



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“EFECTOS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES
MUSCARÍNICOS EN EL DÍA DEL ESTRO SOBRE LA
OVULACIÓN ESPONTÁNEA DE LA RATA ADULTA”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A

GANDY VENTURA JENNIFER
DIRECTORA DE TESIS

Dra. María Esther Cruz Beltrán



MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2013



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTNÓMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental
Zaragoza: Laboratorio de Neuroendocrinología**

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“EFECTOS DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES
MUSCARÍNICOS EN EL DÍA DEL ESTRO SOBRE LA
OVULACIÓN ESPONTÁNEA DE LA RATA ADULTA”**

TESIS

Que para obtener el título de Bióloga

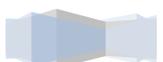
PRESENTA

Jennifer Gandy Ventura

DIRECTORA DE TESIS

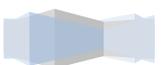
Dra. María Esther Cruz Beltrán

Tesis Financiada por el CONACyT (Convenio 81898).



*Me niego a vivir en el mundo ordinario como una
mujer ordinaria. A establecer relaciones ordinarias.
Necesito el éxtasis. Soy una neurótica, en el sentido de
que vivo en mi mundo. No me adaptaré al mundo.
Me adapto a mí misma.*

Anaís Nin.



AGRADECIMIENTOS

A la fuerza creadora de todas las cosas, por darme la energía con que me muevo, la voluntad y la fortaleza de mi corazón.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por convertirse en mi segunda casa y por brindarme todas las lecciones de vida que aprendí durante mi estancia.

A mis sinodales

M. en C. Rosalva Rangel Corona

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. Leticia Morales Ledezma

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Por sus valiosas sugerencias, por su tiempo y colaboración en esta tesis mil gracias.

A mi directora de tesis:

Un agradecimiento muy especial por su infinita paciencia y apoyo incondicional a la Dra. María Esther Cruz Beltrán.

A mis compañeros de laboratorio:

Gracias a todos y cada uno de ustedes por sus enseñanzas y por hacer divertida la estancia en laboratorio.



Dedicatorias

A mis padres

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy.

A mi madre

Por su infinito cariño que sin escatimar esfuerzo alguno, ha sacrificado gran parte de su vida para formarme y porque nunca podré pagar todo tus desvelos. Gracias por tu paciencia, el amor que me das y por el apoyo incondicional que me has brindado.

A mi hija Regina

Por cambiar por completo mi visión de la vida y convertirse en el motor que me da la fuerza necesaria para estar de pie y con la cabeza en alto ante cualquier situación por difícil que sea.

A Luis

Por ser mí complemento, mi compañero y amigo, por tu comprensión y amor, pero sobre todo por darme lo más valioso en el mundo nuestra hija. Te amo amor.

A mi abuela Sofí

Por ser el gran ejemplo a seguir, por ser la abuelita más hermosa y fuerte del mundo, que me apoyado incondicionalmente sin importar las circunstancias, Te amo Sofí.

A mis hermanas

A mi hermana mayor Tere por mostrarme el mejor camino para andar y por tener a esa hermosa muñeca que quiero tanto. A Didi por ser mi compañera de juegos, por estar conmigo en nuestras travesuras y por ser mi confidente, porque siempre serás mi hermanita y pase lo que pase cuento contigo. A Chivis porque eres una mujer excepcional que tiene una fuerza que nadie podrá quitarte, por encontrar en tu camino a un ángel que siempre está en nuestros corazones.



A la familia Casco

Por abrirme las puertas de su hogar y convertirse en parte de mi familia. A Miguel Ángel Casco y María Elba por brindarme su apoyo incondicional, comprensión y cariño. A Migue y Selenita por todo el cariño, la confianza y ánimos que me han brindado. A Dani y Chío por siempre encontrar en ustedes una compañía muy agradable, por su amistad y por su gran apoyo. Y especialmente a Chío por brindarme a manos llenas todo tu cariño, por ser una persona muy especial y por contagiarme con tu alegría desde el primer momento en que te conocí.

A mis Amigos

Erika y María por todos los momentos felices que hemos pasado, por crecer a mi lado y por compartir nuestras adolescencias juntas. A la gran "B" especialmente a Homita, Fat, Osito, Flakito, Ilhuil, Didi, Hugo, Turko, Juan, Fabo, Shamir, Coto, Liz por todas las inmemorables veces que me hicieron reír y por tener en un ustedes un hombro donde recargarme. Porque descubrí cada rincón del CCH a su lado Ashanti, Rocío, Chucho, Brendita, Andrés, Arturo, Rosita, Herk, Zaid, Alfred, Kika gracias por su amistad.

Areli, Cubo, Claudia, Hugo, Pambo, Carlitos, Marichu, Rodolfo, Luis, Lenin, Alejandro, Alejandra y Clara por acompañarme durante todo el camino a largo de esta carrera, por compartir no solo un salón de clases, sino muy buenos ratos de diversión, con momentos muy felices y agradables. Georgina y Roberto por demostrarme que su amistad es muy valiosa, y que puedo contar con ustedes siempre que lo necesite.

A Sandunga y Jesi por brindarme su amistad, por hacerme sentir parte de su equipo. Blanquita, Yadi, Ale, Kayro, Adriana, Mel, Marian, por convertir el laboratorio en una segunda casa, por hacer el trabajo divertido, porque han demostrado ser unas personas muy valiosas.

Al círculo de corazones vibrantes Alfred, Carol, Fany, Sandy, Peque, Ana, Brenda, Kika, Andrés, Manu, Fer, por compartir su camino y enseñanzas a mi lado.



Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	9
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
MARCO TEÓRICO.....	15
CICLO ESTRAL	15
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO.....	18
EL HIPOTÁLAMO.....	18
LA HIPÓFISIS	21
EL OVARIO	22
Esteroidogénesis	23
Foliculogénesis.....	24
GnRH y NEURONAS GnRHÉRGICAS	27
Bioquímica y evolución.....	27
Distribución anatómica de las neuronas GnRHÉRGICAS.....	28
Los Receptores a la GnRH (RGnRH).....	29
Efectos de la GnRH en la hipófisis.....	29
Patrón de secreción.....	30
RECEPTORES A ESTRÓGENOS	31
PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO.....	35
La Acetilcolina.....	35
Síntesis.....	35
Liberación	35
Receptores colinérgicos.....	36
ATROPINA (Antagonista muscarínico).....	38



Vías colinérgicas aferentes al hipotálamo y receptores muscarínicos en POA-AHA y en el ovario	39
Participación del sistema colinérgico sobre la ovulación de la rata.....	41
JUSTIFICACIÓN	44
HIPÓTESIS.....	45
OBJETIVO GENERAL.....	45
OBJETIVOS PARTICULARES:.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
RESULTADOS	54
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	62
CONCLUSIONES.....	68
ANEXOS	69



ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1. Perfil de las concentraciones plasmáticas de Progesterona, Estradiol, LH y FSH	17
Fig. 2. Eje-Hipotálamo-Hipófisis-Ovario	18
Fig. 3. Corte sagital de cerebro de rata, que muestra las diferentes zonas del hipotálamo.....	19
Fig. 4. Esquema de la esteroidogénesis en el folículo ovárico	24
Fig. 5. Descripción de los cambios en la estructura de un folículo.....	25
Fig. 6. Cortes histológicos del desarrollo de un folículo ovárico de rata	26
Fig. 7. Secuencia de aminoácidos de la molécula GnRH.....	27
Fig. 8. Dominios Funcionales del RE	32
Fig. 9. Síntesis y estructura química lineal de la Acetilcolina	35
Fig. 10. Sinapsis de acetilcolina (A/Ch)	36
Fig. 11. Estructura química del sulfato de atropina.....	39
Fig. 12. Vías colinérgicas.....	40
Fig. 13. Porcentaje de animales que ovularon al estro esperado después de la inyección subcutánea del vehículo o atropina	54
Fig. 14. Efecto de la inyección subcutánea del vehículo ó sulfato de atropina a las 9:00 h del estro, sobre el número de ovocitos liberados en el día del estro esperado.	55
Fig. 15. Efecto de la inyección subcutánea del vehículo ó sulfato de atropina a las 9:00 h del estro, sobre el peso del ovario izquierdo, derecho y de la masa ovárica.	56
Fig. 16. Efecto de la inyección subcutánea del vehículo ó sulfato de atropina a las 9:00 h del estro, sobre el peso del útero	56
Fig. 17. Efecto de la inyección subcutánea de vehículo (VHC) o de 700 kg/kg de sulfato de atropina (ATR) a las 9:00 h del estro, sobre la concentración sérica de progesterona	57
Fig. 18. Efecto de la inyección subcutánea de vehículo (VHC) o de 700mg/kg sulfato de atropina (ATR) a las 9:00 h del día estro, sobre la concentración sérica de estradiol.....	57
Fig. 19. Media y e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para el RE α	58
Fig. 20. Media y e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para el RE- β	59
Fig. 21. Media y e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para la GnRH.....	60
Fig. 22. Efecto de los diferentes reemplazos hormonales.	61
Fig. 23. Posible modelo de señalización de la acetilcolina (ACh) sobre la red neuronal de las células GnRH de POA-AHA.....	64



Fig. 24. Resumen de resultados obtenidos por la inyección subcutánea de 700 mg/kg sulfato de ATR	69
Fig. 25. Modelo explicativo de los efectos del reemplazo de la señal hipotalámica	69
Fig. 26 Modelo explicativo de los efectos del reemplazo de la señal hipofisiaria	70
Fig. 27. Modelo explicativo de los efectos del reemplazo de la señal ovárica.	70
Tabla 1. Resumen de características celulares en las diferentes fases del ciclo estral	16
Tabla 2. Resumen de la organización del hipotálamo	20
Tabla 3. Descripción de las diferentes hormonas secretadas por la hipófisis	22
Tabla 4. Resumen de los efectos de la atropina	38
Tabla 5. Organización de grupos experimentales, volúmenes de agua inyectada para los grupos vehículo (VHC), dosis de sulfato de atropina	46
Tabla 6. Reactivos que conforman la mezcla de retro-transcripción.....	50
Tabla 7. Reactivos utilizado para la mezcla para el PCR.	50
Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la retro-transcripción	51
Tabla 9. Tabla donde se muestran las señales endócrinas reemplazadas.....	52



ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF₁	Factor de transcripción uno
AF₂	Factor de transcripción dos
AHA	Área preóptica anterior
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATR	Atropina
BE	Benzoato de estradiol.
CRH	Hormona liberadora de la corticotropina
ChAT	Colina acetil transferasa
DEf	Dosis efectiva
DHEA	Dehidro-epiandrosterona
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
E₂	Estradiol
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Ácido gama amino butírico
GAP	Péptido asociado a la GnRH
GHIH	Hormona inhibidora de la hormona del crecimiento
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HMB	Hipotálamo medio basal
HP	Hipotálamo posterior
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSD	Hidroxi esteroide deshidrogenasa
ir	Inmuno-reactivas
LBD	Dominio de unión al ligando
LDL	Lipo-proteínas de baja densidad
LH	Hormona leuteinizante
LHRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
P₄	Progesterona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIF	Factor inhibidor de la prolactina
POA	Área preóptica
PRH	Hormona liberadora de la prolactina
RE	Receptor a estrógenos
RIA	Radio análisis
RT	Retro-transcripción
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SP	Sustancia P
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis
TRH	Hormona liberadora de la tirotropina
VHC	Vehículo
VIP	Péptido intestinal vasoactivo



RESUMEN

En la rata la acetilcolina (ACh), al unirse a los receptores muscarínicos regula de manera estimulante la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, su participación como regulador es diferente en cada día del ciclo estral, ya que a las 13:00 h para bloquear la ovulación en el 100% de las ratas se requiere inyectar en estro 300 mg/kg de sulfato de atropina (antagonista de los receptores muscarínicos), en diestro-1, 100 mg/kg, en diestro-2 300 mg/kg y en proestro 700 mg/kg. La potencia reguladora de la ACh en los procesos de la ovulación también cambia con la hora del día, ya que la administración de 100 mg/kg de sulfato de atropina (ATR) a las 09:00, 13:00, 17:00 y 21:00 h de cada fase del ciclo estral altera la frecuencia de ovulación en diferente magnitud.

Con el propósito de estudiar si el grado de participación del sistema colinérgico sobre la ovulación es diferente a las 09:00 del estro con respecto a las 13:00 h, en el presente estudio se decidió conocer la dosis efectiva de sulfato de ATR requerida para bloquear la ovulación de todos los animales tratados. Con esta dosis se procedió a analizar los efectos del sulfato de atropina, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, mediante la cuantificación de la expresión del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de la GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas), de los receptores a estrógenos ($RE\alpha$ y $RE\beta$) en la porción izquierda y derecha del área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) y de la concentración sérica de progesterona y estradiol.

Con la finalidad de conocer cuál de las señales endócrinas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario fue alterada, ratas inyectadas con la dosis efectiva de sulfato de ATR fueron inyectadas con 3.7 μ g de GnRH sintética o de 25 u.i. de gonadotropina coriónica humana (hCG) a las 14:00 del proestro; otro grupo de ratas fueron inyectadas con 10 μ g de benzoato de estradiol a las 14:00 h del diestro-2.

La dosis efectiva de sulfato de para bloquear la ovulación a las 9:00 h del día del estro es de 400 mg/kg más que a las 13:00 h. La administración de los 700 mg/kg peso de sulfato de ATR no provocó cambios en el peso de los ovarios y del útero; incrementó la concentración sérica de P_4 y disminuyó la de 17β -estradiol a las 13:00 h del diestro-2 y a las 11:00 h del proestro con respecto a lo observado en el grupo inyectado con el vehículo.



Además, el sulfato de ATR disminuyó la expresión del ARNm del RE α en ambos lados de POA-AHA en las horas estudiadas. Con respecto a la expresión del ARNm del RE β , el sulfato de ATR la disminuyó en el lado izquierdo de POA-AHA a las 13:00 h del diestro-2, pero la incrementó a las 11:00h del proestro en ambos lados de POA-AHA. La expresión del ARNm de la GnRH en POA-AHA izquierda aumentó a las 11:00 horas del proestro.

El reemplazo de la señal hipotalámica, por la inyección subcutánea de LHRH ó GnRH, no indujo la ovulación en los animales inyectados con 700 mg/kg de sulfato de atropina. En cambio, el reemplazo de la señal hipofisaria, por la inyección de hCG, indujo la ovulación en el 75% de los animales tratados con 700 mg/kg de sulfato de ATR. El reemplazo de la señal ovárica por la inyección de benzoato de estradiol, provocó la ovulación solo en el 14 % de los animales.

La falta de ovulación por la ausencia del estímulo generado por la ACh es resultado de: 1) la disminución de la expresión del ARNm del RE α y el aumento del mensajero del RE β en ambas porciones de POA-AHA, 2) el aumento en la concentración sérica de progesterona y la disminución de la concentración sérica de estradiol y 3) el bloqueo en la respuesta de la hipófisis a la GnRH y como consecuencia la ovulación.



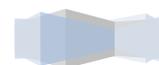
INTRODUCCIÓN

El sistema colinérgico es uno de los sistemas de neurotransmisión que regula la secreción de las gonadotropinas y en consecuencia la ovulación. Desde la década de los 40, Everett et al. (1949) mostraron que este sistema estimula la secreción de las gonadotropinas en el día del proestro. La acetilcolina, neurotransmisor liberado por las neuronas que conforman el sistema colinérgico, tiene un papel estimulante en la ovulación, efecto que aumenta o disminuye durante el ciclo estral y presenta un ritmo circádico (Domínguez et al. 1982). A su vez, la capacidad de la ACh para regular la ovulación cambia con la hora y la etapa del ciclo estral. A las 13:00 h de cada etapa del ciclo se requieren diferentes dosis de sulfato de atropina, para bloquear, la ovulación en el 100% de las ratas inyectadas.

Con la finalidad de proseguir con el análisis de la participación del sistema colinérgico en los mecanismo que regulan la ovulación, se estudiaron los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos a las 9:00 h en el día del estro, por medio de la inyección subcutánea de sulfato de atropina, sobre la expresión relativa de ARNm de la GnRH, del receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$), del beta ($RE\beta$) en el área hipotálmica-anterior, de la concentración sérica de progesterona (P_4) y estradiol (E_2); así como en la ovulación de la rata.

Inicialmente se determinó la dosis efectiva (DEf) que bloqueara la ovulación en todos los animales tratados con sulfato de atropina.

Con el propósito de comprender los mecanismos endocrinos involucrados en la falta de ovulación por el bloqueo de los receptores muscarínicos, grupos de animales inyectados con la DEf de sulfato de ATR se les reemplazó la señal hipotalámica (mediante la inyección de 3.7 μ g de GnRH sintética), la señal hipofisaria (por la inyección de 25 u.i de hCG a las 14:00 h del proestro) y la señal ovárica (al inyectar 10 μ g de BE a las 14:00 h del diestro-2).



MARCO TEÓRICO

CICLO ESTRAL

Los ciclos reproductivos de las hembras adultas, están regulados por factores tanto externos (temperatura, foto períodos, disponibilidad de alimento, etc.) como internos (ritmos endógenos de la actividad neuronal, liberación de hormonas, etc.). En estos ciclos intervienen el hipotálamo, la hipófisis, los ovarios, el útero, las trompas uterinas y las glándulas mamarias. Estos ciclos preparan al aparato reproductor para la gestación (Moore y Persaud, 2008).

En los mamíferos, cuando la hembra alcanza la adultez, manifiesta cambios rítmicos en su conducta sexual, que se repiten periódicamente denominada celo o estro, un tiempo único en el que la hembra permite la cópula. El ciclo estral se define como el tiempo que transcurre entre un periodo de celo y el comienzo del siguiente, su duración es variable con la especie, en el caso de la rata consta de 4 ó 5 días según la cepa (Freeman, 1994). El ciclo estral de la rata se divide en cuatro fases (Tabla 1): estro, diestro-1, diestro-2 y proestro.

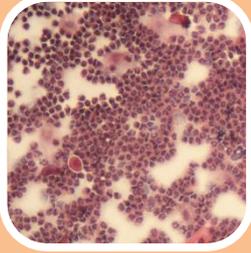
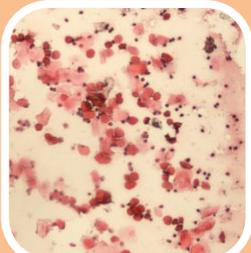
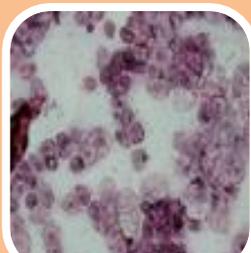
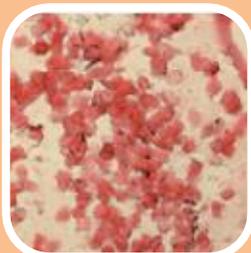
En ratas con ciclos estrales de 4 días, el perfil de secreción de progesterona (P_4), 17β -estradiol (E_2), de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) cambia en cada etapa del ciclo (Fig. 1).

En la madrugada del día del estro (entre las 1:00 y 3:00 h), ocurre la ovulación, las concentraciones de P_4 , E_2 , y LH se mantienen basales. En cambio, las concentraciones de FSH alcanzan un máximo en la mañana de este día.

En el día del *diestro-1* comienza a aumentar las concentraciones de P_4 , mientras que las de E_2 , LH y FSH siguen siendo basales.



Tabla 1. Resumen de características celulares en las diferentes fases del ciclo estral de la rata (Freeman, 1994).

<p>Metaestro ó diestro-1 (Dura de 6 - 8 horas)</p>	<p>Durante el diestro-1 el tipo de célula dominante en el frotis vaginal son los leucocitos, los cuales se presentan alrededor de un significativo número de células nucleadas epiteliales.</p>	
<p>Diestro-2 (Dura de 55-57 horas)</p>	<p>Se caracteriza por la presencia de tres tipos de células; células epiteliales nucleadas, células epiteliales escamadas y leucocitos.</p>	
<p>Proestro (Dura aproximadamente 12 - 14 horas)</p>	<p>Se caracteriza por el predominio de células epiteliales nucleadas, estas células son redondas, el núcleo es visible y aparecen en racimos. En algunas ocasiones se podrían observar células epiteliales escamosas cornificadas</p>	
<p>Estro (Dura de 25-27 horas)</p>	<p>Las células que abundan en el frotis vaginal son del tipo epitelial, escamosa y cornificada, dichas células no presentan núcleo.</p>	

En el día de *diestro-2* la P₄, LH y FSH, se mantienen en concentraciones basales, pero en la tarde de este día, la secreción de E₂ comienza a aumentar paulatinamente.



En el día del proestro, se observan las máximas concentraciones de P₄, E₂, LH y FSH, denominados como “picos” o secreciones pre-ovulatorias. Entre la mañana y el medio día, las concentraciones plasmáticas de E₂ alcanzan su valor máximo, el cual disminuye drásticamente hacia las 14:00 h. Este cambio en la secreción de E₂ induce la secreción de la GnRH, la que a su vez, estimula la secreción pre-ovulatoria de FSH y LH hacia las 17:00 h de este día (Freeman, 2006).

