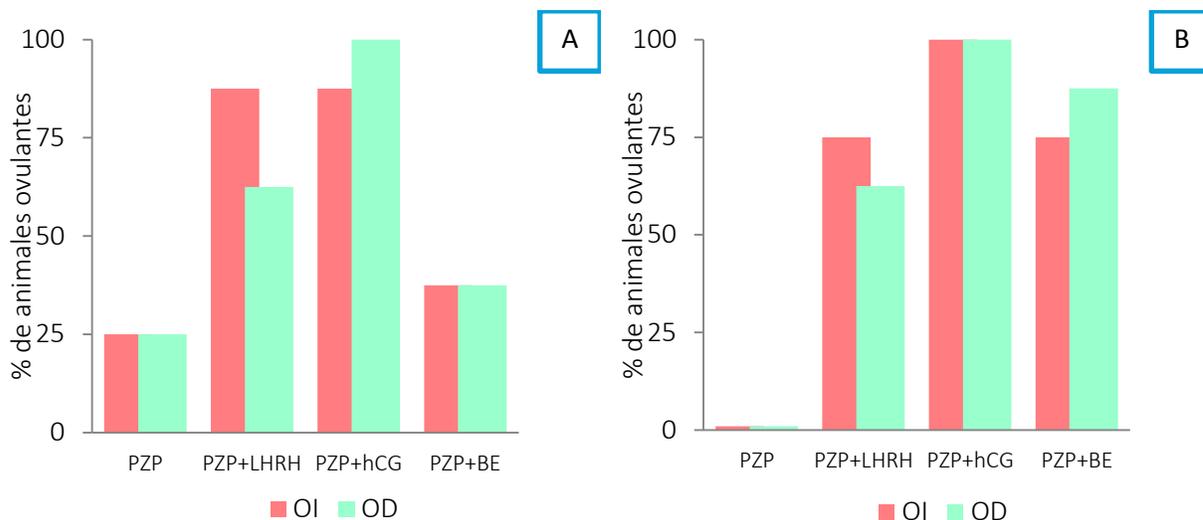


**Gráfica 6.** Porcentaje de animales que ovularon por el ovario izquierdo o el derecho en el día del estro esperado, después de la inyección del LHRH, hCG o BE en ratas tratadas con pirenzepina en el ovario izquierdo (A) o derecho (B) en la fase del diestro-1

## Diestro-2

### Animales Ovulantes

La inyección de LHRH y de hCG y en los grupos de ratas micro-inyectadas con PZP se restableció la ovulación. La inyección de de BE en el ovario izquierdo no estimuló la ovulación; en cambio, en el ovario derecho la restableció (**Gráfica 7**).



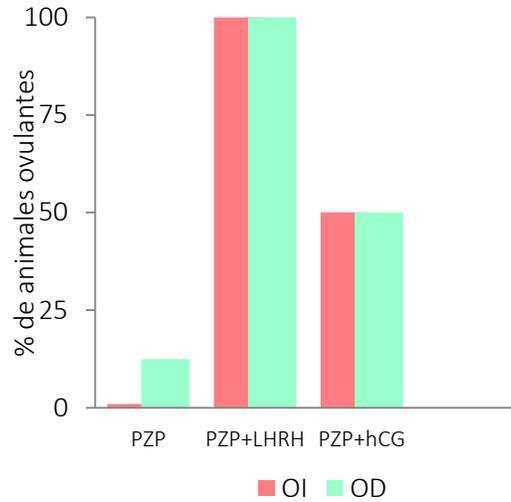
**Gráfica 7.** Porcentaje de animales que ovularon por el ovario izquierdo o el derecho en el día del estro esperado, después de la inyección del LHRH, hCG o BE en ratas tratadas con pirenzepina en el ovario izquierdo (A) o derecho (B) en la fase del diestro-2

## Proestro

---

### Animales Ovulantes

Dado que solo la inyección de PZP en el ovario izquierdo en esta fase del ciclo bloqueó la ovulación, se procedió a realizar el remplazo de las señales hipotalámica e hipofisaria. La inyección de LHRH restableció la ovulación, lo que no sucedió al inyectar la hCG ( $p= 0.2821$ ) (Gráfica 8).



**Gráfica 8.** Porcentaje de animales que ovularon por el ovario izquierdo (OI) o el derecho (OD) en el día del estro esperado, después de la inyección del LHRH, hCG o BE en ratas tratadas con pirenzepina en el ovario izquierdo en la fase del proestro.

# Discusión de resultados.

---

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio sugerimos que en la rata, la unión de ACh a los RM<sub>1</sub> del ovario regula de manera estimulante la ovulación, función que cambia durante el ciclo estral. Este papel de la ACh ocurre al estimular la secreción preovulatoria de la GnRH.

En el día del diestro-1, los ovarios responden de manera diferente al estrés provocado por la inyección del vehículo en la bursa del ovario. Cuando comparamos esta respuesta con el efecto provocado por el anestésico, se llega a la conclusión que en cada ovario se generan señales neuroendocrinas diferentes entre las gónadas. La ausencia de ovulación en los animales anestesiados con Ketamina-Xilazina a las 13:00 h del diestro-1, ya había sido mostrada previamente ([Min-Poblete y col., 2011](#)), pero dado que éste efecto no fue modificado por la micro-inyección de vehículo en el ovario izquierdo (es decir, el animal no ovula), pero sí en el ovario derecho (ya que se indujo la ovulación), se apoya la idea que los mecanismos de regulación entre los ovarios es diferente y que depende de la inervación que reciba cada ovario ([Domínguez y Cruz, 2011](#)).

Dado que en los grupos de animales inyectados en el diestro-1 con vehículo o con pirenzepina en el ovario izquierdo no se modificó el efecto provocado por la anestesia, no podemos concluir si la actividad del receptor en este ovario participa en la regulación de la ovulación. Por el contrario, el agua en el ovario derecho estaría inhibiendo los efectos provocados por el anestésico y estimulando la ovulación. No contamos con una explicación a este efecto pero aparentemente la inyección de agua provocó la expresión de receptores a LH, ya que la inyección de hCG a ratas anestesiadas con ketamina- xilazina indujo la ovulación lo que no sucede cuando se inyecta LHRH o benzoato de estradiol (datos no mostrados).

