



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN  
LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

### EFFECTOS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN EL DÍA DEL DIESTRO-2 SOBRE LA OVULACIÓN ESPONTÁNEA DE LA RATA ADULTA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

**Melani Areli Velazco Mendoza**



Directora de Tesis: Dra. María Esther Cruz Beltrán  
México, D.F. 2013



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN  
LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGÍA

### EFECTOS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN EL DÍA DEL DIESTRO-2 SOBRE LA OVULACIÓN ESPONTÁNEA DE LA RATA ADULTA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A:

**MELANI ARELI VELAZCO MENDOZA**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN**

**Financiada por CONACYT (Convenio 81898)**

**MÉXICO, D.F.**

**Marzo 2013**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**"ZARAGOZA"**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **VELAZCO MENDOZA MELANI ARELI**, con número de cuenta **408091385**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **5** del mes de **marzo** de 2013 a las **10:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ  
VOCAL DRA. CRUZ BELTRÁN MARÍA ESTHER  
SECRETARIO M. C. RAÚL ZAVALA CHAVERO  
SUPLENTE DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR  
SUPLENTE M. en IBSh. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

El título de la tesis que presenta es: **Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en el día del diestro-2 sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
México, D. F., a 10 de diciembre de 2012.

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR  
ZARAGOZA  
DIRECCIÓN

RECIBÍ -  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
DR. CARLOS CASTILLO JOS CRUZ  
JEFE DE CARRERA



*Doy gracias a mi Dios  
por el plan que me tiene preparado,  
por la bendición de la sabiduría  
y por la oportunidad de enorgullecer  
a mis padres y a mis hermanos.*

Melania VeMe

## Este trabajo está dedicado especialmente...

*A mi familia, por creer en mí y ser parte de quien soy, los quiero mucho, “como me es justo sentir esto de todos vosotros, por cuanto los tengo en el corazón, todos vosotros sois participantes conmigo de la gracia”.*

Papi: Dedico parte de este trabajo a ti, por mostrarme cómo es que tengo que esforzarme cada día para lograr mis sueños, por el apoyo incondicional y la motivación, gracias por enseñarme a canalizar mis emociones y sacar la casta; por admirarme Te Amo Papi.

Mami: Eres parte de este gozo por tu dedicación, tu apoyo y tener fe en mí, gracias porque me has criado con amor y he crecido, con sencillez en el corazón y con determinación para lograr mis sueños; por ser un ejemplo a seguir Te Amo Mami.

Arturo: Me has enseñado y cuidado cuando lo he necesitado, has sido un impulso de quien soy ahora ya que has sido parte de mí toda mi vida, gracias por quererme tanto; por ser como eres Te Amo hermanito.

Adriana: Has sido mi amiga y mi incondicional desde que nací, siempre has sido para tu hermana menor digna de admiración, gracias por tus palabras de aliento y ánimo; por ser como eres Te Amo hermanita.

Anahí: Me has enseñado lo que es compartir y como ser una persona fuerte, has sido para mí un gran apoyo, gracias por esperar siempre lo mejor de mí; por ser como eres Te Amo hermanita.

Ariel: A pesar de ser la más pequeña también he aprendido de ti, me has enseñado a cuidar de quienes amo y a ser mejor todos los días, gracias por creer en mí; por ser como eres Te Amo hermanita.

Ches: Eres parte de mi familia y parte de éste logro, aprendí de ti a disfrutar cada nuevo día, y lo agradezco siempre serás parte de mí.

*A mi amor, por cuanto te tengo también en el corazón eres participante conmigo de la gracia.*

Miguel Angel: Eres un gran compañero, has demostrado ser el amigo de quien no quiero alejarme, gracias por estar a mi lado, Maico por nunca dejar de ser Te Amo.

## AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado por sus sugerencias y por su tiempo; por participar en el inicio de una nueva etapa:

- Dr. Roberto Domínguez Casalá
- M. C. Raúl Zavala Chavero
- Dra. María Elena Ayala Escobar
- M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez

A la Dra. María Esther Cruz Beltrán, su tiempo y su dedicación han dado resultados, resultados que pueden publicarse, GRACIAS.

Al Bioterio de Campus-II por proporcionar a nuestro modelo experimental para la realización de este trabajo.

A mis amigos:

- Karla, Eli, Ceci, Elias, Mariana Lili, Rulo, Peter, Croma, Barra, Daiana, Min, Itza, Kaleb, Orlando, gracias por su amistad y por los momentos agradables que hemos pasado juntos.
- Aideé, por ser mi compañera mientras realizaba la parte experimental de este trabajo, gracias por tu tiempo, te quiero amiga.
- Marian, por tu apoyo gracias amiga, por hacer ameno el cambio al iniciar la carrera.
- Chantal, por ser como eres y confiar en mí gracias, te quiero.
- Cinthya y Martin, han sido parte de mis días en la universidad, gracias por hacerme sentir en casa, gracias por ser parte de esto, los quiero.

Al laboratorio de neuroendocrinología, Blanch, Jenn, Sandy, Reynoso, Jess, Yadi, Esteban; por crear una atmosfera agradable para el trabajo y el aprendizaje. GRACIAS.

A Uriel Hidalgo Lerma, por tu cooperación con la ilustración del modelo experimental de mi trabajo, gracias por esa ratita.



## ABREVIATURAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina	<b>HMB</b>	Hipotálamo medio basal
<b>AChE</b>	Enzima acetilcolinesterasa	<b>HP</b>	Hipotálamo posterior
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>HSD</b>	Hidroxi esteroide deshidrogenasa
<b>AF-1</b>	Factor de transcripción uno	<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>AF-2</b>	Factor de transcripción dos	<b>LHRH</b>	GnRH sintética
<b>AHA</b>	Área preóptica anterior	<b>NAr</b>	Núcleo arcuato
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico	<b>Nm</b>	Núcleos mamilares
<b>ARNm</b>	Mensajero del ácido ribonucleico	<b>NVM</b>	Núcleo ventromedial
<b>ATR</b>	Sulfato de Atropina	<b>NPaV</b>	Núcleo paraventricular
<b>BE</b>	Benzoato de estradiol	<b>NPeV</b>	Núcleo periventricular
<b>ChE</b>	Colinesterasa Inespecífica	<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>CRH</b>	Hormona liberadora de la corticotropina	<b>NSCh</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>CAT</b>	Colino acetil transferasa	<b>NSOp</b>	Núcleo supraóptico
<b>DEf</b>	Dosis efectiva	<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona
<b>DHT</b>	Dihidrotestosterona	<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>DNAc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol	<b>POA</b>	Área preóptica
<b>FSH</b>	Hormona estimulante del folículo	<b>POA-AHA</b>	Área preóptica hipotalámica anterior
<b>GABA</b>	Ácido gama amino butírico	<b>RE</b>	Receptor a estrógenos
<b>GHRH</b>	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento	<b>RIA</b>	Radio-inmuno-análisis
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de las gonadotropinas	<b>RT</b>	Retro-transcripción
<b>GnRHI</b>	Hormona inhibidora de las gonadotropinas	<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>GnRHR</b>	Receptor de la GnRH	<b>SP</b>	Sustancia P
<b>hCG</b>	Gonadotropina coriónica humana	<b>TRH</b>	Hormona liberadora de la tirotrópina
		<b>TSH</b>	Tirotropina
		<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	3
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO .....	3
HIPOTÁLAMO .....	4
HORMONA ESTIMULANTE DE LAS GONADOTROPINAS (GnRH).....	6
HIPÓFISIS .....	8
GONADOTROPINAS.....	8
OVARIO.....	9
HORMONAS ESTEROIDES .....	11
ESTEROIDOGÉNESIS.....	12
RECEPTORES A ESTRÓGENOS .....	16
ESTRÓGENOS Y EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO .....	17
OVULACIÓN .....	18
CICLO ESTRAL.....	18
ASIMETRÍAS FUNCIONALES DEL HIPOTÁLAMO EN LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y FUNCIONES DEL OVARIO.....	20
ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS FIBRAS COLINÉRGICAS EN EL HIPOTÁLAMO .....	21
ACETILCOLINA .....	23
SULFATO DE ATROPINA (ATR).....	24
PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO- HIPÓFISIS-OVARIO .....	25
<b>JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO</b> .....	27
<b>HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	28
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
<b>RESULTADOS</b> .....	32
<b>CONCLUSIONES</b> .....	48
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	49
<b>ANEXOS</b> .....	59
ESTUDIO DEL CICLO ESTRAL POR FROTIS VAGINAL .....	59
CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES POR RADIO-INMUNO-ANÁLISIS (RIA).....	60
EXTRACCIÓN DEL ARNm TOTAL DE LA PORCIÓN IZQUIERDA Y DERECHA DE POA-AHA .....	61
LECTURA DE LA MUESTRA DE ARNm TOTAL.....	61
RETROTRANSCRIPCIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR) .....	61
ELECTROFORESIS .....	63
ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO .....	63
MODELO TEÓRICO QUE EXPLICA LOS POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA INYECCIÓN DE ATR 500 (DEF DE ATR) A LAS 09:00 H DEL DIESTRO-2 SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.....	3
<b>Figura 2.</b> Ubicación del hipotálamo .....	4
<b>Figura 3.</b> Colesterol .....	12
<b>Figura 4.</b> Teoría de la doble célula.....	13
<b>Figura 5.</b> Principal vía biosintética de los esteroides ováricos .....	14
<b>Figura 6.</b> Estradiol .....	15
<b>Figura 7.</b> Progesterona .....	15
<b>Figura 8.</b> Receptor Estrogenos.....	16
<b>Figura 9.</b> Concentraciones séricas de progesterona, estradiol, LH y FSH.....	19
<b>Figura 10.</b> Las vías colinérgicas.....	22
<b>Figura 11.</b> Acetilcolina.....	23
<b>Figura 12.</b> Terminal nerviosa colinérgica.....	23
<b>Figura 13.</b> <i>Atropa belladonna L.</i> .....	25
<b>Figura 14.</b> Atropina.....	25
<b>Figura 15.</b> Ensayo de RT-PCR .....	36
<b>Figura 16.</b> Citología vaginal diestro-1.....	59
<b>Figura 17.</b> Citología vaginal diestro-2.....	59
<b>Figura 18.</b> Citología vaginal proestro.....	59
<b>Figura 19.</b> Citología vaginal estro.....	60
<b>Figura 20.</b> Efectos de la inyección subcutánea de ATR 500 sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.....	64
<b>Figura 21.</b> Efecto del reemplazo hormonal de la señal hipotalámica después de la administración subcutánea de la D <sub>EF</sub> de ATR .....	65
<b>Figura 22.</b> Efecto del reemplazo hormonal de la señal hipofisiaria después de la administración subcutánea de la D <sub>EF</sub> de ATR .....	66
<b>Figura 23.</b> Efecto del reemplazo hormonal de la señal ovárica después de la administración subcutánea de la D <sub>EF</sub> de ATR- .....	67

# RESUMEN

La acetilcolina (ACh) es uno de los diferentes factores que regulan de manera estimulante la ovulación. Esta función de la ACh tiene un ritmo circádico durante el ciclo estral, ya que la administración de 100 mg/kg peso de sulfato de atropina (ATR) (antagonista de los receptores muscarínicos) bloqueó la ovulación solo ciertos días del ciclo estral; así mismo se mostró que el porcentaje de animales que ovulaban dependía de la hora y del día del ciclo estral. Por lo que el propósito de este estudio fue analizar los efectos que tiene el bloquear los receptores muscarínicos a las 09:00 h del diestro-2, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, al evaluar la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para la síntesis de la hormona estimulante de las gonadotropinas (GnRH), de los receptores a estrógenos alfa ( $RE\alpha$ ) y beta ( $RE\beta$ ) en las porciones izquierda y derecha del área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA), la concentración sérica de progesterona ( $P_4$ ) y estradiol ( $E_2$ ), así como la ovulación de la rata adulta.

Se utilizaron ratas hembras adultas, cíclicas, de la cepa CIIZ-V. A las 09:00 h del diestro-2 fueron inyectadas con vehículo, o con 100, 375 o 500 mg/kg ATR. Grupos de animales fueron sacrificados a las 09:00 h del estro esperado, a las 13:00 h del diestro-2 o a las 11:00 h del proestro. Durante la necropsia se disecaron el útero y los ovarios, se registró su peso húmedo. En los oviductos se contó el número de ovocitos liberados. Se extrajo la región POA-AHA del cerebro y se cuantificó la expresión del ARNm de GnRH, del  $RE\alpha$  y del  $RE\beta$  por RT-PCR. En el suero se midió la concentración de  $P_4$  y  $E_2$  por Radio-Inmuno-Análisis (RIA). En otros grupos inyectados con ATR que no habían ovulado, se remplazaron las señales hipotalámica (por la inyección de 3.7 $\mu$ g de GnRH sintética o LHRH), hipofisaria (con 25 u.i. de gonadotropina coriónica humana o hCG) u ovárica (con 10  $\mu$ g de benzoato de estradiol o BE).

La dosis efectiva (DEf) de ATR que bloqueó la ovulación en el 100% de los animales fue de 500 mg/kg peso. Esta DEf provocó el aumento del peso del ovario derecho en la mañana del estro esperado. También incrementó la concentración sérica de  $P_4$ , pero disminuyó la de  $E_2$ . Únicamente en el lado derecho de POA-AHA disminuyó la expresión del ARNm del  $RE\alpha$ ,  $RE\beta$  y GnRH a las 11:00 h del proestro.

El remplazo de cada una de las señales endócrinas estimuló la ovulación en los animales inyectados con ATR.

Los resultados obtenidos soportan la hipótesis de que el sistema colinérgico funciona de manera circádica, y muestran que la actividad de las neuronas colinérgicas cambia con las horas del día. Además, sugerimos que en diestro-2 la unión de la ACh a los receptores muscarínicos regula de manera estimulante la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, al activar la secreción de estradiol, y la expresión del ARNm para la GnRH, del  $RE\alpha$  y del  $RE\beta$  en el lado derecho de POA-AHA.

# INTRODUCCIÓN

La acetilcolina (ACh) unida a sus receptores muscarínicos es uno de los múltiples factores que regulan de manera estimulante la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y en consecuencia la ovulación. Mediante la administración de 700 mg/kg peso sulfato de atropina (ATR) (antagonista de los receptores muscarínicos) se mostró que entre las 08:00 a 14:00 h del proestro, se podía bloquear la ovulación, tiempo que fue denominado como “período crítico” (Everett y col., 1949). Este “período crítico” no sólo se presenta en el día del proestro, sino que varía en cada etapa del ciclo estral (Domínguez y col., 1982). También se mostró que la cantidad de ATR requerida para bloquear la ovulación cambia con la etapa del ciclo, ya que a las 13:00 h del estro se requiere de 300 mg/kg, 100 en diestro-1 y 300 en diestro-2 (Domínguez y col., 1982). Mediante la inyección de la dosis mínima utilizada (100 mg/kg ATR) a diferentes horas de cada fase del ciclo estral, se mostró que la eficacia de la ACh como mecanismo de regulación de la ovulación es rítmica y circádica (Domínguez y col., 1982).

Por lo que el propósito de esta tesis fue investigar primero la dosis efectiva de ATR que bloqueara la ovulación de todos los animales tratados a las 09:00 h del día del diestro-2; y posteriormente analizar sus efectos sobre la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH, del receptor a estrógenos alfa ( $RE\alpha$ ) y beta ( $RE\beta$ ) en el área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA), la concentración sérica de estradiol ( $E_2$ ) y de progesterona ( $P_4$ ), el peso de los ovarios y del útero.

Para analizar en que parte del eje hipotálamo-hipófisis-ovario está afectando el bloqueo de los receptores muscarínicos inyectados con la dosis efectiva de ATR, en la mañana del diestro-2, se remplazaron la señal hipotalámica por la inyección de GnRH-sintética, la señal hipofisaria por la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) y la señal ovárica por la inyección de benzoato de estradiol (BE).

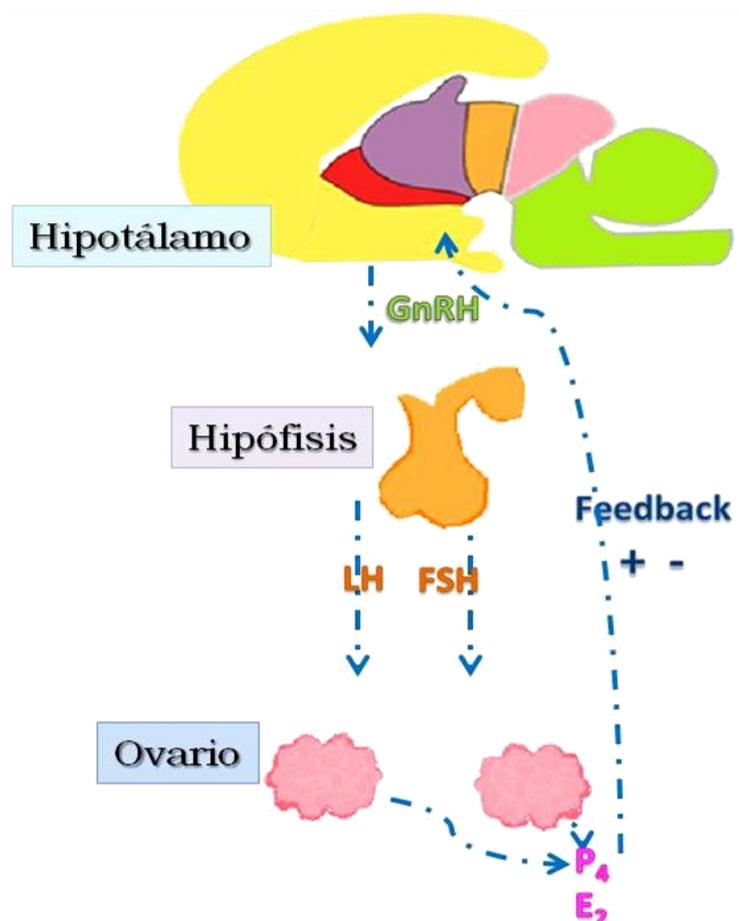
# MARCO TEÓRICO

## EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

El Sistema Nervioso Central (SNC), en particular el hipotálamo regula las funciones endocrinas (Domínguez, 1991). El hipotálamo y la hipófisis conforman una unidad funcional cuya comunicación se establece por diversas hormonas peptídicas entre las cuales se encuentra, la hormona liberadora de la gonadotropinas o GnRH (por sus siglas en inglés) que conocemos como “señal hipotalámica”, cuya secreción es modulada por las hormonas esteroides, péptidos, opioides y neurotransmisores (Yao y Bahr, 1999).

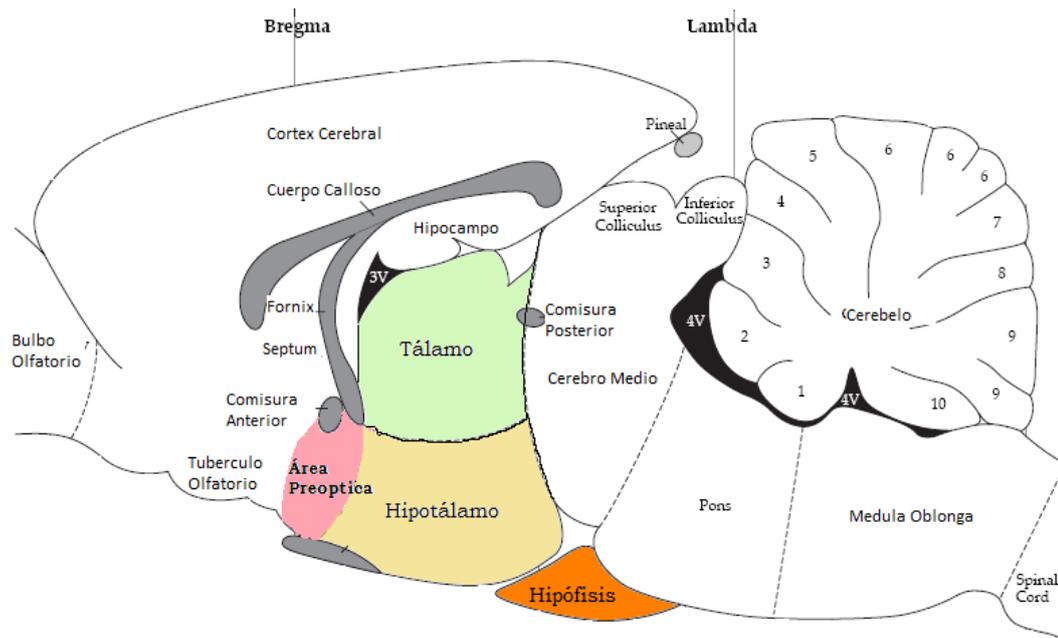
La función de este eje es regular los procesos reproductivos (Welsh y col., 1998). En respuesta al efecto de la GnRH, los gonadotropos de la hipófisis anterior sintetizan y secretan las gonadotropinas: la hormona estimulante del folículo (FSH por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH por sus siglas en inglés), que constituyen la “señal endocrina hipofisaria”. Estas hormonas regulan el crecimiento de los folículos, estimulan la secreción de hormonas esteroides: progesterona ( $P_4$ ) y estradiol ( $E_2$ ) (“la señal ovárica”) y peptídicos que actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis integrando un circuito neuroendócrino conocido como el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Fig. 1) (Ulloa-Aguirre y col., 2000).

**Figura 1.** Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. Se conforma por hipotálamo, hipófisis y ovario, cuya comunicación se establece mediante la secreción de neurotransmisores, péptidos de origen hipotalámico (como la Hormona liberadora de las gonadotropinas o GnRH) hipofisario (como la Hormona luteinizante o LH y la Hormona estimulante del folículo o FSH) u ovárico (hormonas esteroides como progesterona o  $P_4$  y estradiol o  $E_2$ ) (Ilustración de Velazco Mendoza, 2012)



## HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es la parte del encéfalo que forma parte del diencefalo y se sitúa por debajo del tálamo (Fig. 2). Está dividido por el tercer ventrículo en una porción izquierda y una derecha, delimitado en la parte anterior por el quiasma óptico y en la parte posterior por los cuerpos mamilares (McGeer, 1987); lateralmente está rodeado por el subtálamo; centralmente por la lámina terminal y en la parte dorsal por la comisura anterior (Silverman, 1994).



**Figura 2.** Corte sagital del cerebro de la rata donde se muestra la ubicación del hipotálamo (Modificado de Paxinos y Watson, 2004).

Tomando como referencia el tercer ventrículo, en el hipotálamo se describen tres regiones: la región periventricular, la región lateral y la región medial (Brown, 1994). El hipotálamo se divide en cuatro regiones organizadas rostro-caudalmente: Área Preóptica (POA), Área Hipotalámica Anterior (AHA), Hipotálamo Medio e Hipotálamo Posterior (Norris, 1996; Palkovits, 2000). El hipotálamo está constituido por células nerviosas o neuronas, prolongaciones nerviosas, (axones o dendritas de neuronas localizadas fuera y dentro del hipotálamo), células gliales o de sostén y una rica red vascular. Las neuronas forman grupos celulares bien demarcados conocidos como núcleos, o agrupaciones no muy bien delimitadas conocidas como áreas (Norris, 1996; Palkovits, 2000).

El hipotálamo, junto con la hipófisis, regulan la homeostasis del cuerpo por medio de un sistema de retro-control o “feedback” estimulante o inhibitorio que

envía señales al resto del cuerpo de dos formas: la primera por medio del sistema nervioso autónomo y la otra mediante la glándula pituitaria o hipófisis (Prieto, 2002). El hipotálamo regula la temperatura corporal, frecuencia cardíaca, presión arterial, osmolaridad sanguínea, ingesta de agua y de alimento y funciones de los diferentes órganos y sistemas.

El hipotálamo, por medio de la síntesis y liberación de neurotransmisores y de neurohormonas de naturaleza peptídica cumple con sus funciones. Los neurotransmisores son liberados al espacio sináptico, mientras que las neurohormonas pueden ser liberadas localmente o a la circulación sanguínea y ser transportadas hasta sus células blanco.