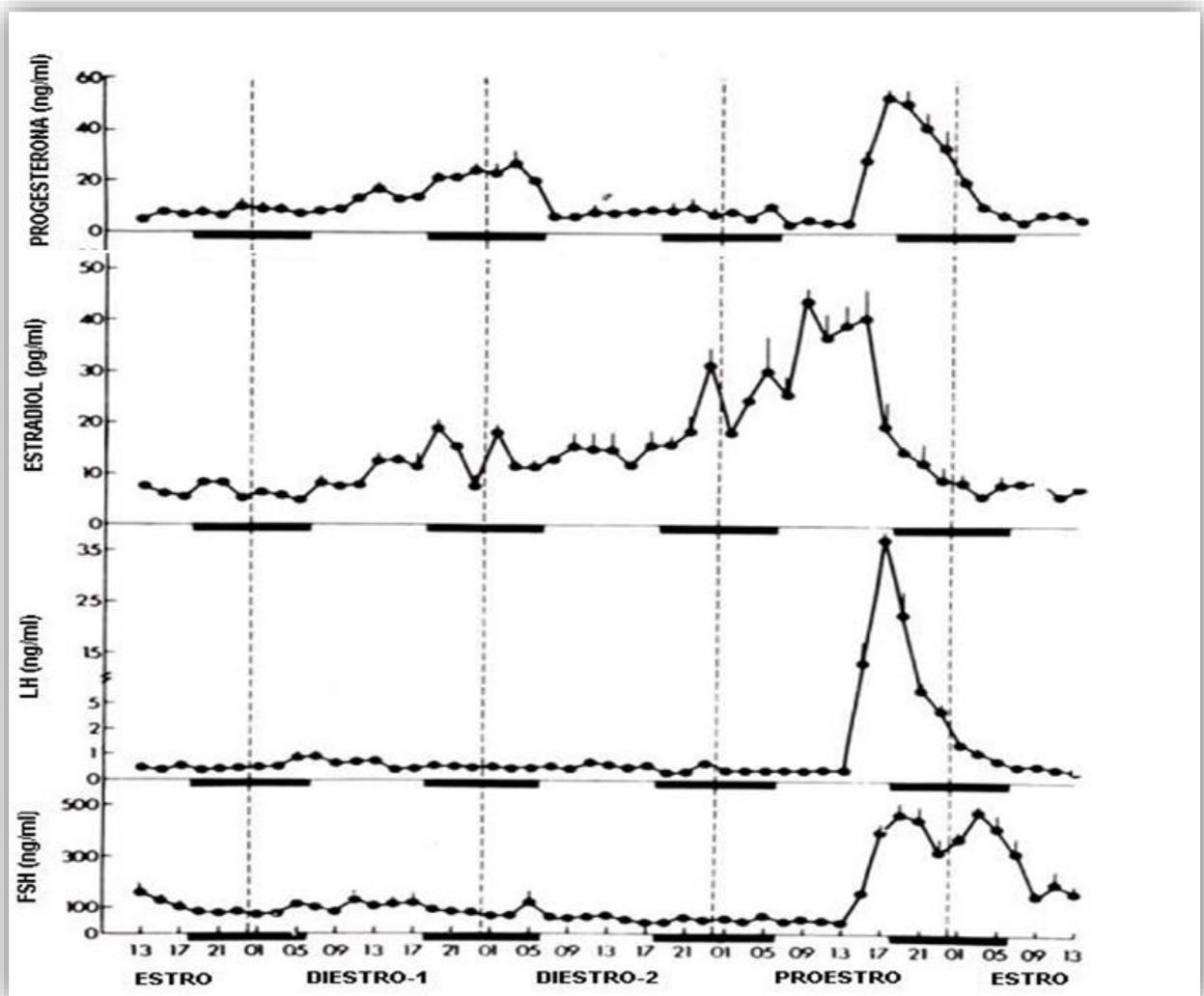


Fig. 1. Perfil de las concentraciones plasmáticas de Progesterona, Estradiol, LH y FSH durante el ciclo estral de la rata (Tomado de Freeman 2006).



EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

La función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario es regular los procesos reproductivos (Welsh et al., 1998). La ovulación es el evento final de una serie de mecanismos regulados por este eje.

EL HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es una estructura del diencefalo en el que se localizan las neuronas productoras de la GnRH, denominadas neuronas GnRHérgicas. La GnRH es liberada en forma pulsátil a los capilares del sistema hipofisario y de ahí es transportada a las células de

la adenohipófisis. Al unirse este decapeptido a sus receptores membranales en la célula gonadotropa, produce cambios moleculares que inducen la secreción de la LH y FSH, las cuales regulan las funciones del ovario, es decir, la síntesis de hormonas esteroides, el crecimiento de los folículos y la ovulación (Fig. 2) (Levy et al., 2006).

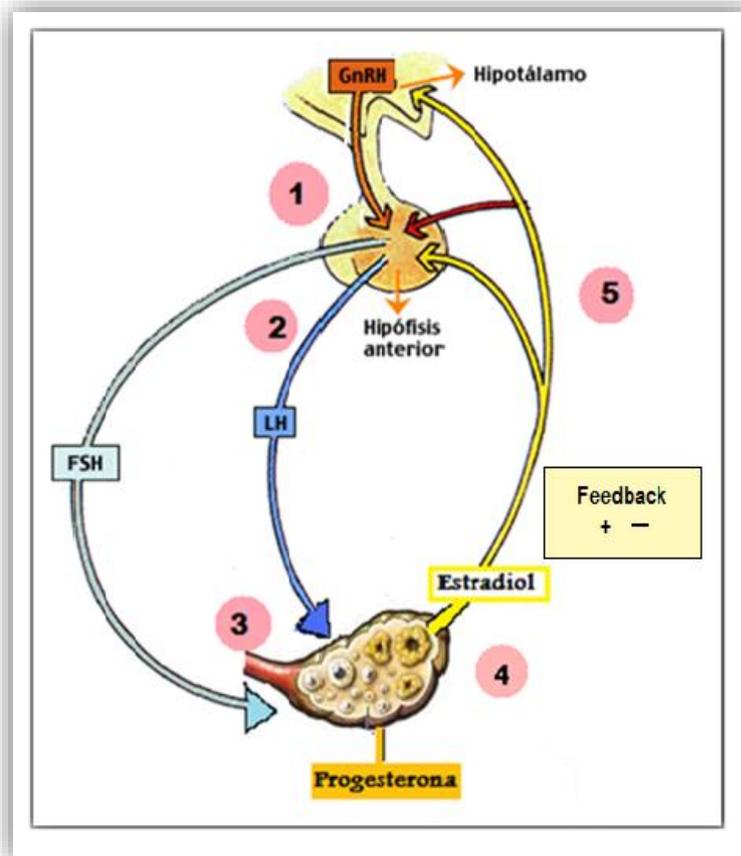


Fig. 2. Eje-Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. 1- El hipotálamo libera la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). 2- Está actúa sobre el lóbulo anterior de la hipófisis, estimulando la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). 3- Estas hormonas viajan al ovario donde la LH estimula la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo y la FSH estimula el desarrollo folicular y la secreción de estrógenos. 4- La LH y la FSH estimula la producción de estradiol y progesterona. 5- Parte del estradiol producido se dirige al hipotálamo y a la hipófisis donde tiene un efecto estimulante o inhibitorio sobre la secreción de la GnRH y las gonadotropinas, completándose así un circuito de retroalimentación llamado "Feedback Positivo o Negativo" (Tomada y modificada <http://www.vi.cl/foro/topic/7194-sistema-endocrino-apuntes/>)



El hipotálamo es una estructura, que se localiza en la base del diencefalo, por debajo del tálamo y está dividido por el tercer ventrículo en hipotálamo derecho e izquierdo (McGeer *et al.*, 1987), lateralmente está rodeado por el subtálamo, centralmente por la lámina terminal y en la parte dorsal por la comisura anterior. (Silverman, 1994).

El hipotálamo desempeña funciones nerviosas, endocrinas y vegetativas. Esta constituido de células nerviosas con sus prolongaciones (axones o dendritas), células gliales o de sostén y una rica red vascular (Norris, 1996).

El hipotálamo está constituido por núcleos y áreas (Tabla 2). Los núcleos son zonas donde las neuronas están apiñadas; mientras que en las áreas las neuronas están menos agrupadas y no tan bien demarcadas dentro del hipotálamo (Yenn *et al.*, 2001). Según Palkovits (2000). Se divide en cuatro regiones organizadas rostro-caudalmente: el área preóptica (POA), el hipotálamo anterior, el medio y el posterior (Fig.3).

Fig. 3. Corte sagital de cerebro de rata, que muestra las diferentes zonas del hipotálamo, área preóptica (POA), área hipotalámica anterior (AHA), hipotálamo medio basal (HMB), hipotálamo posterior (HP) (Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 2007).

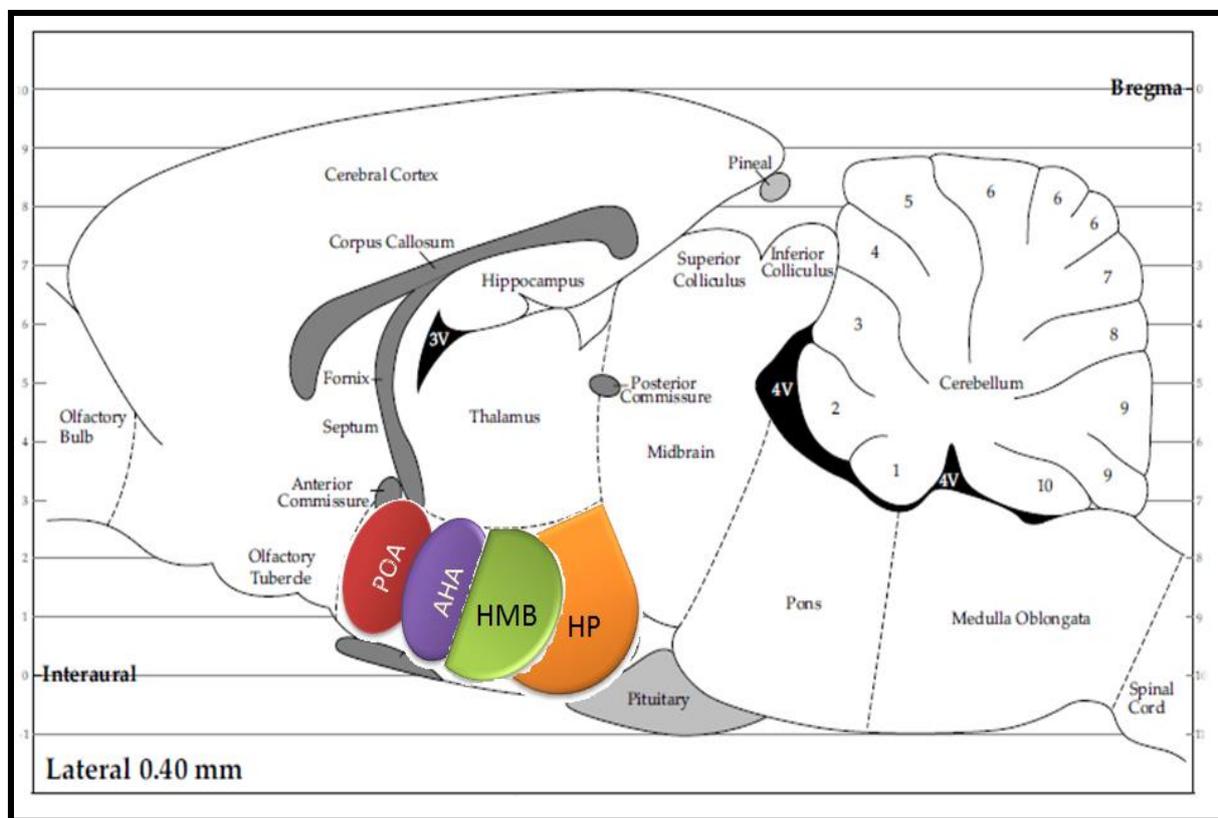


Tabla 2. Resumen de la organización del hipotálamo (Silveran, 1994; Palkovits, 2000).

<p>Área preóptica (POA)</p>	<p>Desde el punto de vista funcional se le considera parte del hipotálamo aunque su origen embriológico es diferente. En la rata esta área ocupa una cuarta parte del total del hipotálamo e incluye el núcleo preóptico medial, el núcleo preóptico periventricular y el órgano vasculoso de la lámina terminal.</p>
<p>Hipotálamo:</p> <p>Anterior</p> <p>Medio</p> <p>Posterior</p>	<p>Es una continuación del área preóptica. La parte medial está formada por los núcleos periventricular, supraquiasmático, hipotálamo anterior y paraventricular; la parte lateral contiene el núcleo supraóptico.</p> <p>En el hipotálamo medio se reconocen tres zonas: media basal, dorsal y lateral. La zona media basal incluye la eminencia media y los núcleos arcuato y ventromedial; la zona dorsal es ocupada completamente por el núcleo dorsomedial; el borde de la zona medial y lateral se localiza el núcleo perifornical.</p> <p>Representa una pequeña parte del hipotálamo y también se le conoce como región premamilar. Incluye los núcleos: Premamilar dorsal y ventral, tuberomamilar, supramamilar, hipotálamo posterior y núcleo arcuato.</p>

El hipotálamo realiza varias funciones, algunas de las cuales son: regular la secreción de hormonas por la hipófisis, modula los mecanismos que regulan la temperatura corporal, los ritmos biológicos, el balance electrolítico, controlar las conductas emocionales y regular el hambre, la sed, la agresión y la motivación sexual (Brown, 1994).

Las neurohormonas liberadas por las neuronas del hipotálamo son: la GnRH, la hormona liberadora de la corticotropina (CRH), la hormona liberadora de la tirotropina (TRH), la hormona liberadora de la prolactina (PRH), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), la hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento (GHIH) y el factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIF), (Lerner y Urbina, 2008).

Existe una estrecha correlación funcional entre el hipotálamo y la hipófisis que resulta ser esencial en el correcto funcionamiento reproductivo. Los núcleos hipotalámicos se



encuentran en contacto con la adenohipófisis a través de la comunicación del sistema portal y con la neurohipófisis mediante una comunicación neuronal (Caravaca *et al.*, 2003). Las hormonas hipotálamicas son transportadas a lo largo de los axones y liberadas en las terminales nerviosas dentro del plexo primario de los capilares del sistema de vasos portal hipofisarios (Lerner y Urbina, 2008).

Los estímulos procedentes del medio ambiente (olfativos, visuales, auditivos y táctiles), son recibidos por el sistema nervioso periférico y, al ser transmitidos al hipotálamo, provocan que sus neuronas elaboren hormonas liberadoras o inhibitoras (también llamadas “Releasing Factors” RF ó “Inhibition Factors” IF) (Caravaca *et al.*, 2003).

LA HIPÓFISIS

La hipófisis se encuentra localizada encima del hueso esfenoides y está cubierta por un diafragma meníngeo muy rígido. A pesar de que posee un tamaño muy pequeño, esta glándula es muy importante en el organismo, ya que secreta diversas hormonas que mantienen la homeostasis funcional del cuerpo (Caravaca *et al.*, 2003).

La hipófisis está constituida por dos lóbulos, estructural y funcionalmente diferentes. Además difieren de su origen embriológico: la neurohipófisis o lóbulo posterior se origina de un crecimiento del piso del diencéfalo; mientras que la adenohipófisis o lóbulo anterior se desarrolla a partir de la bolsa de Rathke, una evaginación dorsal del techo de la cavidad oral (Sanders, 2004).

La neurohipófisis se divide en tres regiones: el proceso infundibular, el tallo infundibular y, por último, la eminencia media. La adenohipófisis incluye a la *pars intermedia*, la *pars tuberculis* y la *pars distalis*. La *pars distalis* es la mayor porción de la hipófisis (90%) y posee cuando menos cinco tipos de células que secretan hormonas en respuesta a estímulos hipotalámicos y periféricos. Las células de importancia funcional para la presente tesis son los gonadotropos, que constituyen alrededor del 10% del total de la población glandular de la adenohipófisis, lugar donde se sintetizan las gonadotropinas (Tabla 3) (Lerner y Urbina, 2008).



Tabla 3. Descripción de las diferentes hormonas secretadas por la hipófisis, siglas o abreviaturas correspondientes y su función en la hembra (Brow, 1994; Alcaraz, 2001).

	Hormona	Sigla	Función
Adenohipófisis	Hormona del Crecimiento	GH	Estimula el crecimiento del soma
	Hormona Adenocorticotrópica	ACTH	Estimula la producción de hormonas de la corteza suprarrenal.
	Hormona Folículo Estimulante	FSH	Estimula el crecimiento de folicular
	Hormona Luteinizante	LH	Estimula la producción de hormonas (progesterona, estradiol, testosterona) y la ovulación.
	Prolactina	PRL	Estimula las glándulas mamarias.
	Hormona Estimulante de la Tiroides.	TSH	Estimula la producción de hormonas tiroideas.
	Hormona Estimulante de los Melanocitos.	MSH	Estimula la producción de melanocitos.
Neurohipófisis	Oxitocina		Estimulación de contracciones en el útero durante el parto y producción de leche.
	Hormona Antidiurética	ADH	Reduce la orina producida

EL OVARIO

En los mamíferos los ovarios se presentan como órganos pares, que se localizan contra la pared pélvica a cada lado de la cavidad abdominal. Es el órgano primario del sistema reproductor, cuyas funciones son la secreción de hormonas esteroides y la liberación de gametos viables para ser fecundados; son regulados por un conjunto de señales hormonales que proceden de la hipófisis, los propios ovarios, las adrenales y el timo. En el proceso de regulación de las funciones ováricas también participan señales nerviosas y neuroendocrinas que se originan en diversas zonas del sistema nervioso central y periférico (Yeh et al., 2001).

El ovario produce estradiol y progesterona, aunque también produce pequeñas cantidades de estrona, androsterona, testosterona, 17 α -hidroxiprogesterona y varias



hormonas no esteroideas, como la inhibina, la relaxina, la activina, la folistatina y algunos factores de crecimiento locales. Todos los esteroides ováricos se producen fundamentalmente en los folículos en dos tipos de células (la célula de la teca interna y las células de la granulosa) y en el cuerpo lúteo, derivan del colesterol que se obtiene de tres fuentes principales: el colesterol que circula en la sangre, el que se sintetiza *de novo* dentro del ovario a partir de la acetilcoenzima-A y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados en las gotas lipídicas (Tresguerras y Castillo, 1999).

Esteroidogénesis

La fuente principal de colesterol utilizado por el ovario deriva de la captación de colesterol unido a lipo-proteínas de baja densidad (LDL) que entra a la célula por endocitosis, formando gotitas lipídicas de ésteres de colesterol que se hidroliza formando colesterol libre, el cual es transportado de la membrana mitocondrial externa a la interna. La etapa inicial en la biosíntesis de los esteroides es la transferencia del colesterol al interior de la mitocondria, que es realizada por la StAR (proteína reguladora de la estereidogénesis aguda). En las membranas mitocnondriales el colesterol es convertido en pregnenolona por la enzima citocromo P₄₅₀ (20, 22 desmolasa) (Botella, 1995; Yen *et al.*, 2001). Una vez en el retículo citoplasmático, la pregnenolona puede ser transformada a progesterona por dos rutas, la $\Delta 4$ ó $\Delta 5$. En la ruta $\Delta 4$ (Fig. 4), la pregnenolona es transformada a progesterona por la enzima 3- β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (3 β -HSD). La progesterona es convertida a 17 α -hidroxi-progesterona P₄₅₀. La desmolasa (17, 20- esteroide liasa) la convierte a androstenediona. Este metabolito es transformado en testosterona por la enzima 17- β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa (17 β -HSD). Las células teco-intersticiales de los folículos son la primera fuente de andrógenos ováricos. Tanto la androstenediona como la testosterona pueden ser transformados en las células de la granulosa a estrógenos por la enzima P₄₅₀. En el sistema nervioso central algunas células poseen al complejo enzimático de aromatización, por lo que convierte a los andrógenos en estrógenos (Yao y Bahr, 1990; Liteack y Schmidt, 2000).



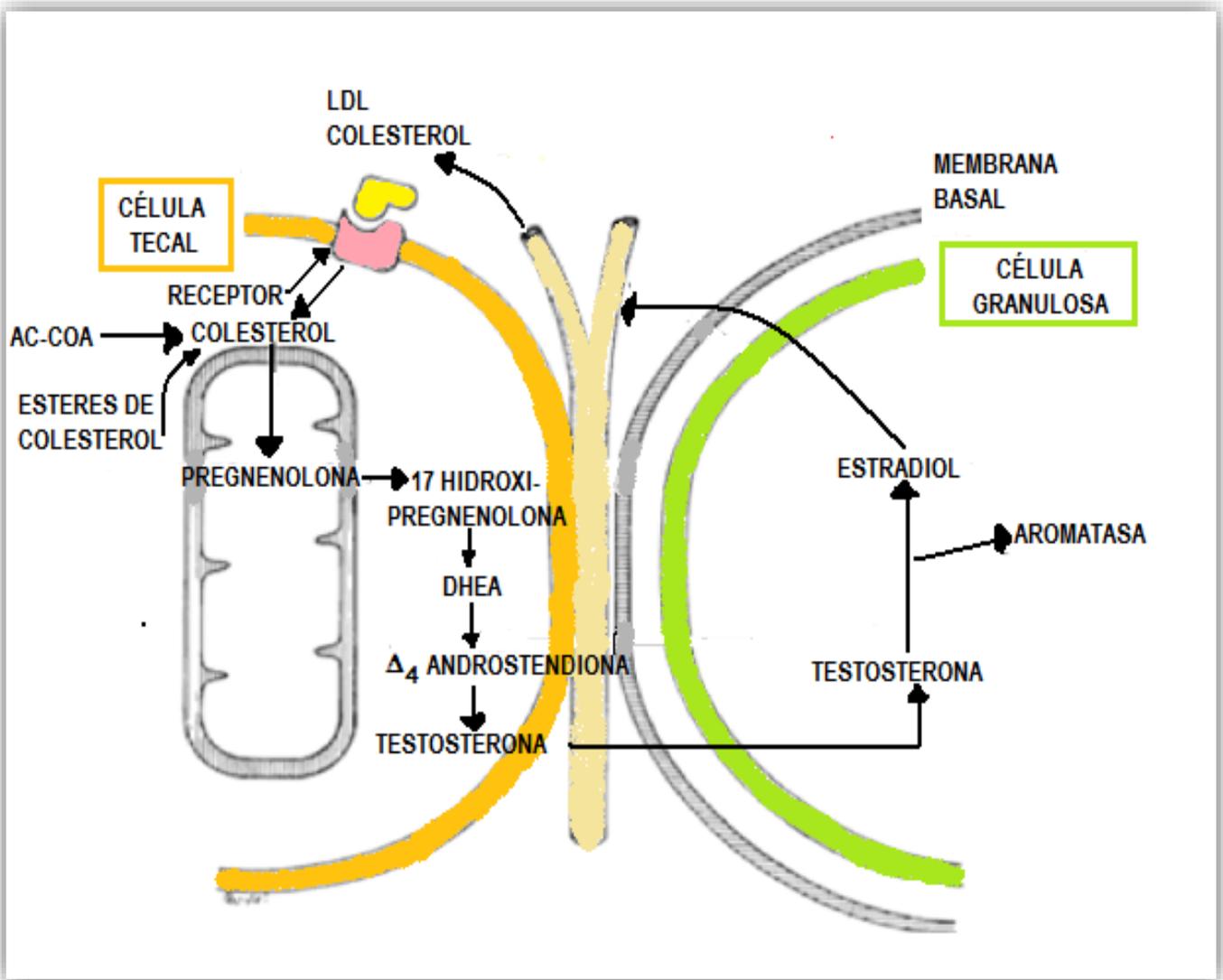
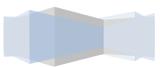


Fig. 4. Esquema de la esteroidogénesis en el folículo ovárico, célula teca y célula de la granulosa (Tomado de Botella, 1995).

En la ruta Δ_5 la pregnenolona es transformada 17 α -hidroxi-pregnenolona por la enzima 17 α -hidrolasa. Después, la C17, 20- liasa transforma 17 α -hidroxi-pregnenolona en dehidro-epiandrosterona (DHEA), está a su vez es transformada a androstenediona por la enzima 17 β -HSD. A partir de aquí la androstenediona sigue la ruta Δ_4 (Yao y Bahr, 1990).

Foliculogénesis

La unidad anatómica y funcional del ovario es el folículo, el cual está formado principalmente por el ovocito, las células de la granulosa, las células de la teca y una membrana basal. El crecimiento de los folículos y la diferenciación ocurre durante la



foliculogénesis (Fig.5). Este proceso finaliza al alcanzar el tamaño y la maduración funcional característico de un folículo preovulatorio (Fig. 6) (Spicer y Echternkemp, 1986).