La disminución del peso del ovario derecho al micro-inyectar en esta misma gónada el agua, en las fases de diestro puede ser explicado como un efecto estresante o una reacción inflamatoria que estaría alterando la receptividad de los folículos a las gonadotropinas o modificando el riego sanguíneo que llega a ese ovario. Durante la cirugía, al exteriorizar el ovario, es posible que se afecten las vías nerviosas que lo inervan, como el plexo ovárico, el cual viaja a lo largo de la arteria ovárica y es fuente de noradrenalina, sustancia P, y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina ([Baljet y Drukker, 1979](#)). Se ha planteado que la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina regulan el flujo sanguíneo al ovario ([Calka y col., 1988](#); [Dees y col., 1986](#)), de tal forma que esta alteración quizá modificó la disponibilidad de FSH que llega al ovario y por lo tanto el crecimiento folicular. En ausencia de la FSH, los folículos no se desarrollan más allá de la etapa pre-antral ([Hunzicker-Dunn y Maizels, 2006](#)).

La activación de los RM<sub>1</sub> que están vinculados con el proceso ovulatorio cambian con el ovario y el día del ciclo. Es decir, la unión de ACh a los RM<sub>1</sub> del ovario izquierdo estimula la ovulación en las fases del diestro-2 y del proestro, mientras que en el ovario derecho esta función ocurre en las fases del diestro-1 y diestro-2.

La ausencia de ovulación en las ratas con bloqueo de los RM<sub>1</sub> en uno u otro ovario puede explicarse por medio de modificaciones en la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH, ya que pulsos de GnRH con frecuencias de aproximadamente una hora estimulan la secreción de LH (Herbison, 2006). Lo que implicaría que la desactivación de los RM<sub>1</sub> del ovario estaría vinculado con el marcapaso de la secreción de la GnRH o con el núcleo supraquiasmático (NSCh), por medio de la vía propuesta entre el ovario y el SNC (Gerendai y col., 2009). La inyección en el ovario del virus de la pseudorabia, utilizado como trazador retrógrado, evidenció la presencia de neuronas marcadas en la médula ventrolateral, en el núcleo magnocelular, en el área postrema, en el núcleo vagal (núcleo del tracto solitario y dorsal del vago), grupos celulares noradrenérgicos A1 y A5, núcleo caudal del rafe, núcleo paraventricular hipotalámico y en el hipotálamo lateral, comprobando de esta manera la existencia de conexiones entre los ovarios y el SNC (Toth y col., 2007).

Otra posibilidad a la falta de ovulación en los animales con bloqueo de los RM<sub>1</sub> sería la alteración de la secreción de estradiol, ya que cuando esta hormona fue administrada, los animales ovularon. Esta idea estaría apoyada si se considera que la secreción de estradiol alla sido alterada por cambios en el crecimiento folicular y en consecuencia la secreción de estradiol. La posible alteración en la concentración de estradiol estaría relacionado con modificaciones en la actividad del nervio ovárico superior, especialmente con la secreción de noradrenalina y del péptido intestinal vasoactivo, neurotransmisores considerados como reguladores de la esteroidogénesis en el ovario (Hsueh, 1994, Aguado y Ojeda, 1984), al regular al sistema aromatasa (Dissen y Ojeda, 1999).

En células de la granulosa aisladas de folículos preovulatorios cultivadas en un medio libre de suero, se mostró que la ACh estimula la secreción de progesterona y de 17β-estradiol, efecto que es bloqueado por atropina (Bódis y col., 1993; Kornya y col., 2001). Luego entonces podemos sugerir que el bloqueo de los RM<sub>1</sub> por la PZP modificó la secreción de 17β-estradiol, y de esta forma la secreción de GnRH.

Esta hipótesis es apoyada por los resultados obtenidos al realizar los remplazos de la GnRH, la LH y el estradiol. De tal forma que la falta de ovulación en los animales inyectados con PZP en el ovario sería resultado de modificaciones en la secreción de la señal hipotalámica, es decir en la secreción de GnRH, generada en el día del proestro, ya que la administración de LHRH sintética a las 14:00 h del proestro esperado indujo la ovulación en los animales con bloqueo de los RM<sub>1</sub> de uno u otro ovario. Este resultado implicaría dos fenómenos:



Uno endócrino, resultado de modificaciones en la secreción preovulatoria de estradiol, ya que cuando éste es administrado a las 14:00 h del diestro-2 esperado, todos los animales tratados con PZP ovularon.



El otro implicaría alteraciones en la señal nerviosa que transcurre desde el ovario al cerebro. Esta vía nerviosa viajaría desde el ovario hasta el hipotálamo a través de la ruta propuesta por [Gerendai y col. \(2009\)](#) y [Toth y col. \(2007\)](#), la que iría desde las astas ventro-laterales de la médula espinal, al núcleo magnocelular, al área postrema, al núcleo vagal (núcleo del tracto solitario y dorsal del vago), a los grupos celulares noradrenérgicos A1 y A5, al núcleo caudal del rafe, al núcleo paraventricular hipotalámico y al hipotálamo lateral.

Es un hecho que la ACh unida a los  $RM_1$  de uno u otro ovario siempre regula la secreción preovulatoria de la GnRH, independientemente del día del ciclo.

La falta de ovulación en ambos ovarios por la ausencia de actividad de los  $RM_1$  del ovario derecho involucra no solo alteraciones en la secreción de la GnRH, sino en la LH, ya que el reemplazo de la hCG resultó en la ovulación de ambos ovarios.

Este mecanismo de regulación de la ACh en los  $RM_1$  ocurriría por medio de las células de la granulosa de folículos preovulatorios, ya que se ha mostrado (por medio de RT-PCR e inmunohistoquímica) que las células de la granulosa de folículos preovulatorios del ovario de la rata expresan el ARNm de  $RM_1$  y  $RM_5$  ([Mayerhofer, 2002](#)).