El hipotálamo produce diferentes factores liberadores que regulan la secreción de las hormonas adenohipofisarias, entre ellos la GnRH, que regula la secreción de FSH y LH (Brown, 1994; Arimura, 2000; Halász, 2000).

Las hormonas hipotalámicas son transportadas a lo largo de los axones y liberadas de las terminales nerviosas dentro del plexo primario de los capilares del sistema de vasos porta-hipofisarios (Arimura, 2000). Estos capilares sanguíneos se conocen como sistema porta-hipotálamo-hipofisario y derivan de las arterias hipofisarias superiores, que al unirse forman las venas portales hipofisarias, las que corren a lo largo del tallo hipofisario, hasta llegar a la parte distal de la adenohipófisis, donde forman un plexo secundario de vasos llamado sinusoides hipofisarios (Fink, 2000). Una vez que las neurohormonas alcanzan la parte distal de la adenohipófisis interactúan con sus respectivos receptores presentes en las células (Arimura, 2000).

En los roedores se considera que existen dos “centros nerviosos” que regulan la secreción de las gonadotropinas (Brown, 1994), el “centro tónico” formado por las neuronas GnRHérgicas que se localizan en los núcleos ventromedial (NVM) y arcuato (NAr), que regula la secreción continua de la hormona, y un “centro fásico” ubicado en POA, el núcleo supraquiasmático (NSCh) y en AHA, que regula la liberación cíclica preovulatoria de las gonadotropinas, la que en la rata adulta ocurre en el día del proestro (Fink, 1986,1988; Palkovits, 2000).

Numerosas evidencias experimentales han puesto de manifiesto la importancia que tiene el área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) en la regulación de la función reproductiva de los mamíferos (Clemens y col., 1976). Un hecho funcional que caracteriza a POA-AHA y el hipotálamo medio es que regulan de manera asimétrica la secreción de gonadotropinas y cada gónada responde también de manera asimétrica a las señales neuroendocrinas que provienen del SNC y de la hipófisis (Gerendai, 1980; Fukuda y col., 1984; Chavez y col., 1987; Advis y col., 1989; Cruz y col., 1989, 1990).

## **HORMONA ESTIMULANTE DE LAS GONADOTROPINAS (GnRH)**

En el hipotálamo se localizan las neuronas que secretan GnRH, denominadas GnRHérgicas; se ubican en POA, los núcleos preóptico medial, anterior, ventromedial y NAr, así como la estría terminal y la banda diagonal de Broca (Silverman y col., 1994; Roth y col., 2001; Yen, 2001). Estas neuronas se originan en el epitelio olfatorio, migran por el septo nasal y continúan hasta llegar al área anterior del hipotálamo. En la rata estas células están presentes desde el día 10 de vida fetal y durante los días 13 al 17 de edad (Halász, 2000).

Las neuronas GnRHérgicas son células muy especializadas que representan la salida de información de una red neuronal integrada, que el cerebro utiliza para generar la secreción pulsátil de las gonadotropinas por la hipófisis (Jennes, 1985).

En los mamíferos se describen al menos 13 moléculas diferentes de la GnRH (Parhar, 2002). En la rata, aproximadamente el 70% de las neuronas GnRH del septo y de POA-AHA proyectan sus terminales nerviosas hacia la eminencia media, cuya liberación regula la secreción de gonadotropinas en la hipófisis (Jennes y col., 1985; Herde y col., 2011). 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).

En regiones que proyectan hacia la eminencia media, los somas de las células GnRHérgicas tienen sinapsis con fibras colinérgicas, catecolaminérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas, glutamatérgicas, dopaminérgicas, GABAérgicas, así como axones que contienen neuropéptido Y (NPY), sustancia P (SP), neurotesina, hormona liberadora de corticotropina (CRH), vasopresina y galanina (Halász, 2000; Herbison, 2008; Tura y col., 2008; McCann y col., 2011).

Este tipo de neuronas no forman agregados, sino redes laxas y difusas (Jennes y col., 1985). Al parecer, estas proyecciones participarían en la regulación del comportamiento sexual de los roedores, ya que la administración de GnRH directamente en POA potencia el reflejo de lordosis (Silverman, 1994).

La población de neuronas productoras de la GnRH es relativamente limitada, entre 1, 000 a 3,000 en todo el SNC (Silverman y col., 1994). En los roedores, el número de neuronas GnRHérgicas es variable, desde un promedio de 356 neuronas en el hámster hasta 560 o 300 células en la rata (Yellon y col., 1990).

Desde el punto de vista filogenético, la molécula de GnRH es muy semejante desde los peces hasta el hombre. Sin embargo, entre los vertebrados existen al menos trece variantes estructurales, nueve en protocordados y uno en la especie de pulpo (Sherwood y col., 1993; Adams y col., 2003; Millar y col., 2004; Barran y col., 2005); la existencia de éstas variantes, dio la pauta para

conocer la relación estructura-función y permitió que hasta la fecha se hayan sintetizado más de 3,500 análogos de GnRH (Russell y White, 1999).

La GnRH es un péptido pequeño constituido por 10 aminoácidos. La secuencia lineal de la GnRH en mamíferos es la siguiente (Susuki y col., 1995):



En diversas especies se han identificado dos o más formas de GnRH una forma de origen hipotalámico (GnRH-I), la cual varía en estructura entre las especies y una forma extra-hipotalámica altamente conservada que actúa como un neuromodulador (Flanagan y col., 1997) y que actualmente se conoce como GnRH-II; en la rata se ha identificado la GnRH-I, GnRH-II y GnRH-III: 1 GnRH-I se localiza en POA y es el principal decapeptido relacionando con la regulación de la función hipofisaria; la GnRH-II se localiza en el cerebro medio, cuya función es regular la conducta reproductiva (Millar y col., 2008) y la GnRH-III, que se localiza en POA cuya función es regular de manera específica la secreción de la FSH (Hiney y col., 2001).

Una vez sintetizado el decapeptido, es transportado en la vesícula hasta la terminal sináptica, la cual finaliza en la eminencia media, en donde es liberado en los vasos del sistema porta hipotalámico-hipofisario; la liberación de la GnRH se realiza por exocitosis en respuesta a cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la apertura de los canales de Ca<sup>+2</sup> dependientes de voltaje (Sitges, 1993). Como resultado de la entrada de calcio se activan las enzimas proteolíticas que degradan la membrana plasmática, de tal forma que el péptido es liberado (Charli y col., 1991).

La GnRH se secreta en forma pulsátil, lo que permite un fino mecanismo de regulación por medio de los distintos sistemas neuronales que le transmiten la información generada por hormonas esteroides, el balance energético y por estados de estrés, así como los estímulos producidos por la época del año y el medio ambiente (Clarke y Tilbrook, 2008).

En la hipófisis se localizan las células que expresan el receptor para la GnRH (GnRHR); estas células son los gonadotropos, las cuales algunas sintetizan exclusivamente FSH, LH y otras secretan ambas. En los mamíferos, incluyendo la rata, la secuencia de los 327 aminoácidos que constituyen el GnRHR se mantiene entre las diferentes especies, ya que el 85% de los aminoácidos son idénticos (Sealfon, 1997).

La presencia del GnRHR en el SNC nos sugiere que la GnRH actúa como un transmisor o un neuromodulador que puede participar en la regulación de conductas reproductivas y en la promoción de la ovulación (Sealfon, 1997).

Los GnRHR se encuentran exclusivamente en las membranas citoplasmáticas, de los gonadotropos de la adenohipófisis. Receptores de ésta hormona también se han encontrado en gónadas, en placenta, tejido adrenal, en SNC y células cancerígenas (Sealfon, 1997).

El papel opuesto al de la GnRH lo lleva a cabo la hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnRI), que inhibe la síntesis de la subunidad  $\alpha$  (común) y la subunidad  $\beta$  (específica) de las gonadotropinas en la hipófisis (Bentley y col., 2009). Las neuronas productoras de la GnRI están conectadas con las neuronas GnRHérgicas y modulan su secreción (Kriegsfeld y col., 2006).

## **HIPÓFISIS**

La hipófisis se encuentra en la base del cerebro alojada en el esfenoideas y cubierta por la duramadre (Fink, 2000). Está unida al hipotálamo por el tallo hipofisiario, donde se localiza el sistema porta-hipofisiario.

La hipófisis está dividida en tres partes: el lóbulo anterior, el lóbulo intermedio y el lóbulo posterior. El lóbulo anterior y el intermedio conforman una glándula endocrina verdadera llamada adenohipófisis. El lóbulo posterior también llamado neurohipófisis es una extensión del hipotálamo (Arimura, 2000).

La adenohipófisis regula las funciones llevadas a cabo por la tiroides, las adrenales, las gónadas, las glándulas mamarias, entre otras por medio de los diferentes neurohormonas hipotalámicas mencionados en la sección anterior. Las funciones de las gónadas son reguladas mediante la producción de FSH y LH, al actuar directamente sobre los ovarios y los testículos (Brown, 1994; Arimura, 2000; Guyton y Hall, 2001).

En la hipófisis, la GnRH al unirse a su receptor estimula la secreción de las gonadotropinas, proceso controlado por la amplitud y la frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH, así como por los efectos estimulante o inhibitorio de los estrógenos. Frecuencias bajas de los pulsos de GnRH estimulan la secreción de la FSH, mientras que las frecuencias altas estimulan la de LH (Gallo, 1981; Terasawa, 1995; Suter y col., 2000; Herbison, 2006).

## **GONADOTROPINAS**

Las hormonas de naturaleza proteica, producto de la síntesis y la secreción de la glándula hipofisaria, ejercen sus efectos sobre los órganos blanco. Dichos efectos inician una serie de eventos bioquímicos en la membrana y en el interior de la célula, lo que resulta en la expresión de su actividad biológica. La LH y la FSH representan, en ambos sexos, el principal estímulo en el desempeño de las funciones de la gónada (Domínguez y col., 1991).

Las gonadotropinas están formadas por dos cadenas peptídicas (una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ ) unidas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. La LH y la FSH comparten cadenas  $\alpha$  casi idénticas, mientras que la cadena  $\beta$  proporciona la especificidad biológica en las interacciones con sus receptores. Las subunidades  $\alpha$  de la LH, FSH, TSH (tirotropina) así como la de la hCG (gonadotropina coriónica humana) son idénticas, y contienen 92 aminoácidos (Reichert, 1998).

Las subunidades  $\beta$  varían para cada hormona: la de la FSH tiene una subunidad  $\beta$  de 118 aminoácidos (FSH- $\beta$ ), que le confiere su acción biológica específica y es responsable de la interacción con el receptor. La subunidad  $\beta$  de la LH (LH- $\beta$ ) está constituida por 121 aminoácidos. Los efectos de la FSH y LH son estimular la síntesis de las enzimas que participan en la síntesis de hormonas esteroides y peptídicas por los ovarios y de otras enzimas que tienen efectos proteolíticos sobre la pared del folículo (Domínguez y col., 1991).

En la hembra las concentraciones máximas de FSH se dan inmediatamente antes de la liberación preovulatoria de LH; entre otras funciones que desempeña la LH están la estimulación de la estereidogénesis, la inducción de la ovulación y la luteinización del folículo. En la mayoría de las hembras el ciclo reproductivo está dividido por la secreción preovulatoria de LH; por la fase de desarrollo folicular que finaliza en la ovulación o en la degeneración del folículo y en la fase luteínica, caracterizada por la presencia del cuerpo lúteo (Bousfield, 1998).

## **OVARIO**

En los vertebrados, el ovario es un órgano pareado, cada uno se localiza en cada lado de la cavidad pélvica, y está suspendido en un pliegue peritoneal llamado mesovario. La arteria ovárica (o arteria útero-ovárica) que recibe riego sanguíneo por la aorta abdominal, llega al ovario a lo largo del mesovario, rama que entra a través del hilio, por donde también salen las venas (Fawcett, 1995; Yao y Bahr, 1998).

En el ovario se describen tres compartimientos: el lúteoal, el intersticial y el folicular. Este último engloba a los folículos en crecimiento, que son la unidad anátomo-funcional de la gónada y a partir de los cuales se originan los otros dos compartimientos (Ganong, 2004).

Compartimento Lúteoal o cuerpo lúteo:

Se forma a partir de las células de la granulosa y de la teca interna de los folículos que expulsan al ovocito, como resultado del estímulo de la LH, que al actuar sobre sus receptores en las células granulo luteínicas y teca luteínicas estimula la secreción de  $P_4$  (Espey, 1999; Ross y col., 1997).

Compartimento Intersticial o glándula intersticial:

Incluye tanto a las células teco-intersticiales de los folículos en crecimiento y las células de la teca de los folículos atrésicos, y representa la unidad endócrina productora de andrógenos (Sánchez-Criado, 2003; Yao y Bahr, 1999).

Compartimento Folicular:

Está formado por folículos que se encuentran en la corteza del ovario, en diferentes etapas de desarrollo y crecimiento, como son los primordiales, I o primarios, secundarios, terciarios, y preovulatorios (Domínguez y col., 1991; Ross y col., 1997).

El folículo está formado por el 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 denominada teca interna. Además de las células de la granulosa y las tecaes, el folículo está rodeado por un complejo sistema de fibras colágenas, células del tejido conectivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas, que en conjunto recibe el nombre de teca externa (Domínguez y col., 1991).

Con base en su organización estructural, pueden definirse cinco fases del desarrollo folicular:

- *Folículos primordiales*: consisten de un ovocito esférico rodeado de una capa de células epiteliales planas y de la membrana basal. Algunos de los folículos primordiales se desarrollan y se convierten en folículos primarios (Domínguez y col., 1991; Hirshfield, 1997).
- *Folículos primarios*: el ovocito aumenta de tamaño y aparece rodeado por dos o más capas de células epiteliales que adquieren una forma cilíndrica y que ahora reciben el nombre de células de la granulosa (Domínguez y col., 1991; Fawcett, 1995). El ovocito al continuar creciendo, queda separado de las células de la granulosa adyacentes, por una estrecha hendidura en la que se proyectan micro vellosidades y prolongaciones del mismo ovocito y la célula folicular. En este espacio se acumula una glucoproteína que se condensa gradualmente y forma la zona pelúcida. El estroma circundante forma la teca folicular (Schwartz, 2000). La proliferación de las células de la granulosa es estimulada por la FSH y los estrógenos, que actúan de manera sinérgica (Van, 1999). La FSH, a su vez, estimula la síntesis de sus propios receptores en las células de la granulosa, lo que permite que su número se incremente conforme el folículo madura y también estimula la síntesis de los receptores a LH (Domínguez y col., 1991; Ulloa-Aguirre, 1991).
- *Folículo secundario*: continúa la proliferación de células de la granulosa, se forman varias capas circundantes al ovocito. Después, entre las células de

la granulosa se forman zonas que contienen líquido, que al aumentar de tamaño que al fusionarse forman una cavidad llamada antro folicular como resultado de esto, el ovocito adopta una posición excéntrica, rodeado de células de la granulosa, estructura denominada el *cumulus oophorus*. En esta etapa del crecimiento del folículo, la teca interna está muy vascularizada, y las células secretan andrógenos y expresan receptores a LH. Los andrógenos son transportados a las células de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos por acción del complejo enzimático aromatasa el cual es regulado por la FSH (Gor-Langton y Armstrong, 1994; Van, 1999; Yao y Barh, 1999). En el licor folicular hay proteínas, polipéptidos, FSH, LH, prolactina, P<sub>4</sub>, andrógenos (DHT, 5 $\alpha$ -androstano-3-17-diona, androsterona y epiandrosterona), estrógenos, gonadocrininas, acetilcolina y noradrenalina, cuyas concentraciones varían durante el ciclo estral de la rata (Domínguez y col., 1991).

- *Folículo preovulatorio*: 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 (Hirshfield, 1997). Los vasos sanguíneos al igual que los nervios sólo llegan a la teca interna, ya que no penetran a la granulosa. Algunos 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 influiría 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).

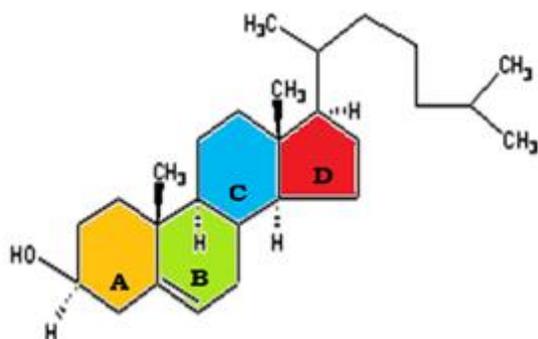
El crecimiento y la diferenciación del folículo finalizan con su ruptura y la expulsión del ovocito II (la ovulación) o con la atresia (Espey y Lipner, 1994).

## **HORMONAS ESTEROIDES**

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente el E<sub>2</sub> y la P<sub>4</sub>, aunque también se produce estrona, androstendiona, testosterona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroideas, como la inhibina, la relaxina, la activina, la folistatina y algunos factores de crecimiento locales (Tresguerres, 1999).

Las hormonas esteroideas derivan del colesterol que se obtiene a partir de tres fuentes principales: el colesterol que circula en la sangre en forma de lipoproteínas, el que se sintetiza *de novo* dentro del ovario, a partir de acetilcoenzima-A y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en gotas lipídicas (Tresguerres, 1999).

La estructura química del núcleo básico del colesterol es el ciclopentano-perhidrofenantreno o “núcleo esteroide”, 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 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 (Fig. 3) (O'Malley y Strott, 2001).



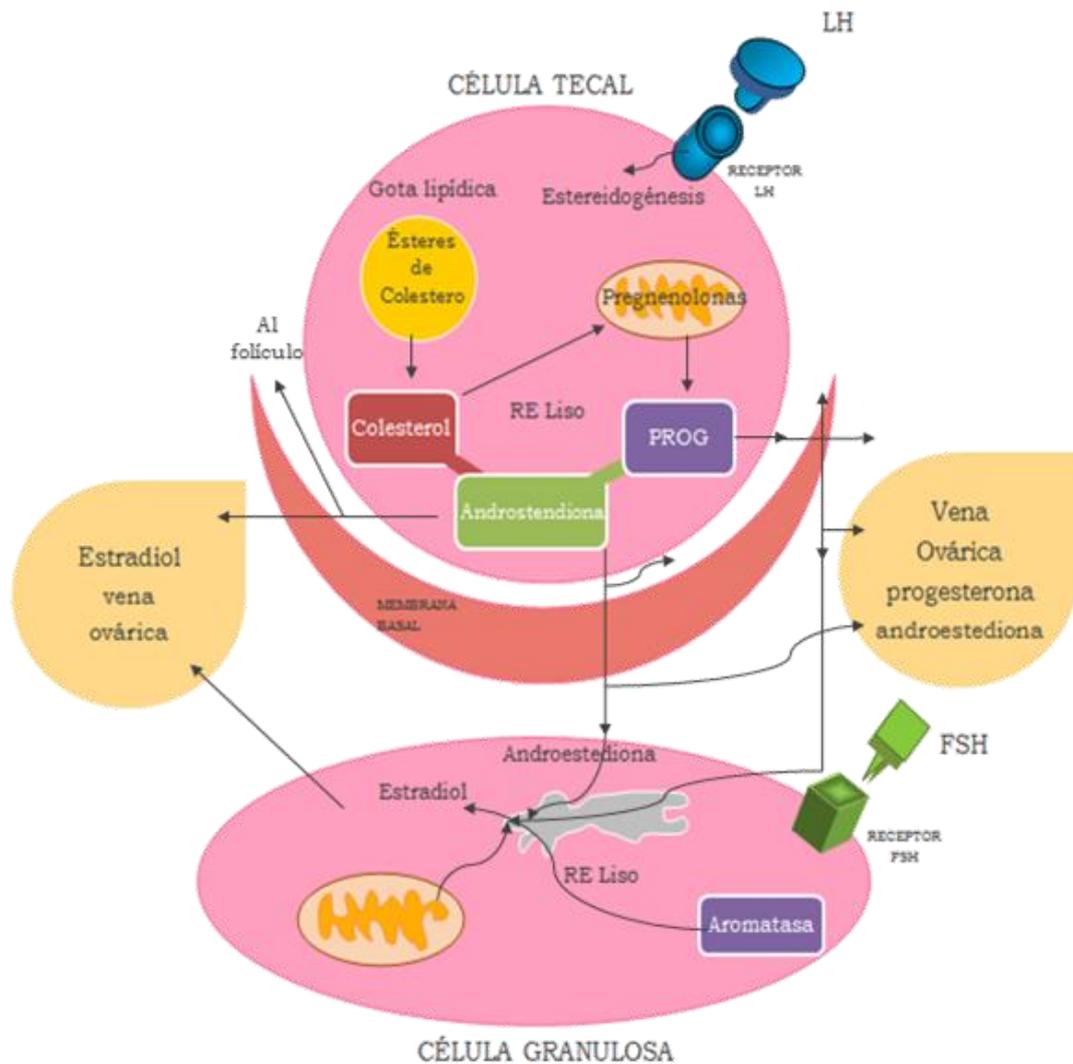
**Figura 3.** Estructura química del colesterol en el que se representa el “núcleo esteroide” (Ilustración de Velazco Mendoza, 2012).

## ESTEROIDOGÉNESIS

En el ovario, la síntesis de hormonas esteroideas se explica por medio de la teoría de “la doble célula” o “de la doble célula-doble hormona”, en la cual se plantea la participación combinada de las células de la teca interna y las células de la granulosa (Brown, 1999; Sánchez-Criado, 2003), y la acción de la LH sobre la producción de andrógenos en las células de la teca, junto con la acción de la FSH en la síntesis de estrógenos por las células de la granulosa (Fig. 4) (Yao y Bahr, 1999).

La conversión de colesterol en pregnenolona es regulada por la enzima Citocromo P450<sub>sc</sub> (20,22 desmolasa) localizada en la membrana interna de la mitocondria (O' Malley y Strott 2001). La pregnenolona es el precursor de todas las hormonas esteroideas. Una vez en el retículo endoplásmico, la pregnenolona puede ser transformada a androstediona y testosterona, a través de dos diferentes vías metabólicas, la  $\Delta^5$  y  $\Delta^4$  (Fig.5) (Domínguez, 1997; O'Malley y Strott 2001; Smith, 1999).

En la ruta  $\Delta^4$  la pregnenolona es transformada a P<sub>4</sub> por la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (HSD); la P<sub>4</sub> es convertida a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona por la enzima P450<sub>c17 $\alpha$</sub> . La desmolasa (17,20-esterpide liasa) la convierte a androstendiona, la cual es transformada en testosterona por la enzima 17 $\beta$ -HSD. Tanto la androstendiona como la testosterona pueden ser transformadas a estrógenos por la aromatasa.