Fig. 5. Descripción de los cambios en la estructura de un folículo durante su desarrollo (Baker, 1982).



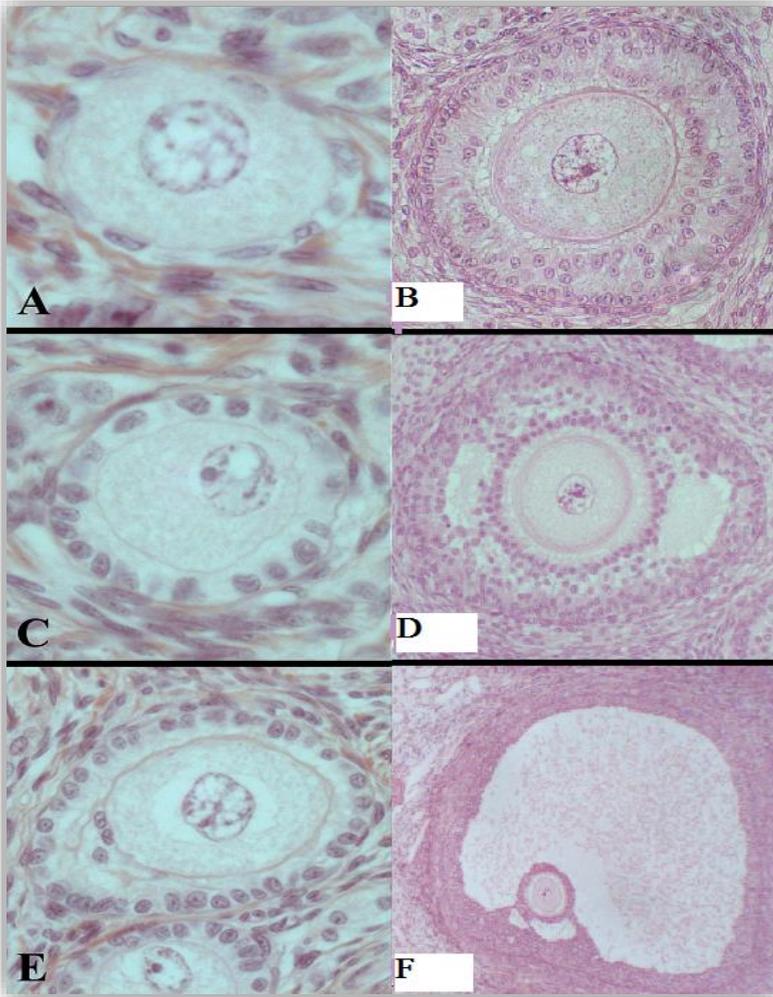
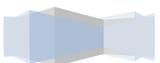


Fig. 6. Cortes histológicas del desarrollo de un folículo ovárico de rata. A, C.-Folículo primordial. E.- Folículo primario en el que empiezan a distinguirse más capas de células. B.- Folículo primario multilaminar. D.- Folículo secundario o antral. F.- Folículo preovulatorio (Tomado y modificado de <http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/practica4.htm>).



GnRH y NEURONAS GnRHÉRGICAS

En todo el hipotálamo hay células nerviosas peptidérgicas llamadas neuronas GnRHérgicas las cuales son células muy especializadas que secretan a la GnRH (Jennes y Stumpf, 1980; Gore, 2002).

Bioquímica y evolución

La GnRH es un decapeptido cuya secuencia lineal de aminoácidos es la siguiente:

pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂

Fig. 7. Secuencia de aminoácidos de la molécula GnRH, en letras rojas se señalan la posición de los aminoácidos que no cambian en las diferentes moléculas de GnRH (Gore, 2002).

La GnRH se sintetiza como parte de una molécula precursora de mayor peso molecular, la que después de acciones enzimáticas, se elimina un péptido (señal) en el grupo N-terminal denominado péptido asociado a la GnRH (GAP). Todas las formas del decapeptido presentan un pGlu en el grupo N-terminal y una Gly-amida en el grupo C-terminal, lo que indica la importancia funcional que han tenido las regiones terminales a lo largo de la línea evolutiva (Kronenberg *et al.*, 2009).

En los mamíferos se han identificado dos genes que codifican para la síntesis de la GnRH (Sherwood *et al.*, 1993; Urbanski *et al.*, 1999). El primer gen codifica una proteína precursora de 92 aminoácidos, conocida como *GnRH-I*; ésta es la que se encuentra en las neuronas hipotalámicas (Urbanski *et al.*, 1999). El segundo gen de la GnRH, codifica para la *GnRH-II*, este decapeptido difiere del primero en tres aminoácidos (el número 5, 7 y 8): pGlu-His-Trp-Ser-**His**-Gly-**Trp**-**Tyr**--Pro-Gly-NH₂ (Pawson *et al.*, 2003). Esta última forma de GnRH se encuentra en el mesencéfalo, y actúa más como neurotransmisor que como factor de liberación hipotalámico (Pawson *et al.*, 2003).

Estudios filogenéticos indican que la GnRH es una molécula muy antigua y que durante la evolución, a partir de un gen ancestral común, se derivaron distintas formas moleculares. Hasta hoy se han descubierto 15 formas moleculares de la GnRH (Montaner *et al.*, 2001)



Tanto la *GnRH-I* como la *GnRH-II* se encuentran en especies filogenéticamente diferentes, desde los peces hasta los mamíferos, lo que sugiere que estas formas múltiples de la GnRH se separaron desde las primitivas fases de la evolución de los vertebrados (Fernald y White, 1999).

El gen que codifica la GnRH-I ha sido aislado originalmente en mamíferos y presente en los humanos. La forma de GnRH-II fue aislada originalmente del cerebro de gallina y junto con la GnRH-I regulan la liberación de las gonadotropinas en las aves. Al parecer, la GnRH-II es la isoforma más antigua identificada hasta hoy y la más común entre los vertebrados (Montaner *et al.*, 2001).

La información obtenida de cDNAs clonados del hipotálamo y de la placenta indica cuatro exones. El primer exón consiste de una región 5'- no transcrita que difiere de los DNA codificados de la placenta y el hipotálamo. El segundo exón codifica para el péptido señal, la GnRH (10 aa) y los primeros 11 residuos de aminoácidos de GAP. El tercer exón codifica para los residuos 12-43 de GAP. El cuarto exón codifica para los 13 residuos de aminoácidos terminales del GAP y la restante RNAm no se traduce (Kronenberg *et al.*, 2009).

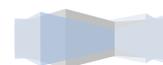
Distribución anatómica de las neuronas GnRHÉRGICAS

Las neuronas que producen la GnRH, tienen su origen embrionario fuera del sistema nervioso central, derivan de la placoda olfatoria durante la gestación temprana; dichas neuronas migran hacia el hipotálamo junto con o como parte del nervio terminal a través de la lámina cribiforme (Prieto y Velázquez, 2002).

Las neuronas GnRHérgicas son células pequeñas, de forma bipolar y fusiforme, con finos axones que se proyectan predominantemente a la eminencia media y al tallo infundibular (Phoenix y Chambers, 1990).

Las principales vías de neuronas que sintetizan la GnRH en el sistema nervioso son: la septo-preóptico infundibular, la de la región pericomisural, las vías procedente de los órganos circunventriculares y las que proyectan a zonas extra hipotalámicas (Gore, 2002).

En todas las especies, la vía más importante de fibras GnRHérgicas es la septopreóptica–infundibular, la cual es una vía común que participa en la regulación de la función secretora de la hipófisis. Esta vía se conforma de las neuronas GnRH que se localizan



en zonas rostrales a la Banda Diagonal de Broca. Este paquete de axones GnRHérgicos se bifurca cerca del área preóptica (POA), donde principia el tercer ventrículo. Ambos paquetes viajan en la línea media: uno dorsal y el otro ventral a lo largo de la superficie del quiasma óptico (Jennes *et al.*, 1985; Silverman, 1994). Los axones de las neuronas GnRH de las zonas más caudales y laterales a POA y al hipotálamo anterior viajan cerca del haz medial del cerebro anterior, cerca de la eminencia media, este haz se desvía hacia la zona medial del hipotálamo. Estas fibras periventriculares contribuyen a la inervación de la eminencia medial del hipotálamo y quizá a la de estructuras más caudales (Prieto y Velázquez, 2002).

En la rata, las neuronas GnRHérgicas hipotálamicas se concentran en el área preóptica medial, la banda diagonal de Broca, las áreas septales y el hipotálamo anterior (Phoenix y Chambers, 1990).

Los Receptores a la GnRH (RGnRH)

Efectos de la GnRH en la hipófisis

Los RGnRH se encuentran exclusivamente en las membranas citoplasmáticas. El principal sitio blanco de esta hormona es el gonadotropo de la adenohipófisis. Sin embargo, receptores para el decapeptido se han observado en las gónadas de la rata y del humano, en la placenta, en el tejido adrenal, en algunos tejidos cancerígenos de mama y en el sistema nervioso central (SNC) (Kronenberg *et al.*, 2009).

El RGnRH es un receptor de siete dominios transmembranales acoplado a la proteína G (Cheng y Lung, 2005). Existen considerables evidencias *in vivo* e *in vitro* de que el número de receptores de GnRH presentes en la superficie celular de los gonadotropos está regulado por variaciones de la frecuencia de los pulsos GnRH (Katt *et al.*, 1985). La GnRH al unirse a su receptor de membrana en los gonadotropos, estimula la síntesis y secreción tanto de la FSH como de la LH. Las concentraciones de GnRH están reguladas por neurotransmisores (acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina), aminoácidos (ácido gama amino butírico [GABA], ácido glutámico, aspartato, glicina), opióides, péptidos y hormonas esteroides (el estradiol puede provocar tanto supresión como estimulación) las gonadotropinas (que provocan supresión) y el calcio y la proteína cinasa C (que provocan la estimulación) (Norris, 1996; Cheng y Lung, 2005).



Patrón de secreción.

En una serie de experimentos llevados a cabo en el mono Rhesus, Knobil (1980) estableció que en el hipotálamo medio basal, el sistema neuronal donde interactúa la neurona GnRH, se comporta de manera rítmica con pulsos agudos y breves de actividad eléctrica.

El conjunto de neuronas GnRHérgicas del hipotálamo que envían sus axones al sistema portal de la eminencia media descargan el decapeptido de manera coordinada, repetitiva y episódica, por lo que en la circulación sanguínea portal aparecen pulsos diferenciados de GnRH (Carmel et al., 1976). El carácter pulsátil de la GnRH ocasiona en la hipófisis, la liberación de la LH en pulsos. Animales de experimentación, en los que es posible recoger muestras de sangre portal y periférica simultáneamente, se ha demostrado que la velocidad de secreción entre los pulsos de GnRH y de LH son 1:1 (Phelps y Hurley, 1999). En estudios in vivo o in vitro descubrieron que una frecuencia de pulsos elevada de GnRH (intervalo de 30 min), estimula preferentemente la biosíntesis y secreción de la LH, mientras que una menor frecuencia de pulsos de GnRH (intervalo de 2 h) estimula a la FSH (Dalkin et al., 1989).



RECEPTORES A ESTRÓGENOS

Los estrógenos realizan sus efectos por medio de la unión con sus respectivos receptores. Estos receptores se encuentran localizados en el núcleo y citoplasma de tejido mamario, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimo, próstata y el encéfalo. (Korach, 1994).

El sistema de señalización de los receptores a estrógenos (RE), juegan un papel crucial en el desarrollo normal de las funciones de la hembra, en las características sexuales secundarias y en la reproducción (Muramatsu e Inove, 2000). También están implicados en funciones del sistema nervioso central, esquelético y sistema cardiovascular (Wantanabe et al., 1997).

La unión del estrógeno a su receptor provoca la activación de este, mediante cambios conformacionales en su estructura terciaria y cuaternaria. Estos cambios permiten que el estradiol unido a su receptor adquiera una alta afinidad a secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN). Esta unión regula la transcripción de uno o varios genes minutos después de que el estrógeno entre a la célula blanco (Falkenstein et al., 2000).

Los factores de transcripción son proteínas que participan en la regulación de la transcripción del ADN, las cuales estimulan a la enzima polimerasa del ácido ribonucleico que inicie la transcripción de un gen específico; este evento provoca la síntesis de un pre-ácido ribonucleico (ARNm) de gran tamaño, que incluye todos los exones en una secuencia continua que codifica el producto proteínico respectivo del gen. El pre-ARN es procesado por una proteína (denominada empalme) que separa todos los intrones y reúne los exones en una secuencia continua que codifica el producto proteínico respectivo del gen. El ARNm es transportado al compartimiento citoplasmático de las células, allí la información vuelve a ser codificada en los ribosomas, lo que genera una proteína específica del gen en cuestión (Malley y Strott, 2001).

Los RE están formados por seis dominios, que han sido denominados con las letras de la “A” a la “F”, la primera región A/B, está localizada en el extremo N-Terminal y es conocida como activador funcional-1 (AF-1) (uno de los dos factores de transcripción), es la región menos conservada entre los distintos receptores nucleares (Fig. 8) (Ignar-Trowbridge et al., 1992; Gustafsson y Mathews, 2003). Inmediato a él se encuentra la región de unión al ADN, el dominio C, el cual tiene una región corta de 66-70 aminoácidos, esta región es la más



conservada entre los diferentes receptores nucleares y está compuesta por nueve residuos de cisteínas que son invariablemente conservados entre los diferentes receptores esteroideos, de los cuales, ocho están coordinados alrededor de dos iones de Zn^{2+} para formar los dedos de zinc, que permiten al receptor interactuar con el ADN, esta secuencia está determinada por la composición de los aminoácidos localizados entre estos dos dedos de zinc, conocida como la caja P (P-box) (Freedman, 1992).

La región D o región de bisagra, permite alterar la conformación de la proteína, participa en la unión a la proteína chaperona de golpe de calor hsp 90 (heat shock protein 90), la cual permanece unida al receptor mientras éste se encuentre en un estado inactivo. Esta región se une al dominio que se va a acoplar al ADN y el dominio donde está el ligando (Freedman, 1992; Tsai y O'Malley, 1994). La siguiente región es el dominio E o dominio de unión al ligando (LBD), donde se une la hormona esteroide. A pesar que esta región es conservada entre los diferentes receptores a esteroides, es altamente específica para su hormona, es decir que el receptor de estrógenos se une al estrógeno con alta afinidad, pero no a otras hormonas esteroideas. Otras funciones de este dominio incluye la activación de la transcripción o AF-2 (activador funcional-2) (Fig. 8) (Freedman, 1992; Catt, 1999; McDonell, 2000).

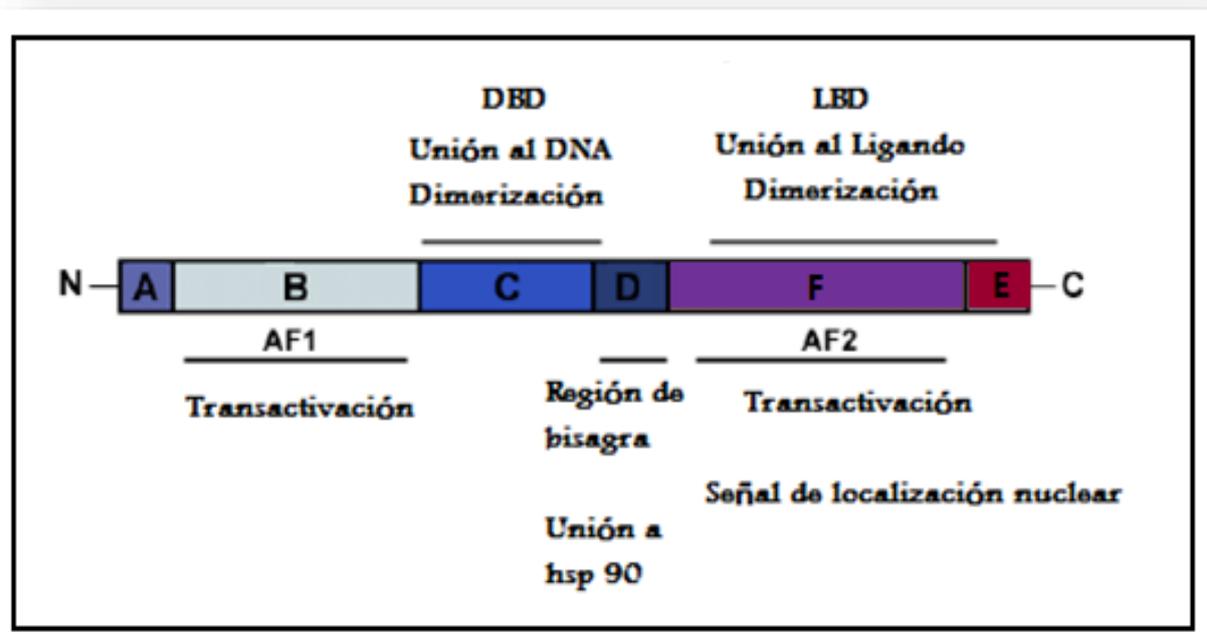


Fig. 8. Dominios Funcionales del RE (Tomada y modificada <http://vitae.ucv.ve>).



Finalmente en el extremo C-terminal se encuentra el dominio F, esta región no es muy conservada; es una cadena que contiene 44 aminoácidos y es importante en la transcripción, la activación y la represión de anti-estrógenos sintéticos. En el dominio F se asocian con mayor o menor afinidad antagonistas y agonistas sintéticos, lo que depende del tipo de célula y del ligando. La secuencia en el dominio F inhibe la dimerización que se presenta en el dominio E (Montano et al., 1995; Peters y Khan, 1999).

El RE fue identificado hace aproximadamente 40 años por Jensen y Jacob (1962). Ellos describieron la presencia de sitios de unión a estrógenos en diferentes tejidos de rata. Cuatro años más tarde, Tofk y Gorski (1966), aislaron por primera vez RE del útero de rata, al cual llamaron receptor a estrógenos alfa ($RE\alpha$). En 1996, Kuiper et al, clonaron un ácido desoxi-ribonucleico complementario (ADNc) del receptor a estrógenos en la próstata de rata, al cual denominaron receptor a estrógenos beta ($RE\beta$).

A pesar de su importancia, la función de los estrógenos sobre la neurona GnRHérgica no es aún del todo clara. En el 2000, Hrabovszky *et al*, mostraron que en las áreas rostrales del cerebro anterior (estría terminal, núcleo medial de la amígdala y el núcleo preóptico periventricular e incluso el área preóptica) hay neuronas que expresan el ARNm para ambos tipos de receptores, pero también se han identificado neuronas que expresan sólo el ARNm para el $RE\alpha$ o para el $RE\beta$. Mediante la detección del ARNm y la cuantificación de los receptores a estrógenos (por la técnica de unión con estrógeno tritiado) en neuronas GnRHérgicas (identificadas por inmunohistoquímica), se mostró que las neuronas GnRHérgicas del área preóptica contienen el $RE\beta$ pero no el $RE\alpha$ (Shughrue *et al.*, 1998).

La expresión de los genes del $RE\alpha$ y $RE\beta$ es diferente en la porción izquierda y derecha de POA-AHA. Cada gen tiene su expresión máxima en diferentes fases del ciclo estral. La expresión del ARNm del $RE\alpha$ en el día del estro presenta su máxima expresión en la porción derecha de POA-AHA, a las 17:00 horas, el cual es seguido de un segundo aumento de menor magnitud el día del diestro-2 (13:00 h); mientras que la máxima expresión del ARNm del $RE\beta$ ocurre en la porción la izquierdo de POA-AHA en el día diestro-2 a las 13:00 horas (Arteaga *et al.*, 2005).



En el 2007 Mendoza *et al*, mostraron por inmuno-histoquímica que el número de células inmuno-reativas (ir) a los RE α y β en POA-AHA dependen de la hora y la etapa del ciclo. El mayor número de células (ir) para el RE α es mayor a las 09:00 h y 17:00 h y menor a las 13:00 h en cada etapa del ciclo. En cambio, el máximo número de células ir-RE β se observa a las 13:00 h del proestro y del estro.

Aún no es claro el papel que juega el RE α y RE β sobre la neurona GnRHérgica; Herbison (1998) y Abraham *et al.*, (2003) han propuesto que tanto el RE α como el RE β están involucrados en los efectos “feedback” inhibitorios de los estrógenos sobre las neuronas GnRHérgicas. La función del estradiol ocurriría por medio de mecanismos transinápticos indirectos, dependientes de las células gliales, las cuales expresan el RE α (Herbison, 1998).

Por medio del uso de ratones “knockout”, en los que el RE α o el RE β se desactivan, se ha mostrado que el RE α pero no el RE β es necesario para que ocurra el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos sobre la neurona GnRH. En este modelo experimental y mediante el uso de un ligando selectivo para el RE α se mostró que este receptor no sólo es necesario, sino que es suficiente para estimular la secreción preovulatoria de LH (Rissman *et al.*, 1997).

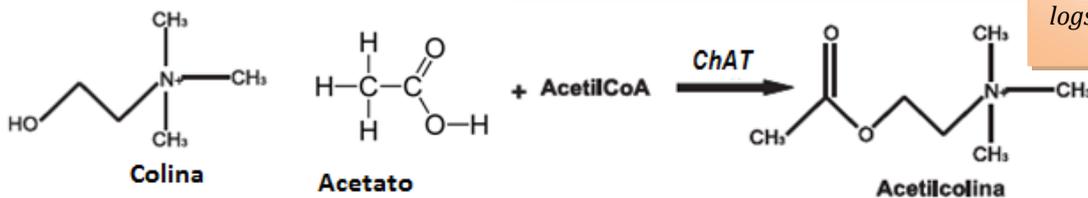
La función de los RE α y RE β de POA-AHA en la ovulación de la rata cambia en cada etapa del ciclo y sus efectos dependen del tipo de receptor que se inactive en la porción izquierda o derecha de esta zona hipotalámica (Rodríguez, 2010; Galindo, 2011; Vázquez, 2011).



PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO.

Uno de los primeros neurotransmisores descritos y clasificados como tal, es la acetilcolina (ACh). Se calcula que entre el 5% y el 10% de las sinapsis en el sistema nervioso central (SNC) son de tipo colinérgico (Perry *et al.*, 1999).

Fig. 9. Síntesis y estructura química lineal de la Acetilcolina (Tomada de <http://neuroquimicaclinica.blogspot.mx>.)



La Acetilcolina

Síntesis

La ACh se sintetiza a partir del acetato y colina tomados de la corriente sanguínea o de la recapturada en el espacio sináptico, su síntesis es catalizada por la enzima colina-acetiltransferasa (ChAT) (Fig. 9). El mecanismo por el que la colina se transporta a través de la membrana es de naturaleza activa y depende del Na^+ . La colina presente en el espacio sináptico es el producto del rompimiento de la acetilcolina por medio de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Fig. 10) (McMahan, 1992; Alcaraz, 2001;). La ChAT ha sido localizada en el SNC, específicamente donde tiene lugar la síntesis de ACh. La mayor actividad de la ChAT ocurre en el núcleo interpeduncular, el núcleo caudado, la retina, el hipocampo, la corteza cerebral y las raíces ventrales de la médula espinal. La ACh se sintetiza en el soma de la neurona y viaja a lo largo del axón (Massoulie y Bons, 1982).