En la fase del proestro, la activación de los  $RM_1$  del ovario izquierdo estaría regulando la respuesta del folículo a la LH, ya que el peso de los ovarios disminuyó y solo un animal ovuló cinco ovocitos del ovario inyectado. El receptor a LH en las células de la granulosa es inducido por la FSH ([Zelevnik y col., 1974](#)). Las células de la teca expresan el receptor a LH y coincide la formación de las capas de células de la granulosa en las etapas tempranas del crecimiento folicular ([Camp y col., 1991](#); [Gelety y col., 1997](#)). Sin embargo se desconoce si la expresión del receptor a LH es constitutiva en estas células o si es regulada por un factor paracrino, producido por el mismo ovocito o por las células de la granulosa. La FSH promueve de manera estimulante la síntesis de ARNm del receptor a LH en las células de la granulosa por medio de un mecanismo transcripcional ([Shi y Segaloff, 1995](#)).

Otro efecto asimétrico generado por la desactivación de los  $RM_1$  de cada ovario tiene que ver con la secreción de estrógenos. En la fase del diestro-2, el bloqueo de los  $RM_1$  del ovario izquierdo estaría modificando el efecto feedback estimulante de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH, ya que la inyección de benzoato de estradiol no indujo la ovulación. En cambio el bloqueo de los  $RM_1$  del ovario derecho regularía la secreción de estradiol, ya que cuando esta hormona fue reemplazada en los animales con bloqueo de los  $RM_1$  los animales

ovulan. Este efecto del remplazo de estradiol también ocurre en el grupo de animales con bloqueo de los  $RM_1$  del ovario izquierdo llevado a cabo en diestro-1.

El aumento en el peso de los ovarios en los grupos de animales con bloqueo de los  $RM_1$ , sea en el ovario izquierdo o derecho, e inyección de hCG podría estar relacionado con un aumento de receptores a la LH en el ovario, sin embargo sería necesario cuantificarlos para contar con una explicación plausible a este efecto.

## Conclusiones.

---



La ACh unida a los  $RM_1$  del ovario izquierdo o del ovario derecho, en las etapas de diestro1, diestro-2 y proestro regula de manera estimulante la ovulación de ambos ovarios.



El papel estimulante de la ACh sobre la ovulación, al unirse a los  $RM_1$  estimula la secreción preovulatoria de la GnRH y de LH del día del proestro.



En el día del diestro-2, la ACh unida a los  $RM_1$  del ovario izquierdo no altera la secreción de estradiol, sino que interfiere con el efecto de retrocontrol estimulante de los estrógenos en la secreción de GnRH. En cambio, la ACh unida a los  $RM_1$  del ovario derecho regula la secreción de estradiol.

# Referencias.

---

## A

Aguado LI, Ojeda SR (1984). "Prepuberal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation". *Endocrinology* 114: 1845-1853.

Álvarez, I., Tendillo F.J. (2001). Métodos de anestesia, analgesia y eutanasia. En Martín-Zúñiga, J.M. y col., (dir.). *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal*. Madrid (España): McGraw-Hill•Interamericana, , pp 385-418. ISBN 84-486-0310-9

## B

Bajlet B, Drukkler J (1979). "The extrinsic Innervation of the abdominal Organs in the Female Rat" *Acta Anatomica* 104 (3): 243-267.

Bakalkin GY, Tizbezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID, Krivosheev OG (1984). "Lateralization of LHRH in rat hypothalamus". *Brain Research* 296: 361-364.

Baker TG (1982) "Células Germinales Primordiales". En: Austin CR, Short RV. (Coordinadores). *Células Germinales y Fertilización*. Ediciones Científicas La prensa Médica Mexicana, Cap. 1, pp. 1-14.

Batra S, Popper LD, losif CS (1993). "Characterisation of muscarinic cholinergic receptors in human ovaries, ovarian tumors and tumors cells lines". *Eur J. Cancer* 29A: 1302-1306.

Bergman RA, Afifi AK, Heidger PM (1998). "Sistema reproductor femenino". En: *Histología*. Editorial McGraw-Hill- Interamericana. México cap. 16. pp. 307-320.

Berne RM, Levy MN. (2001). "Fisiología". 3º Edición. Eds. Elsevier-Science. Madrid.

Berne RM, Levy MN (2006). "Fisiología". 4a Eds. Editorial Elsevier-Science. Madrid. España. pp 51.

Beynen, A.C., Festing, M.F.W., van Montfort, M.A.J. (1999). *Diseño de experimentos con animales*. En Martín-Zúñiga J. (dir.), *Principios de la ciencia del animal de laboratorio*, Granada (España): Elsevier, pp. 233-268. ISBN 84-605-9222-7

Branson, K. (2003). *Anestésicos inyectables*. En Adams H.R. ed. *Farmacología y Terapéutica veterinaria*. 2ª ed (8ª inglesa) Zaragoza (España). Acribia, , pp. 225-281. ISBN: 84-200-1000-6.

Bódis J, Tinneberg HR, Papenfuss F, Török A, Cledon P, Hanf V, Schwarz H. (1993). "Cholinergic stimulation of progesterone and estradiol secretion by human granulosa cells cultured in serum-free medium". *Gynecol Endocrinol*. Jun;7(2):83-7.

Bousfield GR (1999). "LH (Luteinizing Hormone)". Encyclopedia of Reproduction. Vol 2. Academic Press. Pp 1034-1038.

## C

Calka J, McDonald JK, Ojeda SR. (1988). "The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide". Biol Reprod 39: 1215-1223.

Camp, T. A., Rahal, J. O., and Mayo, K. E. (1991). Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. Mol. Endocrinol. 5, 1405–1417.

Carlson BM. (2009) "Embriología Humana y Biología del Desarrollo". 4ª edición, Editorial Elsevier , Ámsterdam. Cap. 1, 16. Pp. 3-13, 416-428.

Charly JL. Ponce G. Joseph BP. (1990). "Los mecanismos de la regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas". En: Domínguez Casalá (Ed.). Tópicos selectos de la Reproducción. México. UNAM-M. A. Porrúa. Cap. 3. pp 58-81.