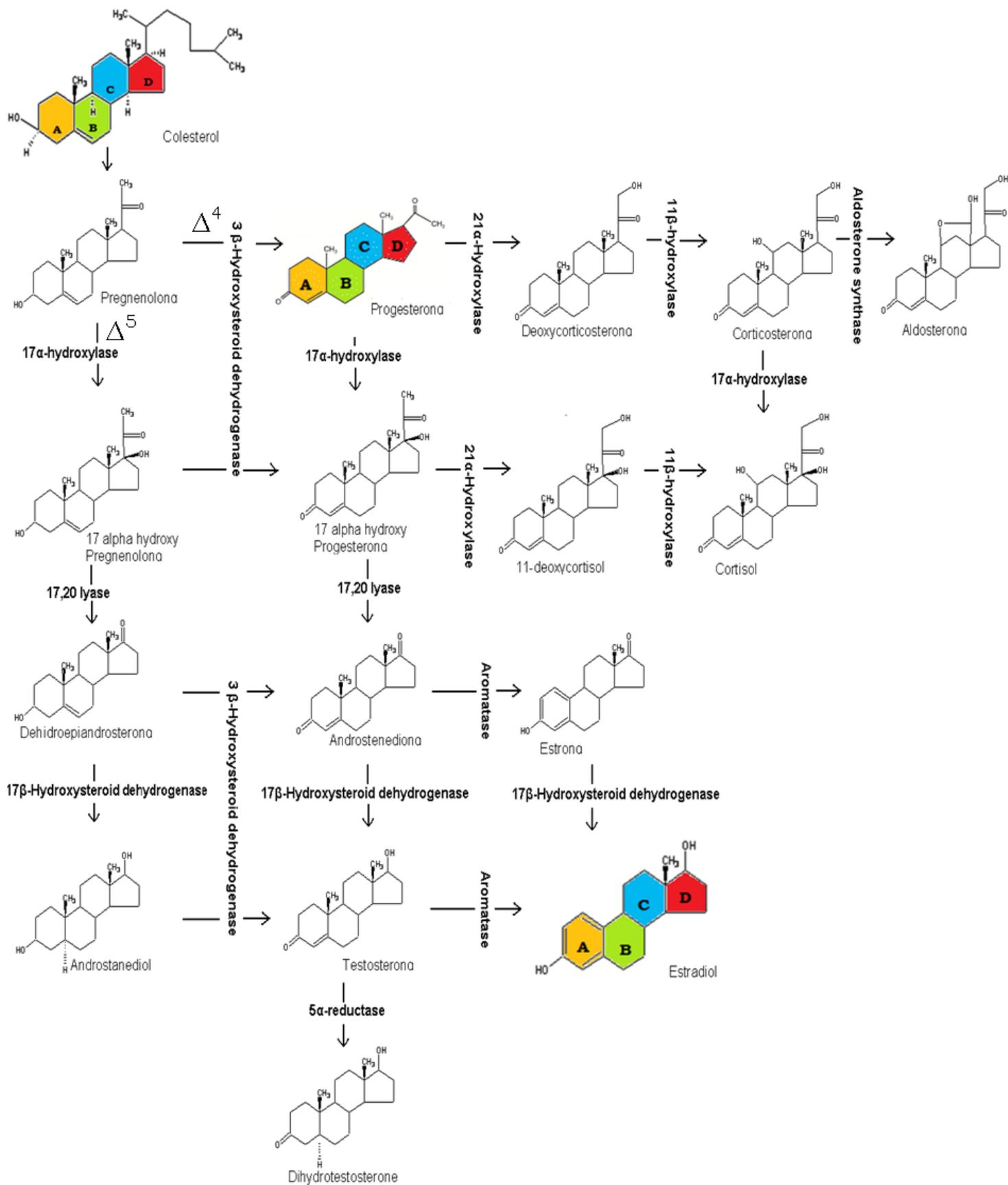


**Figura 4.** Teoría de la doble célula. Interacción entre las células de la teca interna y las de la granulosa en la biosíntesis de estrógenos (Modificado de Tresguerres, 1999)

Las células teco-intersticiales de los folículos son la principal fuente de andrógenos ováricos. En el SNC algunas células poseen el complejo enzimático de aromatización, por lo que convierten a los andrógenos en estrógenos (Domínguez, 1997; Smith 1999; Yao y Bahr, 1999).

En la ruta  $\Delta^5$  la pregnenolona es transformada en  $17\alpha$ -hidroxi-pregnenolona por la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa. Después, la  $C_{17-20}$ -liasa transforma la  $17\alpha$ -hidroxi-pregnenolona en dehidro-epiandrosterona (DHEA), ésta a su vez es transformada a androstendiona por la enzima  $17\beta$ -HSD. A partir de aquí, la androstendiona sigue la ruta  $\Delta^4$  (Yao y Bahr, 1999).

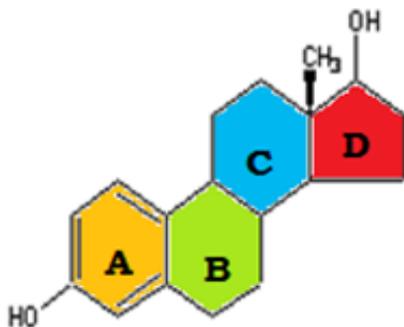
La androstenediona y testosterona se difunden a través de la membrana basal y llegan a las células de la granulosa, donde son aromatizadas a estrógenos por el complejo enzimático  $\Delta^4$ , que se activa como resultado de la unión de la FSH a sus receptores de membrana. La androstenediona se transforma en estrona y la testosterona en  $17\beta$ -estradiol. La enzima  $17\beta$ -HSD transforma la estrona en  $E_2$  (Gore-Langton y col., 1994; Hinshelwood, 1999).



**Figura 5.** Principal vía biosintética de los esteroides ováricos. (Modificado de Sánchez-Criado, 2003).

En la rata los ovarios secretan principalmente  $17\beta$ -estradiol y pequeñas cantidades de estrona. La mayor proporción de estrona se sintetiza en otros tejidos a partir de los andrógenos, androstendiona y testosterona los que son secretados por las adrenales y las células de la teca del folículo. El estriol es producto del  $E_2$  y la estrona, cuya conversión se realiza en el hígado y la placenta (Brown, 1999; Jaffe, 2001).

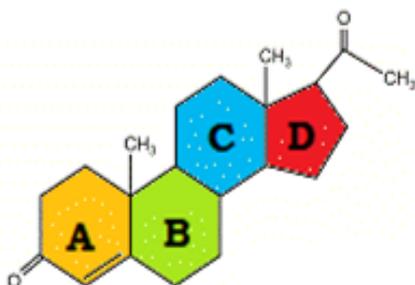
El  $E_2$  conserva el núcleo esteroide de 18 carbonos. El anillo A se transforma en un anillo fenólico (anillo aromático) con un grupo hidroxilo en la posición C-3 y un grupo  $\beta$ -hidroxilo o cetona en la posición C-17 del anillo D (Fig. 6). El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y la alta afinidad a receptores de estrógenos (Jordan y col., 1985; Duax y col., 1988; Sánchez-Criado, 2003; Smith, 1999).



**Figura 6.** Estructura química del  $E_2$  en el que se representa el “núcleo esteroide” (Ilustración de Velazco Mendoza, 2012).

En la hembra, la principal fuente de estrógenos son los ovarios. Los estrógenos también son sintetizados en órganos como el hígado, la médula ósea, la placenta, los tejidos; adiposo, nervioso, óseo y muscular (Carson-Jurica y col., 1990; Hinshelwood, 1999; Sánchez-Criado 2003).

La  $P_4$  conserva el núcleo esteroide de 21 carbonos, por lo que implica haber perdido el fragmento de 6 carbonos de la cadena lateral en el C-17 del colesterol; la oxidación del grupo alcohol en C-3, y la migración del doble enlace del anillo B al anillo A (Fig. 7) (Gore-Langton, 1988).



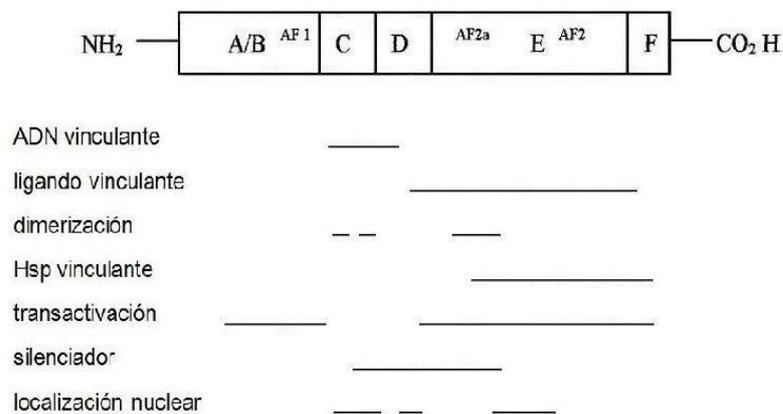
**Figura 7.** Estructura química de la  $P_4$  en el que se representa el “núcleo esteroide” (Ilustración de Velazco Mendoza, 2012).

## RECEPTORES A ESTRÓGENOS

A pesar de su importancia, la función precisa de los estrógenos sobre la neurona GnRHérgica no es del todo clara. Hasta hace quince años, ni aún con la uso de técnicas inmuno-histoquímicas se había podido detectar el receptor a estrógenos (RE) en la neurona GnRHérgica de diferentes especies (Herbison, 1998). De igual forma, a partir de estudios *in vivo* existía poca evidencia acerca de la acumulación de estradiol radiactivo en estas células (Kuiper y col., 1996).

Los RE son proteínas activadoras ligando-dependientes, que median la actividad de los estrógenos en las células que los poseen o las células blanco (Mangelsdorf y col 1995; O'Malley y Strott. 2001).

El RE consta de seis dominios funcionales: A/B, C, D, E y F (Fig. 8) (Rollerova y Urbancikova 2000).



**Figura 8.** Función de los dominios de los receptores a estrógenos (RE) y su localización en la molécula. La estructura del RE puede ser dividida en seis dominios A-F. Las líneas indican la función de cada dominio. (Modificado MacGregor y Jordan 1998).

El dominio A/B, localizado en el extremo amino terminal (terminal-N) contiene la región AF-1 que regula la actividad transcripcional.

El dominio C es el sitio de unión específico al ADN, el cual constituye una sección hidrofílica del receptor y es la región más conservada entre los diferentes receptores nucleares. Está formado por 66-68 aminoácidos, entre los cuales se encuentran cisteínas capaces de unir zinc, las cuales forman dos proyecciones peptídicas de configuración tetraédrica con el zinc, denominados dedos de zinc, que son dos, cuya función es mantener las interacciones específicas con los elementos de respuesta a los estrógenos. La unión a una secuencia específica del ADN está determinada por la composición de los aminoácidos Glu, Gly y Ala.

El dominio D o región de bisagra (“finge”) permite al receptor flexibilidad o alterar su conformación. Mediante la técnica de mapeo proteolítico del RE se ha mostrado que una porción del dominio D es necesaria para unir un ligando con

máxima afinidad. También se ha mostrado que participa en la unión a la proteína chaperona de golpe de calor hsp90, la cual permanece unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo.

El dominio E o sitio de unión del esteroide o ligando, consiste en una cadena de aproximadamente 250 aminoácidos, que forman una sección hidrofóbica, la cual determina la alta especificidad de la unión de la hormona al receptor. Es importante en la dimerización del receptor, la localización nuclear y las interacciones con co-activadores y co-represores transcripcionales. Contiene la región AF-2 una de las dos regiones que regulan la actividad transcripcional del dominio; y la región AF2a que funciona de transactivación único para RE.

El dominio F contiene alrededor de 42 aminoácidos, los cuales no son bien conservados entre los RE de los vertebrados. Es importante en la activación de la transcripción y la represión de las actividades de antiestrógenos. Las secuencias en el dominio F son inhibitorias para la señal de dimerización que están presentes en la región E (Rollerova y Urbancikova 2000).

En la actualidad se reconoce la existencia de tres RE. En el año de 1996, Kuiper y col., clonaron un ácido desoxi-ribonucleico complementario (DNAC) del RE de la próstata de rata, al cual denominaron RE subtipo  $\beta$ , para distinguirlo del que previamente se había clonado del útero de la rata, al cual consecuentemente se denominó RE subtipo  $\alpha$ . El tercer tipo es el denominado subtipo  $\gamma$ .

## **ESTRÓGENOS Y EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO**

En la rata, los estrógenos regulan la secreción de la GnRH (Silverman y col., 1994), al actuar directamente sobre la neurona GnRHérgica o indirectamente, por medio de inter-neuronas, localizadas principalmente en POA-AHA.

La función estimulante o inhibitoria de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH, cambia durante el ciclo, como resultado de modificaciones en su concentración en la sangre, en el número y afinidad de sus receptores en sus células blanco, o de todos los factores a la vez (Freeman, 1994; Funabashi y col., 2002; Herbison, 1998).

En la hipófisis anterior, los estrógenos estimulan la síntesis de GnRHR en los gonadotropos, fenómeno denominado sensibilización o imprimación hipofisiaria a la GnRH (Silverman y col., 1994; Yen, 2001).

En el ovario, los estrógenos regulan el crecimiento y desarrollo de los folículos ováricos durante el ciclo reproductivo, mediante la estimulación de la proliferación de las células de la granulosa de los folículos pequeños, incrementan las concentraciones de receptores a FSH (R-FSH) en las células de la granulosa. Por lo tanto, aumenta la capacidad de respuesta de las células de la granulosa a las gonadotropinas. A su vez, el aumento en la concentración de

E2 e inhibina (producidos por el ovario) inhibe la secreción de FSH, impidiendo la maduración de otros folículos. También actúan en la modulación de la producción de P<sub>4</sub> por las células de la granulosa y la producción de andrógenos por las células de la teca, y la modulación de la capacidad esteroidogénica del cuerpo lúteo. Los estrógenos y las gonadotropinas coordinan la maduración del folículo y regulan las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, lo que induce la secreción preovulatoria de gonadotropinas (McLean y col., 1989; Freeman, 1994; Greenwald y Roy, 1994; Yao y Bahr, 1999; Yen y Adashi, 2001).

## **OVULACIÓN**

La ovulación es una de las dos formas con las que culmina el crecimiento y la diferenciación folicular. En la mayoría de los mamíferos, en el momento de la ovulación uno o varios folículos liberan su ovocito secundario, 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, paracrinas y nerviosas. Las principales señales endocrinas proviene de la hipófisis (las gonadotropinas y la prolactina), también participan en la regulación del crecimiento y diferenciación folicular las hormonas secretadas por las suprarrenales (corticosterona), la tiroides (tiroxina T<sub>4</sub> y triyodotironina T<sub>3</sub>) y el timo. Las señales paracrinas son ejercidas por las hormonas del propio ovario (estrógenos, P<sub>4</sub>, andrógenos e inhibina, activina y folistatina) y por un conjunto de péptidos pequeños y la GnRH (Espey, 1994).

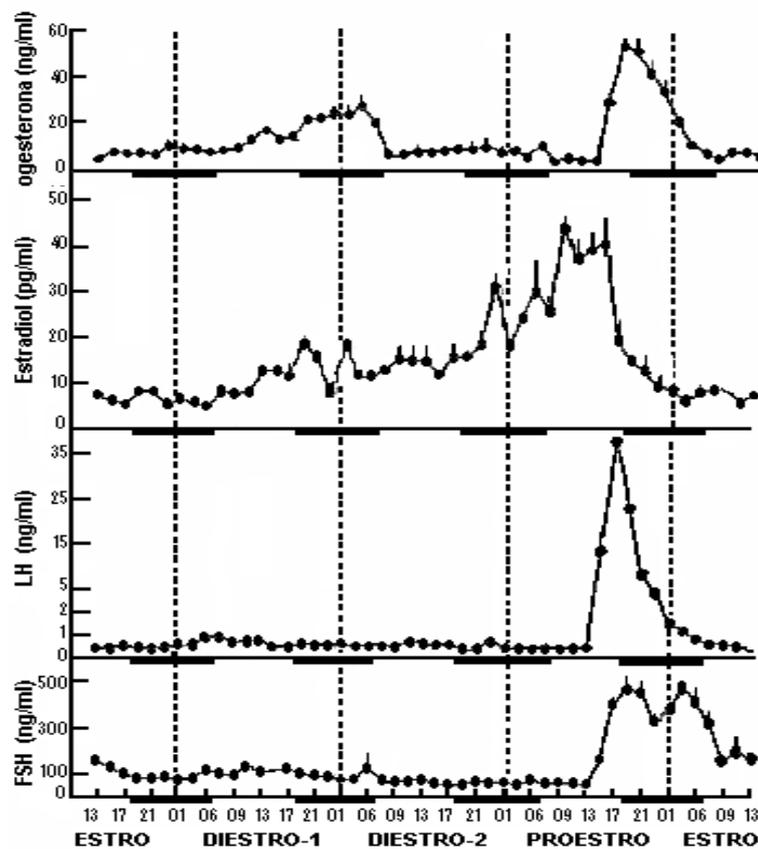
## **CICLO ESTRAL**

Las hembras de los mamíferos tienen ciclos reproductivos que pueden ser catalogados como menstruales o estrales, en función de las evidencias externas que se observan en las hembras: menstruación en el caso de los algunos primates y humanos y receptividad sexual en los otros mamíferos.

En los roedores, el ciclo estral implica una cascada de eventos conductuales y hormonales que son progresivos, sincronizados y repetitivos (Domínguez, 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, llamada “calor” o celo (Kilen y Schwartz, 1998). Durante el ciclo estral ocurren diferentes interrelaciones de señales que provienen del medio ambiente, del hipotálamo, de la hipófisis, de los ovarios y de los órganos sexuales accesorios que están bajo la regulación del SNC (Knobil, 1980).

La rata hembra durante todo el año presenta ciclos estrales cuya duración varía de cuatro a cinco días, dependiendo de la cepa de estudio (Schwartz, 2000). Su duración es regulada por variaciones en el periodo de luz: oscuridad, la alimentación, la temperatura y la presencia del macho (Fink, 1988). En el caso de nuestro modelo de estudio, las ratas de la cepa CIIZ-V presentan ciclos estrales de cuatro días de duración que se dividen en: diestro-1, diestro-2, proestro y estro (Schawartz, 2000).

El estudio de la citología vaginal mediante la toma diaria de frotis, es una herramienta adecuada para el monitoreo del ciclo estral de la rata, debido a que se ha mostrado que el epitelio de la vagina responde a los cambios en las concentraciones hormonales que se presentan durante el ciclo estral (Fig.9) (Kilen y Schwartz, 1999).



**Figura 9.** Concentraciones plasmáticas de progesterona, estradiol, LH y FSH obtenidas a intervalos de 2 horas durante los cuatro días del ciclo estral de la rata. Cada punto representa la concentración media  $\pm$  e.e.m. de las hormonas. Las barras negras representan la fase de oscuridad de las hormonas de las 18:00 a las 06:00 h del día siguiente (Modificado de Freeman, 1994).

## **ASIMETRÍAS FUNCIONALES DEL HIPOTÁLAMO EN LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS Y FUNCIONES DEL OVARIO**

A partir de diversos estudios realizados con lesiones o implantes de fármacos u hormonas han mostrado que las respuestas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es asimétrica (Gerendai, 1980; Nance y Morger, 1982; Nordeen y Yahr, 1982; Mizunuma y col., 1983; Gerendai y col., 1984; Nance y col., 1984; Fukuda y col., 1984; Cook, 1987; Advis y col., 1989; Cruz y col., 1989; Cruz y col.1990).

La primera observación que mostró la existencia de una asimetría hipotalámica de tipo neuroendocrino fue dada por Gerendai y colaboradores (1978), al mostrar que en la rata hembra adulta la cantidad de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal (HMB) es significativamente mayor que en el izquierdo. Bakalkin y col., (1984) mostraron la misma asimetría en el hipotálamo la cual varía durante las horas del día. Arteaga-López y col. (2003) mostraron que la expresión del ARNm de la GnRH cambia durante el ciclo estral. En la región de POA-AHA de la rata, la expresión del ARNm de la GnRH es mayor en POA-AHA del lado derecho a las 13:00 h del día del diestro-2, mientras que del lado izquierdo no ocurre. La expresión de ARNm para RE  $\alpha$  tiene un máximo en la tarde del estro (17:00 h), seguido de un aumento de menor magnitud al mediodía del diestro-2 (13:00 h). La máxima expresión del mensajero para el RE  $\beta$  se observa al mediodía del diestro-2 (13:00 h). Estas variaciones durante el ciclo estral son asimétricas, de tal forma que el lado de POA-AHA que más expresa el RE  $\alpha$  es el lado derecho, mientras que el RE  $\beta$  se expresa en ambos lados: en el lado izquierdo a las 09:00 h y en el lado derecho a las 13:00 h del diestro-2. Las diferencias de expresión del ARNm de cada RE en cada lado de POA-AHA nos sugieren que puede desempeñar funciones diferentes o actuar en momentos diferentes en la regulación de la secreción de GnRH y por lo tanto en la ovulación.

También POA-AHA responde de manera asimétrica a las hormonas esteroideas; el implante de E<sub>2</sub> en el lado derecho del POA o del núcleo ventromedial de ratas hembras de cinco días de edad, provoca masculinización cuando los animales llegan a la edad adulta (estas hembras prefieren sexualmente a otras hembras). En cambio, cuando el E<sub>2</sub> se implanta en las zonas hipotalámicas del lado izquierdo ocurre defeminización (los animales no tienen ciclos estrales) (Nordeen y Yahr, 1982).

La región de POA-AHA y el HMB funcionan en forma asimétrica, ya que de la integridad de uno de los lados de estas estructuras pareadas depende que el animal ovule en el ciclo inmediato. Sin embargo, este control puede cambiar en función de las señales nerviosas intra y extra hipotalámicas que se generan por

el ambiente endocrino que predomina en cada ciclo estral (Cruz y Domínguez, 2001).

No sólo cada lado del hipotálamo regula en forma asimétrica la función de una y otra gónada sino que éstas responden de manera asimétrica a los mecanismos neuroendocrinos que la regulan. Así, el número de ovocitos liberado por el ovario izquierdo de la rata adulta es mayor que el del derecho (Domínguez y col., 1988). Cuando se extirpa el ovario derecho, el número de animales que ovulan es significativamente menor que cuando se extirpa la gónada izquierda (Chávez y col., 1987). En la rata ovariectomizada unilateralmente y adrenalectomizada, el ovario izquierdo secreta más testosterona y E<sub>2</sub> que el ovario derecho, 24 h después de efectuada la cirugía (Barco y col., 2003).

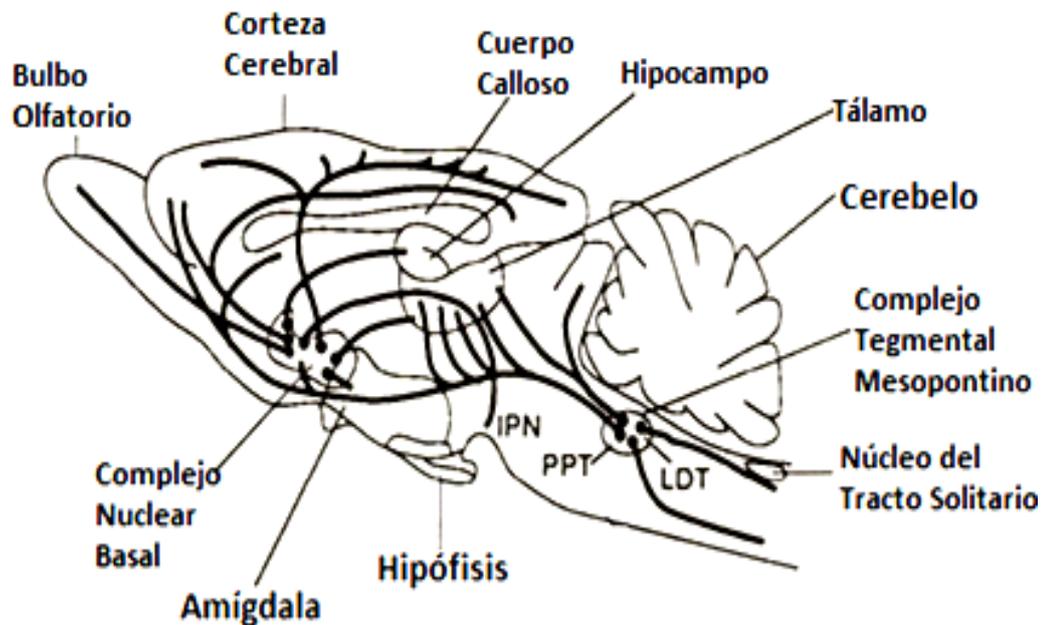
## **ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE LAS FIBRAS COLINÉRGICAS EN EL HIPOTÁLAMO**

Poca información se ha descrito sobre las vías colinérgicas que llegan al hipotálamo vinculadas con la regulación de la secreción de las gonadotropinas. En el cerebro anterior de la rata, se ha descrito la existencia de dos vías colinérgicas: la vía tegmental dorsal y la ventral.

La primera, formada por fibras que contienen tanto colinesterasa inespecífica (ChE) como acetilcolinesterasa (AChE), se origina en el núcleo cuneiforme de la formación reticulada mesencefálica y se proyecta hacia el tectum, el área pretectal, los cuerpos geniculados, el tálamo y el sistema límbico. Las fibras de la vía tegmental ventral, que sólo contienen AChE, se originan en la sustancia negra y el área tegmental ventral del cerebro medio, atraviesan el hipotálamo y el subtálamo hasta llegar al tallo cerebral. Desde aquí, muchas neuronas que contienen AChE, se proyectan a todas las regiones de la corteza cerebral y del bulbo olfatorio (Müller y col., 1977).