Liberación

En las terminales colinérgicas, la ACh es liberada como resultado de un estímulo nervioso que induce el ingreso de Ca^{+2} a la célula y se acumula en el citoplasma de la neurona; esto activa las proteínas contráctiles del citoesqueleto y facilita que la vesícula que contiene la ACh, sea llevada directamente a la membrana presináptica y liberarla por exocitosis al espacio sináptico (Südhof, 1995).



La neurotransmisión colinérgica concluye con la inactivación de la ACh, que implica la hidrólisis del neurotransmisor, en la que la AChE produce colina y acetato. La colina es reincorporada al citoplasma por un mecanismo de captación de alta afinidad, para ser reutilizada con el ácido acético en la síntesis de ACh. (Fig.9) (Felder, 1995).

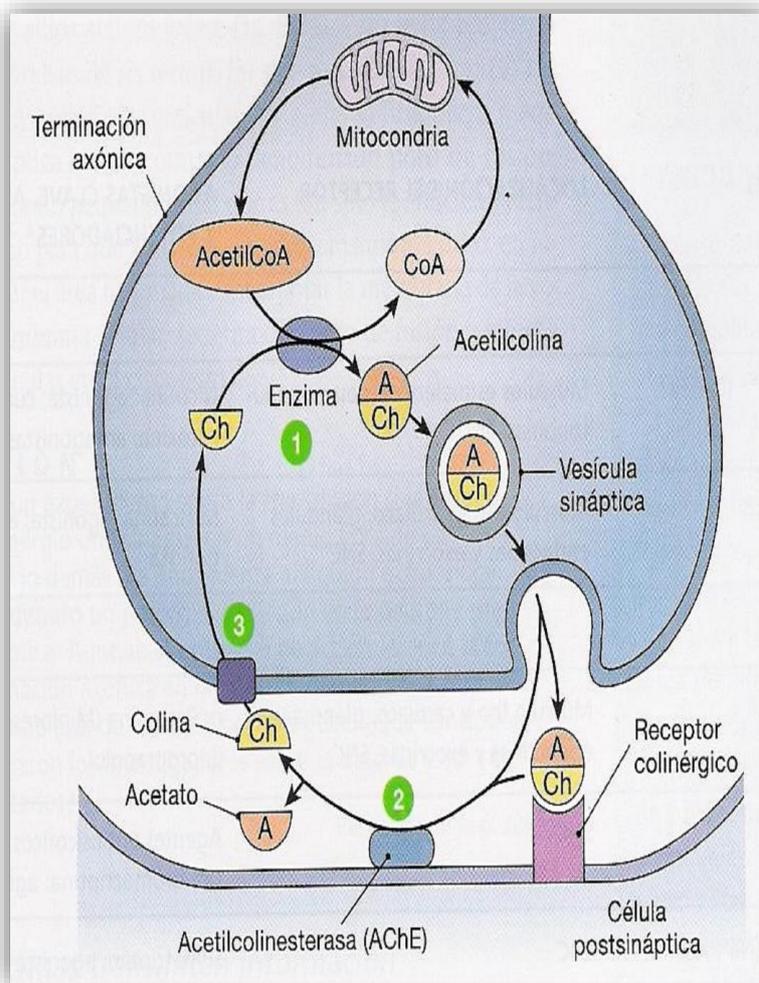


Fig. 10. Sinapsis de acetilcolina (A/Ch). 1 La A/Ch se forma a partir de colina y acetil CoA, catalizada por la enzima colina-acetil-transferasa (ChAT). 2 En la hendidura sináptica la ACh es rápidamente degradada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE). 3 La colina es transportada de regreso hacia la terminación axónica y es utilizada para formar más ACh (Tomado de <http://neuroquimicaclinica.blogspot.mx/2010/08/neurotransmisor-de-la-semana.html>).

La ACh liberada al espacio sináptico actúa sobre sus receptores, lo que permite cambios bioquímicos y eléctricos en la célula postsináptica (Changeux et al., 1984).

Receptores colinérgicos

La ACh se une a dos tipos de receptores colinérgicos de membrana:

1.- Los receptores que permiten la apertura de canales iónicos llamados receptores nicotínicos, que generan respuestas rápidas; estos receptores se localizan en los ganglios simpáticos, en el SNC y la placa muscular (Cardinali, 1992; Gotti et al., 1997).



2.-Los receptores muscarínicos que interactúan con proteínas unidas a nucleótidos de guanina (proteína G) (Unwin, 1995). Participan en los efectos de la ACh en las sinapsis post ganglionares, en el músculo liso, corazón y glándulas exocrinas; son responsables también de parte de los efectos de ACh en el SNC y ganglios autonómicos.

Por medio de experimentos *in vitro* y el uso de animales “Knockout” o por retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), los receptores muscarínicos se han identificado en varias zonas del cerebro como corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebro medio, médula espinal, cerebelo y cordón espinal (Wei *et al.*, 1994).

También están presentes en diversos órganos y tejidos como tejido cardíaco, músculo liso y glándulas exocrinas. Se han identificado cinco subtipos de receptores muscarínicos, identificados como M₁, M₂, M₃, M₄ y M₅ (Kubo *et al.*, 1986; Bonner *et al.*, 1988).

Dos de estos tipos de receptores muscarínicos se han descrito con base en la afinidad por la pirenzepina (antagonista): Los M₁, son de alta afinidad y predominan en el cuerpo estriado, el hipocampo y la corteza cerebral; los del tipo M₂, son de baja afinidad y se localizan en la corteza cerebral (Ashkenazy y Peralta, 1994). Los M₃ y M₅ han sido identificados por la utilización de [³H]-N-metil-4-piperidil bencilato (Felder, 1995; Struckmann *et al.*, 2003).

En tanto que el M₄ es de alta afinidad a pirenzepina (Felder, 1995; Struckmann *et al.*, 2003); todos son receptores de membrana con una estructura común, siete dominios transmembranales y los extremos tanto amino como carboxilo terminal, dentro y fuera de la neurona respectivamente (Duclert y Chengeux, 1995; Richmond *et al.*, 1999).

Los receptores acoplados a proteínas G, entre los que se encuentran los muscarínicos, pueden ejercer gran variedad de acciones intracelulares, según el tipo de proteína G a la que se encuentren acoplados, lo que implica que puedan estimular o inhibir respuestas rápidas o lentas, de diversas vías de mensajeros intracelulares o segundos mensajeros (Richmond *et al.*, 1999).



ATROPINA (Antagonista muscarínico).

Los receptores muscarínicos pueden ser estimulados o inhibidos por fármacos específicos, como es el caso de la atropina (ATR), que es clasificada como un fármaco antagonista (Tabla 4), es decir bloquea el receptor impidiendo cualquier tipo de acción que pueda tener la acetilcolina sobre éste (Velázquez et al., 2008).

La ATR actúa compitiendo con la ACh por los cinco receptores muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 y M_5). Esta propiedad hace que sus efectos se presenten en el cerebro y en todos los órganos inervados por el sistema nervioso autónomo (SNA) parasimpático (Flórez et al., 2003).

Tabla 4. Resumen de los efectos de la atropina (Velázquez et al., 2008).

- ❖ Inhibe los efectos de la acetilcolina mediante su unión a los receptores colinérgicos muscarínicos en las uniones neuroefectoras del sistema nervioso parasimpático, como en los ganglios autónomos y en el SNC.
- ❖ Los efectos incluyen taquicardia, dilatación pupilar, inhibición de las secreciones exocrinas y relajación del músculo liso (intestinal, urinario y bronquial); sobre el sistema nervioso produce una acción dual, que consiste en una estimulación seguida de depresión.
- ❖ Los efectos adversos consisten en la exacerbación de los efectos farmacológicos: sequedad de boca, fotofobia, visión borrosa, retención urinaria. En el SNC se manifiestan como trastornos de atención y del estado de ánimo, desorientación, alucinaciones, hipertermia, afasia, entre otras.

La ATR es un alcaloide presente en plantas de la familia Solanaceae *Atropa belladonna* y *Datura stramonium*; químicamente es un éster orgánico formado por el ácido trópico y una base orgánica, la atropina, componente farmacológicamente activo. El sulfato de ATR (Fig.



11) es un fármaco de acción rápida, absorbida por el tracto gastrointestinal, que se difunde a todos los tejidos, capaz de atravesar las barreras hematoencefálica, placentaria y se le encuentra en la leche materna. Tiene una vida media en la sangre de 2.5 h y se elimina durante las primeras 12 h posteriores a su administración. Entre el 55 y 75% de la ATR inyectada en el sistema se elimina por la orina sin modificación alguna. El resto, se inactiva en el hígado por medio de n-metilación, para hidroxilación y desaminación oxidativa (Velázquez *et al.*, 2008).

El sulfato de atropina, es un compuesto sintético en forma de cristales incoloros, es inodoro, eflorescente en el aire seco, es decir al perder humedad, cambia a un compuesto en forma de polvo blanco. El sulfato de ATR es una droga que se utiliza para bloquear la estimulación nerviosa de los músculos y las glándulas. También se utiliza para aumentar la frecuencia cardíaca, reducir las secreciones y en el tratamiento de los efectos adversos de algunos venenos (Lippincott y Wilkings, 2003).

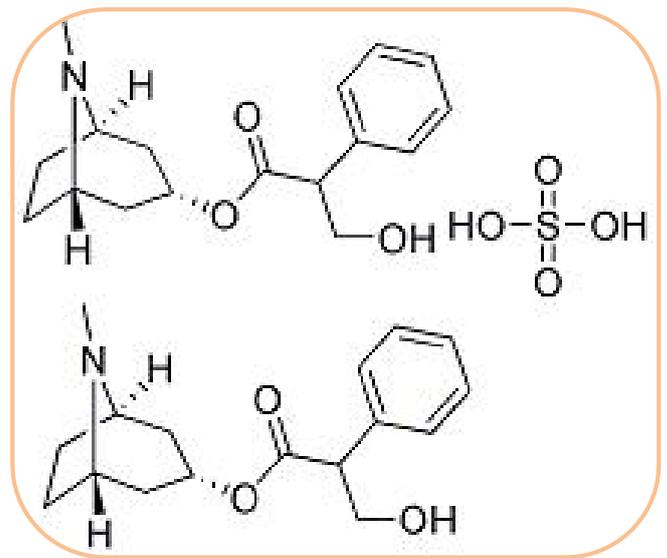


Fig. 11. Estructura química del sulfato de atropina. (Lippincott y Wilkings, 2003).

Vías colinérgicas aferentes al hipotálamo y receptores muscarínicos en POA-AHA y en el ovario

Las neuronas colinérgicas se organizan principalmente como circuitos locales y neuronas de proyección. En el cerebro anterior de la rata se han identificado dos vías colinérgicas principales (Fig. 12). La vía tegmental dorsal, cuyos somas neuronales colinérgicos se localizan en el núcleo cuneiforme de la formación reticulada mesencefálica, que proyectan sus fibras hacia el tectum, el área pretectal, los cuerpos geniculados, el tálamo y el sistema límbico. La otra vía, la tegmental ventral, cuyas neuronas se encuentran en la sustancia negra y el núcleo tegmental ventral del cerebro medio y sus fibras nerviosas viajan a lo largo del haz tegmental ventral y atraviesan el hipotálamo y el subtálamo hasta llegar al tallo cerebral (Nisticó y Müller, 1989).



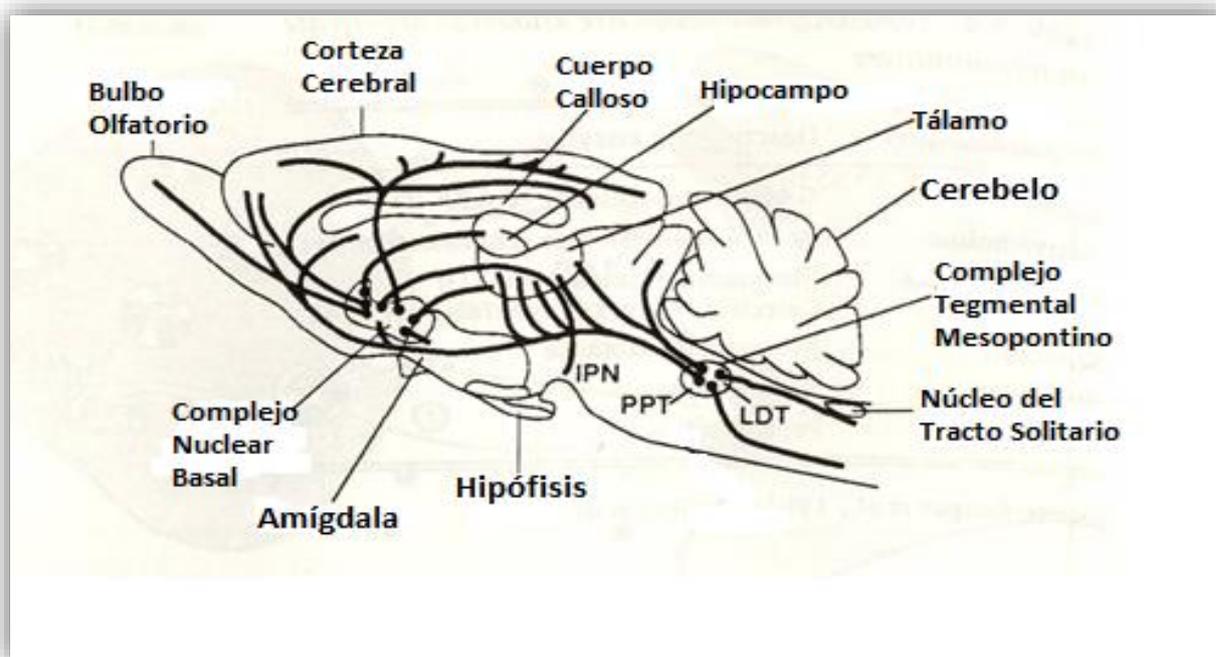


Fig. 12. *Vías colinérgicas. Las neuronas colinérgicas se agregan en dos regiones del cerebro principalmente: el complejo nuclear basal, que envía axones hacia el bulbo olfatorio, corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo y el núcleo interpeduncular (IPN); el núcleo tegmental pedunculopontino (PPT) y el núcleo tegmental laterodorsal (LDT) de la región tegmental mesopontina, que envían axones hacia el tálamo, el bulbo olfatorio y la corteza cerebral (Tomado de Brown, 1994).*

En el núcleo submamilar del hipotálamo se encuentra un núcleo denso de neuronas colinérgicas. Dispersas en las áreas posterior y lateral del hipotálamo existen otras neuronas acetilcolinerasa-positivas. El área preóptica (POA) lateral es rica en células de este tipo y aquellas que se ubican en la porción dorsal del área preóptica envían fibras hacia la amígdala, por medio de la estría terminal (Nisticó y Müller, 1989).

Experimentos *in vitro* de POA muestran que existe una relación directa entre la concentración de 17β -estradiol y la proporción de receptores muscarínicos de alta y baja afinidad (Egozi *et al.*, 1986). En esta misma área hipotalámica el número de receptores muscarínicos cambia a lo largo del ciclo estral: en la mañana del día del proestro aumenta la proporción de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos (60%), comparado a lo observado en diestro-2 ó en la tarde del proestro (35%). Los cambios significativos en los receptores muscarínicos coinciden con el llamado “periodo crítico”, caracterizado por altas



concentraciones de estrógenos y un gran número de receptores a estrógenos en POA (Egozi y Kloog, 1985).

El contenido de ACh, y el número y la afinidad de los receptores cambia, durante el ciclo estral. En el día del diestro-1 se presentan las concentraciones máximas de ACh y en el diestro-2 las mínimas. Las concentraciones de ACh en POA-AHA presentan diferencias asimétricas, en el día del diestro-1 y en el proestro el lado derecho de POA-AHA tiene una mayor concentración de ACh que el lado izquierdo. También los receptores presentan diferencias asimétricas en la afinidad, es mayor en el lado izquierdo de POA-AHA en los días del estro, diestro-1 y proestro (Cruz *et al.*, 1997).

El ovario también recibe fibras colinérgicas a través del nervio vago. El nervio vago es un nervio mixto que contiene en su mayoría fibras de naturaleza parasimpática, así como fibras sensoriales y motoras. Este paquete neural transporta ACh, sustancia P (SP) y en menor proporción al péptido intestinal vasoactivo (VIP) y somatostatina. Los somas de las neuronas del nervio vago, se localizan en el ganglio nodoso y en las células ganglionares de la raíz dorsal de los segmentos T10 a L2 (Burden *et al.*, 1983).

En el ovario del humano y la rata, las células de la granulosa sintetizan ACh. En el humano, las células de la granulosa expresan receptores M₁, y el ovocito expresa M₃. El papel de la ACh en el folículo ovárico se relaciona con la proliferación celular y la morfogénesis (Gutkind *et al.*, 1991; Lauder, 1993; Mayerhofer *et al.*, 2002).

Participación del sistema colinérgico sobre la ovulación de la rata.

Las primeras evidencias de la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de gonadotropinas fueron los experimentos realizados por Everett, Sawyer y Markee (1949) quienes mostraron que el bloqueo del sistema colinérgico, por la inyección subcutánea de ATR interrumpía la ovulación.

Estudios realizados por Everett y Sawyer, en coneja y rata muestran evidencias de la participación estimulante del sistema colinérgico en la regulación de la secreción preovulatoria de gonadotropinas, durante el día del proestro. En la coneja un animal de ovulación refleja, la inyección de ATR administrada después del coito interrumpe la ovulación. En la rata, un animal de ovulación espontánea, el mismo tratamiento en la tarde



del proestro impide la ovulación esperada en la mañana del estro (Everett *et al.*, 1949 y 1950).

Estudios *in vitro* con células de hipófisis e hipotálamo, muestran que la ACh estimula la liberación de la FSH y LH, efecto que es bloqueado por la ATR (Egozi y Kloog, 1985). La liberación preovulatoria de la LH, que ocurre en el día del proestro, es inhibida al activarse los receptores nicotínicos, ya que la administración de nicotina durante el periodo crítico del día del proestro, inhibe la liberación de LH, pero no la de FSH (Simonovic *et al.*, 1974; Billiar *et al.*, 1988).

En el día del proestro del ciclo estral de la rata, la secreción de la LH y la ovulación dependen en parte del sistema colinérgico; Domínguez *et al.*, (1982), mostraron que el grado de participación del sistema colinérgico en la regulación de la ovulación es diferente en cada día del ciclo estral, en el día del estro se requiere de 300 mg/kg de sulfato de atropina, en diestro-1 de 100 mg/kg, en diestro-2 de 300 mg/kg y en el proestro de 700 mg/kg para bloquear la ovulación. Además, demostraron que el sistema colinérgico no sólo varía con el día del ciclo, sino con la hora del día, ya que la proporción de animales que logra ovular al administrar de la dosis mínima efectiva (100 mg/kg) es diferente según la hora del día.

Ya que el hipotálamo, específicamente el anterior, regula de manera asimétrica la secreción de gonadotropinas y la ovulación, Cruz *et al.*, (1989) mostraron mediante la colocación de implantes unilaterales de ATR en POA-AHA, que en el día del estro, la señalización de tipo colinérgico muscarínico del lado derecho de esta zona, es indispensable para que se lleve a cabo la ovulación. En el día de diestro-1, la señal colinérgica que se origina en ambos lados de POA-AHA estimula la ovulación; mientras que en el día de diestro-2 es la señal del lado izquierdo la que regula este proceso. En el día del proestro, el bloqueo del sistema colinérgico muscarínico no altera la ovulación esperada en la mañana del día siguiente.

Villegas *et al.*, (2001) mostraron que la falta de ovulación por el bloqueo del sistema colinérgico llevada a cabo en el diestro-1, resulta de la inhibición de la secreción preovulatoria de la LH en la tarde del proestro. Efecto que resulta de modificaciones en la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de GnRH o LHRH sintética a las 14:00 horas de este día, induce la ovulación en ratas con implante de



ATR (Cruz *et al.*, 1992). A su vez, esta modificación en la secreción fásica de GnRH es consecuencia de una alteración en el efecto de “feedback” estimulante de los estrógenos en el lado derecho de POA-AHA, ya que al restablecer la señal ovárica en el día del diestro-2, mediante la inyección subcutánea de benzoato de estradiol, los animales ovulan sólo cuando el implante se colocó en el lado izquierdo de POA-AHA, no así cuando se localiza del lado derecho (Cruz *et al.*, 1992).

Estos resultados llevaron a considerar que el sistema colinérgico en POA-AHA regula la síntesis de estrógenos y la secreción de GnRH, y se concluyó que estos mecanismos de regulación son asimétricos, ya que el bloqueo de los receptores muscarínicos de la porciones izquierda o derecha de POA-AHA modifican de manera asimétrica la ovulación esperada en el día del estro (Cruz *et al.*, 1992), la unión de la ACh a los receptores muscarínicos del lado derecho de POA-AHA estimula la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación, en cambio la unión de la ACh a los receptores del lado izquierdo de POA-AHA inhibe la secreción de GnRH, las gonadotropinas y la ovulación (Cruz *et al.*, 1992).

En el hipotálamo y la adenohipófisis de la rata, las propiedades de los sitios de unión al agonista muscarínico [³H]-N-metil-4-piperidil bencilato, cuantificadas por ensayos de competencia, muestran que el E₂ y la P₄, provocan disminución en los sitios de unión de alta afinidad y en la constante de disociación. Esto muestra una vinculación entre el sistema colinérgico muscarínico y los mecanismos por los cuales los esteroides ováricos inducen la liberación de las gonadotropinas desde la hipófisis (Sokoiovky *et al.*, 1981).

Experimentos realizados en POA-AHA muestran que el contenido de ACh, en la actividad de la enzima de síntesis (ChAT), de degradación (AChE) y en el número y la afinidad de los receptores muscarínicos cambia durante el ciclo estral (Egozi *et al.*, 1986; Cruz *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 1994; Merchenthaler *et al.*, 2000).