Chávez R, Cruz ME, Domínguez R. (1987c). "Differences in the Ovulation rate of the right and left ovary in unilaterally ovariectomized rats: effects of ipsi and contraateral section of the vagus nerves on the remaining ovary". Journal of Endocrinology. 113 pag: 397-401.

Czepita D (2005). "Fundamentals of modern treatment of myopia". Ann Acad Med Stetin 51 (2): pp. 5-9.

Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez JO, Chavira R, Domínguez R. (2006). "The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model". Reprod Biol Endocrinol. ;4:43.

## D

Dees W L, Ahmed CE, Ojeda SR. (1986) "Substance P and Vasoactive Intestinal Peptide. Containing Fibers Reach the Ovary by Independent Routes" Endocrinology 119:638-641

Dissen G, Ojeda SR. (1999). "Ovarian innervation" Encyclopedia of reproduction. Academic Press. USA. 3: 583-589.

Domínguez R., Cruz ME., Chávez R. (1989). "Differences in the ovulatory ability between the right and the left ovary related to ovary innervation. In Growth factors and the ovary" pp 321-323 Ed. AN Hirshfield. Plenum Press, New York and London.

Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991) "la Regulación de Crecimiento y del Desarrollo del Folículo Ovárico". En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Miguel Ángel Porrúa. México. Pp. 161-192.

Domínguez R, Cruz ME y Morán C. (1998). "Differential effects of ovarian local anaesthesia during pro-oestrus on ovulation by the right or left ovary in normal and hemi-ovariectomized adult rats". Journal of Reproduction and fertility. En: Unit Biology of Reproduction on Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF.

Domínguez R, Cruz SE. (2011). "The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions". In endocrinology & Metabolic Syndrome. 2161-1017 EMS.

## E

Espey LL, Lipner H. (1994). "Ovulation". En: The Physiology of reproduction, Segunda edición. Vol. 1. Eds: Knobil E, Neill JD. Raven Press, New York, Cap. 13, 725-780.

Espey LL. (1999). "Ovulation". En Encyclopedia of reproduction. Vol. 3. Eds: Knobil E, Neill JD. Academic Press. USA. 590-595.

## F

Fawcett DW. (1995). Tratado de Histología. Duodécima edición. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid. Pag: 885-893.

Feder HH. (1981) "Estrous Cyclicity in Mammals" En: Adler NT. (Ed.) Neuroendocrinology of Reproduction, Physiology and Behavior. Plenum Press. New York. Chaper 10. Pp. 279-308.

Flecknell, P., (1987). Laboratory animal anesthesia. Accademic. London. Citado por Hawk,C.T. and Leary, S.L. Formulary for laboratory animal.2nd ed. Iowa (USA) Iowa State University Press, 1999, pp. 42-44, 47. ISBN: 0-8138- 2468-0

Flecknell P., (2003). Anesthesia in rodents and rabbits. En: McKelvey, D., Wayne Hollingshead, K. (dir.), Veterinary anesthesia and analgesia. Editado por McKelvey, D., Wayne Hollingshead, K. 3ª ed. Missouri (USA): Mosby, , pp. 350-384. ISBN 0-323-01988-9

Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Barco AI, Chavira R, Domínguez R, Cruz ME. (2005). "The participation of the Cholinergic System in regulating Progesterone secretion through the ovarían-adrenal crosstalk varies along the estrous Cycle". Endocrine. 28: 145-151.

Flores A, Rodríguez JO, Palafox MT, Meléndez G, Barco AI, Chavira R, Cruz ME, Domínguez R. (2006). "The Acutte Asymmetric Effects of Hemiovariectomy on Testosterone secretion vary along the estrous Cycle. The Participation of the Cholinergic System". Reproductive Biology and Endocrinology 1:4-11.

Flores A, Gallegos AI, Velazco J, Mendoza FD, Montiel C, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. (2008). "The Acute Effects of Bilateral Ovariectomy or Adrenalectomy on Progesterone, Testosterone and Estradiol Serum Levels depend on the surgical approach and the day of the Estrous Cycle when they are performed". *Reproductive Biology and Endocrinology*. 6: 48.

Freeman ME. (2006). "The Neuroendocrine control of the ovarian cycle of rat". En: *The Physiology of Reproduction, Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds.) Academic Press. U.S.A. Vol 1: 613-654.

Fritz S, Föhr KJ, Boddien S, Berg U, Brucker C, Mayerhofer A. (1999). "Functional and molecular characterization of a muscarinic receptor type and evidence for expression of choline-acetyltransferase and vesicular acetylcholine transporter in human granulosa-luteal cells". *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1744-1750.

Fritz S, I. Wessler, R. Breitling, W. Rossmannith, S. R. Ojeda, G. A. Dissen, A. Amsterdam, and A. Myerhofer. (2001). "Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence from nonneuronal acetylcholine synthesis". *The journal of clinical endocrinology and metabolism*. 86: 349-353.

Fritz S, Kunz L, Dimitrijevic N, Grunert R, Heiss C, Mayerhofer A. (2002). "Muscarinic receptors in human luteinized granulosa cells: activation blocks gap junctions and induces the transcription factor early growth response factor-1". *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1362-1367.

## G

Gelety, T. J., and Magoffin, D. A. (1997). Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biol. Reprod*. 56, 938-945.

Gerendai I, Halász B. (1997). Neuroendocrine Asymmetry. *Frontiers in neuroendocrinology*. Vol. 18, Article No. FN970154. 354-381.

Gerendai I, Tóth I.E, Boldogkoi (2009). "Recent Findings on the Organization of Central Nervous System Structures Involved in the Innervation of Endocrine Glands and other Organs; Observations Obtained by the transneuronal Viral Double-Labeling Technique". *Endocrinology*. 36: 179-188.

Goldfien A y Monroe S.E. (1998) "Ovarios". En Greenspan F.S, Strewler G.J. (Eds) *Endocrinología básica y clínica*. 4º edición. Editorial el manual moderno. Mexico D.F. Cap. 13. pp 497-554.