En el núcleo supramamilar del hipotálamo se ha observado una densa agrupación de células que contienen AChE (Jacobowitz y Palkovits, 1974), mientras que en el hipotálamo posterior y lateral existen células aisladas de este tipo, excepto en la parte rostral de este último (Fig. 10) (Müller y col., 1977). Otra área hipotalámica rica en células que contienen AChE es POA, las que envían axones hacia la amígdala a través de la estría terminal. En el hipotálamo dorsal también existen células AChE positivas, que se proyectan hacia el *globus pallidus* y el núcleo talámico reticular. Los NSCh, núcleo periventricular (NPeV) y el NAr tienen pocas fibras AChE, mientras que algunas de las células de los núcleos mamilares (Nm), del núcleo supraóptico (NSOp) y el núcleo paraventricular (NPaV) tienen moderada cantidad de la enzima, pero sus axones carecen de ella (Jacobowitz y Palkovits, 1974; Müller y col., 1977). En la rata

macho adulta, la corteza, el cerebro medio, el puente, el bulbo, la amígdala y el núcleo caudado presentan un patrón circádico en el contenido de AChE (Owasayo y col., 1980).

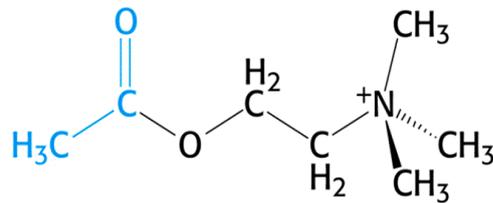


**Figura 10.** Las vías colinérgicas. Las neuronas colinérgicas se agregan en dos regiones del cerebro principalmente: el complejo basal nuclear, que envía axones hacia el bulbo olfatorio, corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo y el núcleo interpeduncular (IPN); y el núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) y el núcleo tegmental laterodorsal (LDT) de la región tegmental mesopontinos, que envían axones hacia el tálamo, el bulbo olfatorio y la corteza cerebral (Tomado de Brown, 1994).

Las neuronas colinérgicas se organizan principalmente como circuitos locales y neuronas de proyección (Clemens y col., 1997). El hecho de que después del aislamiento del hipotálamo medio basal no existan cambios significativos en la actividad de la colino-acetiltransferasa (CAT), abre la posibilidad de la existencia de una vía colinérgica tuberoinfundibular semejante a la dopaminérgica, la que podría ser responsable de las modificaciones neuroendocrinas provocadas por agentes acetilcolinomiméticos (estimulantes o inhibitorios) (Müller y col., 1977).

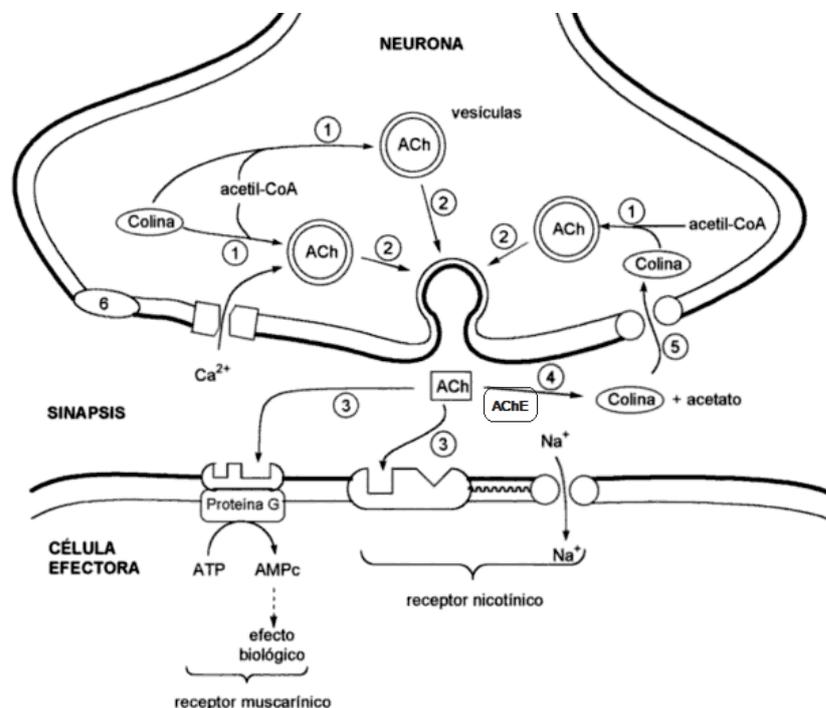
## ACETILCOLINA

La acetilcolina (ACh) fue el primer neurotransmisor descubierto por Otto Loewi en 1963, está constituida por una molécula de acetato y una de colina (Fig.11) (Mendoza, 2008).



**Figura 11.** Estructura molecular de la acetilcolina (Acetato + Colina).

La colina es capturada por la membrana presináptica, a través de un mecanismo de transporte activo, en el 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 CAT. El catabolismo de la ACh ocurre en la hendidura sináptica, en ese sitio se localiza la acetilcolinesterasa (AChE) que hidroliza a la ACh en colina y acetato en fracciones de segundo. La colina es recapturada nuevamente por la presinápsis, lo que induce el inicio de un nuevo ciclo de síntesis del neurotransmisor (Fig. 12) (Delgado, 2004).



**Figura 12.** Terminal nerviosa colinérgica. Se muestra 1) biosíntesis y almacenamiento, 2) liberación, 3) interacción con los receptores postsinápticos, 4) metabolismo en la hendidura sináptica por la AChE, 5) recaptura presináptica del precursor (colina), y 6) autorreceptores. (Modificado de Delgado, 2004).

Una vez sintetizada la ACh, se almacena en vesículas presinápticas, las cuales son llevadas al botón presináptico en respuesta a un potencial de acción que se propaga hasta la terminal sináptica, lo que induce el ingreso de  $Ca^{2+}$  y de esta forma por el mecanismo de exocitosis, se libera la ACh al espacio sináptico, la que se une a los receptores postsinápticos localizados en las estructuras efectoras (Mendoza, 2008).

Cuando la ACh se libera al espacio sináptico viaja hasta la estructura postsináptica y se une a dos tipos de receptores específicos. Los receptores muscarínicos ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  Y  $M_5$ ) y los nicotínicos ( $N_n$  y  $N_m$ ) (Mendoza, 2008). Estos tipos de receptores colinérgicos difieren en sus características estructurales y localización topográfica, así como en los mecanismos de transducción y amplificación de las señales intracelulares a los que se encuentran acoplados (Mendoza, 2008).

Los receptores muscarínicos (receptores metabotrópicos), están constituidos por siete dominios transmembranales y se encuentran acoplados a proteínas G. Algunos como los  $M_2$  y  $M_4$  están acoplados a la proteína  $G_i$  que inhiben la actividad de la adenilciclase y disminuye las concentraciones intracelulares del AMPc y otros a las proteínas  $G_{q/11}$  que activan la fosfolipasa C y aumentan las concentraciones de los segundos mensajeros, inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y el DAG ( $M_1$ ,  $M_3$ ,  $M_5$ ) (Mendoza, 2008).

En el SNC los receptores nicotínicos de la ACh tienen una estructura diferente (sólo están formados por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ), acoplados a canales iónicos dependientes de ligando (receptores ionotrópicos). Los receptores muscarínicos predominantes en el cerebro son del tipo  $M_1$ , que como ya se mencionó, se encuentran acoplados a proteínas  $G_q$ . En la rata se localizan principalmente en la corteza cerebral, en el núcleo *accumbens*, en la amígdala, en el hipocampo (Mendoza, 2008) y disminuyen gradualmente conforme nos ubicamos en el cordón espinal caudal (Wei y col., 1994). El subtipo  $M_2$  es más abundante en el tálamo, hipotálamo y puente troncoencefálico. El subtipo  $M_4$  se encuentra en mayor cantidad en el cuerpo estriado, mientras que  $M_3$  y  $M_5$  se expresan de manera semejante en todo el SNC (Wei y col., 1994).

## **SULFATO DE ATROPINA (ATR)**

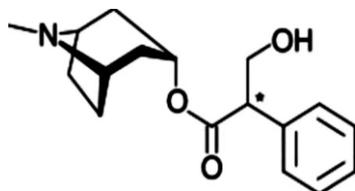
El sulfato de atropina (ATR) es un compuesto sintético, con forma cristalina incolora e inodora, que al mantenerlo al aire seco se convierte espontáneamente en polvo al perder el agua de la cristalización, adquiriendo un color blanco (Gennaro, 2003).

El ATR se extrae por medio de la desecación de las hojas, flores y fruto de la *Atropa belladonna*, (Fig. 13) (Raviña, 2008). El núcleo fundamental del alcaloide atropina es el tropano (N-metil-B-azabi-ciclo [3.2.1] octano), sistema

formado por un anillo de piperidina metilado en el átomo de nitrógeno y otro de pirrolidina con el fragmento C-N (CH<sub>3</sub>)-C y deriva de la tropina, 3-hidroxitropano. La atropina está constituida por la unión de un éster de tropina y el ácido tróponico rácemico (Fig. 14) (Raviña, 2008).



**Figura 13.** *Atropa belladonna* L. (Modificado de Raviña, 2008).



**Figura 14.** Estructura molecular de la Atropina (Modificado de Raviña, 2008)

## **PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO**

La ACh al unirse a los receptores muscarínicos de POA-AHA regulan en forma asimétrica la secreción de la GnRH y la ovulación, asimetría que cambia durante el ciclo estral (Cruz y col., 1989; Cruz y col., 1992). Esta afirmación se basa en los siguientes hechos: el implante de atropina en la porción derecha de POA-AHA (a las 13:00 h del día del estro) bloquea la ovulación, mientras que el implante del lado izquierdo no lo hace. Si el fármaco se coloca en el día del diestro-1, ambos implantes (izquierdo o derecho) bloquean la ovulación; en el día del diestro-2, sólo el implante del lado izquierdo la afecta, y en el día del proestro el implante en uno u otro lado de POA-AHA no la modifican (Cruz y col., 1989).

La estimulación del sistema colinérgico de POA-AHA, mediante implantes de pilocarpina, tiene un efecto opuesto al bloquear el sistema en el día del estro, el implante del lado izquierdo provoca el bloqueo de la ovulación, mientras que el del lado derecho no la afectan. En los días de diestro, tanto el implante del lado izquierdo o derecho impiden la ovulación; y en el día del proestro los efectos son muy semejantes a los observados en el día del estro (López y col., 1997).

La falta de ovulación en animales con implante unilateral de atropina en POA-AHA resulta de modificaciones en la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de LHRH sintético a las 14:00 h de este día, induce la ovulación en ratas con implante de atropina (Cruz y col., 1992).

Esta modificación en la secreción fásica de la GnRH parece ser el resultado de la alteración en el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos en la porción derecha de POA-AHA, ya que al restablecer esta señal ovárica en la tarde del diestro-2 (inyección subcutánea de 10µg benzoato de estradiol), induce la ovulación sólo en aquellos animales con implante de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA (Cruz y col., 1992).

Domínguez y col (1982) demostraron que esta regulación varía durante el ciclo estral (Domínguez y col., 1982). Ya que a las 13:00 h en el día del estro se requiere una dosis de 300 mg/kg de ATR para bloquear la ovulación en el 100% de los animales inyectados, 100 mg/kg de ATR en diestro-1 y de 300 mg/kg en diestro-2. Además, la actividad estimulante del sistema colinérgico no solo cambia con el día del ciclo, sino con la hora de la etapa considerada, ya que la administración de 100 mg/kg de ATR a las 09:00, 13:00, 17:00 o 21:00 h de cada fase del ciclo estral provoca que el porcentaje de animales que ovula varíe.

# JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Dado que en la rata adulta la ACh regula de manera estimulante la ovulación y a las 13:00 h en cada día del ciclo los efectos de la ACh dependen de la cantidad de ATR inyectada, por lo que en esta tesis se analizaron los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos, realizado a las 09:00 h del día del diestro-2 sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, mediante la cuantificación de la expresión del ARNm de la GnRH, del RE $\alpha$ , del RE $\beta$ , de la concentración sérica de E $_2$  y de P $_4$ , así como en la ovulación espontánea. Con la finalidad de conocer cuál de las señales endócrinas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario fue alterada por el bloqueo de los receptores muscarínicos, se llevó a cabo el reemplazo de la señal hipotalámica (por medio de la inyección de LHRH-sintética), la hipofisiaria (con gonadotropina coriónica humana o hCG) y la ovárica (con benzoato de estradiol o BE) en ratas inyectadas con el fármaco.

## HIPÓTESIS

Ya que los receptores muscarínicos regulan de manera estimulante la ovulación, pero esta función depende de la hora del día y de la etapa del ciclo estral que se considere, entonces, el bloqueo de estos receptores a las 09:00 h del diestro-2 alterará los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación de manera diferente a lo reportado a las 13:00 y 17:00 h. Además, la dosis efectiva para bloquear la ovulación espontánea en el 100% de los animales también será diferente.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos a las 09:00 h de la etapa del diestro-2 del ciclo estral, sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- En la etapa del diestro-2 investigar la dosis efectiva (DEf) de ATR que provoque el bloqueo de la ovulación en el 100% de las ratas inyectadas., investigar el tiempo que se retrasa la ovulación como resultado del bloqueo de los receptores muscarínicos con la DEf de ATR y analizar los efectos de la DEf de ATR sobre los ovocitos liberados, el peso de los ovarios y el útero.
- Estudiar los efectos de la DEf de ATR sobre la concentración sérica de hormonas esteroides ( $P_4$  y  $E_2$ ).
- Estudiar los efectos de la DEf de ATR sobre el perfil de la expresión del ARNm de la GnRH y de los receptores a estrógenos alfa y beta ( $RE\alpha$ ,  $RE\beta$ ) en el lado izquierdo y derecho del área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA).
- Estudiar las señales endócrinas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que fueron alteradas por la DEf de ATR, por reemplazo de la señal hipotalámica, hipofisaria y ovárica.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## **Animales**

Se utilizaron ratas hembras adultas (3 a 4 meses de edad) de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso al alimento y al agua.

Los animales se mantuvieron en grupos de seis por caja y se les realizó el estudio del ciclo estral por medio de la toma diaria de frotis vaginal. Sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración.

## **Investigar la dosis efectiva (DEf) de ATR que provocara el bloqueo de la ovulación sobre los ovocitos liberados, el peso de los ovarios y el útero.**

A las 09:00 h del día del diestro-2, se formaron grupos de 8 ratas, a un grupo se les dejó intactas como grupo control; otro grupo fue inyectado subcutáneamente con agua desmineralizada Theissire (conductividad eléctrica de  $2\mu\Omega$ , pH 6), como grupo vehículo; otros grupos fueron inyectados subcutáneamente con 100, 375 o 500 mg/kg peso de ATR (ATR 100, ATR 375 o ATR 500).

Los animales fueron sacrificados a las 09:00 h del estro esperado para pesar los ovarios y el útero, y se contaron el número de ovocitos liberados en las trompas uterinas.

## **Investigar el tiempo que se retrasa la ovulación por la inyección de la DEf de ATR**

A un nuevo grupo se les inyectó la Dosis Efectiva (DEf), es decir la que indujo el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales inyectados, este grupo fue sacrificado a las 09:00 h el día del estro vaginal (cuando las células del epitelio vaginal correspondieran al característico del estro) y se contaron el número de ovocitos liberados en las trompas uterinas.

## **Estudiar los efectos de la DEf de ATR sobre la concentración sérica hormonas esteroideas ( $P_4$ y $E_2$ ).**

Se sacrificaron animales control, vehículo e inyectados con la DEf de ATR a las 13:00 h del diestro-2, a las 11:00 h del proestro y a las 09:00 h del estro esperado por decapitación, la sangre del tronco se colectó en tubos de ensayo, que se dejaron reposar a temperatura ambiente por 20 minutos, posteriormente las muestras fueron centrifugadas (en una centrifuga marca UNICO®, Power Spin™ MX) durante 30 minutos, con ayuda de una micropipeta se colocaron 500  $\mu$ L de suero en un tubo eppendorf, que se mantuvieron a  $-4^\circ$  C hasta la cuantificación de las hormonas por radio-inmuno-análisis (RIA).

### **Estudiar los efectos de la D<sub>EF</sub> de ATR sobre la expresión del ARNm de la GnRH y de los receptores a estrógenos alfa y beta (RE $\alpha$ , RE $\beta$ ) en el lado izquierdo y derecho del área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA).**

Se sacrificaron animales control, vehículo e inyectados con la D<sub>EF</sub> de ATR a las 13:00 h del diestro-2, a las 11:00 h del proestro y a las 09:00 h del estro esperado por decapitación, en seguida se extrajeron los cerebros de cada grupo experimental y se colocaron en solución salina fría. El cerebro se colocó en una cama de hielo sobre una caja petri cubierta con papel filtro, con base a la técnica propuesta por Palkovits (1973), viendo el cerebro por la parte ventral, se realizó un primer corte *frontal* a la altura de los nervios ópticos, otro *posterior* a la altura de la parte media del hipotálamo, y dos cortes *laterales* en los límites de los surcos hipotalámicos. A las muestras de tejido de POA-AHA se les extrajo el ARNm total utilizando la metodología habitual del laboratorio (Arteaga-López y col., 2003). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro para conocer la concentración de ARNm, posteriormente para obtener el ADN complementario (ADNc) se realizó la retrotranscripción (RT) del ARN y por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de los genes de los RE- $\alpha$ , RE- $\beta$  y el de GnRH; una vez obtenidas las muestras el ARNm se mezcló con 10  $\mu$ L de solución de carga, se cargaron 25  $\mu$ L de cada muestra en el gel y se corrieron. El corrimiento de las muestras se observó en un transiluminador de luz ultravioleta y los negativos de las fotografías del gel se cuantificaron por densitometría. El valor obtenido se expresó como la expresión relativa del ARNm para GnRH, RE $\alpha$  y  $\beta$ .

### **Estudiar las señales endócrinas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que fueron alteradas por la D<sub>EF</sub> de ATR**

A un grupo de animales tratados con la D<sub>EF</sub> de ATR es decir la que indujo el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales inyectados, se les reemplazó la señal hipotalámica por medio de la inyección subcutánea de 3.7  $\mu$ g/kg peso de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) sintética (Humphrey y col., 1973) a las 14:00 h del día del proestro; a otro grupo de animales tratados con la D<sub>EF</sub> de ATR se les reemplazó la señal hipofisiaria con 25 u.i. de gonadotropina coriónica humana (hCG) a las 14:00 h del diestro-2; por último a otro grupo tratado con la D<sub>EF</sub> de ATR se les reemplazó la señal ovárica con la inyección subcutánea de 10  $\mu$ g de benzoato de estradiol (BE) a las 14:00 h del día del diestro-2.

Todos los animales fueron sacrificados el día del estro esperado a las 09:00 h por una sobredosis con éter e inmediatamente se extrajeron los ovarios y se disecaron los oviductos con la finalidad de contar el número de ovocitos liberados, con ayuda de un microscopio estereoscópico.

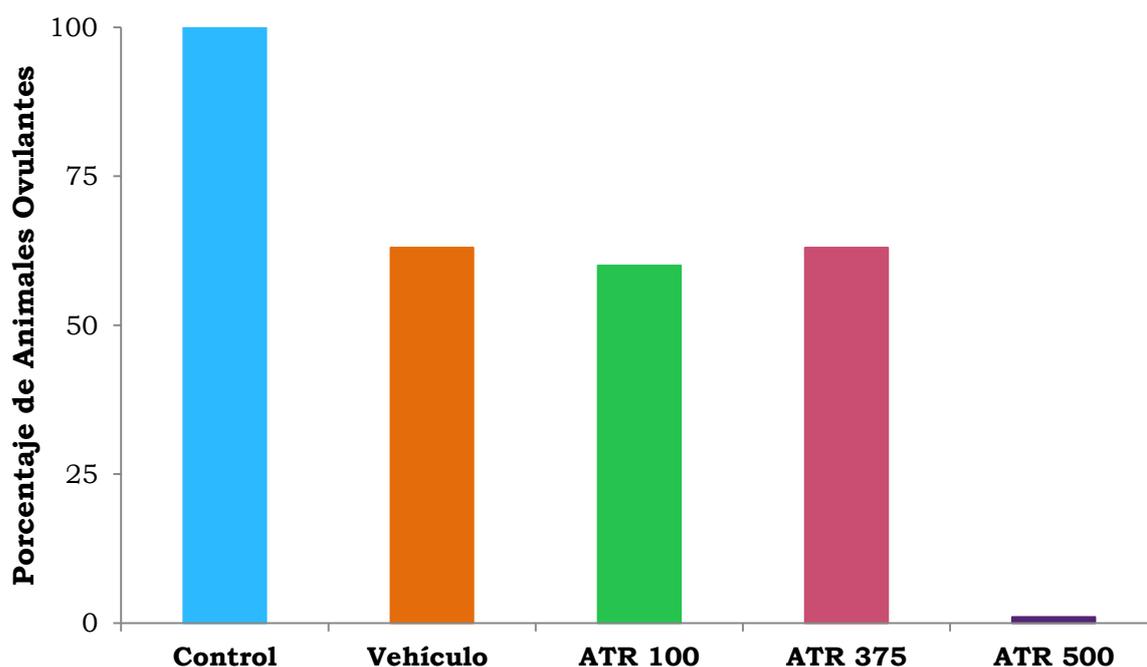
### **Análisis estadístico**

Los resultados del peso relativo de los ovarios y del útero, de la expresión del ARNm de GnRH, del RE $\alpha$ , del RE $\beta$ , así como los de la concentración de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en suero, se analizaron utilizando la prueba de Análisis de Varianza Múltiple, seguida de la prueba de Tukey. Los resultados del número de ovocitos liberados se analizaron por la prueba de Kruskal- Wallis, seguida de la prueba de Dunn. Para los casos en los que se compararon los resultados de dos muestras, se utilizó la prueba de “t” de Student o la de “U” de Mann-Witney (para datos paramétricos y no-paramétricos respectivamente). En todos los casos se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue  $\leq 0.05$ .

# RESULTADOS

INVESTIGAR LA DOSIS EFECTIVA (*DEf*) DE ATR QUE PROVOCARA EL BLOQUEO DE LA OVULACIÓN, SOBRE LOS OVOCITOS LIBERADOS, EL PESO DE LOS OVARIOS Y EL ÚTERO.

Con respecto al grupo de animales sacrificados en el estro vaginal, la inyección del vehículo no modificó el número de animales que ovularon espontáneamente al estro esperado (5/8 vs. 8/8,  $p= 0.2$ ). En los animales que se les administró 100 o 375 mg/kg de ATR (ATR 100 y ATR 375) a las 09:00 h del diestro-2, se observó un comportamiento similar. En cambio, la inyección de 500 mg/kg de ATR (ATR 500) bloqueó la ovulación en el 100% de los animales tratados, por lo que ésta fue considerada la *DEf* (Gráfica 1).