JUSTIFICACIÓN

En la rata adulta, la ACh regula de manera estimulante la ovulación, esta función depende de la hora del día y de la etapa del ciclo estral que se considere (Domínguez *et al.*, 1982). A las 13:00 horas del día del estro se requiere de 300 mg/Kg de peso de sulfato de ATR para lograr que ningún animal ovule en el siguiente estro esperado. La administración de 100 mg/Kg a las 09:00 h del estro provoca que el 67 % de los animales ovule, la misma dosis inyectada a las 13:00 h no la bloquea. Cuando esta dosis se inyecta a las 17:00 h solo el 30% de las ratas ovula y a las 21:00 h lo hace el 43% (Domínguez *et al.*, 1982). Estos resultados muestran que la actividad del sistema colinérgico-muscarínico cambia con la hora del día, lo que se refleja en su capacidad reguladora de la ovulación. Por ello se decidió conocer la dosis efectiva que a las 09:00 h del día del estro, induce el bloqueo de la ovulación en el estro esperado. También analizar los efectos de esta dosis sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, por medio de la cuantificación de la expresión del ARNm de la GnRH, del RE α , del RE β en POA-AHA, y de la concentración plasmática de estradiol y progesterona, así como de la ovulación espontánea. Con finalidad de analizar cuál de los sistemas involucrados en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario fue alterado por el bloqueó del sistema colinérgico con la DEf, se estudio el efecto de la inyección subcutánea de la LHRH, de gonadotropina coriónica humana (hCG) y de benzoato de estradiol (BE) en la ovulación.



HIPÓTESIS

Dado que la ACh regula de manera estimulante la ovulación, pero esto depende de la hora del día y de la fase del ciclo estral en la que se encuentre la rata hembra adulta, entonces, el bloqueo de los receptores muscarínicos a la 9:00 h del día de estro afectará la ovulación de manera diferente a la observada previamente a las 13:00 y 17:00 h. Además, la dosis efectiva para bloquear la ovulación en el 100% de los animales también será diferente.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos, a las 09:00 horas de la fase del estro sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Conocer la dosis efectiva (*DEf*) de sulfato de ATR administrada a la 9:00 horas en el día del estro, que provoque el bloqueo de la ovulación al estro esperado en el 100% de las ratas inyectadas.
- Estudiar los efectos de la *DEf* sobre la secreción preovulatoria de estradiol (E_2) y progesterona (P_4) a las 13:0 h del diestro-2, 11:00 h del proestro y 9:00 h del estro.
- Analizar los efectos de la *DEf* sobre la expresión del ARNm de la GnRH y de los $RE\alpha$ y $RE\beta$ en el lado izquierdo y derecho de POA-AHA a las 13:00 h de diestro-2 y 11:00 h del proestro.
- Analizar los efectos en la ovulación del reemplazo de la señal preovulatoria hipotalámica, por la inyección de LHRH-sintética, la señal hipofisaria mediante la inyección de hCG y de la señal ovárica BE en ratas inyectadas con la *DEf*.



MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas, vírgenes, cíclicas, de la cepa CIIZ-V mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luz encendida de 5:00-19:00 h), a temperatura de 22°C, con libre acceso al alimento (Harlan) y al agua. El estudio del ciclo estral se realizó mediante la toma diaria de frotis vaginales, sólo se utilizaron animales que mostraron al menos dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración.

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS EFECTIVA DE SULFATO DE ATR NECESARIA PARA BLOQUEAR LA OVULACIÓN

Para identificar la *DEf* de sulfato de ATR que en el día del estro bloqueara el 100% de los animales tratados, se conformaron siete grupos experimentales para lo cual a las 09:00 h del estro vaginal, los animales fueron asignados al azar:

Tabla 5. Organización de grupos experimentales, volúmenes de agua inyectada para los grupos vehículo (VHC), dosis de sulfato de atropina.

Grupo	Inyección subcutánea a las 09:00 h del estro				Día sacrificio
Intactas n=8					Estro vaginal
Vehículo (VHC) (n=31)	0.650 mL Agua❖ (n=9)	0.200 mL Agua❖ (n=9)	0.650 mL Agua❖ (n=6)	0.500 mL Agua❖ (n=7)	Estro esperado
Sulfato de ATR (n=32)	100 mg/kg (n=8)	300 mg/kg (n=8)	500 mg/kg (n=8)	700 mg/kg (n=8)	Estro esperado

Todos los animales inyectados se sacrificaron por decapitación a las 10:00 h del estro esperado, se colectó la sangre del tronco y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 3000 r.p.m durante 15 minutos. El sobrenadante (suero) se colectó y se distribuyó en alícuotas de 300 µL, las cuales se depositaron en tubos

❖ Agua desmineralizada, pH=6, conductividad eléctrica= 2 µ0ms, marca Thiessier



ependorf de 1.5 ml, que se almacenaron y se mantuvieron a -4°C , hasta la cuantificación de las concentraciones de estradiol y progesterona por radioinmunoanálisis (RIA).

En el día de la necropsia, se procedió a extirpar los ovarios y el útero, a cada órgano se le eliminó la grasa circundante fueron pesados en una balanza analítica (ESJ SERIES ESJ200-4). Previo al pesado de cada ovario se separó el oviducto para contar el número de ovocitos liberados, bajo el ocular de un microscopio estereoscópico (Olympus SZ2-LGCL).

ANÁLISIS DE LA *Def* SOBRE LA SECRECIÓN PREOVULATORIA DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA

Grupos de 9 ratas inyectadas con la *Def* de ATR, fueron sacrificados a las 13:00 horas del diestro-2, 11:00 horas del proestro, y 9:00 horas del estro esperado, con la finalidad de cuantificar la concentración de estradiol y progesterona.

Cuantificación de hormonas esteroideas

Las concentraciones séricas de P_4 y E_2 fueron cuantificados con un estuche comercial marca Coat-A-Count (Diagnostic Product, Los Angeles, CA, USA), que contiene tubos de polipropileno impregnados con anticuerpo de coneja, viales de hormona marcada (^{125}I -Progesterona ó ^{125}I -Estradiol) y calibradores para establecer la curva patrón para cada hormona (P_4 : 0.00, 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 5.00, 10.00, 20.0, y 40 ng/ml; E_2 : 0.0, 10.0, 20.00, 50.0, 150.0, 250.0, 500.0, y 900.0 pg/ml). A cada tubo se le adicionaron 100 μL del suero problema más 100 μL de la hormona marcada (^{125}I -Progesterona o ^{125}I -Estradiol). Los tubos se agitaron durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas. Posteriormente se decantaron y se limpiaron por la parte externa del tubo, finalmente con la ayuda de un contador de centello Gama (modelo Cobra 5005, PackardTM), se cuantificó la cantidad de hormona problema. Los datos de la concentración de P_4 se expresaron en ng/ml y los de E_2 en pg/ml.

ANÁLISIS DE LA *Def* SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE LA GnRH Y DE LOS $\text{RE}\alpha$ Y $\text{RE}\beta$ EN EL LADO IZQUIERDO Y DERECHO DE POA-AHA

Grupos de 9 ratas inyectadas con la *Def* de ATR, fueron sacrificados a las 13:00 horas del diestro-2 y 11:00 horas del proestro, con la finalidad de cuantificar la expresión del ARNm de la GnRH, del $\text{RE}\alpha$ y del $\text{RE}\beta$ en los lados izquierdo y derecho de POA-AHA.



Extracción de POA-AHA

Para obtener POA-AHA se extrajo el cerebro entero y se enjuagó con solución salina estéril fría y por la técnica de Palkovits (1973), se procedió diseccionar POA-AHA, para lo cual se utilizó material de disección limpio y estéril. Una vez que se obtuvo POA-AHA se procedió a dividir la parte izquierda y derecha. Cada fragmento de tejido se depositó en el tubo de ensayo nuevo y estéril etiquetado para cada porción hipotalámica correspondiente, que contenían TRIzol para la extracción inmediata del ARN total, en cada tubo de ensayo se colocaron los fragmentos hipotalámicos de tres animales. De tal forma que la cuantificación de la expresión de cada ARNm analizado se llevó a cabo en 3 tubos con tejido de POA-AHA izquierda y 3 con derecho con la finalidad de tener 3 datos experimentales.

Extracción de ARN total de POA-AHA izquierda y derecha

Los tubos de ensayo con los fragmentos de POA-AHA y TRIzol a 4°C se homogenizaron con la ayuda de un Polytron, modelo PT-MR 3100 (Kinematica AG, Littau, Suiza). Una vez homogenizados se transfirió el contenido a tubos eppendorf de 1.5 ml nuevos y estériles. Posteriormente se le agregaron 250µL de cloroformo, se taparon los tubos, y se agitaron manualmente durante aproximadamente 30 segundos: Los tubos se mantuvieron en hielo por 5 minutos, posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior compuesta por fenol: cloroformo (que contenía el ADN y las proteínas) y la porción superior acuosa incolora (con el ARN).

Obtención de la Pastilla

La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf nuevo y estéril. Una vez transferido se agregó un volumen igual de isopropanol para precipitar el ARN, la muestra se mantuvo en congelación a -4°C durante 24 horas. Posteriormente se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, el ARN se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta, se removió el sobrenadante y se lavaron las pastillas con etanol al 80%. Después se centrifugaron nuevamente a 12000 rpm a 4°C durante 8 minutos. Una vez centrifugadas las muestras, se extrajo el sobrenadante de la pastilla de ARN. Los tubos con la pastilla se colocaron en sentido inverso sobre una gasa estéril y se dejó a temperatura ambiente hasta que el alcohol con el que se enjuagó la pastilla se evaporó. A cada tubo se le adicionaron 30 µL de agua inyectable y fue congelado a -70°C.



Lectura de ARN

Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (BOECO, modelo S-30) a una longitud de onda de 260 nm-280 nm. Se tomó una alícuota de 2 µL de cada muestra, a la que se le agregaron 98 µL de agua inyectable. Con las lecturas de absorbancia se procedió a calcular la cantidad de ARN por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de ARN total} = \left(\frac{(\text{Abs a } 260 \text{ nm})(40\mu\text{g}/\mu\text{l})(A)}{1000 \mu\text{l}} \right) \cdot 10$$

B

A= Cantidad en la que se diluyó

B=Cantidad de la muestra que se diluyó

Para obtener el ARN complementario (ARNc), se realizó la retro-transcripción del ARN total (RT). El control negativo consistió de una muestra de agua que sustituyó al ARN.

Retro-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para la realización del RT, en un tubo eppendorf se disolvieron 2 µg del ARN total, en 7µl de la mezcla de retrotranscripción (Tabla 6) y agua estéril, cada muestra se colocó en un termociclador de gradientes (Tabla 8) (marca Eppendorf Scientific Inc, Alemania). Después de la retro transcripción a las muestras obtenidas se les agregó 6.5 µL de un coctel de reactivos (Tabla 7), para realizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A través de la cual se amplificó un fragmento de 250 pares de bases (pb)del gen de la GnRH, de 337 (pb) para el REα y de 301 (pb) para el REβ, se utilizó un fragmento de 200 (pb) de GAPDH (Glyceraldehydo, 3-phosfato, Dehydrogenasa), como gen control interno.



Tabla 6. Reactivos que conforman la mezcla de retro-transcripción.

Reactivo	Volumen /1 RX
Buffer 5x	2 μ l
DTT	1 μ l
(Desoxiadenocina trifosfato) d ATP	0.5 μ l
(Desoxicitidina trifosfato) d CTP	0.5 μ l
(Desoxiguanocina trifosfato) d GTP	0.5 μ l
(Desoxitimidina trifosfato) d TTP	0.5 μ l
Oligo Dt	0.5 μ l
(Virus Moloney de la Leucemia Murina)RT-M-MLV	0.5 μ l + 0.5 μ l H ₂ O
H₂O	0.5 μ l
Volumen Total	7 μ l

Tabla 7. Reactivos utilizado para la mezcla para el PCR.

Reactivo	Volumen /1 RX
Buffer 10x	0.5 μ l
MgCl₂	2.5 μ l
d ATP	0.5 μ l
d CTP	0.5 μ l
d GTP	0.5 μ l
d TTP	0.5 μ l
Oligo1	2.0 μ l
Oligo2	2.0 μ l
Taq polimerasa	0.5 μ l
H₂O	26 μ l



El PCR se realizó en un termociclador de gradientes (marca Eppendorf Scientific Inc, Alemania), a las temperaturas y ciclos que se muestran en la Tabla 9 (Arteaga et al., 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
Reα	TTC ACA CCA AAG CCT CGG G	TGC AGC AGC ATC AGC GGA C	64.2	32
Reβ	TCC CGG CAG CAC CAG TAA C	CCC AGA TGC ATA ATC GCT GC	55	32
GAPDH	GAT TTG GGC GCC TGG TCA CC	CGC TCC TGG AAG ATG CTG ATG	55.1	32

Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la retro-transcripción, así como las temperaturas y ciclos utilizados para la técnica de PCR.

Una vez obtenidos los productos del PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2%, preparado con TBE al 1% (Tris Boratos EDTA) y teñido con bromuro de etidio, fue preparado de la siguiente manera: En un matraz Erlenmeyer se agregó 1 gr de agarosa, adicionando 50 ml de una solución Buffer de TBE 1 x que se calentó en horno de microondas (marca Pelco 3400, series Laboratory Microwave Oven) durante 1 min, hasta su completa disolución. Cuando la solución de agarosa alcanzó una temperatura de $\pm 37^{\circ}\text{C}$, se agregaron 2.5 μL de bromuro de etidio. Agitando el recipiente en forma circular, se mezclaron los diferentes componentes, evitando la formación de burbujas en la solución. El gel se vertió lentamente en la cámara de electroforesis horizontal (Horizon 11-14. Life Technologies, Gibco BRL, USA) por uno de sus extremos, con una punta de micro-pipeta limpia y estéril se retiraron las burbujas y se dejó polimerizar la agarosa.



Para la corrida de las muestras, se llenó el tanque de la cámara de electroforesis con buffer TBE 1x. Se conectaron los electrodos de la cámara a la fuente de poder, se graduó el voltaje a 100V y se dejaron correr las muestras. Las bandas resultantes del corrimiento de las muestras en los geles se observaron en un trans-iluminador de luz ultravioleta. Las fotografías del gel fueron tomadas con una cámara Kodak EDAS 216. Las bandas se analizaron por medio del Sistema de Análisis Logic GEL 112.

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS EN LA OVULACIÓN DEL REEMPLAZO DE LA SEÑAL HIPOTÁLAMICA, HIPOFISIARIA Y OVÁRICA

Para analizar los mecanismos endocrinos que provocaron la falta de ovulación por la inyección de subcutánea de la DEf de sulfato de atropina, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, fue necesario realizar tres grupos experimentales: 7 animales para cada tratamiento hormonal, tomados al azar, fueron inyectados a las 09:00 h del estro vaginal con la DEf y fueron tratados como se muestra en la tabla 10:

Tabla 9. Tabla donde se muestran las señales endócrinas reemplazadas, las dosis utilizadas, hora y día del tratamiento, y el día del sacrificio (Humphrey et al., 1973).

Grupo	Tratamiento	Día y hora del tratamiento	Día sacrificio
Señal hipotalámica	3.7 μ L LHRH	14:00 h del Proestro esperado	Estro esperado (20 h post- inyección)
Señal ovárica	25 u.i de hCG	14:00 h del Proestro esperado	Estro esperado (20 h post inyección)
Señal hipofisaria	10 μ g BE	14:00 h del diestro-2 esperado	Estro esperado (44 h post-inyección)

Análisis Estadístico

Los resultados del número de animales que ovularon del total de los tratados en ese grupo experimental se analizaron por medio de la prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher. Los resultados del número de ovocitos liberados se analizaron por la prueba de Kruzcall-Wallis seguida de la prueba Dunn. Mientras que los datos del peso de los ovarios,



del útero, de las concentraciones séricas de las hormonas y de la expresión relativa del ARNm para RE α , RE β , y de la GnRH fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos, el análisis se realizó por medio de la prueba de “t” de Student ó de “U” Mann-Withney. En todos los casos se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue ≤ 0.05 .



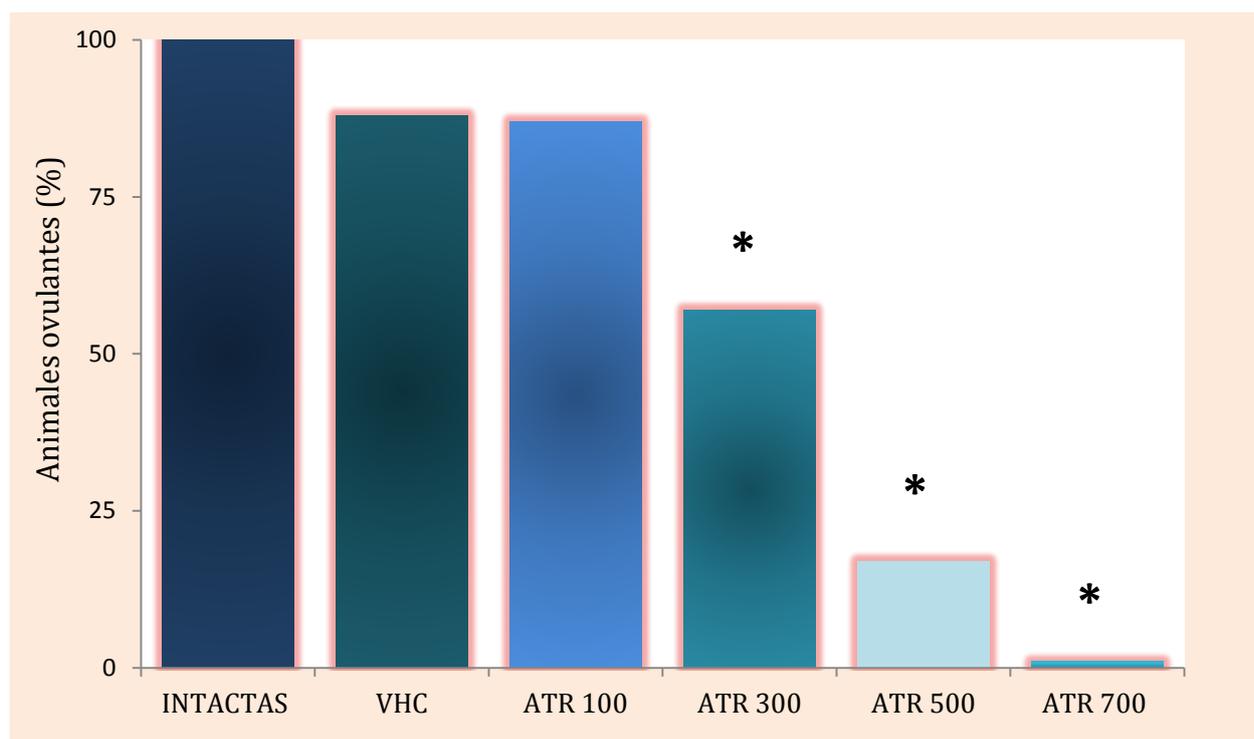
RESULTADOS

EFFECTOS DE LA *DEf*

Porcentaje de Animales Ovulantes

La inyección subcutánea de cada uno de los vehículos no modificaron el porcentaje de animales que ovularon con respecto al grupo de ratas intactas sacrificadas a las 09:00 horas del estro vaginal (100 mg/kg: 8/9; 300 mg/kg: 8/9; 500 mg/kg: 6/6 y 700 mg/kg: 6/7 vs. 8/8). Por lo que se conjuntaron los datos para formar un solo grupo vehículo

La inyección de 300 mg/kg y 500 mg/kg de sulfato de ATR disminuyó el porcentaje de animales ovulantes con respecto al grupo vehículo. Mientras que con 700mg/kg ningún animal ovuló, por lo que ésta fue la *DEf* para bloquear la ovulación a las 09:00 horas del estro (Fig.13).



* $p < 0.05$ vs. VHC (prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).

Fig. 13. Porcentaje de animales que ovularon al estro esperado después de la inyección subcutánea del vehículo (VHC) o de 100 (ATR 100), 300 (ATR 300), 500 (ATR 500) y 700 (ATR 700) mg/Kg peso de sulfato de atropina a las 09:00 h del estro. La dosis efectiva corresponde a 700 mg/Kg peso corporal.

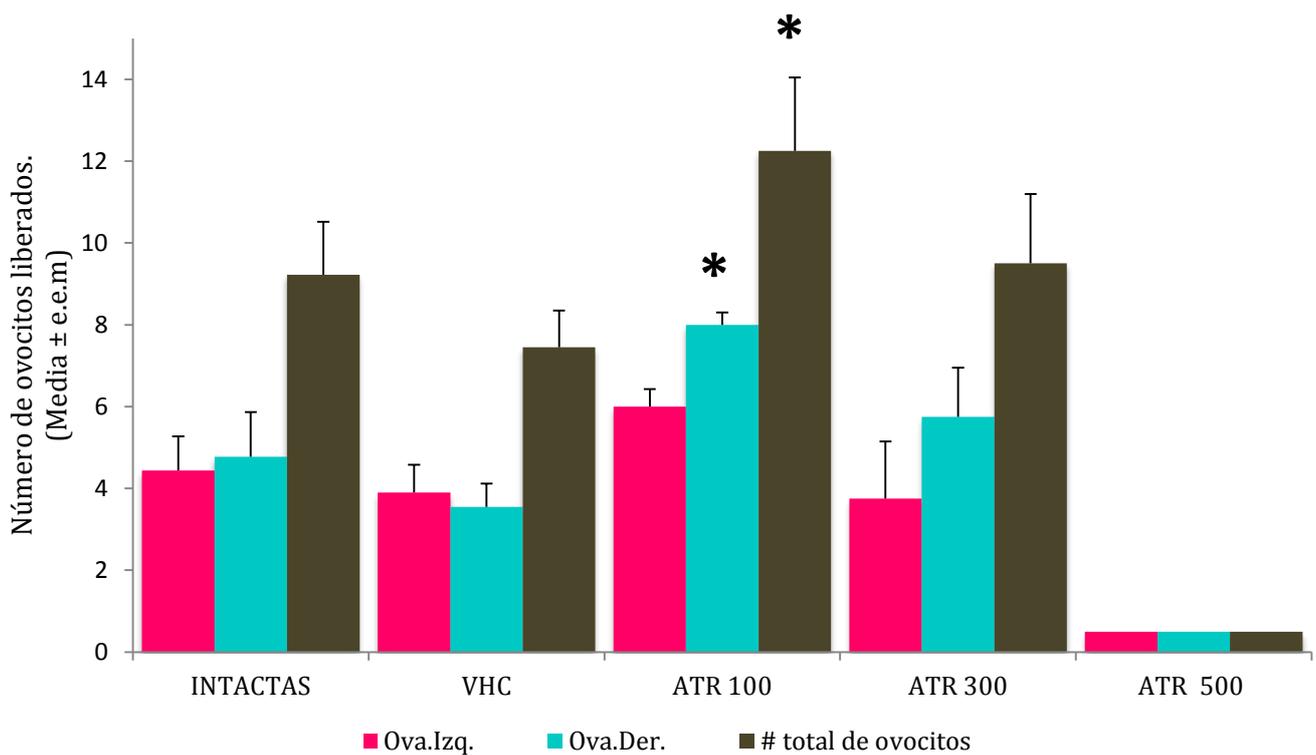


NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS.

La inyección del vehículo no provocó modificaciones en el número de ovocitos liberados con respecto a los animales intactos (ovario izquierdo: 4.4 ± 0.8 vs. 3.9 ± 0.7 ; ovario derecho: 4.8 ± 1.1 vs. 3.6 ± 0.57 ; total de ovocitos: 9.2 ± 1.3 vs. 7.5 ± 0.9).