Goldfien A, Monroe SE. (2000) "Ovarios". En: Greenspan FS, Strewler GJ. (Eds.) Endocrinología Básica y Clínica. 4a edición. Editorial El Manual Moderno. México, D. F. Cap. 13. pp. 497-554.

Gomez-Villamandos, R.J., Ruiz, I. (2001). Anestésicos intravenosos. En Gómez – Villamandos, R.J., (dir.), Anestesiología, reanimación y terapia del dolor en pequeños animales. Córdoba (España): Grupo de Investigación "Anestesiología" de la Junta de Andalucía-Copisterías Don Folio, pp. 46-54. ISBN 84-607-3172-3

González, A., Pereira, J.L. (2002). Anestésicos generales inyectables. En: Botana, L., Landoni, F., Martín, T., (dir.), Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Madrid:McGraw-Hill•Interamericana, , pp. 195-207. ISBN 84- 486-0471-7

Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1994) "Follicular Steroidogenesis and its Control" En: Knobil E, Neill JD. (Eds.) The Physiology of Reproduction". 2nd edition. Editorial Raven Press. New York. Vol 2. Cap. 11. pp 571-611.

Green C. J., Knight J., Precious S. and Simpkin S. (1981). "Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience" Lab Anim 1981 15: 163

Greenwald GS, Roy SK. (1994). "Follicular Development and its Control". En:Knobil E, Neill JD. (Eds.) The Physiology of Reproduction". 2nd edition. Editorial Raven Press. New York. Vol. 2. Cap. 12. Pp. 629-724. Guyton A. (1986). Tratado de Fisiología Médica. 6ª edición, Nueva Editorial Interamericana, México, D. F. Cap. 81, pp. 1186-1198.

Guyton A. (1986) "Tratado de Fisiología Médica". 6ª edición, Nueva Editorial Interamericana, México, D. F. Cap. 81, pp. 1186-1198.

## H

Halász B. (2000). The Hypothalamus as an endocrine organ. En: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Totowa New Jersey USA: Humana Press. . 3-21.

Hawk, C.T. and Leary, S.L. (1999). Formulary for laboratory animal. 2nd ed. Iowa (USA) Iowa State University Press, , ISBN: 0-8138-2468-0

Herbison AE. (2006). Physiology of Gonadotropin-Releasing-Hormone Neural Network. En: The physiology of reproduction. 3th Ed. Knobil E y Neill J (Eds.). Raven Press USA. 1415-1482.

Herbison AE. (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). Centre for Neuroendocrinology, Department of Physiology, School of Medical Sciences,

University of Otago School of Medical Sciences, P.O. Box 913, Dunedin, New Zealand. Brain Res Rev. 277-287.

Herde MK, Geist K, Campbell RE, Herbison AE. (2011). Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. Department of Physiology and Centre for Neuroendocrinology, University of Otago, Dunedin 9054, New Zealand. Endocrinology. 3589-3591.

Hirshfield AN. (1997). "Overview of ovarian follicular development: consideration of toxicologist". Environmental and molecular mutagenesis. 29:10-15.

Hsueh, AJW, Erickson GF, Papkof H. (1983). "Effect of diverse mammalian gonadotropins on estrogen and progesterone production by cultured rat granulosa cell". En: Arch. Biochem. Biophys. 225; 505-511.

Hsueh AJW, Billig H y Tsafiriri A. (1994). "Ovaria follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process". Endocrinology Rev. 15:707-724.

Hunter RHF, Cook B and Baker TG (1985). "Intersexuality in five pigs, with particular reference to oestrous cycle, the ovotestis, steroid hormone secretion and potential fertility". Journal and Endocrinology 106 233-242

Hunzicker-Dunn M, and Maizels TE (2006). "FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: Branching out from protein kinase A" .Cell Signal. 18(9): 1351–1359.

## J

Jácome RA. (2005). Fisiología endocrina. 3ª edición. Editorial Academia Nacional de Medicina. Colombia. pag: 60-65.

Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) producing neurons. Journal of Comparative Neurology; 232:534-547.

## K

Kapia A y Hsueh AJW. (1997). "Regulation of ovarian follicle atresia". Annual Review Physiology. 59: 349-363.

Kawakami M, Kubo K, Uemura T, Moriharu N, Hayashi R. (1981) Involvement of Ovarian Innervation in Steroid Secretion, Endocrinology, The Endocrinology Society, 109: 1

Kilen SD, Schwartz B. (1998) Estrous cycle. En: Encyclopedia of reproduction. Knobil E y Neill JD. Academic Press. U.S.A. pag: 127-136.

Kilen SM, Schwarch B. (1999) Estros cycle. En Knobil E, Neill JD. Encyclopedia of Reproduction. Eds. Academic Press. San Diego. 2. pag: 127-135.

Kim C.-Y., Wakabayashi K. y Nobugata T. (1994). Time-Dependent Ovulation-Blocking Effect of Ether Anesthesia Differs from Pentobarbital in Rats. *Tohoku J. Exp. Med.*, 1994, 172 (3), 237-242pp.

Klein CM, Burden HW. (1988) Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci. Lett.* 85 pag: 217-222.

Knobil E. (1980). Neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res.* 36 pag: 53.

Knobil, E. (1999). "Regulation of gonadal activity in the primate and in the human". *Bulletin et mémoires de l'Académie royale de médecine de Belgique*, 154.

Knobil E, Neill JD. (2006). "Physiology of reproduction" 3° edición. Elsevier academic Press. USA. Pp. 3269.

Kordon C, Drouva SV, Martinez de la Escalera G, Weiner RI. (1994) Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: Knobil JD, Neill. *The Physiology of Reproduction*. 2a edición. Eds: Raven Press. New York. 27 pag: 725-780.

Kornya L, Bodis J, Koppan M, Tinneberg HR, Török A. (2001). "Modulatory effect of Acetylcholine on gonadotropin-stimulated human granulosa cell steroid secretion". *Gynecological obstetrics and investigation.* 52(2): 104-107.

## L

Li M, Zhou T, Gao Y, Zhang N, Li J. (2007). "Ultrastructure and estrogen Regulation the lymphatic stomata of ovarian bursa in mice". *The anatomical Record.* 290: 1195-1202.