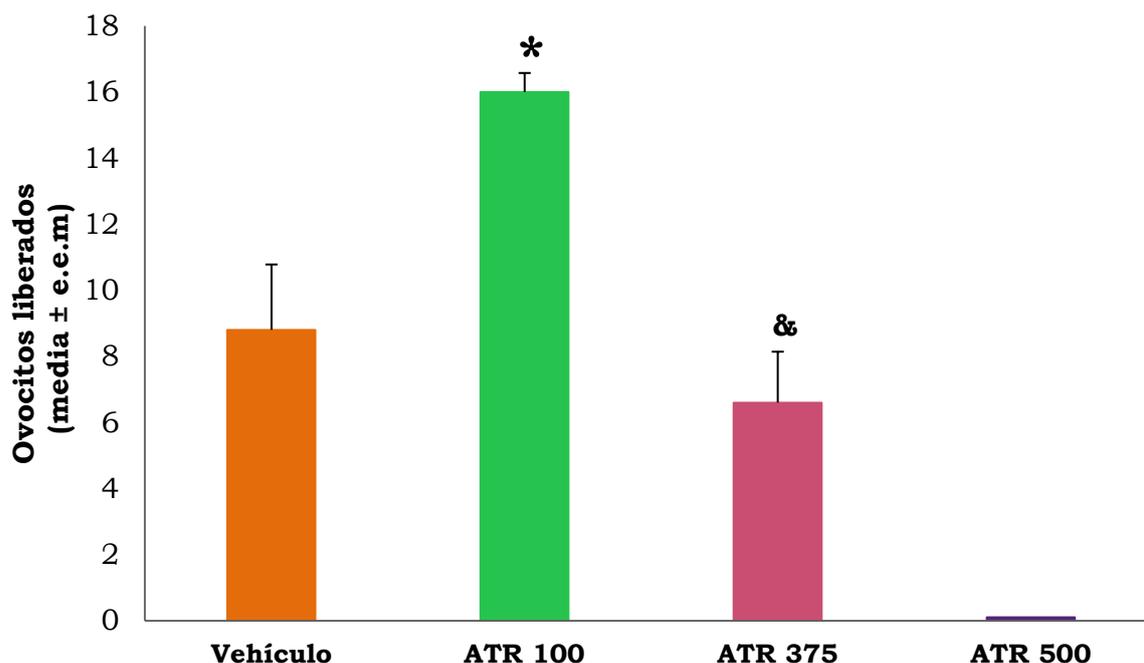


**Gráfica 1.** Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado, después de ser inyectados con vehículo o con 100 (100 ATR), 375 (375 ATR) o 500 mg/kg (500 ATR) de ATR a las 09:00 h del diestro-2.

En el grupo de animales inyectados con la *DEf* de ATR, la ovulación se retrasó 24 horas en todos los animales inyectados.

La inyección de vehículo no modificó el número de ovocitos que se liberan espontáneamente al estro esperado (vehículo vs. control) ( $8.8 \pm 2.0$  vs.  $10.1 \pm 1.2$ ,  $p= 0.3309$ )

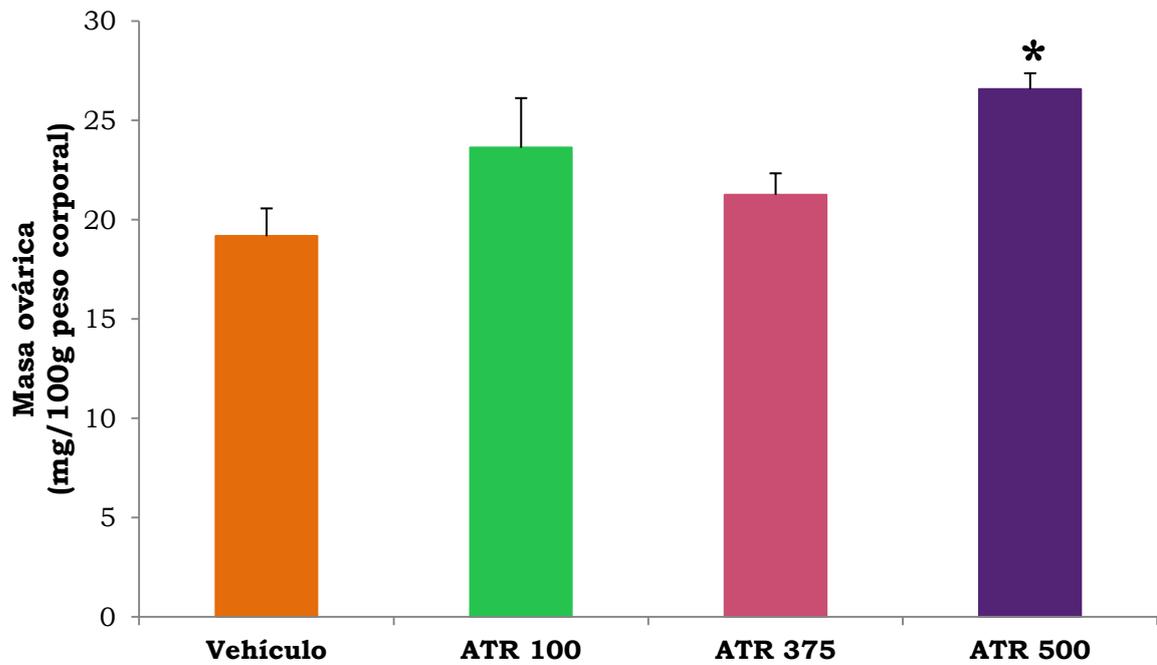
El número de ovocitos liberados aumento en el grupo de animales inyectados con ATR 100, cuando se compara con el grupo vehículo. La inyección ATR 375 disminuyó el número de ovocitos en comparación con el grupo inyectado con ATR 100 (Gráfica 2).



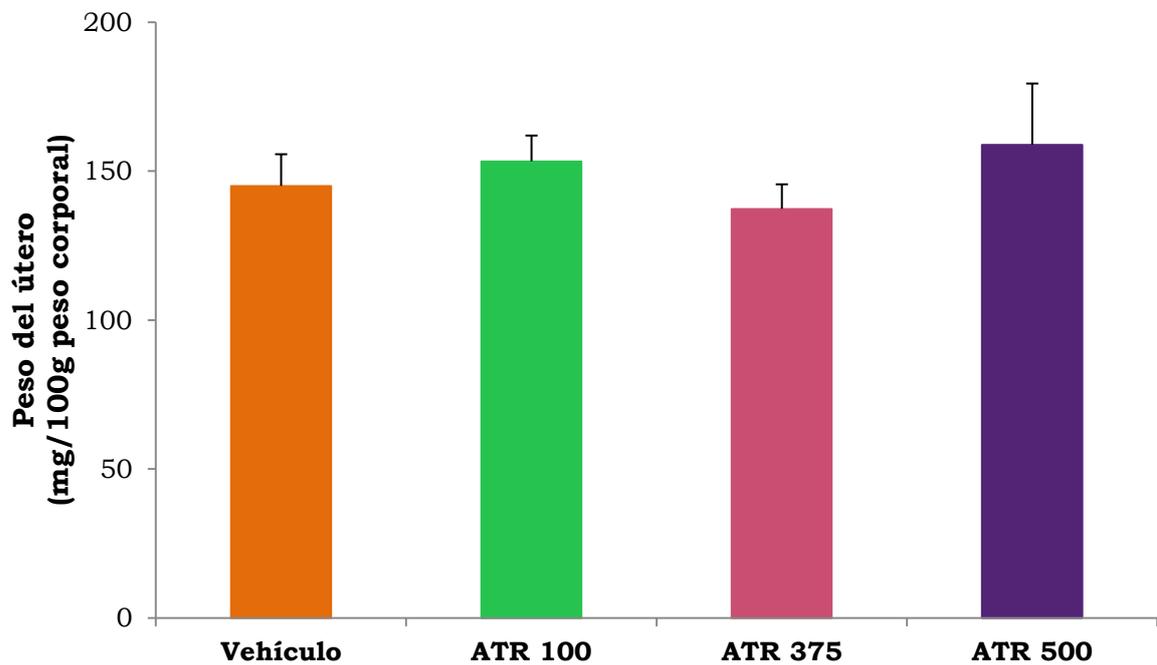
**Gráfica 2.** Media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberado por los animales sacrificados al estro esperado después de ser inyectados con vehículo o con 100 (100 ATR), 375 (375 ATR) o 500 mg/kg (500 ATR) de ATR a las 09:00 h del diestro-2. \*  $p<0.05$  vs. vehículo; &  $p<0.05$  vs. ATR 100 (Kruskal Wallis seguida de la prueba de Dunn)

La masa ovárica (peso del ovario izquierdo + peso del ovario derecho) en el grupo vehículo fue semejante al grupo control ( $19.16 \pm 1.39$  vs.  $23.44 \pm 1.14$ ,  $p= 0.3082$ ). La inyección de la DEF de ATR aumento la masa ovárica respecto al grupo vehículo (Grafica 3).

El peso del útero no se modificó por la inyección del vehículo ( $145.0 \pm 10.62$  vs.  $129.2 \pm 4.4$  mg/100 g  $p= 0.4474$ ), ni por los diferentes tratamientos con ATR (Gráfica 4).



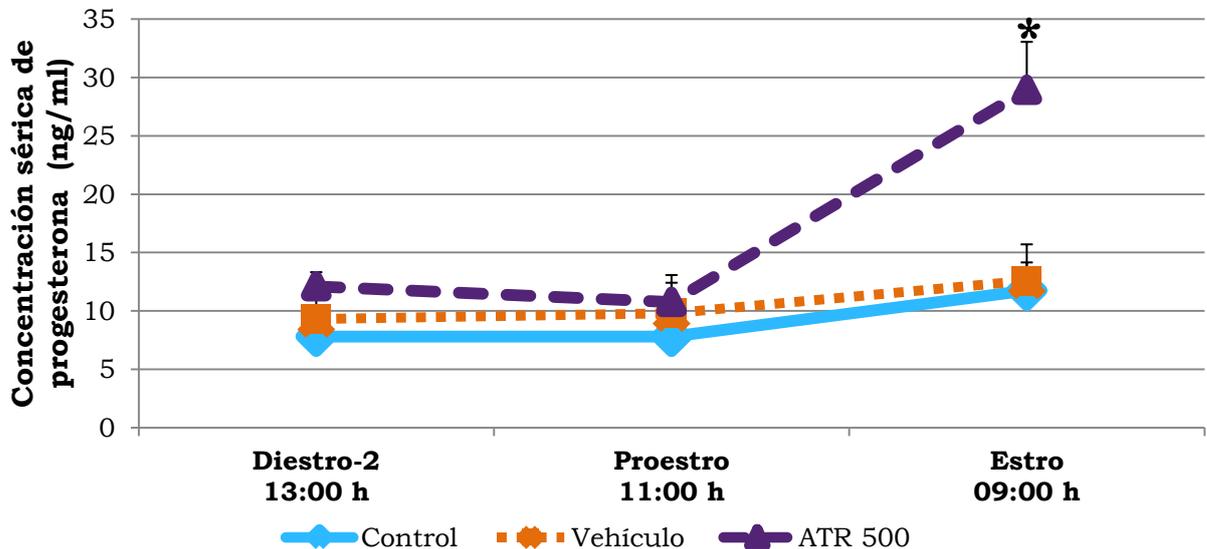
**Gráfica 3.** Media  $\pm$  e.e.m. de la masa ovárica (suma del peso del ovarios izquierdo y derecho) de los animales sacrificados al estro esperado después de ser inyectados con vehículo o con 100 (100 ATR), 375 (375 ATR) o 500 mg/kg (500 ATR) de sulfato de atropina a las 09:00 h del diestro-2. \*  $p < 0.05$  vs. vehículo. (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).



**Gráfica 4.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los úteros de los animales inyectados con vehículo o con 100 (100 ATR), 375 (375 ATR) o 500 mg/kg (500 ATR) de ATR a las 09:00 h del diestro-2.

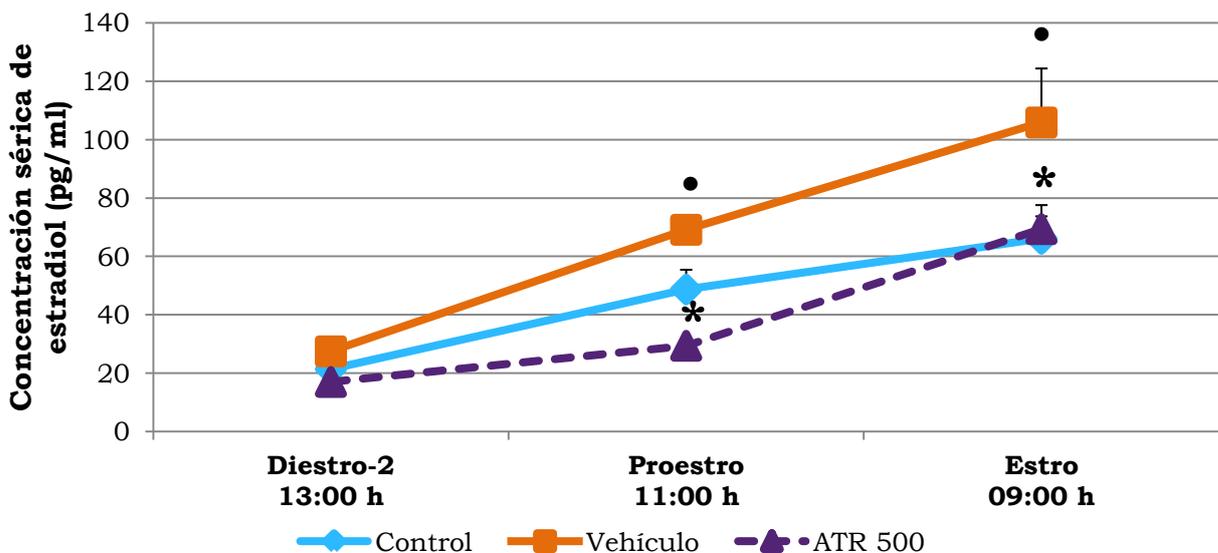
## ESTUDIAR LOS EFECTOS DE LA DEF DE ATR SOBRE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA HORMONAS ESTEROIDES (P<sub>4</sub> Y E<sub>2</sub>).

La concentración de P<sub>4</sub> no fue modificada por la inyección del vehículo. En cambio, la administración de la DEF de ATR (ATR 500) aumentó la concentración de la hormona en la mañana del estro esperado (Gráfica 5).



**Gráfica 5.** Concentración sérica de progesterona (ng/ml) en ratas control o inyectadas con vehículo o con ATR 500 a las 09:00 h del diestro-2, sacrificadas a las 13:00 h del diestro-2, 11:00 h del proestro y 09:00 h del estro esperado. \*  $p < 0.05$  vs. vehículo. (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

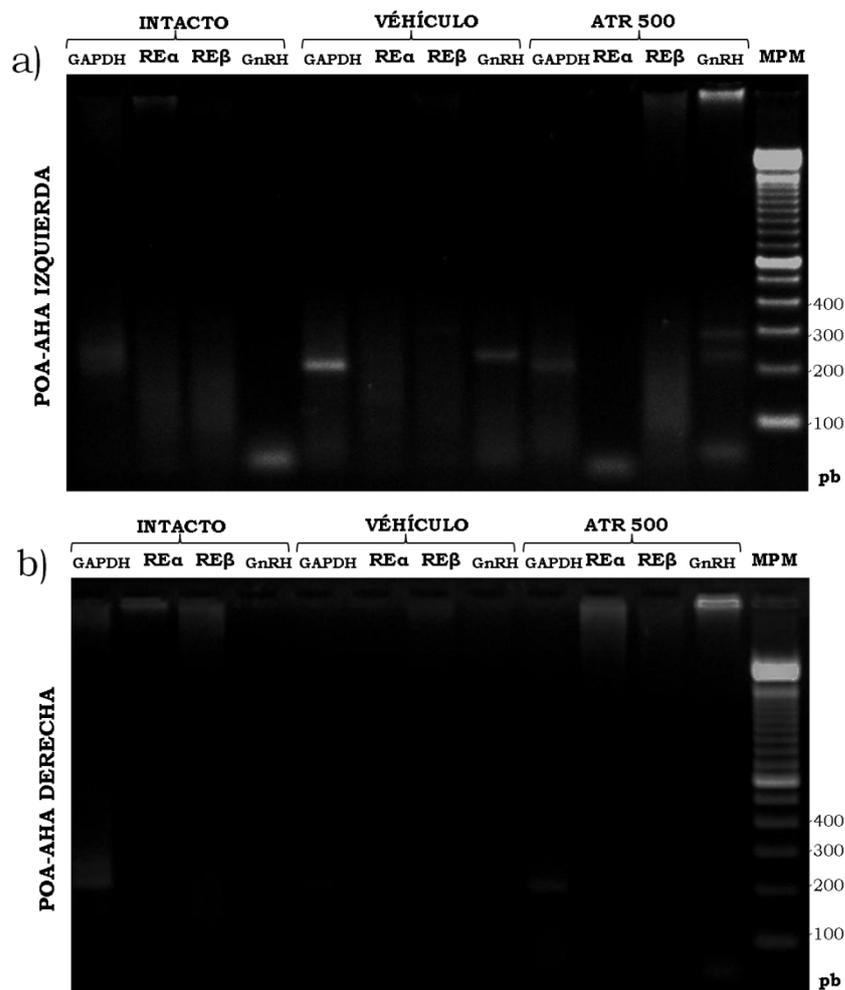
La inyección de vehículo provocó aumento en la concentración de E<sub>2</sub> a las 11:00 h del proestro y en la mañana del estro esperado. Mientras que la inyección de ATR 500 causó una disminución a las mismas horas (Gráfica 6).



**Gráfica 6.** Concentración sérica de estradiol (pg/ml) en ratas control o inyectadas con vehículo o con ATR 500 a las 09:00 h del diestro-2, sacrificadas a las 13:00 h del diestro-2, 11:00 h del proestro y 09:00 h del estro esperado. •  $p < 0.05$  vs. control; \*  $p < 0.05$  vs. vehículo (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

ESTUDIAR LOS EFECTOS DE LA DEF DE ATR SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA GnRH Y DE LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS ALFA Y BETA ( $RE\alpha$ ,  $RE\beta$ ) EN EL LADO IZQUIERDO Y DERECHO DEL ÁREA PREÓPTICA-HIPOTALÁMICA ANTERIOR (POA-AHA).

El análisis densitométrico de la expresión del ARNm de la GnRH, el  $RE\alpha$  y para el  $RE\beta$  en cada porción de POA-AHA se realizó en tres experimentos independientes de RT-PCR. Los valores obtenidos se expresaron con respecto a los valores de expresión del GAPDH. En la Fig. 15, se muestra un gel representativo de los tres utilizados para evaluar los efectos del vehículo y la ATR en la amplificación del ARNm para la GnRH, para el  $RE\alpha$  y para el  $RE\beta$ .



**Figura 15.** Ensayo de RT-PCR representativo de 3 repeticiones independientes para amplificar GAPDH,  $RE\alpha$ ,  $RE\beta$  y GnRH a partir del ARN total de las porciones de POA-AHA a) izquierda o b) derecha de grupos de ratas intacto, vehículo o inyectadas subcutáneamente con la Def de ATR (GAPDH 201 pb, GnRH 250 pb,  $RE\alpha$  337 pb,  $RE\beta$  301 pb).

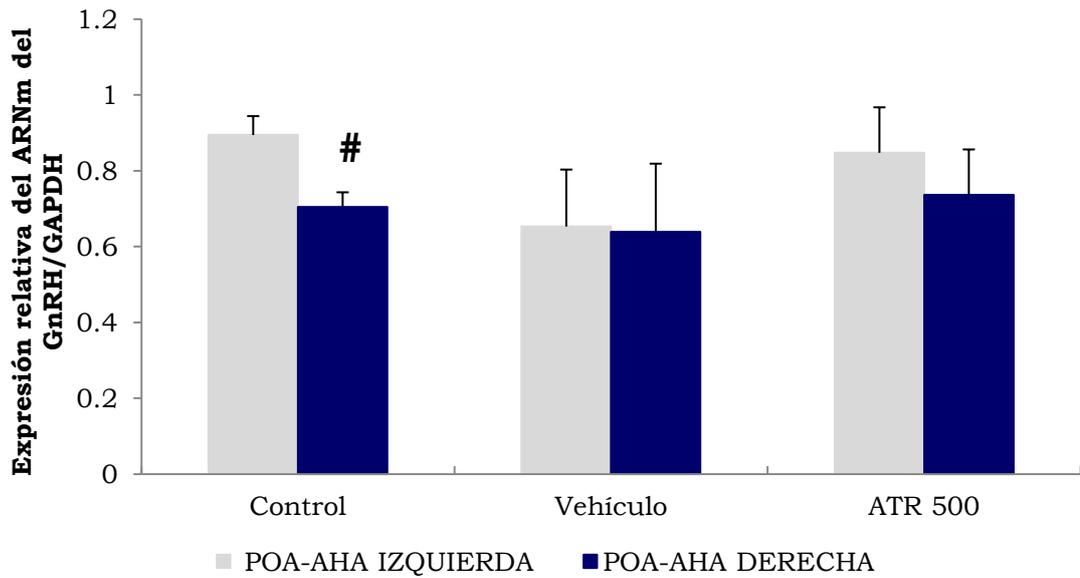
## EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE LA GnRH EN LA PORCIÓN IZQUIERDA O DERECHA DE POA-AHA

En el grupo control, la expresión del ARNm de la GnRH a las 13:00 h del diestro-2 fue menor en POA-AHA derecha que en POA-AHA izquierda. A las 11:00 h del proestro, la expresión del ARNm de la GnRH fue mayor en POA-AHA derecha que en POA-AHA izquierda (Gráfica 7).

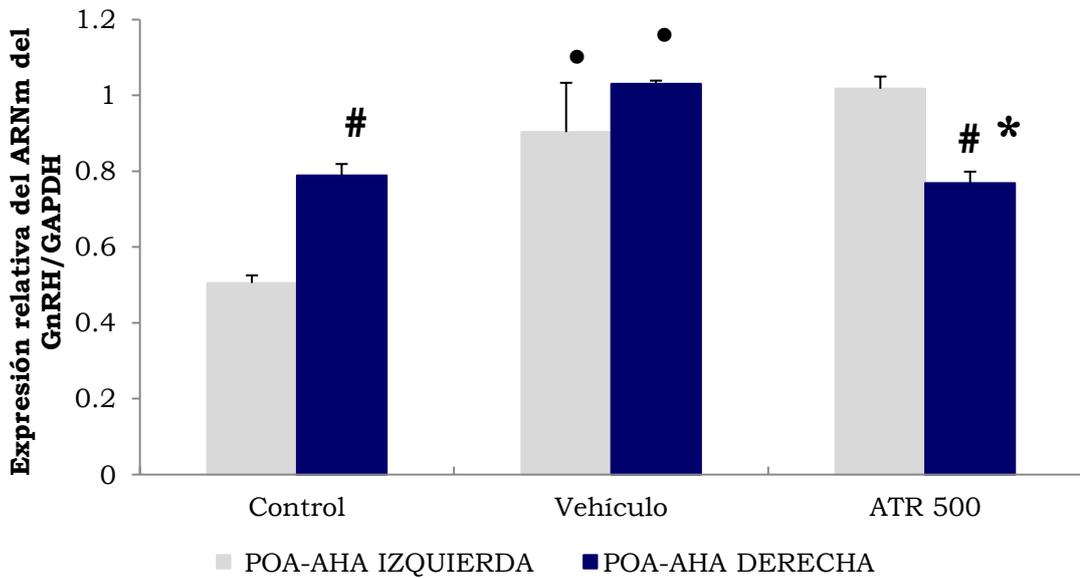
Con respecto a los animales control, la inyección de vehículo no alteró la expresión del ARNm de la GnRH en la tarde del diestro-2 en ningún lado de POA-AHA. En cambio, en la mañana del proestro la inyección del vehículo incrementó la expresión del ARNm de la GnRH en ambos lados de POA-AHA. (Gráfica 7).

Con respecto al grupo de ratas inyectadas con el vehículo, la inyección de ATR no alteró la expresión del ARNm de la GnRH en la tarde del diestro-2. En cambio, comparando con la expresión del mensajero inyectando el vehículo en la mañana del proestro la inyección del fármaco incrementó la expresión del mensajero en POA-AHA derecha; resultado que fue diferente con respecto al resultado de POA-AHA izquierda (Gráfica 7).