Las ratas inyectadas con 100 mg/kg de sulfato de ATR en día del estro y sacrificadas en el estro esperado, liberaron un mayor número de ovocitos del ovario derecho que el grupo inyectado con el vehículo. Este efecto se reflejó en aumento del número de ovocitos liberados por ambos ovarios (Fig. 14).

Como se muestra en la Fig.14, con la dosis de 500 mg/kg, el único animal que ovuló liberó seis ovocitos del ovario izquierdo, ocho del ovario derecho, lo que hizo un total de 13 ovocitos liberados por ambos ovarios.



* $p < 0.05$ vs vehiculo (Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn).

Fig. 14. Efecto de la inyección subcutánea del vehículo (VHC) o de 100 (ATR 100), 300 (ATR 300) y 500 (ATR 500) mg/Kg peso de sulfato de atropina a las 9:00 h del estro, sobre el número de ovocitos liberados en el día del estro esperado.



PESO DE LOS OVARIOS Y DEL ÚTERO.

No se observaron cambios en el peso del ovario izquierdo, derecho o en la masa ovárica de los animales inyectados con el vehículo o con el sulfato de ATR (Fig. 15).

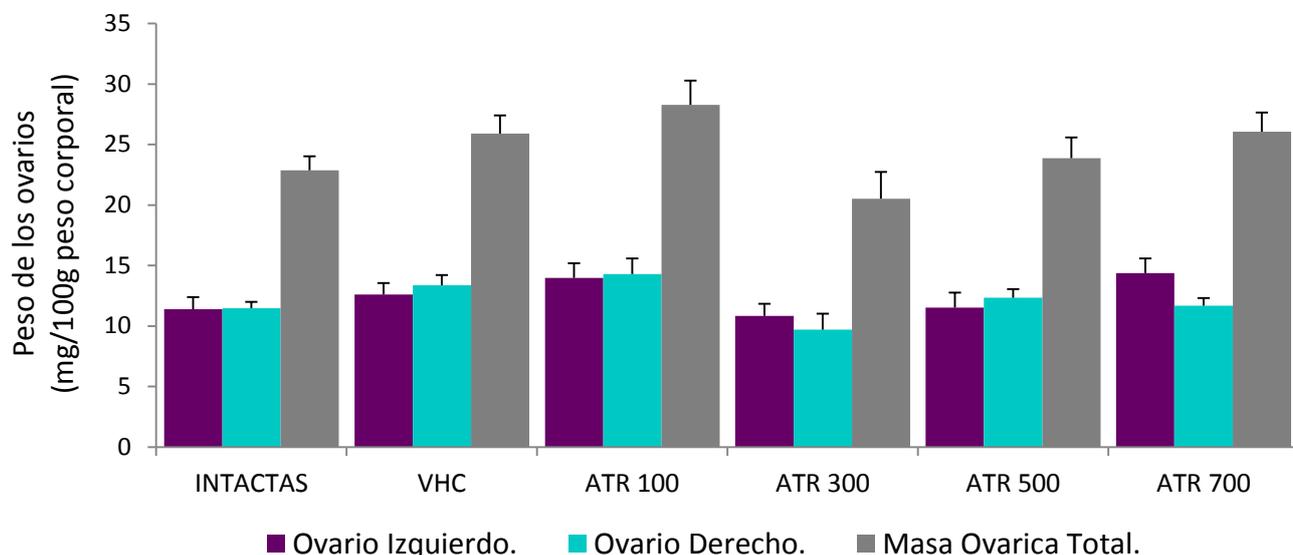


Fig. 15. Efecto de la inyección subcutánea del vehículo (VHC) o de 100 (ATR 100), 300 (ATR 300), 500 (ATR 500) y 700 (ATR700) mg/Kg peso de sulfato de atropina a las 9:00 h del estro, sobre el peso del ovario izquierdo, derecho y de la masa ovárica. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m.

Ninguno de los tratamientos modificó el peso del útero (Fig.16).

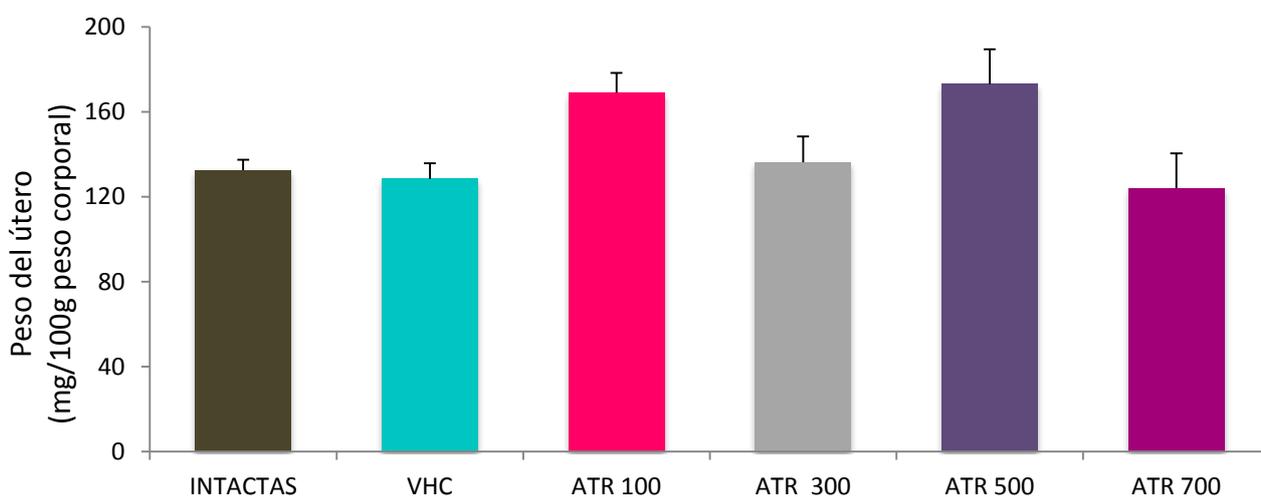


Fig. 16. Efecto de la inyección subcutánea del vehículo (VHC) o de 100 (ATR 100), 300 (ATR 300), 500 (ATR 500) y 700 (ATR 700) mg/Kg peso de sulfato de atropina a las 9:00 h del estro, sobre el peso del útero. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m.



Efecto de la inyección de la DEF (700 mg/kg) de sulfato de atropina sobre la concentración sérica de progesterona y estradiol.

Con respecto al grupo de animales intactos, la inyección del vehículo incrementó la concentración de P_4 en la mañana del estro esperado. La inyección de sulfato de ATR incrementó la concentración sérica de P_4 a las 13:00 h del diestro-2 y a las 11:00 h del proestro con respecto al grupo inyectado con el vehículo. (Fig.17). Los cambios observados en la concentración de estradiol ocurrieron en la mañana del proestro (11:00 h). La inyección del vehículo la incrementó, mientras que el sulfato de atropina la disminuyó (Fig.18).

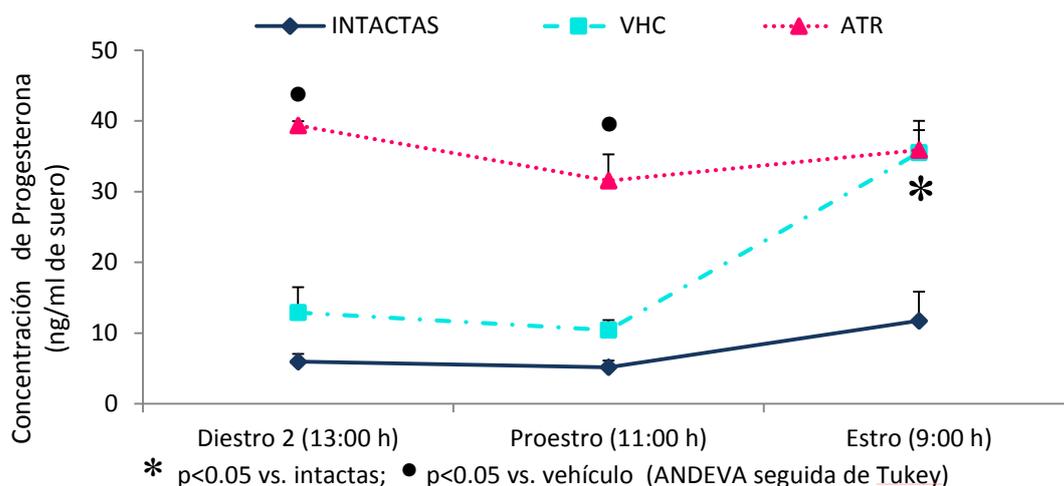


Fig. 17. Efecto de la inyección subcutánea de vehículo (VHC) o de 700 kg/kg de sulfato de atropina (ATR) a las 9:00 h del estro, sobre la concentración sérica de progesterona cuantificada a las 13:00 h del diestro-2, 11:00 h del proestro y 09:00 h del estro esperado. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m.

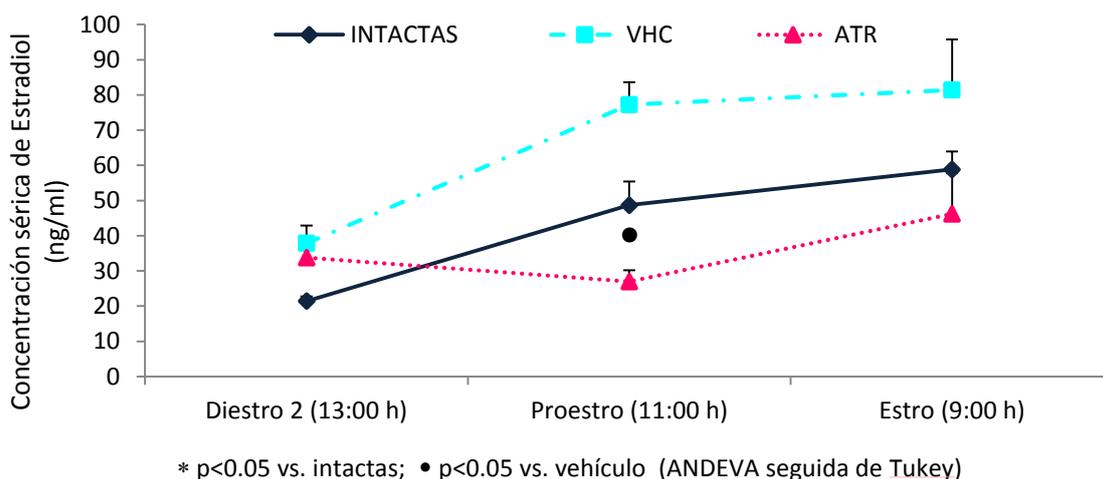


Fig. 18. Efecto de la inyección subcutánea de vehículo (VHC) o de 700mg/kg sulfato de atropina (ATR) a las 9:00 h del día estro, sobre la concentración sérica de estradiol cuantificadas a las 13:00 h del diestro-2, 11:00 h del proestro y 09:h del estro esperado. Los resultados se expresan como la media \pm e.e.m.

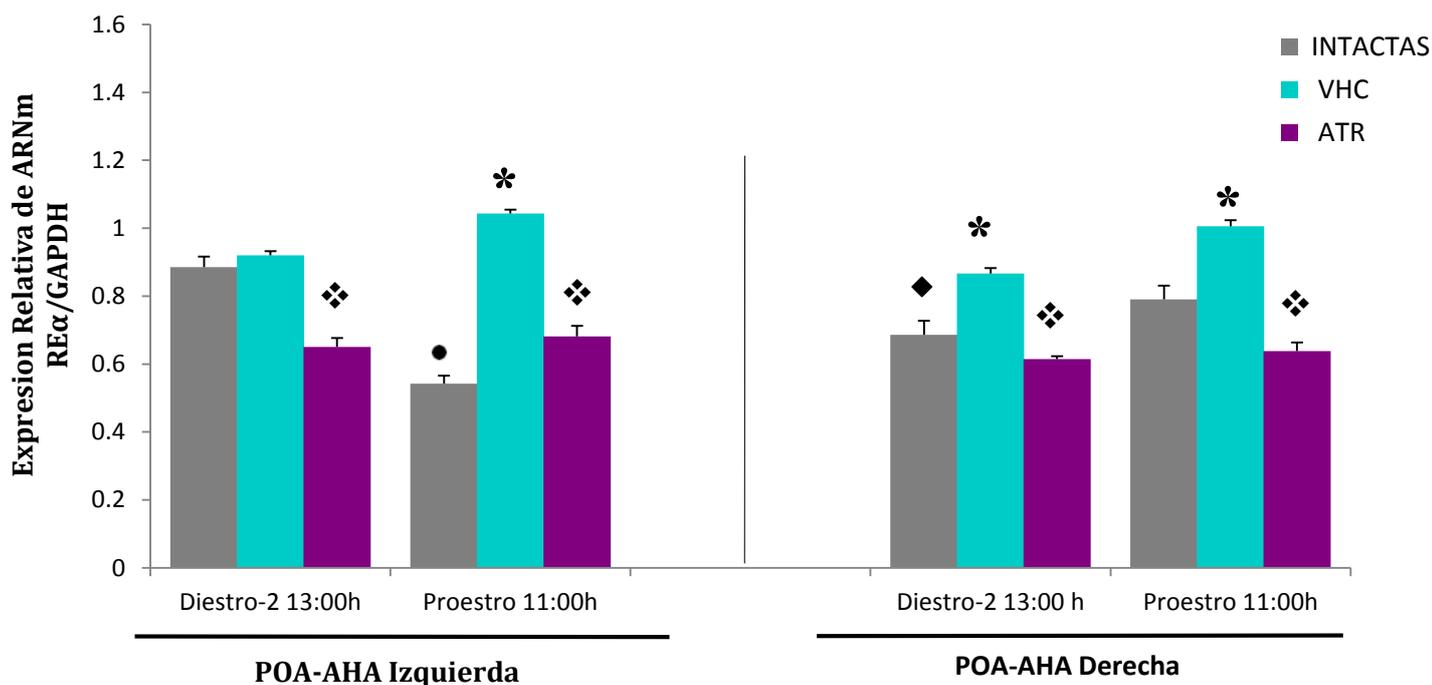


Efectos de la inyección de la DEF de sulfato de atropina a las 9:00 h del día del estró sobre la expresión relativa de ARNm del RE α en POA-AHA izquierda y derecha.

En el grupo de animales sin tratamiento sacrificados a las 13:00h del diestro-2, la expresión del ARNm para el RE α en el lado izquierdo de POA-AHA es significativamente mayor que a las 11:00 h del proestro. Esta diferencia no se observó en el lado derecho de POA-AHA (Fig.19). A esta misma hora, la expresión del ARNm para este receptor es menor en el lado derecho que en izquierdo, pero a las 11:00 h del proestro ocurre lo contrario, es decir, hay más ARNm del lado derecho que del lado izquierdo (Fig. 19).

Con respecto a los animales intactos, la inyección del vehículo provocó aumento del ARNm del RE α en POA-AHA derecha a las 13:00 h del diestro-2. El mismo efecto resultó a las 11:00 horas del proestro en ambos lados de POA-AHA.

Por el contrario, la inyección subcutánea de sulfato de atropina siempre disminuyó la expresión del ARNm del RE α (Fig.19).



● $p < 0.05$ vs. Intacto en diestro-2 del mismo lado de POA-AHA; ◆ $p < 0.05$ vs. Intactas de POA-AHA izquierda; * $p < 0.05$ vs. Intactas; ❖ $p < 0.05$ vs. Vehículo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

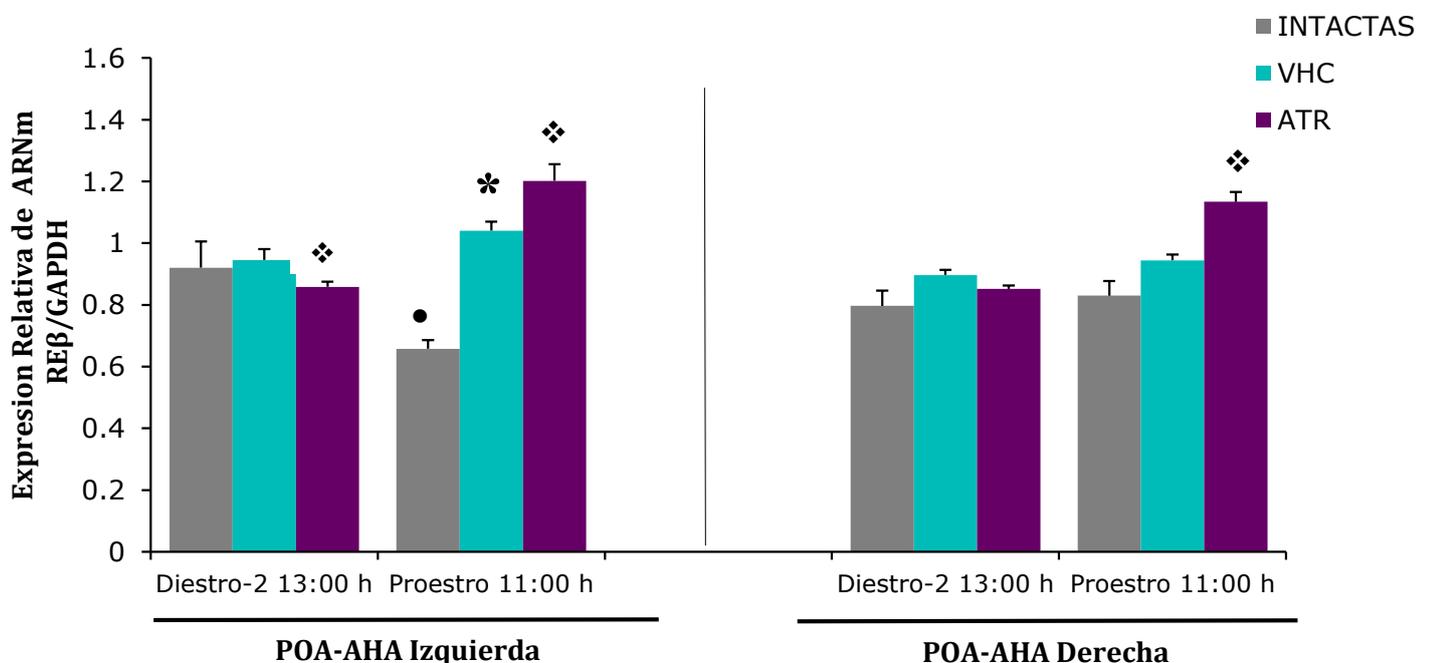
Fig. 19. Media y e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para el RE α , en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a las 13:00 h del diestro-2 ó a las 11:00 h del proestro, en ratas hembras adultas intactas ó tratadas con vehículo (VHC) o con 700 mg/kg peso de sulfato de atropina (ATR) a las 9:00 h del estró



Efectos de la inyección de la DEf (700 mg/kg) de sulfato de atropina a las 9:00 h del día del estro sobre la expresión relativa de ARNm del REβ en POA-AHA izquierda y derecha.

En el grupo de animales sin tratamiento sacrificados a las 13:00h del diestro-2, la expresión del ARNm para el REβ en el lado izquierdo de POA-AHA es significativamente mayor que a las 11:00 h del proestro. Esta diferencia no se observó en el lado derecho de POA-AHA (Fig. 20).

En general, la inyección del vehículo no modificó la expresión del ARNm del REβ excepto en la mañana del proestro que resultó en el aumento del lado izquierdo de POA-AHA. La administración del sulfato de atropina provocó disminución de la expresión del mensajero de este receptor en el lado izquierdo de POA-AHA a las 13:00 h del diestro-2 y el aumento a las 11:00h del proestro en ambos laos de POA-AHA (Fig. 20).



● $p < 0.05$ vs. Intacto en diestro- 2 del mismo lado de POA-AHA; * $p < 0.05$ vs. Intactas; ❖ $p < 0.05$ vs. Vehículo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

Fig. 20. Media y e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para el RE-β, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a las 13:00 h del diestro-2 ó a las 11:00 h del proestro en ratas hembras adultas intactas ó tratadas con vehículo (VHC) o 700 mg/kg peso de sulfato de atropina (ATR) a las 9:00 h del estro.

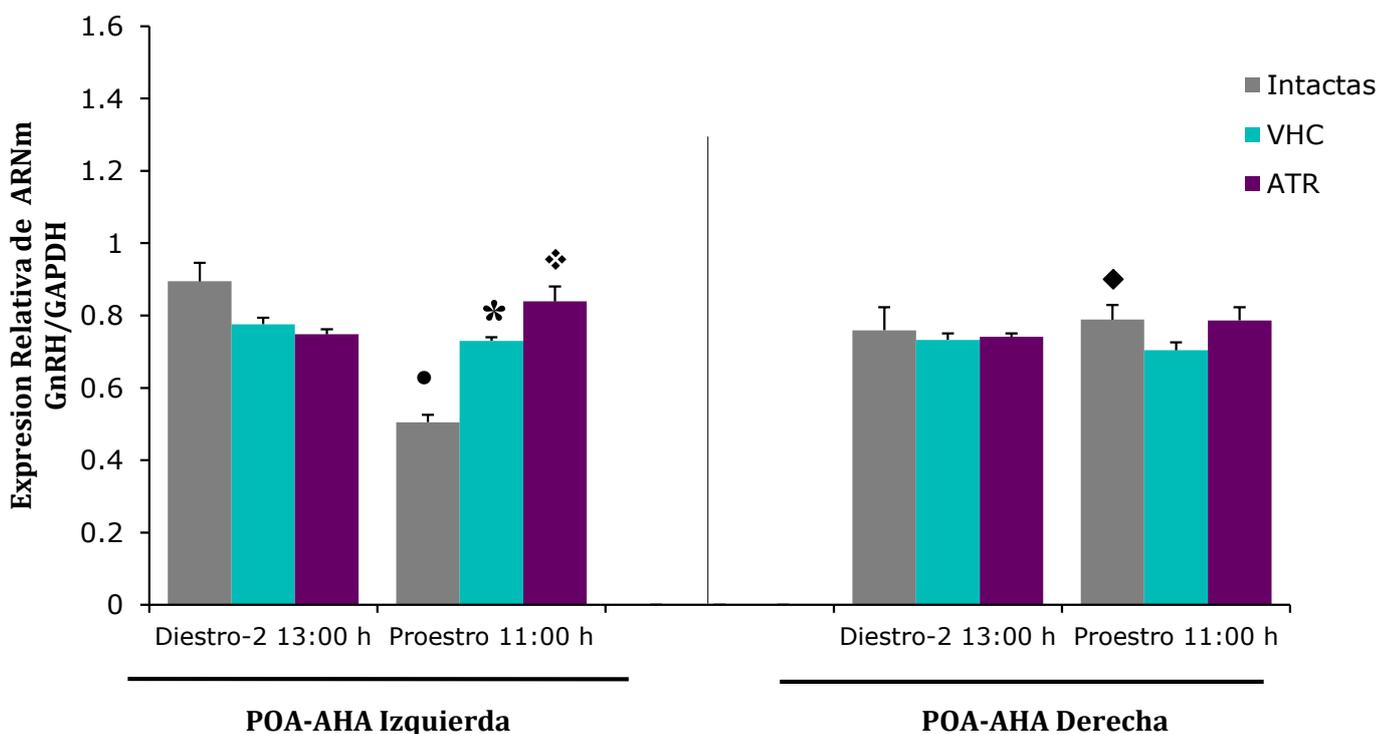


Efectos de la inyección de la DEf (700 mg/kg peso) de sulfato de atropina a las 9:00 h del día del estro, sobre la expresión relativa de ARNm del GnRH en POA-AHA izquierda y derecha.

En el grupo de animales intactos, sacrificados a las 13:00h del diestro-2, la expresión del ARNm para la GnRH en POA-AHA izquierda es mayor que a las 11:00 h del proestro; diferencia que no se observó en POA-AHA derecha (Fig.21). Cuando los animales se sacrificaron a las 11:00 h del proestro, la expresión del gen fue mayor en el lado derecho de POA-AHA que en el izquierdo (Fig.21).

La inyección del vehículo incrementó la expresión del ARNm de la GnRH en POA-AHA izquierda, cuando los animales se sacrificaron a las 11:00 horas del proestro.

La inyección del sulfato de atropina resultó en el incremento de la expresión génica en POA-AHA izquierda. (Fig.21).



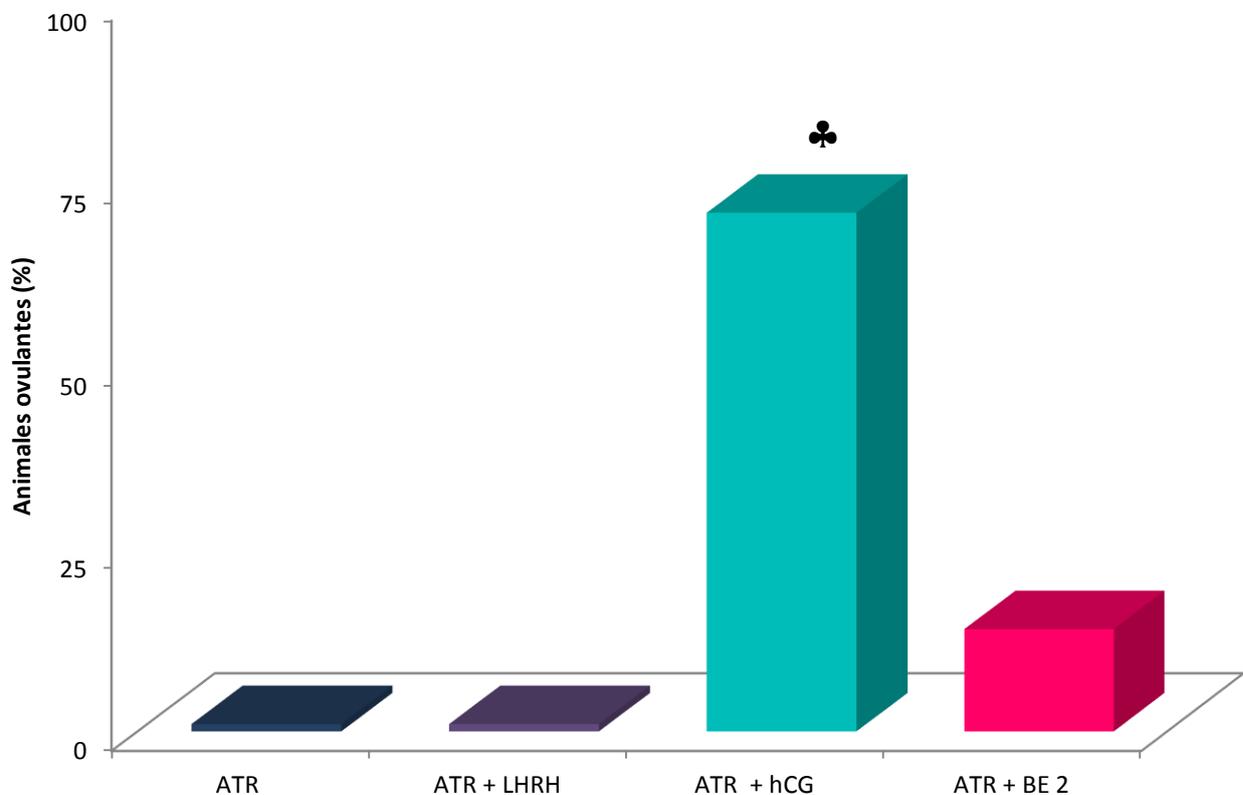
- $p < 0.05$ vs. Intactas en diestro-2 en el mismo lado de POA-AHA; ◆ $p < 0.05$ vs. Intactas de POA-AHA izquierda;
- * $p < 0.05$ vs. Intactas; ◆ $p < 0.05$ vs. Vehículo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

Fig. 21. Media y e.e.m. de la expresión relativa del ARNm para la GnRH, en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA a las 13:00 h del diestro-2 ó a las 11:00 h del proestro en ratas hembras adultas intactas ó tratadas con vehículo (VHC) o 700 mg/kg peso de sulfato de atropina (ATR) a las 9:00 h del estro.



Efectos del Reemplazo de las señales hipotálamicas, hipofisaria y ovárica en animales inyectados con la *Def* (700 mg/kg peso) de sulfato de atropina.

El reemplazo de la señal hipotalámica, por la inyección subcutánea de LHRH, no indujo la ovulación en los animales inyectados con 700 mg/kg de sulfato de atropina. En cambio, el reemplazo de la señal hipofisaria, por la inyección de hCG, indujo la ovulación en el 75% de los animales tratados. El reemplazo de la señal ovárica por la inyección de BE, provocó la ovulación solo en el 14 % de los animales (Fig.22).



♣ $p < 0.05$ vs. ATR (Prueba de la Probabilidad Exacta de Fisher).

Fig. 22. Efecto de los diferentes reemplazos hormonales sobre la ovulación de las ratas tratadas con 700 mg/kg peso de sulfato de atropina a las 9:00 h del estro.



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Domínguez *et al.* (1982) mostró que la dosis necesaria para bloquear la ovulación a las 13:00 h del estro es de 300 mg/kg. En cambio, a las 9:00 h de este día del ciclo, es necesario administrar 700 mg/kg para bloquear la ovulación, es decir 400 mg/kg más que lo reportado por Domínguez *et al.*, 1982; lo que confirma que el sistema colinérgico regula de manera estimulante la ovulación y que la actividad de este sistema de neurotransmisión cambia con la hora del día.

La falta de ovulación por la ausencia del estímulo generado por la ACh es resultado de la disminución de la expresión del ARNm del RE α , pero del aumento en la expresión del RE β en ambas porciones de POA-AHA a las 11:00 h del proestro. Por medio del estudio del reemplazo de la señal hipotalámica, hipofisaria y ovárica, llegamos a la conclusión que a las 09:00 h del estro, la ACh unida a los receptores muscarínicos estimula la respuesta de la hipófisis a la GnRH y como consecuencia se induce la ovulación.

Los resultados obtenidos con la administración de las diferentes dosis de ATR sobre el porcentaje de animales ovulantes nos lleva a plantear que a las 09:00 h del día del estro, la actividad del sistema colinérgico-muscarínico, relacionado con los mecanismos neuroendocrinos centrales y periféricos que inducen la ovulación es mayor que lo previamente reportado por Domínguez *et al.* (1982) para las trece h. El hecho de que con 100 mg/Kg de ATR no se lograra bloquear la ovulación implica que la cantidad de moléculas de ACh era mayor que las de ATR administradas, por lo que no se bloquearon en su totalidad los receptores muscarínicos disponibles en ese momento. Ya que conforme se fue aumentando la dosis de ATR, también fue aumentando la cantidad de animales que no ovularon, pone de manifiesto que a las 09:00 h de este día del ciclo la cantidad de ACh, de receptores muscarínicos ó su afinidad es mayor que en los otros días del ciclo como lo propone Domínguez *et al.*, (1982), pero semejante a el día del proestro (Everett *et al.*, 1949). Previamente se ha mostrado que la cantidad de ACh, el número de receptores y la afinidad a la N-metil-escopolamina tritiada en POA-AHA cambia con la hora del día y la etapa del ciclo estral (Cruz *et al.*, 1997).



La ausencia de ovulación por la inyección de la DEF de ATR puede ser explicada por diferentes mecanismos:

- La modificación en el patrón de liberación de la GnRH, es decir, disminución en la frecuencia de los pulsos, lo que se tradujo en la secreción preponderante de FSH y no de LH. En estudios *in vitro* con células de la hipófisis de rata y de la línea celular LβT2 se mostró que la adición de GnRH cada dos horas al medio de cultivo estimula la síntesis del ARNm de la cadena β de la FSH (FSH-β), en cambio cuando la GnRH se adiciona cada ½ hora se induce la síntesis del ARNm de la cadena β de la LH (LH-β) (Kyeong-Hoon y Kaiser, 2006). Esta hipótesis es apoyada por los resultados obtenidos con el remplazo de LHRH-sintética a las 14:00 h del proestro, ya que los animales inyectados con los 700 mg/kg pesos de sulfato de ATR no ovularon.
- Una alteración en la respuesta de la hipófisis a la GnRH, ya que la inyección de hCG a las 14:00 h del proestro esperado indujo la ovulación en el 75% de los animales tratados. En concentraciones fisiológicas, la GnRH estimula la expresión del gen y el número de receptores a GnRH en la hipófisis (Kaiser *et al.*, 1993; Turgeon *et al.*, 1996). Así que sugerimos que la ACh tendría un papel estimulante en la síntesis del receptor para la GnRH

La cadena inicial de señalización en la regulación del ARNm del REα sería a través de la activación de la proteína Gi que activan la cadena de señalización de la fosfolipasa C (PLC), la hidrólisis del fosfatidil-inositol-difosfato (PIP₂), la síntesis de IP₃ (inocitol trifosfato) y diacilglicerol (DAG) (Fig. 23) (Müller-Sterl, 2008). Con base en los resultados obtenidos sugerimos que en condiciones normales, la expresión del gen del REα es regulado de manera estimulante al activarse los receptores muscarínicos, ya que la administración del sulfato de ATR resultó en la disminución de la expresión génica del REα en ambos lados de POA-AHA. Resultados semejantes fueron observados por Arteaga *et al.* (2005) al inyectar 300 mg/kg peso de sulfato de ATR a las 13:00 h del día del estro.



El efecto inhibitorio en la expresión del ARNm de este receptor ocurre a corto plazo, ya que 4 h después del bloqueo colinérgico muscarínico, ya se observa una menor expresión (Arteaga et al., 2005). El ARNm del RE α no se estaría ni expresando ni traduciendo, ya que la inyección de BE no indujo la ovulación en los animales tratados con el fármaco.

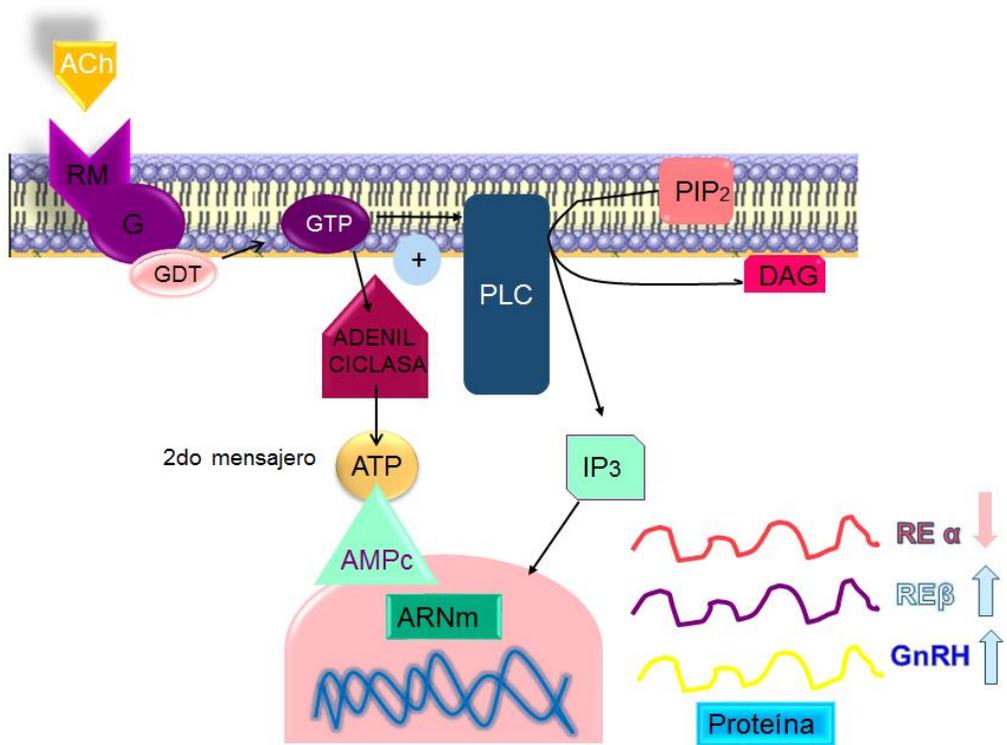


Fig. 23. Posible modelo de señalización de la acetilcolina (ACh) sobre la red neuronal de las células GnRH de POA-AHA. La ACh unida a su receptor muscarínico (RM) activa a la proteína G (G), la que induce la fosforilación de guanosin-difosfato (GDP) a guanosin-trifosfato (GTP). A su vez la GTP activa la formación de adenosin-trifosfato (ATP), energía que induce la formación de fosfolipasa-C (PLC), la que hidroliza al fosfatidil-inositol-difosfato (PIP₂), lo que resulta en la formación de, la síntesis de inositol trifosfato (IP₃) y diacil-glicerol (DAG). Estos fosfolípidos activan factores de transcripción que inducirán la expresión del gen que codifica para la GnRH y el RE β , pero inhibirá la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) del RE α

Dado que la inyección de BE no indujo la ovulación en los animales tratados con el fármaco, sugerimos que el ARNm del RE α no se está ni expresando ni traduciendo.

Por el contrario, la expresión del gen del RE β es inhibido al activarse los receptores muscarínicos, ya que la administración de 700 mg/kg peso de sulfato de ATR resultó en el aumento de la expresión génica de éste receptor. Es posible que el ARNm del RE β no se esté



traduciendo a la proteína ó que este receptor no esté involucrado en la secreción fásica de la GnRH y la LH, ya que el reemplazo de su ligando no estimuló la ovulación.

Con base en los resultados antes descritos apoyamos la hipótesis de que el estradiol unido al RE α estimula la liberación fásica de la LH (Wintermantel *et al.*, 2006; Herbison, 2006). Sin embargo no parece interferir con la síntesis, ya que en la hipófisis de ratones hembra ovariectomizadas y con deficiencia para el RE α aumenta la expresión del ARNm para las cadenas β de las dos gonadotropinas (LH β y de FSH β) (Scully *et al.*, 1997).

La diferencia observada en el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y el derecho, cuando se administraron 100 mg/kg de sulfato de ATR lleva a pensar que mayor número de folículos alcanzaron la etapa preovulatoria en el ovario izquierdo que en el derecho. Este resultado indicaría la existencia de diferencias en el número o en la afinidad de los receptores muscarínicos que posee cada ovario. Mayerhofer *et al.* (2002) han identificado en células de la granulosa de folículos preovulatorios de rata, el ARNm para el receptor M1 y M5. Sin embargo, se desconoce si estos receptores participan en el crecimiento de los folículos. Al parecer el desarrollo folicular no está siendo afectado ya que al pesar los ovarios y el útero no se observan diferencias significativas.

No contamos con una explicación al aumento en la concentración de P₄ 96 horas después de la administración del vehículo. En condiciones normales la concentración de P₄ alcanza el primer máximo en su concentración sérica entre las 19:00 y 21:00 h del día del proestro, esto es entre 2 y 4 horas después de la secreción preovulatoria de LH (Freeman, 2006). Una posible explicación es un cambio o desplazamiento horario en la secreción de la LH que favorezca la luteinización de los folículos y por tanto de la secreción de P₄, o la activación anormal del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Otra explicación sería modificaciones en la secreción de FSH. Estudios llevados a cabo en especies sub-primate han demostrado que la estimulación de la FSH en células de la granulosa durante el desarrollo folicular preovulatorio se asoció con aumento en el contenido celular de ARNm y en las actividades enzimáticas de P₄₅₀sc, 3 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa, Δ 5-4 isomerasa (3 β -HSD), P₄₅₀arom, y el receptor de LH, todos ellos



necesarios para la secreción de hormonas esteroideas por el cuerpo lúteo (Zeleznik y Benyo, 1994).

Dado que la administración de la DEf de sulfato de atropina provocó el aumento en la concentración de P_4 , 48 y 72 horas después de la administración del fármaco, sugerimos que la ACh inhibe la síntesis de P_4 . Este mecanismo de regulación ocurriría en la glándula adrenal, en el ovario o en ambos órganos. Olianás y Olani (2000) mostraron que la ACh estimula y potencializa la secreción de CRH. Por medio de competidores antagonistas muscarínicos, se identificó la presencia de receptores muscarínicos del subtipo M1 y M3 en la hipófisis (Pintér, 1999).

La disminución en la concentración preovulatoria de E_2 , 72 horas después de la administración del sulfato de ATR, nos permite sugerir que en el ovario, la ACh acoplada a los receptores muscarínicos regula de manera estimulante la estereidogénesis del ovario. Este efecto ocurriría 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. Efectos semejantes fueron observados al bloquear el sistema colinérgico, mediante la inyección subcutánea de sulfato de atropina en la mañana del diestro-1 y diestro-2 (López, 2012 y Velazco, 2013).

La ACh también está implicada en los mecanismos de regulación llevados a cabo por la P_4 , ya que en cultivos de células de la hipófisis de ovinos, el estradiol incrementa el número de receptores a la GnRH, pero la P_4 lo disminuye (Laws *et al.*, 1990). En ratas inmaduras como en ovejas, la P_4 incrementa la síntesis del ARNm de la FSH β (Attardi *et al.*, 1992; Webster *et al.*, 1995). En la rata, P_4 puede actuar directamente en la hipófisis incrementando de manera selectiva el ARNm de la FSH β .

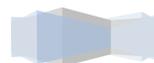


La ausencia de un efecto asimétrico por la administración de la *DEf* de sulfato de atropina en la expresión de los ARNm de la GnRH, del RE α y del RE β resulta de la cantidad del fármaco inyectado, lo que enmascara la dinámica funcional del sistema muscarínico de uno y otro lado de POA-AHA observado en animales sacrificados en esta fase del ciclo (Cruz *et al.*, 1997).



CONCLUSIONES

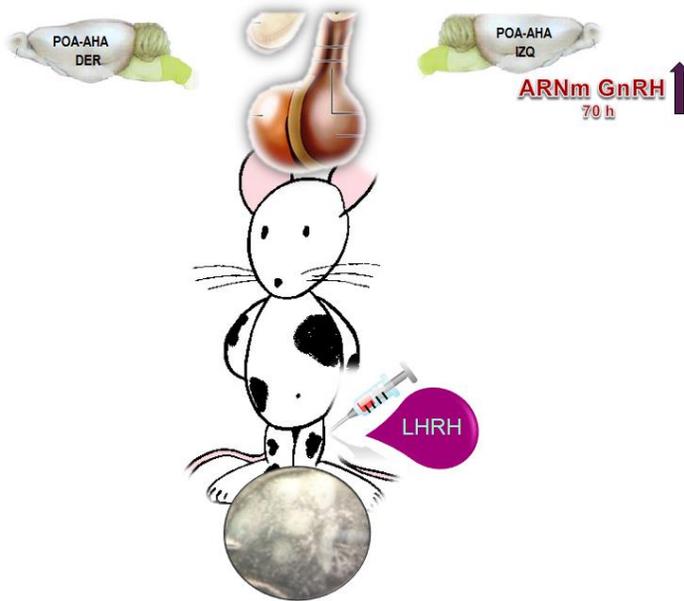
- A las 9:00 h del estro, la *DEf* de sulfato de ATR para bloquear la ovulación en el 100% de los animales tratados es de 700 mg/kg peso.
- El bloqueo de los receptores muscarínicos a las 9:00 h del estro estimula la secreción de progesterona, pero inhibe la de estradiol a las 11:00 h del proestro.
- La administración de sulfato de ATR en la mañana del estro, inhibe la expresión del RE α , pero estimula la del RE β en ambos lados de POA-AHA.
- La ausencia de un estímulo generado por la ACh a las 9:00 h del estro modifica la síntesis de los receptores a la GnRH, lo cual altera la secreción de LH y por tanto la ovulación.





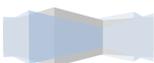
La administración subcutánea de 700 mg/kg de sulfato de ATR, bloqueó la ovulación en el 100 % de los animales inyectados. Una de los mecanismos generados es la inhibición de la expresión del ARNm para el RE α , así como la estimulación de la expresión del mensajero del RE β y de la GnRH.

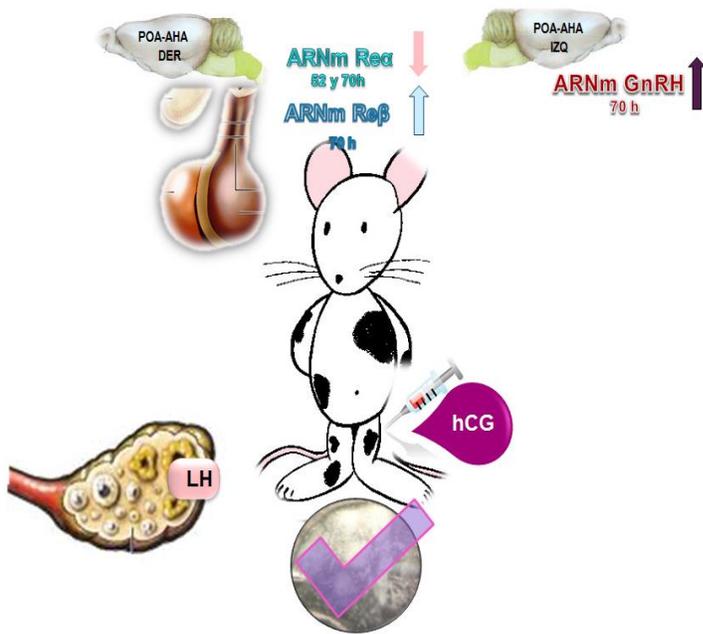
Fig. 24. Resumen de resultados obtenidos por la inyección subcutánea de 700 mg/kg sulfato de ATR a las 9:00 h del día del estro, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.



La inyección de la LHRH sintética (señal hipotalámica) no restableció la ovulación, lo que indica que en el sistema sí se está sintetizando GnRH, pero la hipófisis no responde a ella, posiblemente a alteraciones en los receptores a la GnRH (número de receptores, afinidad o ambos), por lo que la secreción preovulatoria de LH no ocurrió.

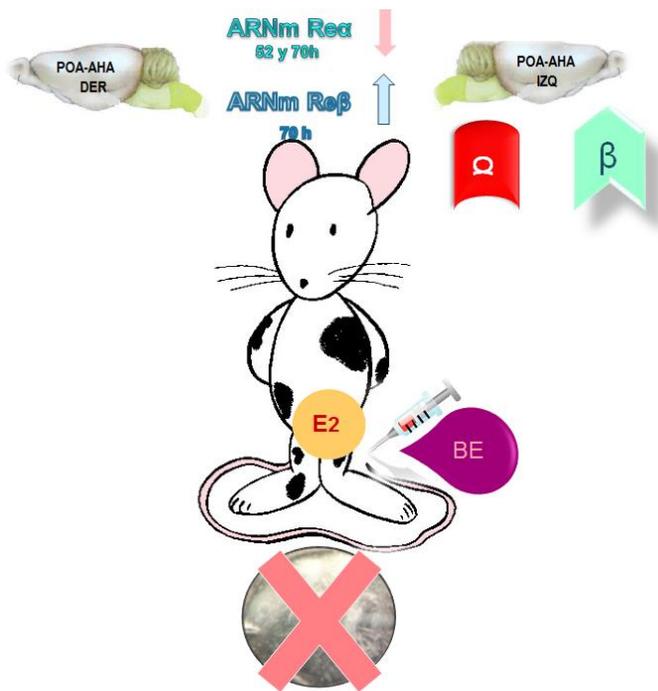
Fig. 25. Modelo explicativo de los efectos del reemplazo de la señal hipotalámica en animales inyectados con 700 mg/kg de sulfato de ATR.





Dado que la administración de 25 u.i. de hCG (señal hipofisiaria) restableció la ovulación, se sugiere que la hipófisis no responde a la GnRH, resultado de alteraciones en los receptores a la GnRH, resultado del bloqueo de los receptores muscarínicos presentes en la glándula.

Fig. 26 Modelo explicativo de los efectos del reemplazo de la señal hipofisiaria en animales inyectados con 700 mg/kg de sulfato de ATR.



Aun cuando se restablece señal ovárica (por la inyección de benzoato de estradiol) sólo ovularon el 14 % de las ratas, debido a que no hay el REα en ambos lados de POA-AHA. Lo que indica que es este receptor y no el REβ el que estaría involucrado en el papel regulador de la ACh en la ovulación.

Fig. 27. Modelo explicativo de los efectos del reemplazo de la señal ovárica en animales inyectados con 700 mg/kg de sulfato de ATR.



BIBLIOGRAFÍA

Abraham IM, Han SK, Todman MG, Korach KS, Herbison AE. (2003). Estrogen receptor β mediates rapid estrogen actions on gonadotropin-releasing hormone neurons in vivo. *J. Neurosc.* 23; 5771-5777.

Alcaraz Romero VM. (2001). Estructura y Función del Sistema Nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. 2ª ed. Editorial El manual Moderno: Universidad de Guadalajara, Instituto de Neurociencias. México pp.23-27.

Arteaga-López PR. (2005). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine.* 21; 251-260.

Ashkenazy A, Peralta EG. (1994). Muscarinic acetylcholine receptors. In: Peroutka SJ (Ed). *Handbook of receptors and channels. G protein-coupled receptors.* Boca Raton, FL: CRC Press p.p.1-27.

Attardi B, Vaughan J, and Vale W. (1992). Regulation of FSH β messenger ribonucleic acid levels in the rat by endogenous inhibin. *Endocrinology* 130; 557-559.

Attardi, B, Vaughan J and Vale W. (1992). Regulation of FSH β messenger ribonucleic acid levels in the rat by endogenous inhibin. *Endocrinology.* 130; 557-559.

Baker T G. (1982). Oogenesis and ovulation in Reproduction mammals. En: *Biotecnología de la Reproducción.* Gustavo Palma A. Primera Edición. Editorial. Machala. Argentina. pp. 38-43.

Billiar RB, Kalash J, Romita V, Tsuji K, Kosuge T. (1988). Neourugatoxin: CNS acetylcholine receptors and luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Brain Res Bull.* 20; 315-322.

Bonner TL, Young AC, Brann MR and Burckley NJ. (1988). Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron.* 1:403-410.

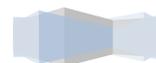
Botella Llusía J. (1995). El ovario fisiología y patología. 1º Edición Díez de Santos. Madrid España pp.49-57.

Brown RE. (1994). The hypothalamic hormones. En: *Introduction to Neuroendocrinology.* Cambridge University Press, Great Britain. pp.40-55.

Burden HW, Leonard M, Smith CP, Lawrence IE. (1983). The sensory Innervation of the ovary. "A horseradish peroxide study in the rat" *The anatomical Record.* 207; 623-627.

Caravaca R, Castel G, Guzmán G, Delgado P, Mena G, Alcalde A, González R. (2003). Bases de la Reproducción Animal. 1º Edición. Ed. Universidad de Sevilla. España pp.82-91.

Cardinali DP. (1992). Manual de Neurofisiología. Editorial Díaz de Santos. Madrid España. p.p.266-270.



Carmel PW, Araki S, Ferin M. (1976). Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: evidence for pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and leuteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*. 111:1737-1739.

Catt KJ. (1999). Receptores for Hormones, Overview. En: *Encyclopedia of reproduction*. Knobil E y Neill D (eds). Academic Press.U.S.A. 4; 634-644.

Changeux JP, Devillers- Thiéry A, Chemouilli P. (1984). The acetylcholine receptor: an "allosteric" protein engaged in intracellular communication. *Science*. 225; 1335-1345.

Cheng CK, Leung PC. (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocrinology Rev*. 26; 283-306.

Cruz ME, Artega PR, Huerta DML, Sánchez MA, Domínguez R. (1997). Differential in acetylcholine content, binding and affinity parameters of muscarinic receptor in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Med. Sci. Res*. 25; 823-825.

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, 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.

Dalkin AC, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Ellis TR, Marshall JC. (1989). The frequency of gonadotropin releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*. 125; 917-924.

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, Riboni, Zipitría, Revilla. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?. *Journal Endocrinology*. 95; 175-180.

Duclert A, Changeux JP. (1995). Acetylcholine receptor gene expression at the menstrual neuromuscular junction. *Physiol Rev*; 75; 339-68.

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.



Egozi Y, Kloog Y. (1985). Muscarinic receptors in the preoptic area sensitive to 17 beta -estradiol during the critical period. *Neuroendocrinology*. 40 (5); 385-92.

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

Everett JW, Sawyer Ch. (1950). A 24h periodicity in the "LH release aparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*. 134; 1806-1811.

Falkenstein E, Tillmann HC, Chris M, Meuring M, Wehling. (2000). Multiple actions of steroid hormones a focus on rapid, nongenomic effect. *Pharmacol Rev*. 52; 513-556.

Felder CC. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB*. 9; 619-625.

Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. (2003). *Farmacología clínica. 4ta Edición. Editorial Masson. Madrid España pp.50-71.*

Freedman LP. (1992). Anatomy of the esteroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev*. 13(2); 129-145.

Freeman ME. (1994). The neuroendocrine control of the rat estrous cycle. En: *The Physicology of Reproduction*. Ed. Knobil E, Neil J D, 2da edición, Nueva York. Raven Pres; 2(46); 613-658.

Freeman ME. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *Knobil and Neill`s Phisiology of reproduction, 3a ed. Cap. 43. Ed By Jimmy D. Neill Elsevier, 2327-330.*

Galindo MJ. (2011). Efecto del bloqueo RE- α en el lado derecho de POA-AHA sobre la ovulación y la secreción preovulatoria de gonadotropinas y hormonas esteroides. En tesis para obtener el título de Q.F.B. D.F., México FES Zaragoza UNAM.

Gore Andrea C. (2002). GnRH: the master molecule of reproduction. Editorial Kluwer Academic Publishers. Massachusetts. (ISB 0-7923-7681-1) pp.10- 85.

Gorski J, Toft D. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 55(6): 1574-81.

Gotti C, Fornasari D, Clementi F. (1997). Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobio*. 53; 199-237.

Gustafsson JA and Matthews J. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and Er β . *Department of Biosciencie at Novum, Karolinska Instituted*. 3; 281-92.



Gutkind JS, Novothy EA, Brann MR, Robbins KC. (1991). *Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes. Proc Natl Acad Sci USA. 88; 4703-4707.*

Guyton AC and Hall JE. (2001). *Tratado de Fisiología Médica. Décima edición, McGraw-Hill-Interamericana. México pp. 100-120; 512-538.*

Herbison AE. (1998). *Multimodal influence of estrogen on gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrine. Rev. 19; 302-330.*

Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Hajszán T, Carpenter CD, Liposits Z, Petersen SL. (2000). *Detection of receptor- β messenger ribonucleic acid and 125 I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone menstrual of the rat brain. Endocrinol Rev. 141(9); 3506-09.*

<http://neuroquimicaclinica.blogspot.mx/> (estructura acetilcolina).

Ernesto Bonilla. Neuroquímica Clínica. Consulta 11 de mayo 20012.

<http://neuroquimicaclinica.blogspot.mx/2010/08/neurotransmisor-de-la-semana.html>

Imagen de acetilcolina.

<http://vitae.ucv.ve>.

Imagen de Receptores a estrógenos.

<http://www.uam.es/departamentos/ciencias/biologia/citologia/practica4.htm>

Cortes histológicos de folículos.

Humphrey RR, Dermody WC, Brink HO, Bousley FG, Schottin NH, Sakawski RW, Waitkus JW, Velosos HT, y Reel JR. (1973). *Induction of leuteinizing hormone (LH) release and ovulation in ratas, hamsters and rabbits by syntetic luteinizing hormone releasing factor (LRF). Endocrinology92; 1515- 1526.*

Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A., Korach, K.S. (1992). *Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4658-4662.*

Imagen eje-hipotalamo-hipofisis- ovario

<http://www.vi.cl/foro/topic/7194-sistema-endocrino-apuntes/>

Jennes L y Stumpf WE. (1980). *LH-RH- systems in the brain of the golden hamster. Cel and Tisuee. Reearch. 209; 239-256.*

Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME. (1985). *Ultrastrctural characterization of gonadotropin-*



releasign hormone (GnRH) producing neurons. Journal of Comparative Neurology. 232; 534-547.

Jensen E V, Jacobson H I. (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Rev.* 18; 387-414.

Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, and Chin W W. (1993). Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 133: 931-934.

Katt JA, Duncan JA, Herbon I. (1985). The frequency of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured pituitary cells. *Science.* 215; 983-985.

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

Korach KS. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science Rev.* 266; 1524-1527.

Kronenberg M, Melmed S, Polonski K, Larsen R. (2009). *Williams Texbook of Endocrinology.* 11^a ed. Editorial Elsevier España. Pp. 133-140.

Kubo T, Fukuda, Mikami A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K., Ichiyama A, Kangawa K, Kojima M, Matsou H, Hirose T and Numa S. (1986) Cloning sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 323; 560-561.

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-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; 5925-930.

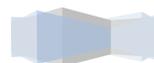
Kyeong-Hoon J y Kaiser UB. (2006). Gonadotropin-Releasing Hormone Regulation of Gonadotropin Biosynthesis and Secretion. En: *Knobil and Neill's Physiology of*, 3^{ra} Edición. Editado por Jimmy D. Neill, Elsevier, Capítulo Capítulo 31: 1635-1701.

Lauder JM. (1993). Neurotransmitters a growth regulatory signal: role of receptor and second messengers. *Trends Neurosci.* 16; 233-240.

Laws SC, Beggs MJ, Webster JC y Miller WL. (1990). Inhibin increases and progesterone decreases receptors for gonadotropin-releasing hormone in ovine pituitary culture. *Endocrinology* 127; 373-380.

Laws, SC, Beggs MJ, Webster JC, and Miller WL. (1990). Inhibin increases and progesterone decreases receptors for gonadotropin-releasing hormone in ovine pituitary culture. *Endocrinology.* 127; 373-380.

Lerner J, Urbina M. (2008) *Fertilidad y Reproducción asistida.* Primera edición. Editorial Médica Panamericana. Caracas pp.62-69.



Levy MN, Bruce MK, Bruce AS. (2006). *Fisiología. 4ta. Edición. Editorial Elsevier. Madrid España pp. 54-56*

Lippincott W y Wilkings. (2003). *Remington: La ciencia y práctica de farmacia. 20^a Edición. Editorial Panamericana Buenos Aires pp. 1571.*

Liteack G, Schmidt TJ (2000). *Bioquímica de las hormonas II: Las hormonas esteroides. En: Bioquímica. Editor: Devlin MT. 3ra edición. Editorial Reverte S.A España, pp. 893-917.*

López TA. (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.*

Malley BW, Strott Ch A. (2001). *Hormonas Esteroides: metabolism 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. pp. 118-143.*

Massoulie J, Bons S. (1982). *The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Annu Rev Neurosc; 5:57- 106.*

Mayarcofer A and Fritz S. (2002). *Ovarian Acethylcholine and Muscarinic Receptors: Hints of a Novel Intrinsic Ovarian Regulatory System. Microscopy Research and Technique. 59; 503-508.*

McDonell DP. (2000). *The mechanosm of action of steroid hormone receptors. En: Principles of molecular regulation. Conn P M, Means A R. Humana Press Inc. Nueva Jersey. pp. 351-56.*

McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG. (1987). *Molecular neurobiology of the mammalian brain. Segunda Edición. Nueva York. pp.150.*

Mendoza L, Arteaga PR, Dominguez R, Cerbón M A, Arrieta I, Flores A, Cruz ME (2007). *Changes in the number of estrogen receptor alpha and beta inmunoreactive cells on POA-AHA during the estrous cycle of the rat. Biology of Reproduction. 77; 106–106.*

Merchenthaler I, Shughrue PJ and Scrimo PJ. (2000). *Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ER α and ER β) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. Neurosciencence. 96; 1: 41-49.*

Montaner AD, Mongiat L, Lux-Lantos VA, Park MK, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lescheid D, Lovejoy D, Libertun C, Sherwood NM, Somoza GM. (2001). *Structure and biological activity of gonadotropin-releasing hormone isoforms isolated from rat and hamster brains. Neuroendocrinology. 74; 2-12.*

Montano MM, Muller V, Trobaugh A. (1995). *The carboxy terminal F domain of the human estrogen recptor: Roll in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. Mol. Endocrinol. 9; 814-825.*



Moore LK, Persaud T V. (2008). *Embriología Clínica. Octava Edición. Ed. Elsevier. Madrid España pp.21-25.*

Müller-Sterl, Werner. (2008). *Bioquímica: Fundamentos para la medicina y ciencias de la vida. Editorial Reverté. Barcelona. pp. 403-419.*

Muramatsu M and Inoue S. (2000) *Estrogen receptors: How do they control reproductive and nonreproductive functions? Biochem. Biophys. Res. Commu. 270; 1-10.*

Nisticó G, Müller EE. (1989). *Neurotransmitters, neuromodulators and neuromediators. En: Brain messengers and the pituitary. 2da. Edición, Academic Press. New York. 15-228.*

Norris OD. (1996). *An overview of chemical regulation. Vertebrate Endocrinology. Academic Press. 1(22); 146-150.*

Olianas MC, Onali P. (2000). *Involvement of beta gamma 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.*

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 pp.23-31.*

Pawson AJ, Morgan K, Maudsley SR, et al. (2003). *Type II gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in reproductive biology. Reproduction. 126; 271-278.*

Paxinos G, Watson Ch. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates, sexta edición. USA.*

Perry E, Walker M, Grace J, Perry J. (1999). *Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? Trends in Neurosciences. 22(6): 273-80.*

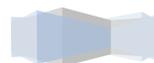
Peters GA and Khan SA. (1999). *Estrogen receptor domains E and F: Role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. Mol. Endocrinol. 13; 286-287.*

Phelps CJ, Hurley DL. (1999). *Pituitary hormones as neurotrophic signals: update on hypothalamic differentiation in genetic models of altered feedback. Proc Soc Exp Biol Med. 222; 39-58.*

Phoenix C and Chambers KC. (1990). *Sexual performance of old and young male rhesus macaques following treatment with GnRH. Physiol Behav. 47; 513-517.*

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.*

Prieto GB, Velázquez PM. (2002). *Fisiología de la reproducción; hormona liberadora de gonadotropinas. Rev. Fac. Med UNAM. 45(6):252-257.*



Richmond JE, Jorgensen EM. (1999). *One GABA and two acetylcholine receptors function at the C elegans neuromuscular junction. Nat Neurosc. 2; 791-7.*

Rissman E, Wersinger SR, Taylor J A. and Lubahn D. (1997). *Estrogen receptor functions as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. Horm Behav. 31(3); 323-43.*

Rodríguez AD. (2010). *Efectos del bloqueo RE β de POA-AHA sobre la ovulación, secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides. En tesis para obtener el título de Q.F.B. D.F., México FES Zaragoza UNAM.*

Salvador N. (2001) *Biología general del reactivo biológico. En Martín-Zúñiga J, Tur Marí J, Milocco S, Piñeiro R, (eds.). Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Madrid (España): McGraw-Hill interamericana, pp. 23-82.*

Sánchez MA, López GM, Cruz ME, Tapi R, Domínguez R. (1994). *Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. Neuroreport. 5; 433-434.*

Sanders Debuse. (2004). *Sistema Endocrino y el Aparato Reproductor. 2da Edición. Ed. Elsevier. Madrid España pp. 3-27.*

Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn, DB, Korach KS, and Rosenfeld MG. (1997). *Role of estrogen receptor in the anterior pituitary gland. Mol. Endocrinol. 11; 674-681.*

Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe IR. (1993). *Origin of mammalian gonadotropin-releasing. Endocrinology Rev. 14; 241-254.*

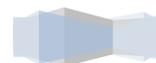
Shughrue PJ, Scrimo PJ, Marchenthaler I. (1998). *Evidence for the colocalization of estrogen receptor-b mRNA and estrogen receptor-a immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. Endocrinol. 139; 1256-66.*

Simonovic I, Motta M, Martini L. (1974). *Acetylcholine and the release of the follicle-stimulating hormone-releasing factor. Endocrinology. 95; 1373-1379.*

Siverman AJ, Levine I, Within JW. (1994). *The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuronal Systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press; Vol 1, Cap. 28. p.1683-1709.*

Siverman AJ. (1994). *The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neural system: immunocytochemistry and in situ hybridization. En: The Physiology of reproduction. Knobil E y Neill D. Raven Press. 1; 1638-709.*

Sokolovski M, Egozi Y, Avissar S. (1981). *Molecular regulation of receptors: interaction of beta-estradiol and progesterone with the muscarinic system. Proceedings of the National Academy of Science of USA 78(9); 5554-548.*



Spicer LJ and Echternkamp S E. (1986). Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle. En: *Biología de la Reproducción*. Gustavo Palma A. Primera Edición. edd Machala. Argentina, pp.38-43.

Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wees J, Haberberger RV. (2003). Role of muscarinic receptor subtypes in the constriction of peripheral airways; studies on receptor-deficient mice. *Mol Pharmacol*.64; 1444-451.

Südhof TC. (1995). The synaptic vesicle: a cascade of protein interactions. *Nature* 375; 645-653.

Toft, D and Gorski, J. (1966). A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA Jun*. 55(6):1574-8.

Tresguerres AF, Castillo C. (1999). *Fisiología Humana*. 2da Edición. Ed. Mac.Graw-Hill Interamericana. España, pp. 1007-1015.

Tsai MJ, O'Malley BW. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem*.63; 451- 486.

Turgeon JL, Kimura Y, Waring, DW, and Mellon PL. (1996). Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol. Endocrinol*. 10; 439-450.

Unwin N. (1995). Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature*. 375; 37-43.

Urbanski HF, White RB, Fernald RD, et al. (1999). Regional expression of mRNA encoding a second form of gonadotropin-releasing hormone in the macaque brain. *Endocrinology* 140; 1945-1948.

Vázquez MM. (2011). Efectos del bloqueo del RE α en el lado izquierdo de POA-AHA sobre la ovulación, la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides. En tesis para obtener el título de Q.F.B. D.F., México FES Zaragoza UNAM.

Velázquez Mendoza MA. (2013). Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos en la mañana del diestro-2 sobre la ovulación de la rata. Tesis En tesis para obtener el título de Biología. D.F., México FES Zaragoza UNAM.

Velázquez L, Moreno A, Lizasoain JC, Leza JC, Moro MA, Portolés A. (2008). *Farmacología básica y clínica*. 18ª. Edición. Editorial panamericana. Buenos Aires pp.133-137.

Villegas G, Cruz ME, Dominguez-Gonzalez A, Dominguez R, Chavira R. 2001Ovulation delay induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior-hypothalamic area of the rat. 54; 339-344.



Watenabe T, Inove S, Sumito o, et al. (1997). Agonistic effect of tamoxifen nis dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: Functional difference between estrogen receptors α and β . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236; 140-145.

Webster JC, Pedersen NR, Edwards DP, Beck CA and Miller WL. (1995). The 5'-flanking region of the ovine follicle-stimulating hormone- β gene contains six progesterone response elements: three proximal elements are sufficient to increase transcription in the presence of progesterone. *Endocrinology.* 136; 1049-1058.

Webster JC, Pedersen NR, Edwards DP, Beck CA, Miller WL. (1995). The 5'-flanking region of the ovine follicle-stimulating hormone- β gene contains six progesterone response elements: three proximal elements are sufficient to increase transcription in the presence of progesterone. *Endocrinology* 136; 1049-1058.

Wei J, Elizabeth A, Walton A. Milici and Jerry J. Buccafusco. (1994). "m1 - m5 Muscarinic Receptor Distribution in Rat CNS by RT-PCR and HPLC". USA International society for Neurichemicty. 815-821.

Welsh TH, Nann KG, Kimberly N, Livingston. (1998). Stress and reproduction. En: *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill D (eds), Academic Press. U.S.A Vol.4: 662, 665, 668.

Wintermantel TM, Campbell E, Porteous R, Bock D, Gröne H J, Todman M G, Korach K S, Greiner E, Pérez C A, Schütz G, Herbirson A E. (2006). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin- releasing hormone neuron and fertility. *Neuron.* 52; 271-280.

Yao HH, Bahr JM (1990). Ovary, overview. En: *Encyclopedia of reproduction.* Knobil E y Neill D (Eds.). Academic Press. U. S. A. 3; 590-595.

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

Yen SC, Jaffe BR, Barbieri LR. (2001). *Endocrinología de la Reproducción: Fisiología fisiopatología y Manejo Clínico.* 4ta Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires Argentina.pp.33-47.

Zeleznik AJ and Benyo DF. (1994). Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. In *The Physiology of reproduction.* (Knobil E. and Neill JD), pp. 751-782. Raven Prees New York.