Lorenzo GPL. (1992) Maduración in vitro de Oocitos de Ganado Vacuno. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria.

Lumb, W. V. (1963). *Small Animal Anesthesia*. Philadelphia: Lea and Febiger.

## M

Mandl AM. (1963). "Pre-ovulatory changes in the oocyte of the adult rat". *Proc R Soc Lond*, 158 pag: 105-118.

Martin CG, Sack M, Talbot P. (1981). "Structure of bursae ovaricae surrounding the ovaries of Golden Hamster". The anatomical Record. 201(3) 485-498.

Matsuo H, Bba Y, Nair RM, Arimura A, Schaky AV. (1971). Structure of the porcine LH- and FS-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. Biochem Biophys Res Commun. 43: 1334-1339.

Mayerhofer A, Fritz S. (2002). "Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system". Microsc Res Tech. 59(6): 503-508.

Mayerhofer A, Kunz L. (2005). "A non-neuronal cholinergic system of the ovary follicle". Ann Anat. 187 pag: 521-528.

Mayerhofer A, Kunz L, Krieger A, Proskocil B, Spindel E, Amsterdam A, Dissen G, Ojeda S and Wessler I. (2006). "FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells". Reproductive Biology and Endocrinology. Deutschland.

McCann SM, Karanth S, Mastronardi CA, Dees WL, Childs G, Miller B, Sower S, Yu WH. (2011). Control of gonadotropin secretion by follicle-stimulating hormone-releasing factor, luteinizing hormone-releasing hormone, and leptin. Department of Basic Science, Pennington Biomedical Research Center, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70808-3030, USA. 476-85.

Mendoza PN. (2008). "Farmacología Médica". Ed Panamericana S. A. de C. V., México D.F., 213-219.

MIN-POBLETE IE, PÉREZ MJ, LÓPEZ AS, SAN AGUSTIN EM, FLORES A, DOMINGUEZ R, CRUZ ME. "Los efectos del pentobarbital o la xilacina-ketamina sobre la ovulación dependen de la hora y de la etapa del ciclo". LIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, 10-14 de septiembre del 2011. León Gto. México

Mittwoch V. (1975). Lateral asymmetry and gonadal differentiation. Lancet. 1: 401-402.

Morse AM, Van Wagenen G. (1936) Observations upon ovulation in primates American Journal of Obstetrics and Gynecology 32 pag: 823-832.

## O

O'Malley B W, Strott Ch A. (2001). "Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción". En Endocrinología de la reproducción fisiología, fitopatología y manejo clínico. Yen S C, Jaffe R B y Barbieri R I. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 118-143.

Oliver RH, Chen GD, Yeh J. (1999) Graafian Follicle. En: Knobil E, Neill JD. Eds:Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. San Diego. 2 pag: 565-568.

## P

Pedernera EA. (1993). "Cooperación Celular en la Biosíntesis de Hormonas Esteroides". En: Comunicación Neuroendocrina, Bases celulares y Moleculares. Editorial sociedad mexicana de Ciencias Fisiológicas. México. pag: 33-46.

Picton HM, Gosden RG. (1999). "Oogenesis, in Mammals". En: Knobil E, Neill JD. Eds: Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. San Diego. 3 pag: 488-497.

Potashnik G, Insler V, Meizner J. (1987). "Frequency sequence and side of ovulation in woman menstruating normally". British Medical Journal. pag:294 219.

## R

Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. (2002) "Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization". Recent Prog Horm Res, 57:195-220.

Ross M, Romrell L, Kaye G. (1997). "Histología". 3a edición. Eds: Médica Panamericana. México. pag: 674-710.

Ross M, Kaye G, Paulina W. (2005). "Histología texto y atlas a color de biología celular y molecular". 4° edición. Eds: Médica Panamericana. Buenos Aires. pag: 735-736.

Roth C. Schricker M., Lakomek AS., Heiden H., Luft U., Munzel W y Jarry H. (2001). Autoregulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system during puberty: effects of antagonistic versus agonistic GnRH analogs in female rat model. Journal of endocrinology. pp. 361-367.

## S

Sánchez-Criado JE. (1999). "Fisiología del ovario". En: Tresguerrres JA. Eds: Fisiología Humana. 2° edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid. Cap. 75 pag: 1020-1032.

Sánchez-Criado JE. (2003). "Fisiología del ovario". En: Fisiología humana. 2ª Ed. México: McGraw-Hill Interamerican. pag: 1036-1048.

Shalgui R, Kaplan R, Kraicer PF. (1977). "Proteins of follicular, bursal and ampullar fluids of rats". Biology of Reproduction. 17: 333-338.

Shi, H., and Segaloff, D. L. (1995). A role for increased lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR) gene transcription in the follitropin-stimulated induction of the LHR in granulosa cells. Mol. Endocrinol. 9, 734-744.

Siatkowski RM, Cotter SA, Crockett RS, Miller JM, Novack GD, Zadnik K; (2008) "Pirenzepine Study Group. Two-year multicenter, randomized, double-masked, placebo-controlled, parallel safety and efficacy study of 2% pirenzepine ophthalmic gel in children with myopia".

Silverman AJ, Livne I, Witkin JW. (1994). "The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridation". En: Knobil JD, Neill. Eds: The Physiology of Reproduction. 2ª edición. Raven Press, New York. 28. pag: 1683-1711.

## T

Tresguerres JAF. (1999) Introducción al Sistema Endocrino: Concepto de Hormona. En: Aguilar BLE, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil LP, Lahera JV, Martínez VJ, Mora TF, Rodríguez RR, Romana PM, Tamargo MJ, Zarco GP. Eds: Fisiología Humana. 2ª edición. Editorial Mc Graw Hill. Madrid España. pag: 814-844.

Tóth IE, Wiesel O, Boldogkoi Z, Bálnit K, Tapaszi Z, Gerendai I. (2007) Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. Microsc Res Tech 70 pag: 710-718.

Turi Gergely F., Zsolt Liposits, Erik Hrabovszky. (2008). Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. Eur J Neurochem. 723-728.