## Diestro-2 13:00 h



## Proestro 11:00 h



**Gráfica 7.** Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para GnRH en POA-AHA izquierda y derecha de ratas control o inyectadas con vehículo o con ATR 500. #  $p < 0.05$  vs. POA-AHA izquierda (“t” de Student seguida de U Mann Withney); •  $p < 0.05$  vs. control; \*  $p < 0.05$  vs. vehículo (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

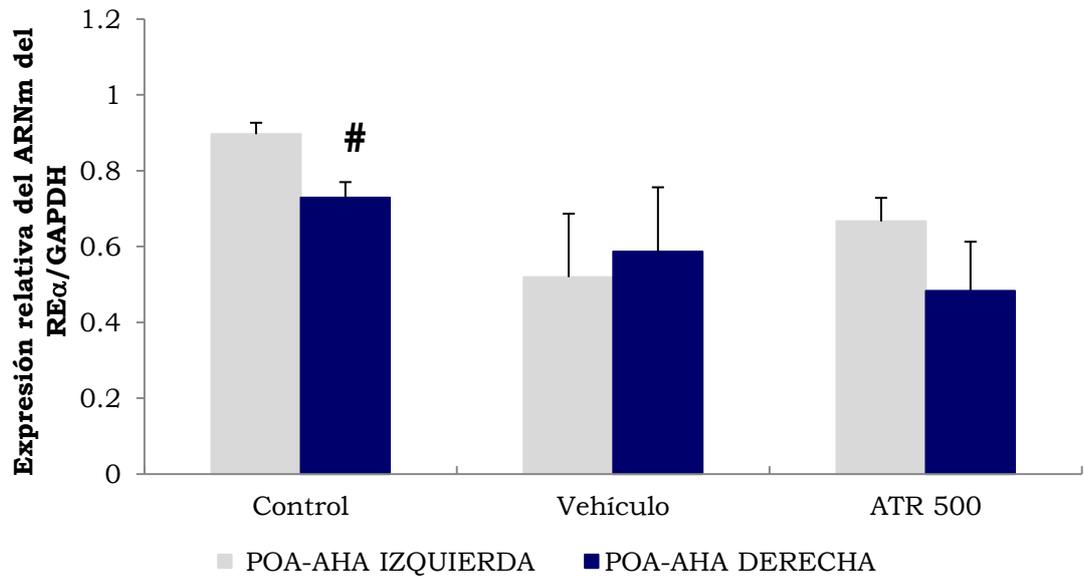
## EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE $\alpha$ EN LA PORCIÓN IZQUIERDA O DERECHA DE POA-AHA

En el grupo control, la expresión del ARNm del RE $\alpha$  a las 13:00 h del diestro-2 fue menor en POA-AHA derecha que en POA-AHA izquierda. A las 11:00 h del proestro, la expresión del ARNm del RE $\alpha$  fue mayor en POA-AHA derecha que en POA-AHA izquierda (Gráfica 8).

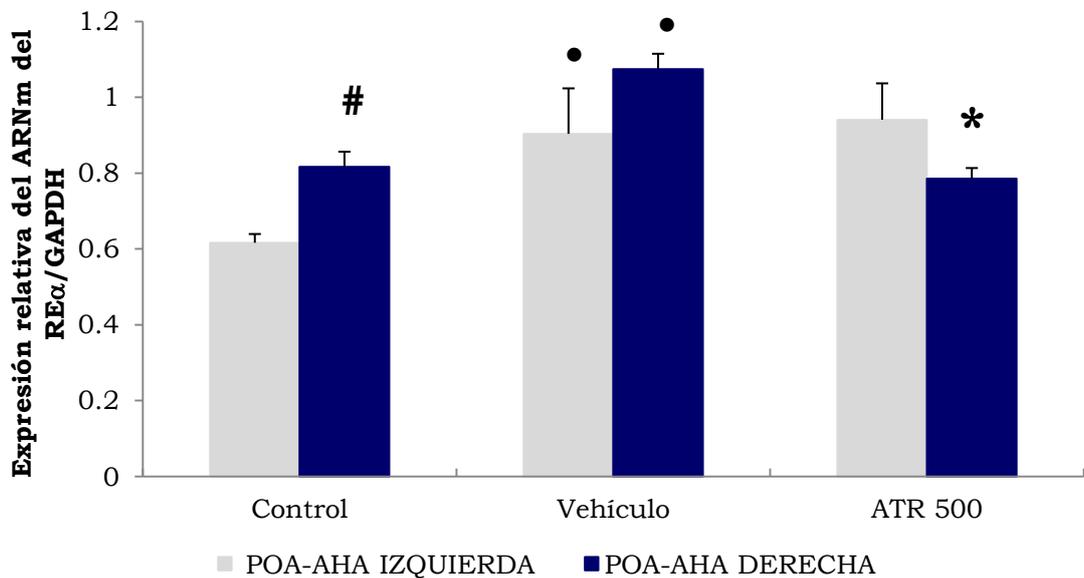
Con respecto a los animales control, la inyección de vehículo no alteró la expresión del ARNm del RE $\alpha$  en la tarde del diestro-2 ni en POA-AHA izquierda ni en POA-AHA derecha, en cambio en la mañana del proestro la inyección del vehículo aumento la expresión del ARNm en ambas porciones de POA-AHA. (Gráfica 8).

En la tarde del diestro-2 la inyección de ATR 500 no alteró la expresión del ARNm del RE $\alpha$  en ninguno de los lados de POA-AHA, mientras que en la mañana del proestro en la porción derecha de POA-AHA la inyección de ATR 500 disminuyó la expresión del ARNm con respecto a la del grupo vehículo. (Gráfica 8).

Diestro-2 13:00 h



Proestro 11:00 h



**Gráfica 8.** Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para el RE $\alpha$  en la porción izquierda y derecha de POA-AHA de ratas control, o inyectadas con vehículo o con ATR 500.

#  $p < 0.05$  vs. POA-AHA izquierda ("t" de Student seguida de U Mann Withney); •  $p < 0.05$  vs. control; \*  $p < 0.05$  vs. vehículo (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

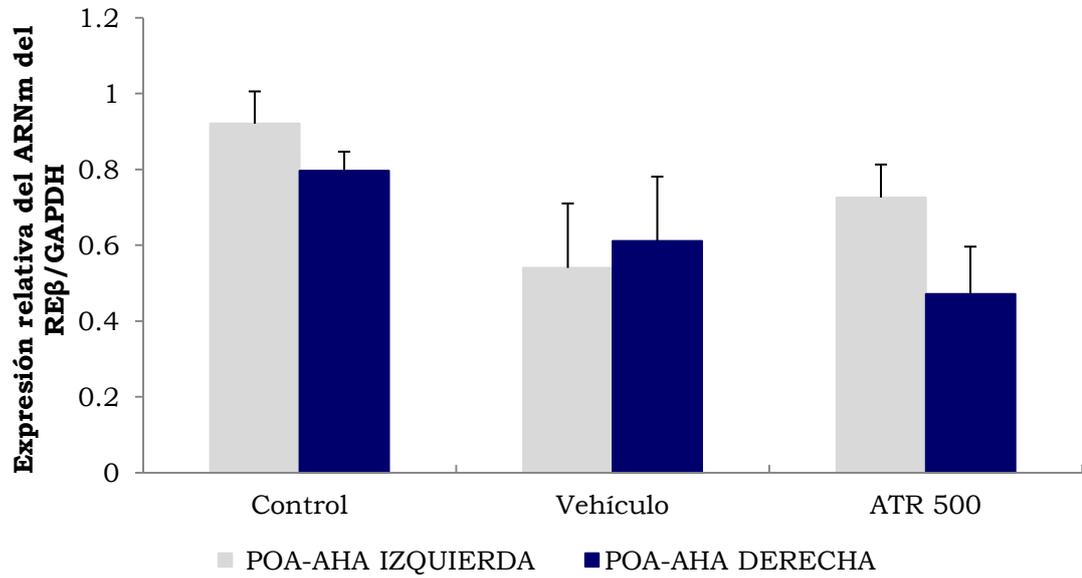
## EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL RE $\beta$ EN LA PORCIÓN IZQUIERDA O DERECHA DE POA-AHA

En el grupo control, la expresión del ARNm del RE $\beta$  a las 11:00 h del proestro fue mayor en POA-AHA derecha que en POA-AHA izquierda (Gráfica 8).

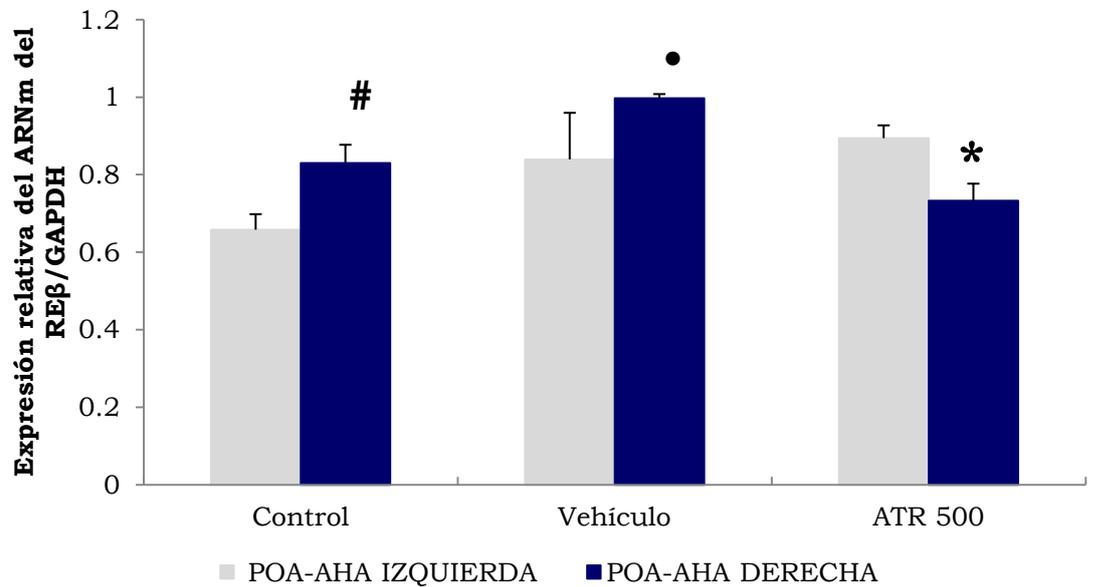
Con respecto al grupo control, la inyección del vehículo no modificó la expresión del ARNm en la tarde del diestro-2 mientras que en la mañana del proestro la expresión del grupo inyectado con vehículo fue mayor del lado derecho de POA-AHA que del izquierdo

La expresión del ARNm del RE $\beta$  cuando se inyectó ATR 500 no se modificó en la tarde del diestro-2, mientras que en la mañana del proestro en la porción derecha de POA-AHA la expresión disminuyó con respecto a la del grupo vehículo. (Gráfica 9).

## Diestro-2 13:00 h



## Proestro 11:00 h

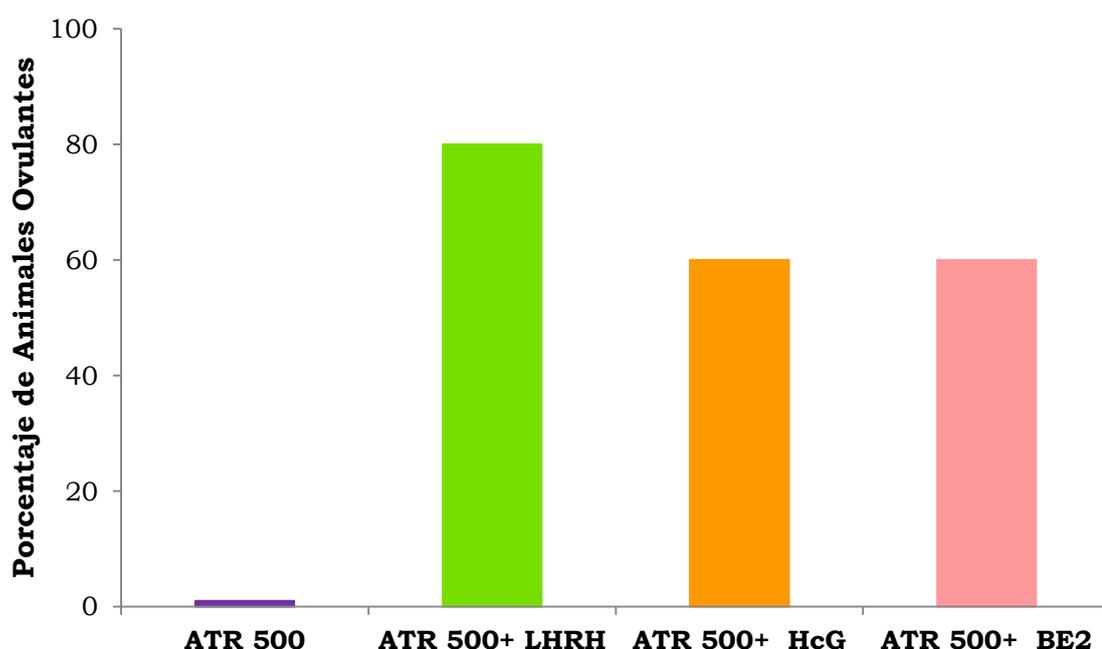


**Gráfica 9.** Media  $\pm$  e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para RE $\beta$  en la porción izquierda y derecha de POA-AHA de ratas control, o inyectadas con vehículo o con ATR 500.

#  $p < 0.05$  vs. POA-AHA izquierda (“t” de Student seguida de U Mann Withney); •  $p < 0.05$  vs. control; \*  $p < 0.05$  vs. vehículo (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

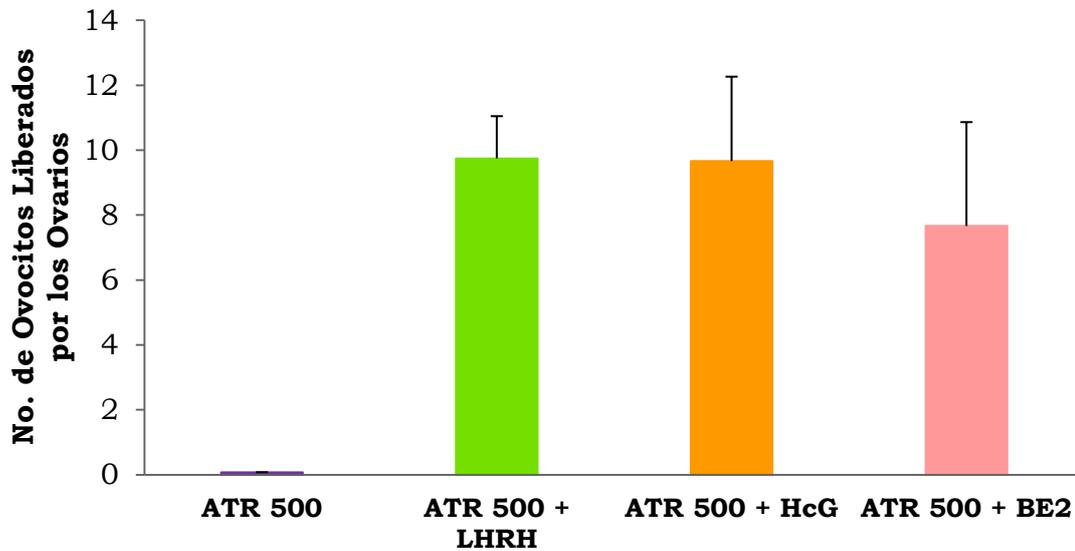
## ESTUDIAR LOS EFECTOS DEL REEMPLAZO HORMONAL DE LA SEÑAL HIPOTALÁMICA, HIPOFISIARIA Y OVÁRICA DESPUÉS DE LA INYECCIÓN SUBCUTÁNEA DE LA *Def* DE ATR, SOBRE LA OVULACIÓN Y EL PESO DE LOS OVARIOS Y DEL ÚTERO

El reemplazo de la señal hipotalámica por la inyección de la LHRH sintética, realizada a las 14:00 h del proestro restableció la ovulación en el 80% de los animales inyectados con la *Def* de ATR. Mientras que el restablecimiento de la señal hipofisiaria con hCG a las 14:00 h del proestro, o de la señal ovárica con BE a las 14:00 h del diestro-2, indujo la ovulación en el 60% de los animales tratados con la *Def* de ATR (Gráfica 10).



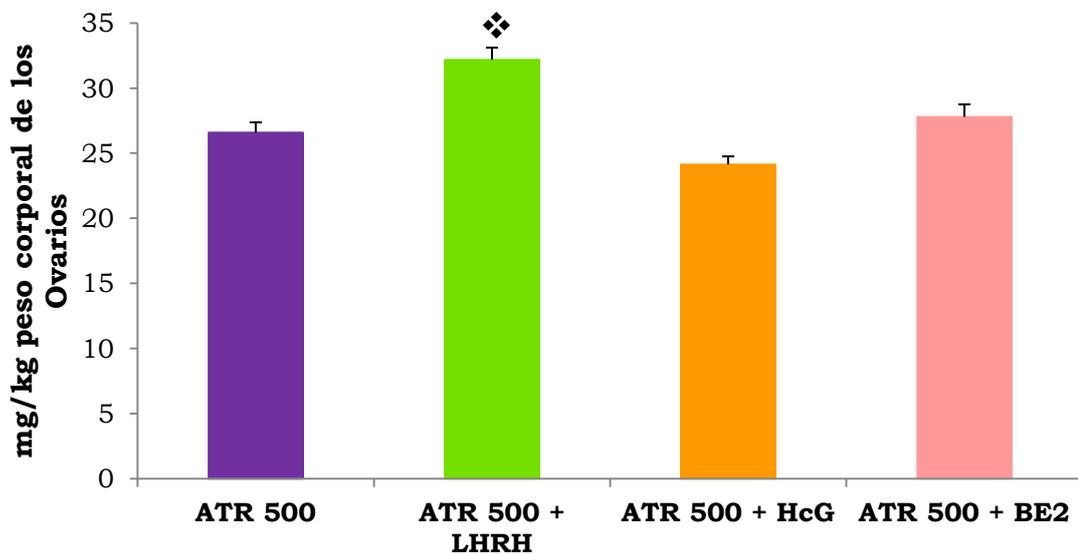
**Gráfica 10.** Porcentaje de animales que ovularon en el día del estro esperado, con el reemplazo de la señal hipotalámica por LHRH, la señal hipofisiaria por hCG o de la señal ovárica con BE, después de ser inyectados con la Dosis Efectiva de ATR.

No hubo diferencia estadísticamente significativas en el número de ovocitos liberados por los animales que fueron inyectados con LHRH, hCG o con BE, después de haber sido inyectados con ATR 500 (Gráfica 11).



**Gráfica 15.** Media ± e.e.m. de los ovocitos liberados por ambos ovarios de los animales que ovularon en el día del estro esperado, con el reemplazo de la señal hipotalámica por LHRH, la señal hipofisiaria por hCG o de la señal ovárica con BE; después de ser inyectados con la DEF de ATR.

La masa ovárica aumentó en los animales con reemplazo la señal hipotalámica (LHRH sintética) cuando se compara con la de los animales tratados con la DEF de ATR. (Gráfica 16).



**Gráfica 16.** Media ± e.e.m. de la masa ovárica de los animales inyectados con la DEF de ATR y reemplazo de la señal hipotalámica por LHRH, la señal hipofisiaria por hCG o de la señal ovárica con BE.

❖  $p < 0.05$  vs. ATR 500 (ANOVA seguida de prueba de Tukey)

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del presente estudio muestran que bloqueo del sistema colinérgico por la inyección subcutánea de ATR a las 09:00 h del diestro-2 bloquea la ovulación como resultado de un efecto inhibitorio en la síntesis de  $E_2$  y en la expresión de ARN mensajero de GnRH, del  $RE\alpha$  y del  $RE\beta$  en el lado derecho de POA-AHA. Con base en estos resultados sugerimos que en la mañana del diestro-2, la ACh al unirse a los receptores muscarínicos en POA-AHA, la hipófisis, el ovario o en las tres estructuras, regula de manera estimulante los mecanismos neuroendocrinos que permitirán que el animal ovule en la mañana del estro, ya que en todos estos órganos se han identificado y caracterizado receptores muscarínicos (Egozi, 1986; Pintér, 1999; Mayerhofer, 2002). *In vitro* se ha mostrado que el número de receptores muscarínicos en POA varía durante el ciclo estral (Egozi, 1986). Por medio de competidores antagonistas muscarínicos, se ha identificado la presencia de receptores muscarínicos del subtipo M1 y M3 en la hipófisis (Pintér, 1999). Por medio de RT-PCR e inmuno-histoquímica se ha mostrado que las células de la granulosa de los folículos preovulatorios del ovario de rata, expresan receptores muscarínicos del subtipo M1 y M5, mientras que en el ovocito está presente el subtipo M3 (Mayerhofer, 2002).

Dado que la expresión de los ARNm de la GnRH y de los  $RE\alpha$  y  $RE\beta$  haya disminuido en la mañana del proestro, por la inyección de ATR, sugerimos que la ACh unida a los receptores muscarínicos es uno de los factores que aseguran la ovulación en la mañana del estro. Gore y Roberts (1997) señalan que el máximo de ARNm de GnRH detectado en la mañana del proestro es el que una vez traducida a proteína, estimula la secreción pre-ovulatoria de éste péptido y la secreción preovulatoria de la LH.

Dado que el bloqueo de los receptores muscarínicos provocó la disminución de los mensajeros en el lado derecho de POA-AHA, corrobora el papel asimétrico de la ACh en los mecanismos de regulación de la ovulación (Cruz y col., 1989). Dicha función asimétrica es explicada en parte como resultado de un mayor número y una mayor afinidad de los receptores muscarínicos en el lado derecho de POA-AHA (Cruz y col., 1997).

A partir de estos hechos sugerimos que en la mañana del diestro-2 los receptores muscarínicos de POA-AHA juegan un papel estimulante de los mecanismos que regulan el “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la secreción de la GnRH.

La idea previa es apoyada por los siguientes resultados:

- La inyección de LHRH-sintética a las 14:00 h del proestro indujo la ovulación en los animales con bloqueo de los receptores

muscarínicos en la mañana del diestro-2, lo que significa que la interrupción de la actividad muscarínica regula de manera estimulante la secreción preovulatoria de la GnRH.

- La inyección de hCG a las 14:00 h del proestro también indujo la ovulación, lo que indica que el impedimento de la unión de la ACh a los receptores muscarínicos regula de manera estimulante la secreción preovulatoria de la LH.
- La inyección de BE a las 14:00 h del proestro restaura la ovulación, lo que significa que la interrupción de la actividad muscarínica en la mañana del diestro-2, regula de manera estimulante la secreción preovulatoria de estradiol por el ovario.

Los resultados de este trabajo experimental nos permiten sugerir que el sistema colinérgico de POA-AHA es más activo a las 09:00 h que a las 13:00 h del día del diestro-2 (Domínguez y col., 1982), ya que se requirió de 200 mg/kg más de ATR para bloquear la ovulación en el 100% de las ratas inyectadas.

El aumento en la secreción de estradiol a partir de las 26 horas de inyectar el vehículo podría explicarse por la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal ya que la ACh estimula y potencializa la secreción de CRH (Olianas y Olani, 2000), y CRH inhibe la secreción hipotalámica de GnRH, mientras que los glucocorticoides suprimen la secreción de LH, E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>, y hacen que los tejidos blanco sean resistentes al estradiol (Kalantaridou y col., 2004). ya que se ha observado que la administración de CRH a ratas hipofisectomizadas incrementa significativamente la concentración de estradiol en suero, efecto que es bloqueado completamente por la adrenalectomía (Murase y col., 2002) o la secreción de estradiol podría aumentar por el mantenimiento de una secreción ligeramente elevada de LH lo que es apoyado por el aumento en la concentración de P<sub>4</sub> a esa misma hora. Otra posibilidad, no excluyente, es que en ese momento está terminando el aumento en la secreción de E<sub>2</sub>, necesario para estimular la liberación pre-ovulatoria de LH.

El aumento en la concentración sérica de P<sub>4</sub> y la disminución de E<sub>2</sub>, 48 h después de la administración de ATR, nos sugiere que en el ovario, la ACh acoplada a los receptores muscarínicos regula de manera estimulante la estereoidogénesis del ovario, mediante la activación de las enzimas involucradas en la transformación del colesterol a la progesterona (3β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa) y de progesterona a estradiol (17β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa, la aromatasa o ambas) (Freeman, 2006).

De esta forma, la ausencia de la secreción preovulatoria de estradiol en la mañana del proestro, no promueve el “feedback” positivo de los estrógenos en la secreción de GnRH, lo que resultó en la falta de LH y de ovulación, como Efectos semejantes fueron observados al bloquear el sistema colinérgico, mediante la

inyección subcutánea de ATR en la mañana del diestro-1 y estro (López-Torres, 2012; Gandy-Ventura, 2013).

En la rata adulta, se ha mostrado que las células de la granulosa de los folículos antrales son inmuno-reactivos a la CAT (Fritz y col., 1999). Además, expresan receptores muscarínicos, principalmente del subtipo M1, M3 y M5. El ARNm para receptores M3 están presentes en el ovocito, mientras que el ARNm para los M1 y M5 se expresa en las células de la granulosa (Fritz y col., 1999, 2001). Por lo que el aumento en el número de ovocitos liberados y en el peso de los ovarios de los animales inyectados con 100 mg/kg peso de ATR nos sugiere que la ATR al bloquear los receptores muscarínicos de los ovario, estimuló el crecimiento folicular e incrementó el número de folículos que alcanzaron la etapa preovulatoria, lo que significa que en condiciones naturales, la ACh en el ovario regula de manera inhibitoria el crecimiento y la atresia de los folículos. La incubación de células de la granulosa con pirenzepina (antagonista de los receptores muscarínicos M1 y M5), estimula la proliferación celular después de 24 h de tratamiento (Fritz y col., 1999). Con base en ésta información sugerimos que la estimulación del crecimiento folicular en los animales tratados con 100 mg/kg peso de ATR sería por medio del bloqueo de los receptores M1 (Mayerhofer y col., 2006).

El aumento del número de ovocitos liberados por el ovario derecho en los animales inyectados con 100 mg/kg de ATR y del peso del mismo en los animales inyectados con 100 o 500 mg/kg peso, nos llevan a sugerir tres mecanismos de regulación:

- 1) alteraciones en la secreción basal de gonadotropinas, ya que se ha reportado que la aplicación sistémica de atropina en ratas maduras reduce las concentraciones séricas de gonadotropinas (Libertum y McCann, 1973; Vijayan, 1980).
- 2) cambios en los patrones de secreción de las gonadotropinas (Piva y col., 1980), lo que resultaría en modificaciones en el crecimiento folicular.
- 3) disminución en el número de receptores a la LH en los folículos preovulatorios (Rajkovic, y col., 2006), lo que resultaría en la permanencia de estos folículos y el aumento del peso del ovario.

# CONCLUSIONES

En la mañana del diestro-2, la dosis efectiva que bloquea la ovulación es de 500 mg/kg de sulfato de atropina, lo que provoca:

- retraso de la ovulación por 24 h
- aumento de la masa ovárica
- inhibición de la secreción de estradiol
- disminución de la expresión de los ARNm de la GnRH, del RE $\alpha$  y del RE $\beta$  en POA-AHA derecha

En la mañana del diestro-2, la ACh al unirse a los receptores muscarínicos regula de manera estimulante la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, al activar la secreción de estradiol, y la expresión del ARNm para la GnRH, del RE $\alpha$  y del RE $\beta$  en POA-AHA derecha, la secreción de la GnRH, de la LH y la ovulación.

# BIBLIOGRAFÍA

- **Adams** BA, Tello JA, Erchegti J. (2003). Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology*; 144:1907-1919.
- **Advis** JP, Ahmed CE, Ojeda SR. (1989). Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal peptide (VIP) levels in the developing rat ovary. *Brain Res. Bull.* 22: 605-610.
- **Arimura** A. (2000). *Hypothalamic hormones: Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Editores: Conn PM, Freeman ME. Humana Press inc. Totowa, New Jersey, USA.
- **Arteaga-López** PR, Domínguez R, Cerbón MA, Mendoza-Rodríguez CA, Cruz ME. (2003). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*; 21:251-26.
- **Arteaga-López** PR. (2005). Expresión asimétrica de la GnRH y del receptor a estrógenos en POA-AHA durante el ciclo estral de la rata. Posible participación del sistema colinérgico. Tesis de Doctor en Ciencias Biomédicas. Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- **Bakalkin** GY, Tsibezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID, Krivosheev OG. (1984). Lateralization of LHRH in rat hypothalamus. *Brain Res.* 361-364.
- **Barco** AI, Cruz ME, Flores Chavira R, Damián-Matsumura P, Domínguez R. (2003). Asymmetric ectopic effects of unilateral ovariectomy on ovarian hormone secretion. *J. Endocrinol.*
- **Barran** PE, Roeske RW, Pawson AJ, Sellar R, Bowers MT, Morgan K, Lu ZL, Tsuda M, Kusakabe T. (2005) Evolution of constrained GnRH ligand confirmation and receptor selectivity. *J Biol Chem*; 280: 38569-38575.
- **Bentley** GE, Ubuka T, McGuire NL, Calisi R, Perfito N, Kriegsfeld LJ, Wingfields & Tutsui K. (2009). Gonadotrophin-Inhibitory Hormone: A multifunctional neuropeptide. *Journal of Neuroendocrinology* 21: 276-281.
- **Bousfield** GR. (1998). LH (Luteinizing Hormone). En: *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 2. Knobil E y Neill J (Eds.). Academic Press. USA. 1034-1054.
- **Brown** RE. (1994). The hypothalamic hormones. En: *Introduction to Neuroendocrinology*. Cambridge University Press, Great Britain; 40-55.
- **Brown** TR. (1999). Steroid hormones, Overview. En: *encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds). Academic Press. U.S.A. Vol. 4. 634-644.
- **Carson-Jurica** MA, Schander WT, O'Malley BW. (1990). Steroid receptor family: Structure and functions. *Endocrine Rev* 11: 201-222.

- **Clemens** J.A. Samlstig EB, Sawyer BD. (1976). Studies on the role of the preoptic area in the control of reproductive function in the rat. *Endocrinology*. 728-735.
- **Clemens** JA, Tinsley FC, Fuller RW. (1997). Evidence of dopaminergic content in series of neural events that lead to the pro-oestrous surge of LH. *Acta Neuroendocrinológica*; 85:18-24.
- **Charli** JL, Ponce G y Joseph- Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRHérgicas hipotálamicas. En: *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. México:Edit. R. Domínguez, UNAM-PORRUA. 59-85.
- **Cook** B. (1997). Endocrine asymmetry (Comentary). *Journal of Endocrinology*. 113:331-332.
- **Chávez** R, Cruz ME, Domínguez R. (1987). Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi-and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrinol*. 113: 397-401.
- **Clarke** IJ, **Tilbrook** AJ. (2008). Gonadotropin, Neural and hormonal control. *Encyclopedia of Neuroscience*. Monash University, Clayton, VIC, Australia; 959-965.
- **Cruz** ME, Jaramillo LP, Domínguez R. (1989) Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of Endocrinology* 123: 437-439.
- **Cruz** ME, Moran JL, Jaramillo LP, Domínguez R. (1990). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Reserch Bulletin*. 24: 739-742.
- **Cruz** ME, Castro J, Domínguez R. (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J. Endocrinol*; 133: 205-210.
- **Cruz** ME, Arteaga PR, Huerta DML, Sánchez MA, Domínguez R. (1997). Differences in acetylcholine content, binding and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Med. Sci. Res.*; 25: 823-825.
- **Delgado** A, Mingillon C, Joglar J. (2004). *Introducción a la Química Treapeútica*. Segunda Edicion. Ediciones Días de Santos S.A. Madrid; 187-190.
- **Domínguez** R, Riboni L, Zipitría D, Revilla R. (1982). Is there a colinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?. *J. Endocr* 95: 175-180.

- **Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991).** La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción. Editor; Domínguez R. Ed. UNAM-Porrúa, México, Capítulo 7:161-192.
- **Domínguez R. (1997).** Endocrinología de las gónadas. En: Curso internacional Pre-congreso. Actualización en Fisiología. Ed. SMCF y PUIS-UNAM, México. 271-279.
- **Domínguez R, Cruz ME, Morán JL. (1998).** Differential effects of local ovarian anesthesia during proestrus, on ovulation in normal and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*.
- **Egozi Y, Kloog Y, Sokolovsky M. (1986).** Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrous cycle. *Brain Research*; 383: 310-313.
- **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 *Enciclopedia of reproduction*. Vol. 3. Eds: Knobil E, Neill JD. Academic Press. USA. 590-595.
- **Everett JW, Sawyer Ch, Markee JE. (1949).** A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology* 44:234-250.
- **Fawcett DW. (1995).** Tratado de Histología. Duodécima edición. Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid; 885-893.
- **Fink KL, Wieben ED, Woloschak GE, Spelsberg TC. (1988).** Rapid regulation of c-myc protooncogene expression by progesterone in the avian oviduct. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* pp.1796-1800.
- **Fink G. (1998).** Gonadotrophin secretion and its control, en: *the physiology of reproduction*. Edt.E. Knobil y J. D. Neill. New York, USA; 1349-1378.
- **Fink G. (2000)** .Neuroendocrine regulation of pituitary function. En: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Totowa N.J.: Humana Press Inc; 2000. 107-133.
- **Freeman ME. (1994).** The neuroendocrine control of the rat estrous cycle. En: *The Physiology of Reproduction*. Ed. Knobil E, Neil J D, 2da edición, Nueva York. Raven Press; 2; 46; 613-658.
- **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**, Wessler I, Breitling R, Rossmannith W, Ojeda SR, Dissen GA, Amsterdam A, Mayerhofer A. (2001). Expression of muscarinic receptor types in the primate ovary and evidence for nonneuronal acetylcholine synthesis. *J. Clin Endocrinol Metab*; 86: 349-354.
- **Fukuda M**, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: Unilateral hypothalamic lesion and compensatory ovarian hypertrophy. *Neurosci Lett*; 51:367-370.
- **Funabashi T**, Mitsushima D, Nakamura TJ, Uemura T, Hirahara F, Shinohara K, Suyama K, Kimura F. (2002). Gonadotropin-Releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats. En: *Gonadotropin-Releasing hormone: Molecules and Receptors*. Parhar I. 141: 165-173.
- **Gallo RV**. (1981) Pulsatile LH release during periods of low-level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biology of Reproduction*. 771-779.
- **Gandy-Ventura, J.** (2013) Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en el día del estro sobre la ovulación espontánea de la rata adulta. Tesis En tesis para obtener el título de Biología. D.F., México FES Zaragoza UNAM.
- **Ganong WF**. (2004). *Fisiología Médica*. Edit. El manual moderno. México DF. 472-483.
- **Gennaro RA**. (2003). *Remington Farmacia*. 2da ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires, 1568-1571.
- **Geneser, F**, (1999). *Histología*. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina; 624-638.
- **Gerendai I**, Rostsztejn W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U. (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neurosc Lett*. 333-336.
- **Gerendai I**. (1980). Unilateral complete isolation of the medial basal hypothalamus interferes with the compensatory ovarian growth following unilateral ovariectomy. *Neuroendocr. Lett*. 2: 39.
- **Gerendai I**, Draco F, Continella G, Scapagnini V. (1984). Effects of masectomy and vagotomy on grooming behavior of the rat: Possible involvement of prolactin. *Physiol Behav*. 33:1-4.
- **Gore AC, Roberts JL**. (1997). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Frontiers in neuroendocrinology*. 209-245.

- **Gore-Langton** RE. (1988). Cyclosporine differentially affects estrogen and progesterone synthesis by rat granulosa cells *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol.* 57:187-198.
- **Gore-Langton** RE, **Armstrong** DT. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The physiology of reproduction.* 3<sup>th</sup> Ed. Eds: Knobil E, Neill J. Raven Press USA. 571-627.
- **Greenwald** GS, **Roy** SK. (1994). Follicular Development and its control. en: *The Physiology of Reproduction,* Eds: Knobil E , Neill J. Raven Press. New York 1:629-724.
- **Guyton** AC, **Hall** JE. (2001). *Tratado de Fisiología Médica.* Décima edición, McGraw-Hill-Interamericana. México; 100-120; 512-538.
- **Halász** B. (2000). The Hypothalamus as an endocrine organ. En: *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine.* Totowa New Jersey USA: Humana Press. . 3-21.
- **Herbison** AE. (1998). Multimodal influence of estrogen on Gonadotropin-Releasing Hormone neurons. *Endocrine Review.* 19:302-330.
- **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.
- **Hiney** JK, Sower SA, Yu WH, McCann SM, Dess ML.(2001). Gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic-hypothalamic region of the rat contain lamprey gonadotropin-releasing hormone III mammalian luteinizing hormone-releasing hormone or both peptides. *Proc Natl Acad Sci;* 99 (4): 2386-2391.
- **Hinshelwood** M. (1999). Steroidogenesis, overview. En: *Encyclopedia of reproduction.* 3<sup>th</sup> Ed. Eds: Knobil E y Neill J. Academic Press. USA. 644-653.
- **Hirshfield** AN. (1997). Overview of ovarian follicular development: consideration of toxicologist. *Environmental and molecular mutagenesis.* 29:10-15.
- **Humphrey** RR, Dermody WC, Brink FG, Schottin NH; Sawowski R, Vaitkus JW, Veloso HT, Reel JR. (1973). Induction of luteinizing hormone (LH) release and ovulation in rats, hamster, and rabbits by synthetic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Endocrinology* 92: 1515.

- **Jacobowitz DM, Palkovits M. (1974).** Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the brain. I. Forebrain (Telencephalon, Diencephalon). *J. Comp. Neur*; 157: 13.
- **Jaffe BR, Yen SC, Barbieri LR. (2001).** *Endocrinología de la Reproducción: Fisiología fisiopatología y Manejo Clínico. 4ta Edición.* Editorial Panamericana. Buenos Aires Argentina.33-47.
- **Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME. (1985).** Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) producing neurons. *Journal of Comparative Neurology*; 232:534-547.
- **Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos P. (2004).** Stress and the female reproductive system. *Jornal of Reproductive Immunology* 62:61-68.
- **Kilen SD, Schwartz B. (1998).** Estrous cycle. En: *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill JD. Academic Press. U.S.A. 127-136.
- **Knobil E. (1980).** Neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res.* 36:53.
- **Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukeba K, Tsutsumi K & Silver R. (2006).** Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *PNAS.* Vol. 103. No. 7: 2410-2415.
- **Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996).** Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 5925-30.
- **Libertum C, McCann SM. (1973).** Blockade of the release of Gonadotropins and prolactin by subcutaneous or intraventricular injection of atropine in male and female rats. *Endocrinology* 92:1714-1724.
- **López E, Cruz ME, Domínguez R. (1997)** Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the rat. *Arch. Med. Res*; 28 (3): 343-348.
- **López-Torres, AS. (2012).** Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos en la mañana del diestro-1 sobre la ovulación de la rata. Tesis En tesis para obtener el título de Biología. D.F., México FES Zaragoza UNAM.
- **MacGregor JI y Jordan VC. (1998).** Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological reviews.* 151-96.
- **Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umeson K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995).** The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 15; 38; 835-839.

- **Mayerhofer** A, Kunz L, Krieger A, Proskocil B, Spindel E, Amsterdam A, Dissen GA, Ojeda SR, Wessler I. (2006). FSH regulates acetylcholine production by ovarian granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*; 4:37.
- **McLean** MP, Khan I, Puryear TK, Gibori G. (1989). Estradiol-Induced Synthesis and Translation of specific proteins in the Corpus Luteum. En: *Grow factors and the Ovary*. Ed. Hirshfield AN. Plenum: New York. 363-368.
- **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.
- **McGeer** PL, Eccles JC, McGeer EG. (1987). *Molecular neurobiology of the mammalian brain*. Segunda Edición. Nueva York. 150.
- **Mendoza** PN. (2008). *Farmacología Médica*. Ed Panamericana S. A. de C. V., México D.F., 213-219.
- **Millar** RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. (2004). Gonadotropine-releasing hormone receptors. *Endocrine Review*; 25:235-257.
- **Millar** RP, Pawson AJ, Morgan K, Rissman EF, Zhi-Liang Lu. (2008). Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol*; 29 (1): 17-35.
- **Müller** EE, Nistico G, Scapagnini U. (1977) *Neurotransmitters and anterior pituitary function*. Academic Press, New York 435.
- **Murase** M, Uemura T, Kondoh Y, Funabashi T, Hirahara F. (2002). Role of corticotropin-releasing hormone in ovarian steroidogenesis. *Endocrine* ; 18(3):255-60.
- **Nance** DM, **Morger** WH. (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemi-castration. *Bain Res. Bull.* 8: 299-302.
- **Nance** DM, Bhargava M & Myatt GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Bain Res. Bull.*13: 651-655.
- **Nordeen** E.J, **Yahr** P. (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science*. 391-393.
- **Norris** OD. (1996). An overview of chemical regulation. *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press. 1-22:146-150
- **Olianas** MC, **Olani** P. (2000). Involvement of betagamma subunits of G(q/11) in muscarinic M(1) receptor potentiation of corticotropin-releasing hormone-stimulated adenylyl cyclase activity in rat frontal cortex. *Journal of Neurochemical*; 75(1):233-9.

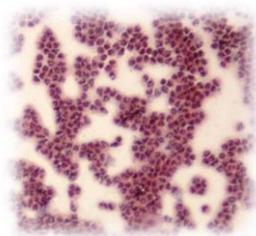
- **O'Malley** B W, **Strott** Ch A. (2001). Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En *Endocrinología de la reproducción fisiología, fitopatología y manejo clínico*. Yen S C, Jaffe R B y Barbieri R I. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 118-143.
- **Owasayo** JD, Okonman AD, Soliman KFA, Walker CA. (1980). Circadian variation in the acetylcholinesterase activity of specific rat brain areas. *Journal Interdiscipl. Cycle Res*; 11:251.
- **Palkovits** M. (2000). Micro and Macroscopic structure, innervations and vasculature of the hypothalamus. En *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Conn PM y Freeman ME. Human Press. 23-31.
- **Parhar** IS, (2002). Cell migration and evolutionary significance of GnRH subtypes. *Gonadotropin-Releasing Hormone: Molecules and Receptors*. Parhar I. 141:3-17.
- **Paxinos** and Watson. (2004). *The rat brain in stereotaxic coordinates: atlas.5° ed.* Editorial El Sevier. San diego California USA: Academic Press.
- **Pintér** I, Moszkovszkin G, Némethy Z, Makara G. (1999). Muscarinic M1 and M3 receptors are present and increase intracellular calcium in adult rat anterior pituitary gland. *Brain Research Bulletin*, 48: 4; 449-456.
- **Piva** F, Borrell J, Limonta P, Gavazzi G, Martini L. (1980). Cholinergic inputs to the amigdala and the control of gonadotrophin release. *Acta Neuroencocrinol* 93:1-6.
- **Prieto** GB, Velázquez PM. (2002). Fisiología de la reproducción; hormona liberadora de gonadotropinas. *Rev. Fac. Med UNAM*. 45; 6:252-257.
- **Rajkovic** A, Pangas SA, Matzuk MM. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep and Human Models. En: *Knobil and Neill's. Physiology of Reproduction*. Eds: Neill JD, 3ra. Ed., Vol.1. Cap 10. Elsevier Academic Press. 383.
- **Raviña** RE. (2008) *Medicamentos: un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de los fármacos*. Ed. Universidad de Santiago Compostela. España 219-230.
- **Reichert** LE. (1998). FSH (Follicle-Stimulating-Hormone). En: *Encyclopedia of reproduction*. Vol. 2. Knobil E y Neill J. Academic Press. USA. 418-422.
- **Rollerova** E y **Urbancikova**. (2000). Intracellular estrogen receptor, their characterization and function (Review). *Endocrine Regulations*. 203-218.
- **Ross**; M., L. Romrell, G. Kaye. (1997). *Histología*. 3a edición. Editorial Médica Panamericana. México, 674-710.

- **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.
- **Russell** D, **White** RB. (1999). Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure and functions. *Frontier in Neuroendocrinology*; 20: 224-240.
- **Schwartz** NB. (2000). Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. En: *Neuroendocrinology in Physiology and medicine*. Eds PM Conn & Mefreema. EEUU. Raven Press. 135-145.
- **Sealfon** SC., Weinstein H., Millar RP. (1997). Molecular mechanism of ligand interaction with the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. 18: 180-205.
- **Sanchez-Criado** JE. (2003). Fisiología del ovario. En: *Fisiología humana*. 2ª Ed. México: McGraw-Hill Interamerican. 1036-1048.
- **Sherwood** NM, Lovejoy DA, Coe IR. (1993). Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrine Review*; 14: 241-254.
- **Silverman** AJ., Livine I., Witikin JW. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRh), neuronal systems: immunocytochemistry and in situ hybridization. *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill. vol. 2. Segunda edición, Raven Press, New York, EUA. 1683-1710.
- **Sitges** M. (1993). Comunicación entre las células nerviosas. Sinapsis. Comunicación neuroendócrina. Bases celulares moleculares. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas CONACyT y SEP. 22.
- **Smith**. (1999). Estrogens, Overview. En: *encyclopedia of reproduction*. U.S.A: Academic Press; 2: 119-126.
- **Susuki** M, Nishihara M, Takahashi M. (1995). Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone gene expression during rat estrus cycle. *Journal Endocrine*; 42 (6): 789-796.
- **Suter** KJ, Song WJ, Sampson TL, Wuarin J-P, Saunders JT, Dudek FE, Moenter SM. (2000) Genetic targeting of green fluorescent protein to gonadotropin-releasing hormone neurons: Characterization of whole-cell electrophysiological properties and morphology. *Endocrinology*. 412-419.
- **Terasawa** E. (1995) Control of luteinizing hormone-releasing hormone pulse generation in nonhuman primates. *Cell Mol Neurobiol*. 141-164.
- **Tresguerres** A F., Castillo C. (1999). *Fisiología Humana*. 2da Edición. Ed. Mac.Graw-Hill Interamericana. España. 1007-1015.

- **Turi** Gergely F., Zsolt Liposits, Erik Hrabovszky. (2008). Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *El. Sevier. Neurochemistry International*. 723–728.
- **Ulloa-Aguirre** A, **Timossi** C. (2000). Biochemical and functional aspects of gonadotrophin- releasing hormone and gonadotrophins. *Reproductive BioMedicine online*; I: 48-62.
- **Van** BJ. (1999). Follicular development. *Enciclopedia of reproduction*. Vol. 2, Eds: Knobil E, Neill J. Academia Press: EUA. 376-388.
- **Vijayan** E, **McCann** SM. (1980). Effect of blockade of dopaminergic receptors on acetylcholine (Ach)-induced alterations of plasma gonadotropin and prolactin (PrI) in conscious ovariectomized rats. *Brain Res Bull* 5:23-29.
- **Wei** J, Walton EA, Milici A, Buccafusco JJ. (1994). m1-m5 muscarinic receptor distribution in rat CNS by RT-PCR and HPLC. *J Neurochem.* ; 63(3):815-21.
- **Welsh** TH, Nann KG, Kimberly N, Livingston. (1998). Stress and reproduction. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D. Academic Press. U.S.A Vol.4: 662, 665, 668.
- **Yao** HH, **Bahr** JM (1999). Ovary, overview. *Enciclopedia of reproduction*. U.S.A: Academic Press; 3: 590-595.
- **Yellon** SM, Lehman MN, Newman SW. (1990). The gonaotrophin-releasing hormone neuronal system of the male Djungarian hamster; distribution from the olfactory tubercle to the medial basal hypothalamus. *Neuroendocr*; 219-225.
- **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.

# ANEXOS

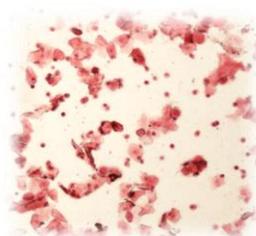
## Estudio del ciclo estral por frotis vaginal



**Figura 16.** Citología característica del epitelio vaginal en el día del diestro-1.

Diestro-1 (Fig.16):

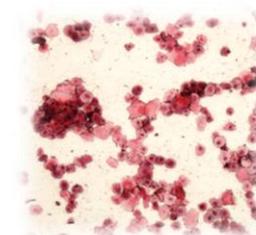
En esta etapa del ciclo, la citología vaginal se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de leucocitos; en el ovario se observan los cuerpos lúteos de la ovulación más reciente. El cuerpo lúteo secreta  $P_4$  por varias horas, lo que provoca que la concentración de esta hormona alcance un valor máximo hacia el medio día\*. En algunas cepas de ratas la secreción de  $P_4$  se prolonga, lo que conducen a ciclos de 5 días (Kilen y Schwartz, 1999; Schwartz, 2000). Las concentraciones de  $E_2$ , LH y FSH son basales durante este día del ciclo.



**Figura 17.** Citología característica del epitelio vaginal en el día del diestro-2.

Diestro-2 (Fig. 17):

En este día se observan leucocitos en el frotis vaginal, y aparecen células epiteliales nucleadas. En el ovario se encuentran cuerpos lúteos y folículos en desarrollo, mientras que en el suero las concentraciones de gonadotropinas se mantienen en concentraciones basales pero suficientes para estimular el crecimiento de los folículos y la secreción de estrógenos, los cuales aumentan conforme crecen los folículos. Si el desarrollo de los folículos continúa, se incrementa de manera significativa la síntesis y liberación de estradiol a partir de las 17:00 h de este día\*. (Kilen y Schwartz, 1999).



**Figura 18.** Citología característica del epitelio vaginal en el día del proestro.

Proestro (Fig. 18):

En esta etapa el frotis vaginal se caracteriza por presentar células epiteliales nucleadas. En el ovario se encuentran folículos preovulatorios, los cuales tienen mayor capacidad de síntesis de estrógenos. Bajo la influencia del incremento en la concentración de esta hormona en el suero, en la mañana de este día, la concentración de estradiol alcanza el valor máximo del ciclo, (evento llamado “pico” de estrógenos)\*, que induce la secreción preovulatoria de la LH y de la FSH tras la disminución abrupta de estrógenos. Este incremento máximo de la concentración de ambas hormonas

ocurre en la tarde de este día (entre las 17:00 y 19:00 h según la cepa). La secreción preovulatoria de LH estimula la secreción de  $P_4$ , que alcanza un segundo “pico” en la noche de este día, lo que favorece la ovulación y facilita el comportamiento sexual, el celo y la cópula en la noche de este día. (Freeman, 1994; Kilen y Schwartz, 1998; Schwartz, 2000).



**Figura 19.** Citología característica del epitelio vaginal en el día del estro.

Estro (Fig. 19):

En este día el frotis vaginal presenta células epiteliales cornificadas y sin núcleo. Aproximadamente a las 01:00 h de este día culmina la degradación de la pared del folículo ovárico y se lleva a cabo la ovulación, después de este evento las células foliculares se luteinizan y se forma el cuerpo lúteo; cuando no se produce la fecundación el cuerpo lúteo sufre luteólisis y deja de secretar  $P_4$ . Entre las 01:00 y las 04:00 h del día del estro se presenta un segundo aumento en la secreción de la FSH\* que parece ser necesario para que un nuevo grupo de folículos inicie su desarrollo (Ross y col., 1997; Geneser, 1999; Kilen y Schwartz, 1998; Schawrtz, 2000).

\* ver Concentraciones séricas de  $P_4$ ,  $E_2$ , LH y FSH en el ciclo estral de la rata.

## **Cuantificación de Hormonas Esteroides por Radio-Inmuno-Análisis (RIA)**

La cuantificación de las concentraciones séricas de  $E_2$  y  $P_4$ , se realizó por (Radio-Inmuno-Análisis (RIA), mediante el uso de estuches comerciales marca Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA), que contenían tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada (125I-Progesterona o 125I-Estradiol) y calibradores para la realización de la curva patrón ( $P_4$ : 0.00, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.00, 10.0, 20.0 y 40.0 ng/mL;  $E_2$ : 0.0, 10.0, 20.0, 50.0, 150.0, 250.0, 500.0 y 900.0 pg/mL ). A cada tubo del estuche se le adicionaron 100  $\mu$ L de suero problema más 100  $\mu$ L de la hormona marcada (125I- $P_4$  o 125I- $E_2$ ). Los tubos se agitaron durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas; posteriormente se decantaron y limpiaron, finalmente con la ayuda de un contador de centelleo gama, se cuantificó la cantidad de la hormona  $P_4$  o  $E_2$ . Los datos de la concentración de  $E_2$  se expresaron en pg/mL y los de  $P_4$  en ng/mL. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 5.3% y 9.87 para  $P_4$ , 6.9% y 10.8% para  $E_2$ . El límite de detección para  $P_4$  fue 0.003 ng/mL y para  $E_2$  fue de 0.09 pg/mL.

## **Extracción del ARNm total de la porción izquierda y derecha de POA-AHA**

A las muestras de tejido de POA-AHA se les extrajo el ARNm total utilizando la metodología habitual del laboratorio (Arteaga-López y col., 2003). Cada tubo eppendorf estéril contenía las porciones izquierda o derecha de POA-AHA el cual contenía 300  $\mu$ L de trizol. Se homogenizó el tejido con la ayuda de un Politrón (modelo PT -MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza). Se le agregaron 100  $\mu$ L de cloroformo y se agitó durante 30 segundos, con la finalidad de extraer el ARNm.

Se procedió a centrifugar a 12,000 rpm a 4° C por 25 minutos; para obtener dos fases una fase inferior orgánica de color rosada, la cual contiene el ARN y las proteínas; y una fase superior acuosa incolora, donde se encuentra el ARN. Esta última fase se transfirió a otro tubo eppendorf y con la finalidad de precipitar el ARN se agregó un volumen igual de isopropanol. La muestra se mantuvo a 4° C durante 72 h.

Transcurrido el tiempo las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm, por 25 minutos, a 4° C. Formándose una pastilla blanca amarillenta, la cual nos muestra la precipitación del ARN. El sobrenadante se removió y se lavó la pastilla con etanol al 80 %. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Después de una segunda separación del sobrenadante, los tubos se colocaron en sentido inverso sobre una gasa estéril y la pastilla se secó a temperatura ambiente para evitar la insolubilidad de la misma. La pastilla de ARN se disolvió en 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O inyectable, que consistió en la muestra a cuantificar.

## **Lectura de la muestra de ARNm total**

Se tomaron alícuotas de 0.2  $\mu$ L de muestra diluidas en 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O inyectable. Se leyeron en un Espectrofotómetro (Modelo S-30 Spectrophotometro) a una absorbancia de 260 y 280 nm. La concentración de ARN se determinó conociendo que: una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 mg de ARN mL<sup>-1</sup>. La pureza del ARN se determinó por medio de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm (260/280 nm).

## **Retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

Para obtener el ADN complementario (ADNc) se realizó la retro transcripción del ARN total. El control negativo consistió de una muestra de agua que sustituyó al ARN. Los reactivos y volúmenes utilizados en la técnica se especifican en el cuadro 1.

Reactivo	Para c/ muestra
ARN total	2 µg
Buffer RT 1x	2 µL
DTT	1 µL
DNTP's	0.5 µL c/u
RT M-MLV	0.5 µL + 0.5 µL H <sub>2</sub> O
Oligo dt	0.05 µL
H <sub>2</sub> O	Aforado a 10 µL

**Cuadro 1.** Reactivos utilizados en el desarrollo en la técnica de retro-transcripción.

Por medio de la técnica de retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificó un fragmento de los genes de los RE- $\alpha$ , RE- $\beta$  y el de GnRH. Se utilizó gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen control interno. En el cuadro 2 se especifican los reactivos y volúmenes utilizados en la técnica.

Reactivo	Para c/muestra
Producto de RT	10 µL
Buffer PCR	5 µL
MgCl <sub>2</sub>	2.5 µL
Taq polimerasa	0.8 µL
DNTP's	0.5 µL c/u
Oligo 1	2.0 µL c/u
H <sub>2</sub> O	25.7 µL

**Cuadro 2.** Reactivos utilizados en el desarrollo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador de gradientes (marca Eppendorf Scientific Inc, Alemania), a las temperaturas y ciclos que se muestran en el cuadro 3.

Cabe señalar que las temperaturas de alineación, así como el número de ciclos utilizados para los genes en cuestión fueron previamente estandarizados para la optimización del experimento (Arteaga-López, 2005).

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Temperatura (°C)	Ciclos
GnRH	CAA CCC ATA GGA CCA GTG CTG G	CAC TAT GGT CAC CAG CGG GG	53.0	32
RE $\alpha$	TTC ACA CCA AAG CCT CGG G	TGC AGC AGC ATC AGC GGA	64.2	32
RE $\beta$	TCC CGG CAG CAC CAG TAA C	CCC AGA TGC ATA ATC GCT GC	55	32
GAPDH	GAT GGG TGT GAA CCA CGA GA	AGT GAT GGC ATG GAC TGT GG	55.1	32

**Cuadro 3.** Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la retrotranscripción, así como las temperaturas y ciclos utilizados para la técnica de RT-PCR.

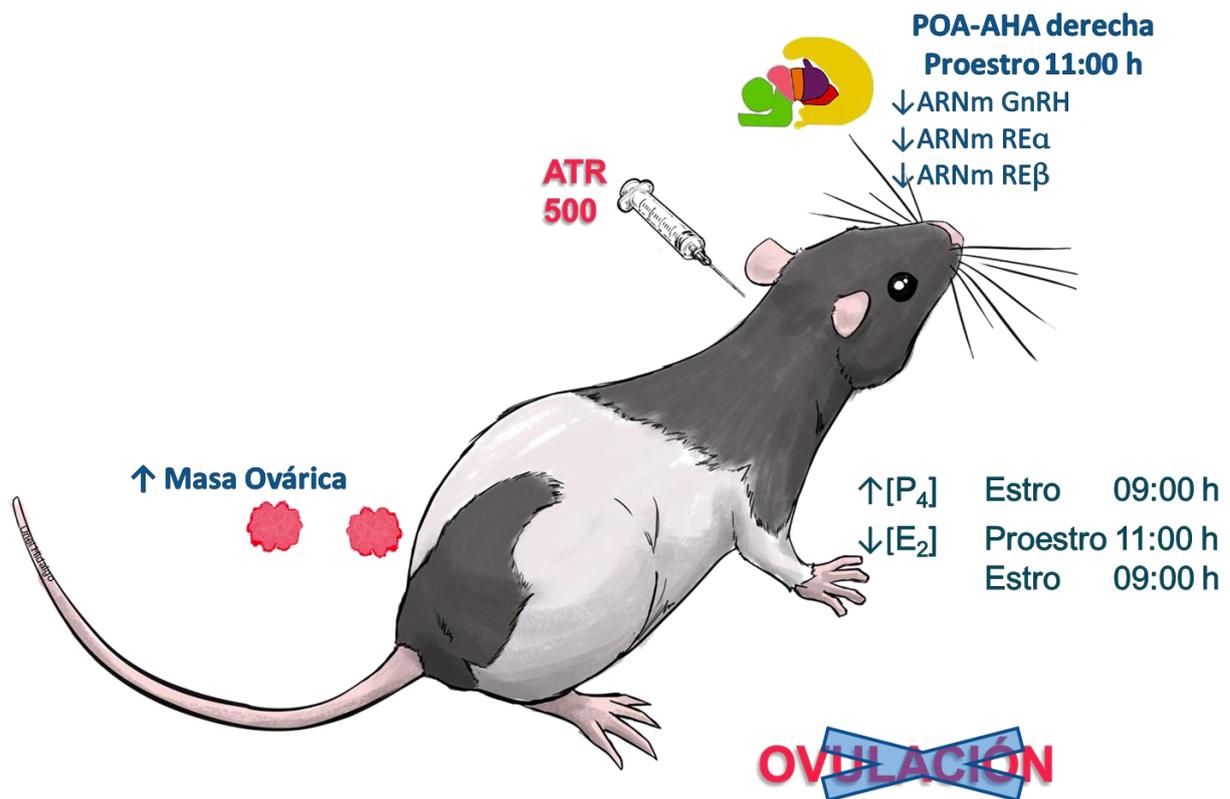
## **Electroforesis**

Una vez obtenidas las muestras, en un matraz erlenmeyer se agregó 1 gr de agarosa, adicionando 50 mL de una solución Buffer TBE 1x que se calentó en el microondas hasta su completa disolución. Cuando la solución de agarosa alcanzó una temperatura de  $\pm 37^{\circ}\text{C}$ , se agregaron 2.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio. Agitando el recipiente en forma circular, se mezclaron los diferentes componentes, evitando que se formaran burbujas en la solución. El gel se vertió lentamente en la cámara de electroforesis (Horizon 58) por uno de sus extremos y con una punta de micro-pipeta limpia se retiraron las burbujas que quedaron sobre el área de corrida de las muestras. Se dejó polimerizar la agarosa. Para el corrimiento del gel, se llenó el tanque de la cámara de electroforesis con Buffer TBE 1X hasta cubrirlo completamente, el ARN se mezcló con 10 $\mu\text{L}$  de solución de carga, se cargaron 25 $\mu\text{L}$  de cada muestra en el gel y se corrieron a 70 volts por 150 minutos. El corrimiento de las muestras se observó en un transiluminador de luz ultravioleta y los negativos de las fotografías del gel se cuantificaron por densitometría.

## **Análisis Densitométrico**

Las fotografías del gel fueron tomadas con una cámara Kodak Gel Logic 112. Los negativos de las fotografías de los geles fueron sometidos a un análisis densitométrico para cuantificar las bandas que corresponden a la expresión del ARNm de GAPDH, GnRH, del RE $\alpha$  y del RE $\beta$  mediante el programa Kodak Gel Logic 112 Imaging System. El nivel de expresión de cada ARNm se determinó mediante la intensidad media de la banda medida en pixeles, para la GnRH correspondiente a un producto de 250 pares de bases (pb), para el RE $\alpha$  correspondiente a un producto de 337 pb y el RE $\beta$  a un producto de 301 pb; el valor obtenido fue dividido entre el valor de la intensidad media de la banda de la expresión del ARNm de GAPDH correspondiente a un producto de 201 pb a fin de normalizar los datos. El valor obtenido se expresó como la expresión relativa del ARNm para GnRH, RE $\alpha$  y  $\beta$ .

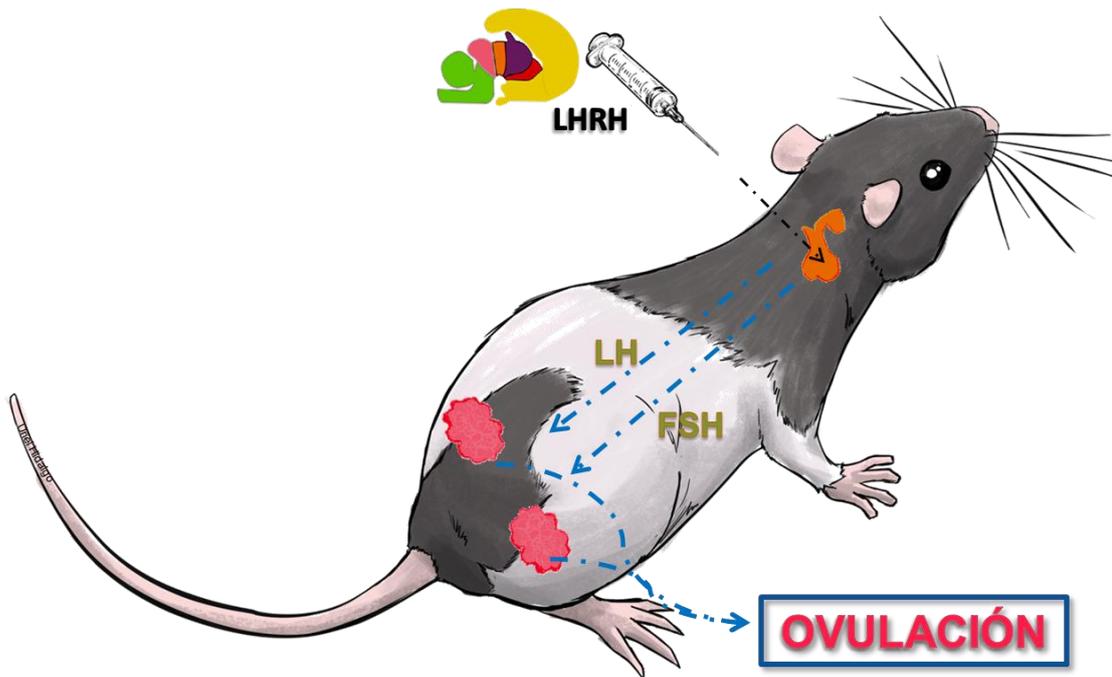
**Modelo teórico que explica los posibles mecanismos de acción de la inyección de ATR 500 (Def de ATR) a las 09:00 h del diestro-2 sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario**



**Figura 20.** Efectos de la inyección subcutánea de ATR 500 sobre la ovulación espontánea de la rata adulta (Ilustración del modelo biológico por Uriel Hidalgo Lerma, 2013).

Al inyectar vía subcutánea ATR 500 (Def de ATR) los animales no ovulan; aumenta la masa ovárica; la expresión del ARNm para GnRH, la de los RE alfa y beta disminuyen en el lado derecho de POA-AHA a las 11:00 h del proestro; la concentración de Progesterona aumenta a las 09:00 h del estro, mientras que las concentraciones de Estradiol aumentan a las 11:00 h del proestro y a las 09:00 h del estro.

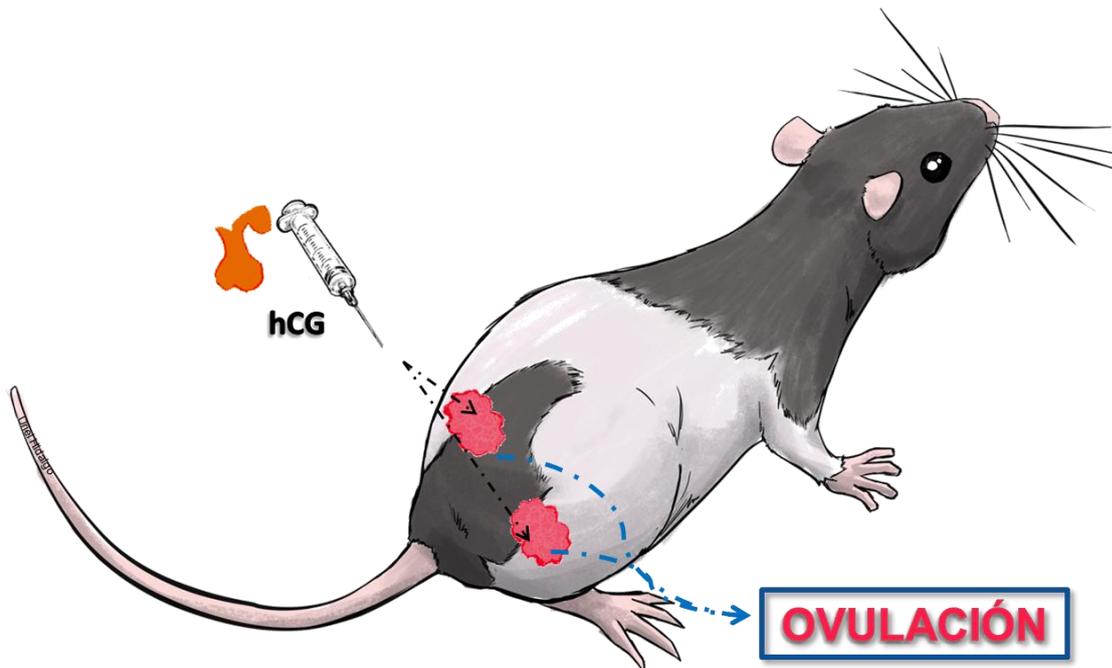
**Modelo teórico que explica los posibles mecanismos de acción de la inyección de ATR 500 (DEf de ATR) a las 09:00 h del diestro-2 sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario**



**Figura 21.** Efecto del reemplazo hormonal de la señal hipotalámica después de la administración subcutánea de la DEf de ATR (Ilustración del modelo biológico por Uriel Hidalgo Lerma, 2013).

Al reemplazar hormonalmente la señal hipotalámica con LHRH, la ovulación se restablece, ya que esta hormona se acopla a sus receptores en la hipófisis y en respuesta a la señal los gonadotropos en la adenohipófisis sintetizan y secretan LH y FSH, las cuales acoplándose a sus receptores en las células del ovario, regulan el crecimiento de los folículos culminando en la ovulación.

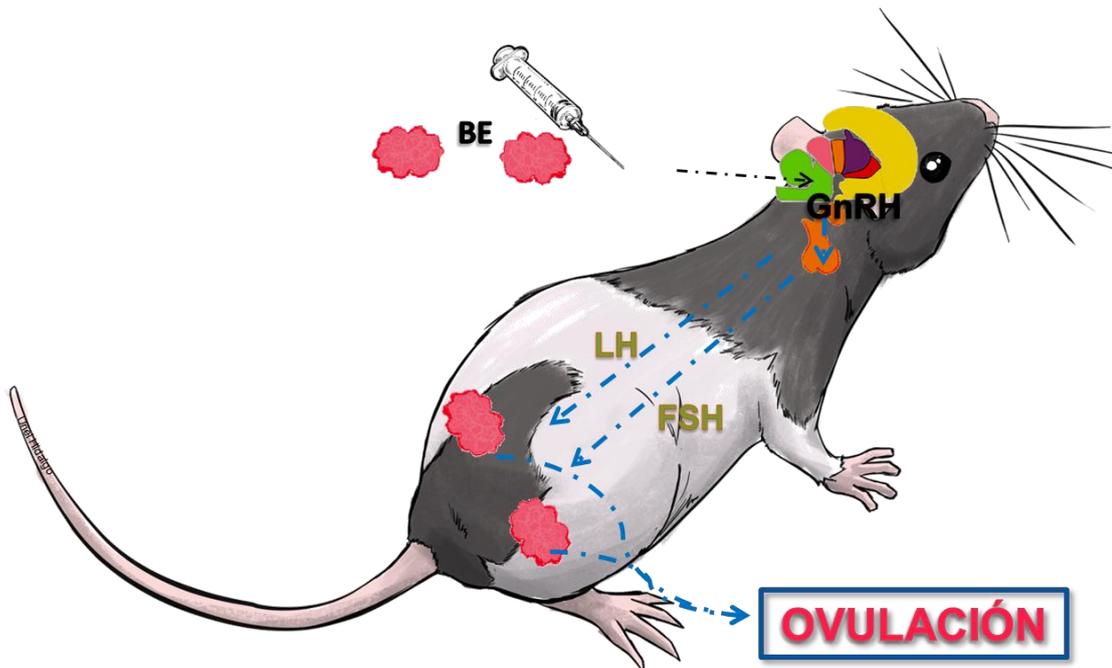
**Modelo teórico que explica los posibles mecanismos de acción de la inyección de ATR 500 (DEf de ATR) a las 09:00 h del diestro-2 sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario**



**Figura 22.** Efecto del reemplazo hormonal de la señal hipofisiaria después de la administración subcutánea de la DEf de ATR (Ilustración del modelo biológico por Uriel Hidalgo Lerma, 2013).

Al reemplazar hormonalmente la señal hipofisiaria con hCG, la ovulación se restablece, ya que esta hormona se acopla a sus receptores en las células del ovario regulando el crecimiento de los folículos culminando en la ovulación.

**Modelo teórico que explica los posibles mecanismos de acción de la inyección de ATR 500 (Def de ATR) a las 09:00 h del diestro-2 sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario**



**Figura 23.** Efecto del reemplazo hormonal de la señal ovárica después de la administración subcutánea de la Def de ATR (Ilustración del modelo biológico por Uriel Hidalgo Lerma, 2013).

Al reemplazar hormonalmente la señal ovárica con BE la ovulación se restablece, ya que esta hormona se acopla a los  $RE\alpha$  y  $RE\beta$  en el hipotálamo, sintetizando y liberando GnRH la que en la hipófisis se une a sus receptores y en respuesta a la señal los gonadotropos en la adenohipófisis sintetizan y secretan LH y FSH, que al acoplarse en sus receptores en las células de ovario regulan el crecimiento de los folículos culminando en la ovulación.