## V

Valenstein, E. S. A note on anesthetizing rats and guinea pigs. J Exp Biol. 4: 6, 1971.

Vanderhyden BC, Rouleau A, Armstrong DT. (1986) Effect of removal of the ovarian bursa of the rat on infundibular retrieval and subsequent development of ovulated oocytes. J Reprod Fertil. (2):393-9.

Van Voorhis BJ. (1999). "Follicular steroidogenesis". En: encyclopedia of reproduction. Knobil E, Neill J. D Eds: Academic Press, USA.

Van Voorhis BJ. (1999a). "Follicular Development". En: Knobil E, Neill JD Eds: Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. San Diego. 2 pag: 389-395.

Van Voorhis BJ. (1999b). "Follicular Steroidogenesis". En: Knobil E, Neill JD. Eds: Encyclopedia of Reproduction. Academic Press. San Diego. 2 pag: 389-395.

Velasco M.A., Alvarez G.F.J (1988). Compendio de Psiconeurofarmacología, Ed. Diaz de Santos. Madrid.

## W

Wong KHH, Adashi EY. (1998). "Granulosa Cells". En: Encyclopedia of Reproduction, Editores: Knobil E, Neill JD. Academic Press. USA. 3 pag: 569-571.

## Y

Yao HH, Bahr JM. (1998). "Granulosa Cells". En: Enciclopedia of Reproduction, Editores Knobil E, Neill JD. Academic Press, Usa Vol. 3 pag:569-571.

Yao HH, Bahr JM (1999). "Ovary, overview". Encyclopedia of reproduction. U.S.A. Academic Press. 3 pag: 590-595.

Yen J, Adashi EY. (2001). El ciclo ovárico. En: Endocrinología de la reproducción. Yen S, Jaffe R, Barbieri R. editorial Médica Panamericana. Cuarta Edición México. 164-202.

## Z

Zambricki, E.A., Dalecy, L.G. (2004). Rat sex differences in anesthesia. Comp Med, vol. 54, nº 1, p. 49-53.

Zeleznik, A. J., Midgley, A. R. Jr., and Reichert, L. E. Jr. (1974). Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. Endocrinology 95, 818–825.

# Anexo

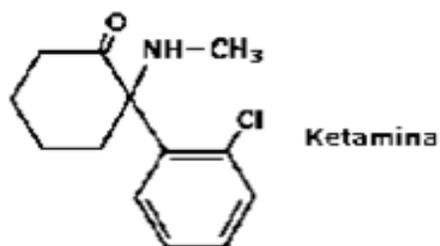
El uso de animales como modelo de experimentación ha contribuido ampliamente en la investigación básica y aplicada, siendo las especies de roedores uno de los grupos más importantes en el campo de experimentación. La administración de anestésicos por vía intraperitoneal (IP) es la de uso más frecuente (Flecknell 2003).

Los agentes anestésicos afectan los sistemas reproductor, cardiovascular, respiratorio y termorregulador, además del sistema nervioso central (SNC). Otros factores que también influyen (Zambricki, 2004), además de la variabilidad individual, son la especie, la cepa, la edad y el sexo (Beynen y col., 1999; Zambricki, 2004).

La anestesia de pequeños animales representa un continuo problema para los investigadores en muchos laboratorios. Valenstein (1971) señaló que, aunque el éter es un anestésico seguro, (a) puede hacer elevar la presión arterial, lo que aumenta el sangrado durante la cirugía, y (b) su volatilidad puede hacer que sea un peligro para la seguridad bajo ciertas condiciones. Por estas razones, la anestesia con barbitúricos se ha popularizado en los últimos años. En concreto, pentobarbital sódico (Nembutal) ha ganado una amplia aceptación por ser un agente eficaz para anestesiarse pequeños animales como la rata (Lumb 1963).

## 1. Ketamina

La 2-(o-clorofenil)-2-(metilamina)-ciclohexanona (Branson, 2003) o ketamina es un derivado de la fenciclidina que tiene propiedades analgésicas que no produce efectos permanentes de orden neurológico o fisiológico, pero afecta el sistema cardiovascular, induce amnesia y anestesia por disrupción funcional (disociación) del SNC induciendo la pérdida de conciencia que es similar al estado catatónico (Machado y col., 2009).



La ketamina es un anestésico de uso muy generalizado en la práctica clínica veterinaria. Asimismo este fármaco es de gran utilidad en el manejo y contención de especies de laboratorio y en la captura y transporte de animales salvajes (González y Pereira, 2002).

La ketamina sola tiene un efecto muy limitado en ratones y en otras especies, incluso a dosis elevadas (Flecknell, 2003) y no se suele alcanzar una inconciencia adecuada (Hawk y Leary, 1999) pero se considera un anestésico de extraordinaria seguridad y eficacia combinado con otras sustancia depresoras del SNC. Su falta de acción depresora en los sistemas cardio-respiratorios no tiene igual en ningún otro anestésico general existente (Branson, 2003).

En ratones, cuando es utilizada en combinación con la xilazina induce un tipo de anestesia general, es decir, provoca un estado transitorio, reversible, de depresión del SNC, caracterizado por pérdida de la conciencia, sensibilidad, motilidad y los reflejos (He y col., 2010).

## 2. Xilazina

La xilazina es un cristal incoloro, soluble en agua, que se usa como analgésico, sedante no narcótico, relajante muscular y que provoca temblor muscular, bradicardia, bloqueo atrioventricular parcial. Químicamente la xilazina es 2(2,6-dimetilfenilamino)-4H-5,6-dihidro-1,3- tiazina. Es una sustancia relacionada con la clonidina, fármaco que se ha usado para controlar la hipertensión arterial en el hombre. El principal uso de la xilazina en animales de laboratorio es su combinación con ketamina para producir anestesia quirúrgica. Se ha descrito en ratas y ratones que la combinación ketamina-xilazina produce hiperglucemia e incremento de la diuresis por lo que se debería usar con precaución en caso de problemas renales o de obstrucción de vías urinarias (Álvarez y Tendillo, 2001; Gómez-Villamandos y Ruiz, 2001). Algunas áreas del cerebro, como el sistema límbico son estimuladas, mientras que el tálamo se deprime. La asociación Ketamina-Xilazina (K-X) es una de las mezclas más empleadas para inducir la anestesia general en ratones (Flecknell, 1987).

Para anestesiar a un animal se requiere administrar una concentración mínima efectiva que actúe sobre el sistema nervioso central, la que estará sujeta a una concentración mínima efectiva alveolar, la que a su vez depende de la concentración mínima efectiva en el aire inspirado. Esta combinación de efectos se ha alcanzado en la siguiente relación ketamina/xilacina, la cual se utiliza para anestesiar a una gran variedad de especies de roedores. (Servicio de Cirugía Experimental y Bioterio. CMN 20 de Noviembre, ISSSTE):

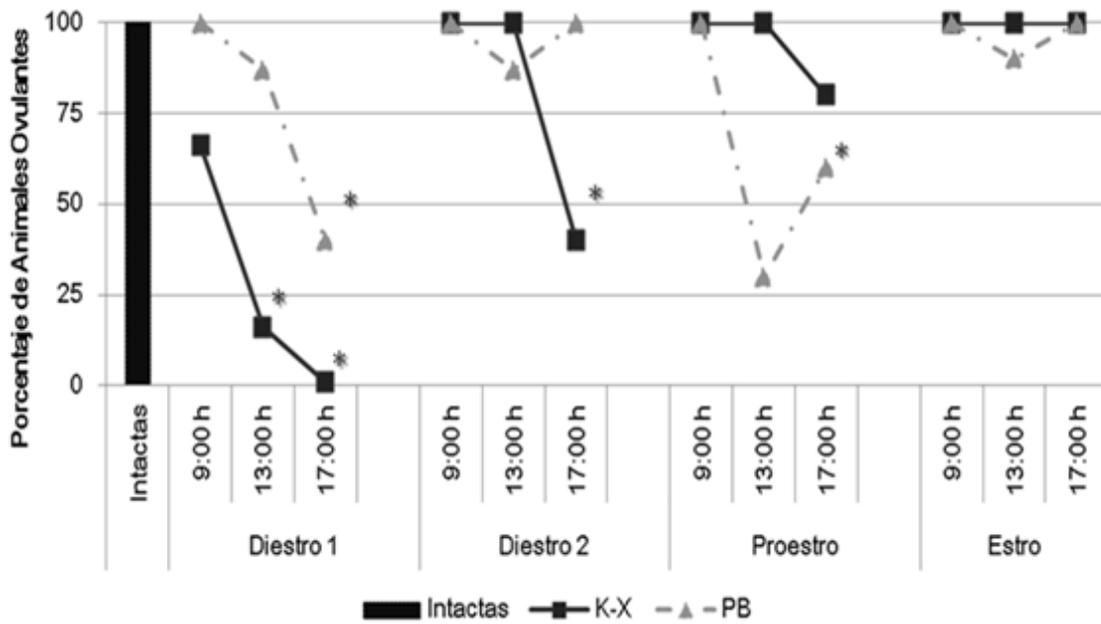
Ketamina 100 mg/kg (presentación 500 mg/10 ml).  
Xilacina 13 mg/kg (presentación 200 mg/ 100 ml).

Por ejemplo, para una rata de 300 a 304 g, se inyectan: Ketamina 30.0 mg o 0.60 ml y Xilazina 3.9 mg o 0.20 ml. (Unidad de microcirugía. Depto. de Cirugía Experimental. F.M. UNAM. C.U.)

En las ratas, la ketamina (20-40 mg/kg im) induce un estado parecido a la anestesia general por 20-40 min. Se requieren unos 10 min para lograr el efecto máximo, y los animales se recuperan completamente en aproximadamente 2 hrs.

Los barbitúricos son sustancias sólidas, cristalinas, pulverulentas, de color blanco, inodoras, de sabor ligeramente amargo, escasamente solubles en agua. Inducen y mantienen anestesia general, son potentes depresores respiratorios y tienen efectos variables sobre el sistema cardiovascular. Los barbitúricos como el pentobarbital (PB) incrementan la liberación de GABA, deprimen la actividad de la corteza cerebral y del tálamo, así como áreas motoras y sensoriales del cerebro. Es uno de los anestésicos generales más usados en los estudios con animales, su mayor ventaja es su bajo costo, pero tiene un bajo efecto analgésico, ya que se requiere de dosis relativamente grandes para amortiguar la percepción del dolor (Machado y col., 2009).

El PB afecta la ovulación; en la rata la administración de éste analgésico a las 14:00 h del día del proestro retrasa 24 h la ovulación (Kim y col., 1994).



**Gráfica 1a.** Efecto de la inyección de Pentobarbital o Ketamina-Xilazina a las 9:00, 13:00 o 17:00 horas en cada día del ciclo estral sobre el porcentaje de animales ovulantes en el día del estro esperado. \*  $p < 0.05$  vs Intactas (Prueba exacta de Fisher)

La inyección de la combinación de Ketamina-Xilazina en el día del diestro-1 bloquea la ovulación, como resultado del bloqueo de la secreción fásica de la GnRH y por ende de las gonadotropinas, ya que atraviesa la barrera hematoencefálica y modifica el componente lipídico de la membrana, lo que lleva a la membrana a tornarse más fluida, interfiriendo con el intercambio rápido de los iones cloro, sodio, potasio, calcio y con la liberación de neurotransmisores. Esta falta de ovulación sería el resultado del efecto inhibitorio provocado por el sistema GABA (ácido gamma amino-butirico) sobre la neurona GnRH, ya que los barbitúricos facilitan los efectos de este neurotransmisor al prolongar el tiempo de apertura del canal para el cloro (Velasco y Álvarez, 1988).

La mezcla de ketamina-xilazina es un anestésico que puede ser utilizado en las fases del estro, diestro-2 o proestro, a las 13:00 h, para llevar a cabo cirugías relacionadas con el área de la Biología de la Reproducción, con la certeza de que no modificará la ovulación de la rata. Además que este anestésico no deberá utilizarse en el medio día del diestro-1, porque interfiere con los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación.