



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO DE CIENCIAS**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL AREA DE
BIOQUIMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

NOMBRE DE LA TESIS:
**IDENTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DEL
OVARIO A LO LARGO DEL CICLO ESTRAL DE LA RATA: EFECTOS
DEL ANTAGONISMO ESPECÍFICO SOBRE SU EXPRESIVIDAD**

PRESENTA:
Q.F.B. MARIA CORAZÓN FLORES BAUTISTA

DIRECTORES DE TESIS
**DRA. NIDIA GARY PAZOS SALAZAR
DR. JOSE LUIS MORAN PERALES**

FECHA DE TESIS: 20 JUNIO 2018

ÍNDICE

	TEMA	PÁGINA
1	RESUMEN	8
2	MARCO TEÓRICO	9
2.1	Morfología y función del ovario	9
2.2	Inervación ovárica	10-11
2.3	Biosíntesis de esteroides sexuales	12-15
2.4	Desarrollo folicular	16
2.5	Atresia folicular	17-18
2.6	Ovulación	19
2.7	Formación del cuerpo lúteo	19
2.8	Eje Hipotálamo- Hipófisis- Ovario	20-21
2.9	Ciclo estral	22
2.10	Hormonas	22-24
2.11	Sistema dopaminérgico	25-27
2.12	Fosfoproteína Regulada por Dopamina y <i>AMPC</i> : DARPP-32	28-30
2.13	Antagonistas de la dopamina	30
2.14	Propiedades farmacológicas de sulpiride	30
2.15	Propiedades farmacológicas de SCH 23390	31
2.16	Especies reactivas de oxígeno: ROS	32
2.17	Especies reactivas de oxígeno en el ovario	34-36
2.18	Indicadores del estrés oxidativo	36-38
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38-40
4	ANTECEDENTES	40-43
5	JUSTIFICIÓN	43
6	HIPOTESIS	43
7	OBJETIVO GENERAL	44

8	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
9	MATERIALES Y METODOS	44
9.1	Animales de Experimentación	44-46
9.2	Indicadores de estrés oxidativo	46-47
9.3	Identificación de los receptores dopaminérgicos	47
9.4	Cortes Histológicos	47
9.5	Identificación de los receptores a dopamina y DARPP-32 por inmunofluorescencia	47-49
9.6	Análisis Estadístico	50
10	RESULTADOS	50
10.1	Identificación de los receptores DA1 por inmunofluorescencia	50-54
10.2	Identificación de DARPP-32 por inmunofluorescencia	55-59
10.3	Análisis de indicadores de estrés oxidativo	60-65
10.4	Identificación de RDA1 por inmunofluorescencia en grupos con administración de antagonistas específicos del receptor	66-67
10.5	Identificación de DARPP-32 por inmunofluorescencia en grupos con administración de antagonistas específicos del receptor	68-69
11	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70-76
12	CONCLUSIONES	77
13	PERSPECTIVAS	77
14	BIBLIOGRAFIA	78-85

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS		Página
1	Esquema que muestra los principales compartimientos anatómicos y funcionales del ovario en los mamíferos	10
2	Inervación sináptica de los folículos	11
3	Biosíntesis de esteroides por el ovario	12
4	Estructura de los principales estrógenos	14
5	Concentraciones plasmáticas de progesterona, prolactina, estradiol, LH, FSH	15
6	Desarrollo folicular	18
7	Eje Hipotálamo - Adenohipófisis - Ovario	21
8	Síntesis de catecolaminas	24
9	Señalización intracelular de los receptores RDA1	27
10	Señalización intracelular de los receptores RDA2	28
11	Estructura del sulpiride	30
12	Estructura del SCH 23390	31
13	Generación de especies reactivas de oxígeno	33
14	Regulación antioxidante en el desarrollo folicular	37
15	Estructura molecular del MDA	38
16	Estructura molecular del HDA-4	38
17	Expresión del receptor RDA1	50
18	Cuantificación global del receptor RDA1	51
19	Cuantificación global del receptor RDA1 en tres horarios	52
20	Inmunofluorescencia del receptor RDA1: Diestro-1 y Diestro-2	53
21	Inmunofluorescencia del receptor RDA1: Proestro y Estro	54
22	Expresión de la DARPP-32	55
23	Cuantificación global de la DARPP-32	56

24	Cuantificación global de la DARPP-32 en tres horarios	57
25	Inmunofluorescencia de la DARPP-32: Diestro-1 y Diestro-2	58
26	Inmunofluorescencia de la DARPP-32: Proestro y Estro	59
27	Concentraciones de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenales (4-HDA)	61
28	Concentración global de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenales (4-HDA)	62
29	Concentraciones de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenales (4-HDA) en tres horarios	63
30	Concentraciones de nitritos (NO ₂)	64
31	Concentraciones de nitritos (NO ₂) global	64
32	Concentraciones de nitritos (NO ₂) en tres horarios	65
33	Expresión del receptor RDA1 posteriormente a la administración de los antagonistas	66
34	Inmunofluorescencia del receptor DAR1 posteriormente a la administración de los antagonistas	67
35	Expresión de la DARPP-32 posteriormente a la administración de los antagonistas	68
36	Inmunofluorescencia de la DARPP-32 posteriormente a la administración de los antagonistas	69

TABLAS

		Página
1	Resumen de los cambios a nivel de ovario, útero, epitelio vaginal y conducta en las distintas fases del ciclo estral de la rata	23
2	Grupos de animales a analizar de acuerdo al tratamiento realizado y el grupo control	45
3	Grupos de animales a analizar de acuerdo al tratamiento realizado con el grupo de antagonistas	46

ÍNDICE DE SIGLAS

4-HDA: 4-hidroxi-alquienales

AC: Adenililciclase

AMPA: Receptores del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropiónico-4

ATP: Adenosin trifosfato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

CF: cuerpo folicular

BSA: Albumina sérica de bovino

CREB: Elemento de unión de respuesta a proteína de AMPc

CL: Cuerpo lúteo

DA: Dopamina

RDA-1: Receptor a dopamina 1

RDA-2: Receptor a dopamina 2

D2L: Receptor a dopamina 2 largo

D2S: Receptor a dopamina 2 corto

DARPP-32: Fosfoproteína reguladora de cAMP-fosforilada, 32 kDa

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

D β H: dopamina β -hidroxilasa

DBD: Dominio de unión al ADN

DOPA: Dihidroxifenilalanina

EEM: error estándar de la media

EPAC-GEF: Factor de intercambio de guanina-nucleótido de Rap1

FITC: fluoresceína 5-isotiocianato

FNMT: feniletanolamina-N-metil-transferasa

FSH: Hormona Folículo Estimulante

GABA: Acido γ -aminobutírico

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GF: Granulosa folicular

GSH: Glutati6n

GST: Glutati6n transferasa

GPX: Glutati6n peroxidasa

GR: Glutati6n reductasa

IP₃: Inositol trifosfato
LAAD: descarboxilasa de L-aminoácidos-aromáticos
LBD: Dominio de unión a ligando
LH: Hormona Luteinizante
MDA: Malondialdehído
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos
mTOR: Blanco de rapamicina en mamíferos
NMDA: N-metil-D-aspartato
NaCl: Cloruro de sodio
NO₂: Nitritos
OPN: Nervio del plexo ovárico
PBS: Buffer de fosfatos
PKA: Proteína quinasa A
PP1, PP2A o PP2B: Proteína fosfatasa-1, 2A o 2B
PKC: Proteína quinasa C
PLC: Fosfolipasa C
PIP2: Fosfatidilinositol bifosfato
Rap1: Proteínas de unión al GTP
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SNC: Sistema nervioso central
SOD: Superóxido dismutasa
SON: Nervio ovárico superior
TH: Tirosina hidroxilasa
VIP: Péptido vasoactivo intestinal

1. RESUMEN

La función integrativa del eje hipotálamo-adenohipófisis-gónada ocurre como resultado de la emisión de señales hormonales y neuroquímicas. La dopamina es un neurotransmisor clásico del grupo de las catecolaminas y desempeña múltiples funciones en el sistema nervioso central. Varios estudios la ubican como una señal química que participa en el control de la secreción de GnRH y en varios mecanismos que regulan la función reproductora. El presente trabajo tuvo como propósito identificar los receptores dopaminérgicos tipo 1 (RDA1) y la proteína indicadora de la formación de su ligando: la DARPP-32, a lo largo del ciclo estral de la rata en los diferentes tejidos de la corteza ovárica. De igual forma, se exploró la concentración de indicadores de estrés oxidativo en homogenados frescos de los ovarios a lo largo de un ciclo estral normal, así como los cambios en la expresión de los RDA1 cuando son bloqueados selectivamente con antagonistas específicos.

Ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV, con ciclos estrales regulares de cuatro días (animales cíclicos) fueron asignados en cuatro grupos experimentales divididos en lotes que se analizaron en tres diferentes horarios: 08:00, 14:00 y 20:00 h. En los tres diferentes horarios y en cada uno de los días del ciclo estral, grupos de dos animales cíclicos se sacrificaron para obtener sus ovarios frescos, se homogenizaron y se centrifugaron para recuperar los sobrenadantes y realizar el ensayo para indicadores de estrés oxidativo: malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenoales (4-HDA) como indicadores de lipoperoxidación y de nitritos (NO_2^-). En otros dos animales de cada grupo y lote horario, se fijaron los ovarios por perfusión intracardiaca con paraformaldehído 4 % y realizó la técnica de inmunofluorescencia para la identificación de los receptores RDA1 y la DARPP-32. A las 14:00 h del Diestro-1 o del Proestro, otros grupos de animales cíclicos recibieron una microinyección en las bursas ováricas de un antagonista selectivo para los RDA: SCH-23390 (antagonista selectivo del RDA1) o sulpiride (antagonista selectivo del RDA2), fueron sacrificados en la mañana del estro esperado, se perfundieron con solución de paraformaldehído 4 % y se disecaron los ovarios para el análisis de la expresión del receptor RDA1 y la DARPP-32; como grupos testigo, se utilizaron animales cíclicos que recibieron una microinyección con el vehículo correspondiente (NaCl 0.9 % para el SCH23390 o ácido ascórbico 0.1 % para el sulpiride) y que se sacrificaron en la mañana del estro esperado.

El análisis global del conteo del inmunomarcaje positivo para el receptor RDA1 mostró diferencias durante el Estro respecto a los otros días del ciclo, ya que la cantidad de marca fue notablemente mayor en este día del ciclo (Estro: 55210 ± 4781 vs los otros días del ciclo estral: 30984 ± 4051 , $p < 0.001$ U de Mann-Whitney) particularmente en las células de la teca folicular. De igual manera, el análisis global del conteo inmunopositivo para la DARPP-32 mostró diferencias entre el día del Estro y los otros días del ciclo, donde la cantidad de marca fue claramente mayor en este día (Estro: 10023 ± 1864 vs los otros días del ciclo estral: 4318 ± 362 , $p < 0.001$; U de Mann-Whitney). Se observó un cambio circádico en los indicadores de estrés oxidativo a lo largo del ciclo estral, donde los niveles más bajos se presentan durante la noche de cada día. Los cambios significativos dependieron de la hora, ya que a las 14:00h del Diestro-2, indicadores de lipoperoxidación se incrementaron significativamente. La concentración de nitritos presentó fluctuaciones a lo largo del ciclo estral, pero los mayores índices se observaron en el día del Proestro y los menores en día del Diestro-1. Al antagonizar los receptores con sulpiride o SCH23390 a las 14:00 h del día del Diestro-1 o Proestro, la inmunofluorescencia para el RDA1 mostró mayor marcaje en los animales tratados con los antagonistas en el Proestro y menor en los tratados en Diestro-1, respecto al control en Estro; por su parte, la DARPP-32 también mostró mayores marcajes cuando se antagonizó con sulpiride o SCH23390 en el día del Proestro respecto al control en Estro y a los grupos antagonizados en Diestro-1.

Estos resultados permiten sugerir que existen cambios paralelos en la expresión del receptor DA1 y la DARPP-32 a lo largo del ciclo estral que determinarían la ovulación espontánea en la rata adulta, donde lo que ocurre en el día del estro es fundamental. Así mismo, existe una actividad altamente dinámica en los mecanismos de oxidorreducción en los tejidos de la corteza ovárica que están posiblemente mediados por el receptor DA1 y que ocurren particularmente en el momento de la transición entre la fase luteal y folicular.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Morfología y función del Ovario

Las principales funciones del ovario son la liberación periódica de gametos sanos (ovocitos) y la producción de diferentes hormonas, tanto de naturaleza peptídica como las de naturaleza esteroidea. Los principales esteroides sexuales que el ovario produce son el estradiol y progesterona, señales químicas imprescindibles para la integración funcional de los componentes anatómicos del eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario, mismos que participan en el control del ciclo reproductor en sincronía con el evento ovulatorio. Las funciones ováricas se integran en un proceso repetitivo y continuo de maduración del folículo, ovulación, formación y regresión del cuerpo lúteo: el ciclo ovárico (Freeman, 2006).

El ovario es una glándula par que se encuentra en la cavidad peritoneal a cada lado del útero, sostenida sobre la pared corporal por el ligamento suspensor. Consta de dos partes principales: la corteza, parte externa donde se ubican los principales componentes funcionales de la gónada: folículos, cuerpos lúteos y glándula intersticial; y la médula, la porción central por la que ingresan el sistema vascular (sanguíneo y linfático) y nervios. La zona más externa de la corteza se denomina túnica albugínea y su superficie está coronada por una sola capa de epitelio cúbico (epitelio superficial del ovario). Los ovocitos se hayan encerrados en complejos denominados folículos y todos ellos se encuentran en la parte interior de la corteza (Strauss y Williams, 2009) (Figura 1).

Los ovocitos son secuestrados en los folículos primordiales antes de nacer y permanecen en reposo en el ovario. La activación de crecimiento del folículo es importante para el control biológico que vigila el potencial reproductivo femenino. La comprensión de los sistemas de señalización intracelular que controlan el mantenimiento y la activación de ovocitos tiene implicaciones en la capacidad reproductiva femenina. Tiene aplicación en la cría de animales domésticos, control de poblaciones de animales salvajes y la infertilidad en las mujeres (McLaughlin y McIver, 2009).

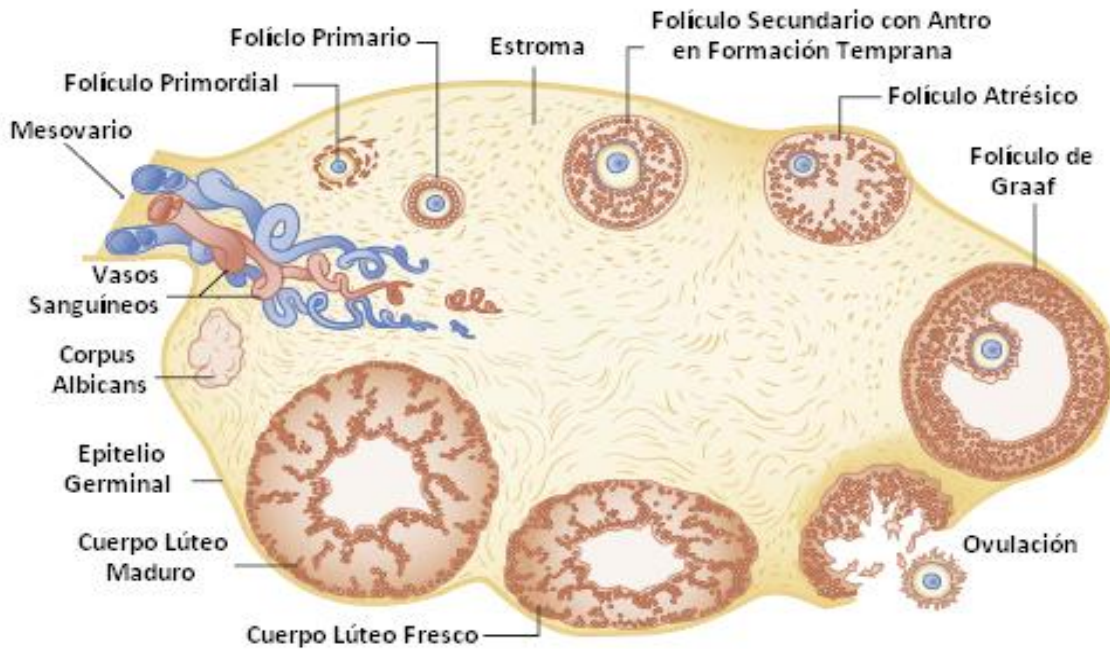


Figura 1. Esquema que muestra los principales compartimientos anatómicos y funcionales del ovario en los mamíferos (Modificado Strauss III y Williams, 2009).

2.2 Inervación ovárica

El ovario de mamífero tiene un nervio simpático que descarga norepinefrina como el principal neurotransmisor. Estudios histoquímicos de fluorescencia en el ovario humano de este neurotransmisor han revelado una red de fibras fluorescentes que penetran en el ovario a través de la región hiliar y se distribuyen sobre toda la región perivascular, en el estroma y en las capas foliculares tecaes. Se ha sugerido que las catecolaminas provenientes de la inervación ovárica tienen influencia sobre la secreción de progesterona y andrógenos. Las terminales nerviosas del ovario humano están, como en otros mamíferos, en estrecho contacto sináptico con la capa de células de la teca, pero no parecen cruzar la membrana basal folicular (Lara *et al*, 2001).

En la capa de células de la granulosa ninguna otra caracterización funcional de los nervios ha sido publicada, aunque ha habido muchos estudios sobre el supuesto rol de las catecolaminas en la fisiología ovárica, particularmente en la contracción y relajación de la pared folicular (Lara *et al*, 2001).

Los nervios que llegan al ovario provienen del nervio ovárico superior, del nervio del plexo ovárico y del nervio vago y se postula que modulan la reactividad de los tres compartimentos ováricos (folicular, luteal e intersticial) a las señales hormonales. La regulación de las funciones ováricas por señales nerviosas implica la liberación secuencial y ordenada de uno o más neurotransmisores a una frecuencia y amplitud particular. El ovario de los primates tiene una red de neuronas, algunas de las cuales son catecolaminérgicas. En la rata, desde el período juvenil (10 a 20 días de edad), las neuronas están presentes en el hilio ovárico, la médula y en la corteza ovárica. El tamaño del soma neuronal aumenta durante el período prepuberal, alcanzando sus valores máximos antes de la pubertad. Las neuronas catecolaminérgicas se encuentran tanto en la corteza ovárica como en la médula, y están aisladas o agrupadas en estructuras parecidas a ganglios (Domínguez y Cruz-Morales, 2011) (Figura 2).

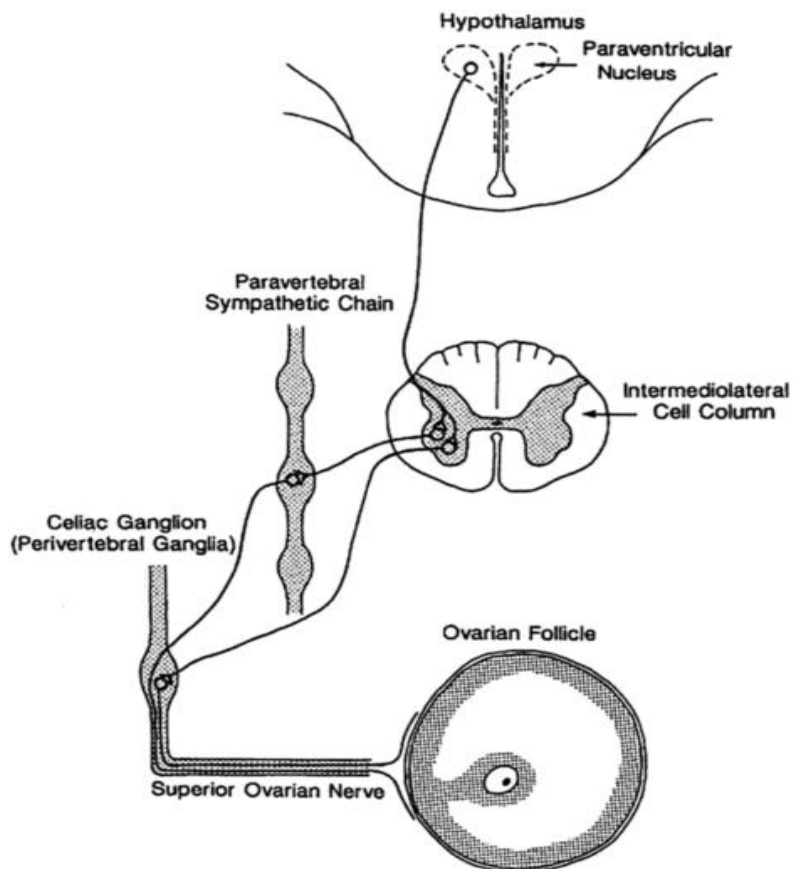


Figura 2. Inervación sináptica de los folículos. Los cuerpos neuronales proyectan al ovario y se localizan en el ganglio celiaco y los ganglios de la cadena simpática paravertebral (Dissen y Ojeda 1999).

2.3 Biosíntesis de esteroides sexuales

Los esteroides sexuales juegan un papel importante en el crecimiento y la diferenciación de los tejidos reproductivos y también, en el mantenimiento de la fertilidad. Producidas *de novo* a partir del colesterol, las progestinas, los andrógenos y los estrógenos son sintetizados por el ovario de una manera secuencial, sirviendo cada uno como sustrato para el siguiente esteroide en la vía de biosíntesis (Figura 3). Las hormonas esteroides se unen a receptores nucleares para regular eventos transcripcionales específicos. Estos receptores forman parte de una superfamilia de receptores nucleares, todos los cuales contienen elementos estructurales comunes. Estos incluyen un *dominio de unión al ADN* (DBD) altamente conservado, una *dominio de unión a ligando de* (LBD) moderadamente conservado y 2 dominios de transactivación: AF1, situado en el dominio A/B y AF2, ubicado en el dominio E/F (Drummond, 2006).

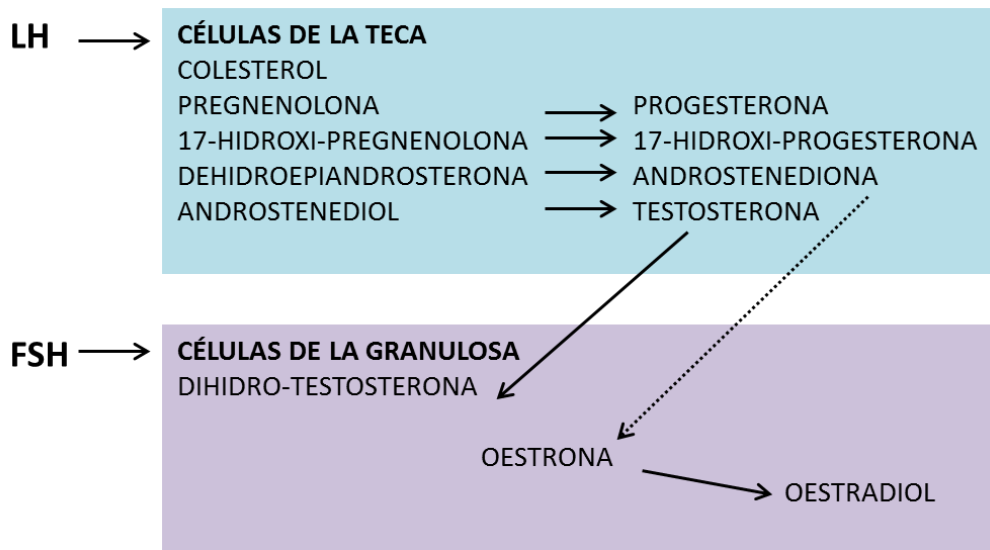


Figura 3. Biosíntesis de esteroides por el ovario. En la teca, bajo la influencia de la LH, el colesterol se convierte en pregnenolona y se metaboliza a través de una serie de sustratos que terminan en la producción de andrógenos. El modelo de dos células y dos gonadotrofinas entra en juego con los andrógenos producidos por las células de la teca y son transportados a las células de la granulosa donde se aromatizan a los estrógenos (Tomado y modificado de Drummond, 2006).

Todas las hormonas esteroideas tienen una estructura semejante; la estructura básica es la molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno, que deriva del colesterol. Los esteroides sexuales se dividen en 3 grupos, según el número de átomos de carbono (Norman y Litwak, 1997):

- *C-21: Corticosteroides y progestágenos*, basados en el núcleo de *pregnano*.
- *C-19: Todos los andrógenos*, basados en el núcleo de *androstano*.
- *C-18: Estrógenos*, basados en el núcleo del *estrano*.

De las progestinas, la más importante es la progesterona; desempeña un papel clave en la ovulación, la implantación y el mantenimiento del embarazo. Producida por el ovario bajo la influencia de las hormonas adenohipofisarias: FSH: hormona folículo estimulante y LH: hormona luteinizante (por sus siglas en inglés), principalmente en el cuerpo amarillo (cuerpo lúteo fresco). La secreción de la progesterona comienza antes de la ovulación, desde el folículo destinado a la liberación del óvulo. Cuando no se produce la gestación, el cuerpo lúteo involuciona y disminuyen los niveles de progesterona. Si el óvulo es fertilizado, el trofoblasto comienza a secretar una hormona conocida como gonadotropina coriónica humana en la circulación materna, prolongando así la vida funcional del cuerpo lúteo. Posteriormente, la placenta en desarrollo secreta estrógenos y progesterona en colaboración con las glándulas suprarrenales fetales y entonces el cuerpo lúteo ya no es esencial para que prosiga la gestación. La placenta continúa produciendo estrógenos y progesterona en gran cantidad hasta el momento del parto. Esta hormona ejerce una multiplicidad de acciones biológicas en sus tejidos blanco, previamente sensibilizados por los estrógenos (Orizaba-Chávez *et al*, 2013).

Además de sus efectos sobre el crecimiento, se ha demostrado que los andrógenos aumentan la diferenciación mediada por la FSH en las células de la granulosa, como índice del aumento en la producción de progesterona y estradiol y sus efectos en la maduración de ovocitos. Uno de los papeles más importantes desempeñados por los andrógenos en el ovario es la síntesis de estrógenos. Los

andrógenos sirven como sustratos de la aromatasa P450, que media la conversión a los estrógenos (Drummond, 2006).

Los estrógenos son hormonas esteroides con naturaleza no polar, por lo que son capaces de difundir dentro y fuera de las células atravesando la membrana celular con relativa facilidad. Existen tres estrógenos principales, estos son: estradiol, estrona y estriol. El estradiol es el más abundante y potente (Locia-Espinoza *et al*, 2013) (Figura 4).



Figura 4. Estructura de los principales estrógenos. Producidos por las células de la granulosa en los folículos ováricos (Locia-Espinoza *et al*, 2013).

En las células de la teca hay receptores a la LH que inicialmente están ausentes en las células de la granulosa, mismos que conforme crece el folículo, la FSH induce la aparición de receptores de LH en las células de la granulosa. La teca se caracteriza por actividad esteroideogénica en respuesta a la LH, con influencia específica en la producción de andrógenos, estimulando la transcripción de los genes de P450_{scc}, P450_{c17} y 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (Marc y Speroff, 2005). En las células de la granulosa existen receptores de FSH y son inducidos por la propia hormona que también induce la actividad de la enzima aromatasa en estas células. La aromatización de andrógenos a estrógenos es una actividad característica en el interior de la capa granulosa inducida por la FSH y por activación del gen de P450_{arom}. Por consiguiente, los andrógenos producidos en la teca deben difundir a la granulosa donde se convierten en estrógenos y el incremento cada vez mayor de la concentración de estradiol en la circulación periférica; los estrógenos difunden nuevamente hacia la teca y alcanzan los vasos sanguíneos. Las células de la teca y la granulosa secretan péptidos que actúan como factores autocrinos y

paracrinos reguladores que también participan en mecanismos de retrocontrol en el eje hipotálamo-adenohipofisiario (Marc y Speroff, 2005) (Figura 5).

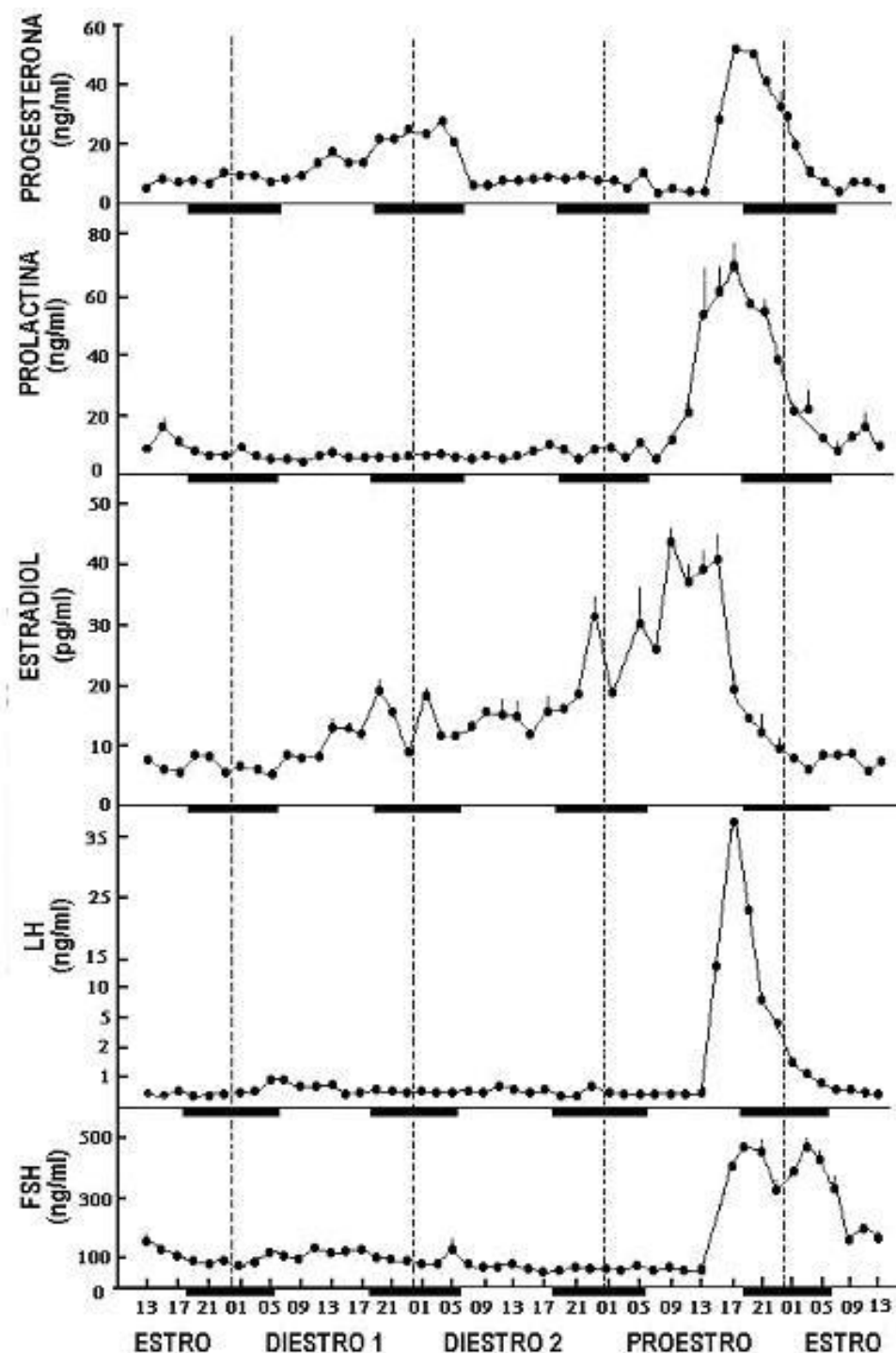


Figura 5. Concentraciones plasmáticas de progesterona, prolactina, estradiol, LH (Hormona Luteinizante) FSH (Hormona Folículo Estimulante) obtenidas a intervalos de dos horas durante los cuatro días del ciclo estral de la ratona. Cada punto representa la concentración media \pm E.E.M. de las hormonas. Las barras negras representan la fase de oscuridad de las 18:00 a las 06:00 horas del día siguiente (Smith *et al*, 1975; citado por Freeman, 2006).

La testosterona se puede convertir en estrógeno por un proceso enzimático, llamado aromatización, que es catalizada por la enzima *aromatasa* (estrógeno sintasa). Esta enzima está presente principalmente en el ovario (pero también, en menor medida en los testículos), la placenta y los huesos. Los estrógenos pueden ser producidos localmente en el cerebro por aromatización de andrógenos que entran libremente al sistema nervioso central (Cornil *et al*, 2006)

2.4 Desarrollo folicular

La diferenciación de los folículos ováricos comienza durante la vida fetal con la transformación de células germinales primordiales en ovocitos, que serán rodeados por células aplanadas en estructuras llamadas folículos. Estos folículos primordiales se consideran las unidades reproductivas fundamentales del ovario, constituyen la reserva que a lo largo de la ontogenia de la hembra seleccionará solo aquellos que se transformarán en folículos dominantes, mismos que determinarán todos los ciclos menstruales u ováricos. El ingreso de un folículo primordial al grupo de folículos en crecimiento se denomina reclutamiento o activación folicular primordial. El folículo reclutado que ha iniciado su desarrollo contiene: un ovocito primario pequeño ($\sim 25 \mu\text{m}$ de diámetro) detenido en la primera fase de meiosis I, una sola capa de células de la granulosa aplanadas o escamosas estrechamente unidas al ovocito, y una lámina basal. No tienen un suministro de sangre independiente y por lo tanto tienen acceso limitado al sistema endocrino. Un cambio en la forma escamosa a cuboidal en la capa de células granulosas, junto con la adquisición del potencial mitótico en estas células son características histológicas del reclutamiento, el cual es seguido del crecimiento del ovocito. En ese momento, el folículo recibe el nombre de folículo primario (Erickson, 2012).

Las células de la granulosa comienzan a expresar receptores a la FSH en la etapa del folículo primario. Los estimuladores de la expresión del receptor de FSH incluyen la misma FSH, *Activina* y AMP cíclico. Aunque el reclutamiento folicular y las etapas iniciales del crecimiento folicular son independientes de las gonadotropinas, la FSH es necesaria para el desarrollo del folículo primario hasta la

fase preantral. En los otros mamíferos, altos niveles de FSH en plasma aceleran el desarrollo folicular primario (Figura 6).

El desarrollo del folículo secundario comienza con la adquisición de una segunda capa de células de la granulosa rodeadas por una capa de células intersticiales de la teca que se diferenciarán posteriormente en las células de la teca interna y de la teca externa que son diferentes de células de músculo liso. Cuando el ovocito completa su crecimiento durante la foliculogénesis preantral, reanudará espontáneamente la meiosis (Erickson, 2012).

2.5 Atresia Folicular

Las células de la granulosa que rodean al ovocito son avasculares y están separadas del estroma que las envuelve por una membrana basal. Las células de la granulosa están privadas de riego vascular hasta que concluye la ovulación y dependen de uniones comunicantes especializadas que conectan las células y se comunican con el ovocito para el intercambio metabólico y el transporte de moléculas de señalización. Las células de la granulosa difieren en su función y su actividad; por ejemplo, las concentraciones más elevadas del receptor LH se observan en las células más próximas a la membrana basal y las más bajas corresponden a las que rodean al ovocito (Marc y Speroff, 2005).

En cualquier momento de este desarrollo, los folículos individuales se detienen y finalmente retroceden en el proceso apoptótico denominado atresia. Cuando la atresia se inicia, el componente de la granulosa empieza a deteriorarse. Los componentes de la cavidad antral se reabsorben y la cavidad se colapsa y se obstruye. El ovocito se degenera *in situ* y se observa una veta cicatrizada con forma de lazo rodeada de teca. Al final, esta masa de teca pierde sus lípidos y es imposible de diferenciar de la masa de estroma en crecimiento. Así pues, el proceso de la apoptosis es extenso en la granulosa, pero la teca apenas resulta afectada y se incorpora al tejido intersticial. Antes de la regresión, los folículos quísticos pueden quedar retenidos en la corteza durante períodos variables de tiempo (Marc y Speroff, 2005).

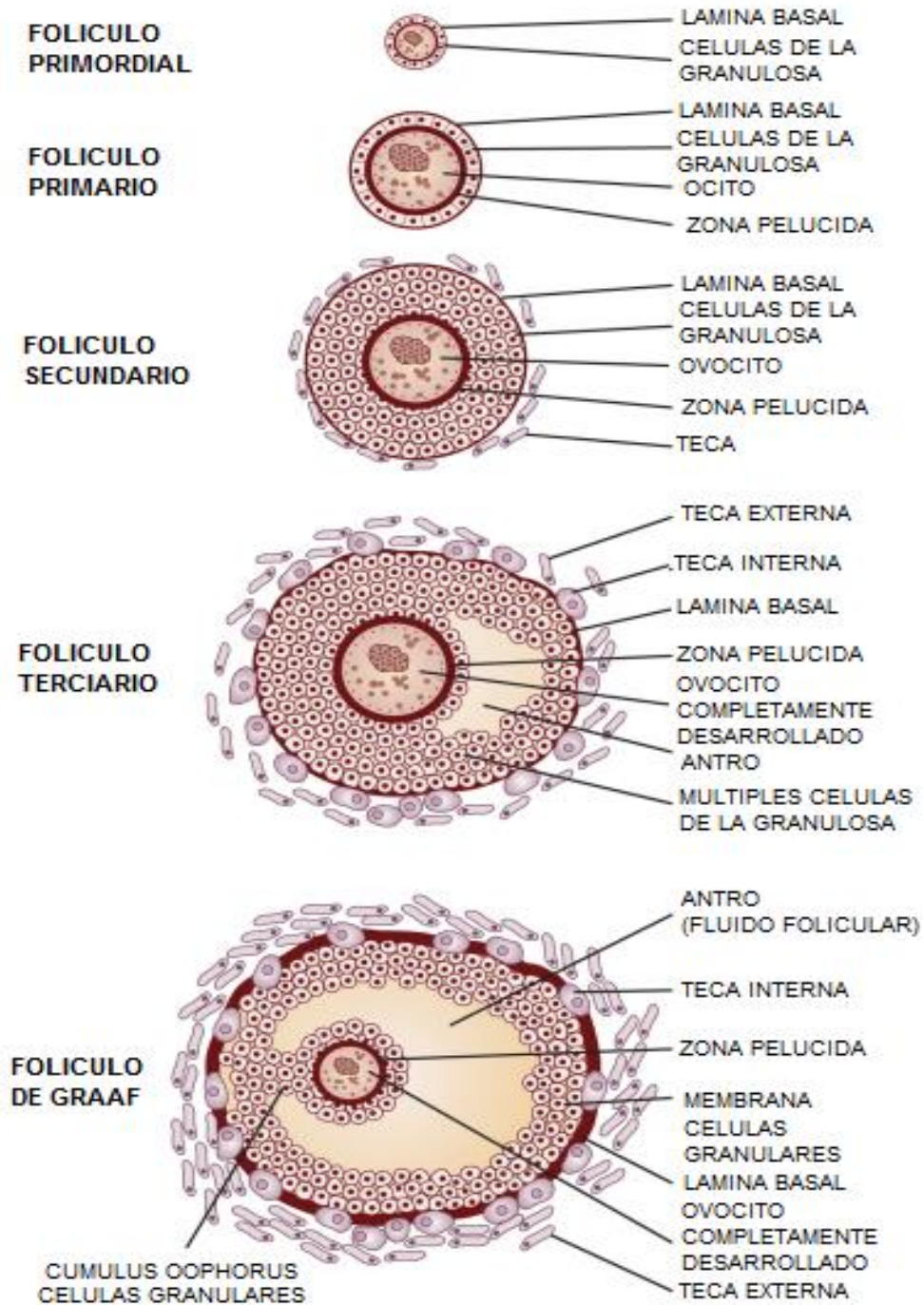


Figura 6. Desarrollo folicular. Se muestran las distintas etapas del crecimiento de los folículos ováricos a lo largo de su desarrollo; los principales compartimentos sufren cambios graduales que se caracterizan por la proliferación de las células de la granulosa y de las células de la teca, además de la aparición del antro; al iniciarse el desarrollo, el ovocito abandona su estado en dictioteno de la profase I y continúa su diferenciación hasta culminar la segunda división meiótica, si y solo si es fertilizado por el espermatozoide (Modificado de Buluny y Adashi, 2008).

La atresia folicular es el proceso predominante en la vida folicular y la evaden solo aquellos folículos destinados al desarrollo óptimo lo cual evidencia un control preciso de la selección de los mejores gametos para la especie.

2.6 Ovulación

A diferencia de los folículos que han desarrollado atresia, si la estimulación de las gonadotropinas es suficiente, una de las diversas unidades foliculares habrá alcanzado grados variables de madurez y el folículo elegido progresará hasta la ovulación (Marc y Speroff, 2005).

Desde el punto de vista morfológico, estos acontecimientos comprenden la dilatación del antro por incrementos del líquido antral y la compresión de la granulosa contra la membrana que separa la granulosa avascular y la teca interna vascularizada y luteinizada. Además, el incremento de líquido antral comprime gradualmente el *cumulus ooforo*, el montículo de granulosa que envuelve al ovocito (Marc y Speroff, 2005).

Los mecanismos del adelgazamiento de la teca sobre la superficie del folículo la convierten en un tejido distendido y prominente; la creación de una zona avascular que debilita la cápsula del ovario y la distensión aguda final del antro con la ruptura y la extrusión del ovocito en su *cumulus* son múltiples y complejos. La expulsión física del ovocito depende de un aumento vertiginoso de la síntesis de prostaglandinas en el folículo antes de la ovulación (Marc y Speroff, 2005).

2.7 Formación del cuerpo lúteo

Si se inhibe la síntesis de prostaglandinas, la ovulación no ocurre y se produce un cuerpo lúteo con un ovocito atrapado. Se cree que tanto las prostaglandinas como el considerable incremento de gonadotropinas a la mitad del ciclo elevan la concentración y la actividad de proteasas locales, como la conversión del plasminógeno en plasmina. Como resultado del debilitamiento tisular generalizado,

se produce una rápida acumulación de líquido antral seguido de la rotura de la cubierta tisular debilitada que rodea al folículo (Marc y Speroff, 2005).

Después de la ovulación, se producen notables alteraciones de la organización celular en los restos del folículo. Cuando se recupera la integridad y la continuidad del tejido alterado por la ruptura folicular, las células de la granulosa sufren una acusada hipertrofia que llena gradualmente la cavidad quística, a veces hemorrágica, del cuerpo lúteo precoz. La granulosa se luteiniza notablemente por la incorporación de vacuolas ricas en lípidos al interior de su citoplasma. Ambas propiedades habían sido los rasgos exclusivos de la teca antes de la ovulación. La teca del cuerpo lúteo pierde prominencia y al final sólo se aprecian vestigios en los intersticios del festoneado típico del cuerpo lúteo maduro. Como resultado, se forma un cuerpo amarillo, denominado así por el aspecto hipertrófico de las células granulosas, rica en lípidos y totalmente vascularizada (Marc y Speroff, 2005).

2.8 Eje Hipotálamo - Hipófisis - Ovario

El proceso reproductivo depende de la liberación regular de un óvulo maduro, este complejo proceso depende a su vez de la integración funcional del eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario y de los estímulos aferentes provenientes de otros sistemas (Figura 7).

La secreción normal de gonadotropinas requiere una secreción pulsátil de GnRH dentro de intervalos y frecuencia de sus pulsos que estimulan la secreción de FSH mientras que frecuencias mayores favorecen la secreción de LH. Por eso la disminución de la frecuencia de los pulsos de GnRH en la fase lútea tardía es un factor importante que favorece la síntesis y la secreción de FSH para que en el siguiente ciclo provoque una serie de eventos integrativos y altamente coordinados que conduce a su liberación inmediata, su síntesis, su almacenamiento (pool de reserva) y su movimiento. Además, estimula la síntesis de nuevos receptores al decapeptido que permite a las células responder a cantidades menores de GnRH, lo cual es importante para la aparición del pico preovulatorio de LH (Bulnes, 2000).

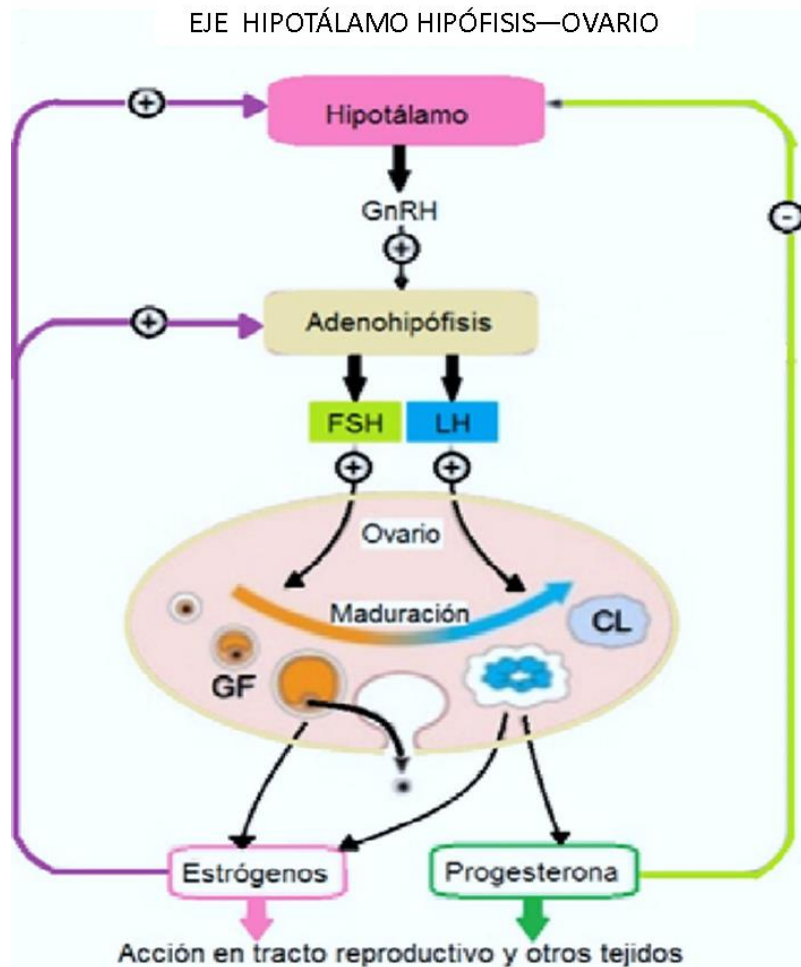


Figura 7. Eje hipotálamo-Adenohipófisis-ovario. La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) viaja hasta la adenohipófisis, que en respuesta secreta las hormonas folículo estimulante (FSH) y Luteinizante (LH); ambas gonadotropinas se unen a sus receptores en los tejidos funcionales del ovario: células de la granulosa folicular (GF) y células de la teca; luego de la ovulación, el cuerpo lúteo (CL) secreta progesterona e inhibe la secreción de GnRH (Modificado de Guyton, 2000).

Aunque la actividad rítmica pulsátil es una propiedad intrínseca de las neuronas GnRH-*érgicas*, puede modularse por la acción de diversas hormonas y neurotransmisores como las aminas biogénicas, acetilcolina, indolaminas y diversos péptidos que actúan directamente sobre la actividad de las neuronas GnRH-*érgicas*. Los estrógenos son los principales responsables del mantenimiento del tono opioide y potencian la acción de la progesterona, lo que explica la máxima supresión de la liberación de GnRH y, por tanto, de las gonadotropinas (Bulne, 2000).

2.9 Ciclo estral

El ciclo estral de la rata adulta dura de 4 a 5 días y la ovulación se produce espontáneamente. Las fases del ciclo son diestro-1, diestro-2, proestro y estro, este ciclo hace referencia a la conducta de celo (calor sexual) que la hembra debe desplegar para aceptar la copula y está perfectamente sincronizado con el ciclo ovárico y la ovulación (al final del estro conductual ocurre la ovulación); el propósito principal de la aparición de la conducta de celo es la fertilización exitosa de los ovocitos que la hembra libera horas después de la presencia del pico preovulatorio de la LH (Martin, 1979).

Los cambios que ocurren en la citología vaginal se repiten de manera cíclica durante la vida fértil de la rata hembra y son reflejo de los cambios hormonales que ocurren en cada ciclo estral. El fotoperiodo es fundamental para que se presenten ciclos regulares de cuatro a cinco días de duración. La presencia de un ciclo estral con mayor duración es relativamente anormal y refleja cambios importantes en el patrón de secreción de hormonas a consecuencia de diversos factores (Montes y Luque, 1988). Los cambios descritos anteriormente son de características generales de las hembras de mamíferos que presentan un ciclo estral definido como un ciclo alusivo a la conducta de celo y la receptividad de la hembra al macho, y se diferencia del ciclo menstrual que se refiere a un ciclo periódico de desgaste y regeneración del endometrio uterino este es propio de los primates del viejo mundo y del humano. El ciclo estral se puede estudiar con base en los cambios del epitelio vaginal (Eckert *et al*, 1988; Guyton, 2000) (Tabla 1).

2.10 Hormonas

La neurohormona que controla la secreción de las gonadotropinas (FSH y la LH) se denomina GnRH: *hormona liberadora de gonadotropinas* (por sus siglas en inglés) o *gonadoliberina*. La GnRH es un pequeño péptido de 10 aminoácidos con cierta variación de la secuencia de aminoácidos entre los diversos mamíferos. El gen que codifica la proteína precursora de 92 aminoácidos para la GnRH: la *pro*-GnRH, está localizado en el brazo corto del cromosoma 8. La proteína precursora para la GnRH

contiene, en el orden siguiente: una secuencia de señal de 23 aminoácidos, el decapeptido de GnRH, un lugar de procesamiento proteolítico de 3 aminoácidos y una secuencia de 56 aminoácidos denominada GAP (péptido asociado a la GnRH), un estimulador de las gonadotropinas (Marc y Speroff, 2005).

Tabla 1. Resumen de los cambios a nivel de ovario, útero, epitelio vaginal y conducta en las distintas fases del ciclo estral de la rata (Tomado de De la Cruz y Pasaro, 1998).				
FASE	OVARIO	ÚTERO	VAGINA	CONDUCTA Y DURACIÓN
Estro	Maduración de folículos. Ovulación.	Máxima distensión. Inicio de degeneración del epitelio uterino.	Epitelio grueso. Capa de células cornificadas en la superficie. Frotis vaginal con abundancia de células escamosas.	Receptividad máxima. Lordosis. Copulación 25 a 27 horas.
Diestro-1	Formación de cuerpos lúteos.	Alguna degeneración vacuolar pero también regeneración.	Descamación del epitelio cornificado. Epitelio delgado. Invasión de leucocitos. Frotis vaginal con abundancia de leucocitos y células epiteliales.	No hay receptividad. 6 a 8 horas.
Diestro-2	Crecimiento de cuerpos lúteos. Folículos de varios tamaños.	Regeneración de epitelio uterino.	Epitelio delgado. Regeneración del epitelio. Frotis vaginal con abundancia de leucocitos y células epiteliales.	No hay receptividad. 55 a 57 horas.
Proestro	Crecimiento rápido de folículos. Degeneración de los cuerpos lúteos del ciclo previo.	Útero distendido con fluido aumentando su tamaño.	Epitelio grueso. Células epiteliales superficiales. Frotis vaginal con abundancia de células epiteliales.	Estado receptivo a la copulación hacia el final del proestro. 12 a 14 horas.

La vida media de la GnRH es sólo de 2-4 min a causa de una rápida degradación, combinada con la enorme dilución al acceder a la circulación periférica. Su función, a su vez, depende de relaciones complejas y coordinadas entre GnRH y gonadotropinas hipofisarias y los esteroides gonadales. La interacción entre estas señales químicas está gobernada por efectos de retroalimentación, tanto estimuladores (positivos) como inhibidores (negativos). Estas señales y las procedentes de centros superiores en el sistema nervioso central pueden modificar

la secreción de GnRH mediante la liberación de diversos neurotransmisores: dopamina, noradrenalina, catecolaminas y endorfinas, por mencionar algunos. Las catecolaminas pueden ser producidas en las glándulas suprarrenales, ejerciendo una función hormonal, o en las terminaciones nerviosas, por lo que se consideran neurotransmisores. El precursor de todos ellos es la tirosina, que se usa como fuente en las neuronas catecolaminérgicas (productoras de catecolaminas). La dopamina y la noradrenalina, al igual que otras aminas biogénicas, se sintetizan en las terminaciones nerviosas por descarboxilación de la *L-dihidroxifenilalanina* (*L-DOPA*), que a su vez se sintetiza por hidroxilación de la tirosina. La dopamina es el precursor inmediato de la noradrenalina y la adrenalina, pero ella misma actúa como una neurohormona esencial en el hipotálamo y la adenohipófisis (Marc y Speroff, 2005) (Figura 8).

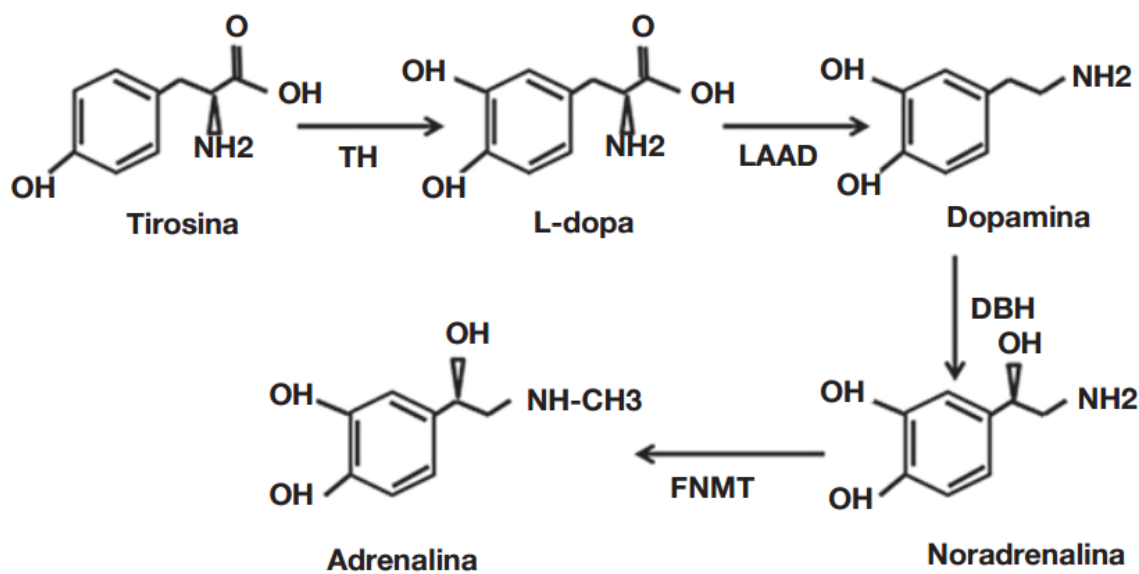


Figura 8. Síntesis de catecolaminas. Se observa la estructura molecular y el nombre de cada molécula involucrada. El precursor principal es la L-tirosina para la posterior síntesis de las catecolaminas. Ruta de síntesis de catecolaminas. TH: tirosina-hidroxilasa; L-dopa: dihidroxifenilalanina; LAAD: descarboxilasa de L-aminoácidos-aromáticos; DBH: dopamina-β-hidroxilasa; FNMT: feniletanolamina-N-metil-transferasa (Tomado de García Sevilla, 1988).

Las gonadotropinas son sintetizadas en la adenohipófisis en respuesta a la GnRH y se encargan de vehicular la información desde el bloque central hasta las

gónadas. Las citadas gonadotropinas: FSH y LH, son glucoproteínas constituidas por 2 subunidades: alfa y beta. La subunidad alfa es común para FSH y LH, en tanto que la subunidad beta es específica de cada hormona y es la causante de sus propiedades biológicas específicas (Bulnes, 2000).

La FSH es necesaria para el desarrollo folicular; estimula la multiplicación celular en la granulosa, junto con los estrógenos y la LH. Aumenta la cantidad de receptores para LH en la granulosa, preparándola así para la producción de progesterona durante la fase lútea. Incrementa la capacidad de aromatización del folículo, favoreciendo la transformación de los precursores androgénicos en estrógenos (Bulnes, 2000).

La LH promueve la esteroidogénesis, aumentando la producción de precursores androgénicos en la teca y también en la granulosa después de la ovulación. Favorece el desarrollo folicular y la ovulación por sus efectos sobre el ovocito (Bulnes, 2000).

2.11 Sistema dopaminérgico

Las catecolaminas se caracterizan por un grupo *catecol*: un anillo bencénico con dos grupos hidroxilo al que está unido un grupo amina. Entre las catecolaminas está la dopamina, la norepinefrina (noradrenalina) y la epinefrina (adrenalina). Todas las catecolaminas se sintetizan a partir del aminoácido L-Tirosina (Figura 8). Las catecolaminas se sintetizan principalmente en el cerebro, en la médula suprarrenal y en algunas fibras nerviosas simpáticas (Tresguerres, 2008).

La dopamina es sintetizada por neuronas específicas que tienen sólo las dos primeras enzimas de la ruta de biosíntesis: *Tirosina Hidroxilasa* y *L-Dopa-descarboxilasa* que actúan secuencialmente para la producción exclusiva de dopamina: las neuronas dopaminérgicas, que tras su estimulación química o eléctrica liberan dopamina en la sinapsis (García Sevilla, 1988).

Las catecolaminas juegan un papel clave en el metabolismo de nutrientes y la generación de calor corporal (termogénesis). Estimulan no sólo el consumo de oxígeno sino también el consumo de combustibles, como la glucosa y los ácidos

grasos libres, generando así calor. Estimulan la glucogenólisis y la degradación de los triglicéridos a los ácidos grasos libres (lipólisis). También tienen un papel en la regulación de la secreción de múltiples hormonas. Por ejemplo, la dopamina inhibe la secreción de prolactina, la norepinefrina estimula la secreción de GnRH y la epinefrina inhibe la secreción de insulina por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas (García Sevilla, 1988).

La dopamina es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (SNC) y algunas zonas periféricas incluyendo el sistema cardiovascular y el sistema renal. En el cerebro, la dopamina está involucrada en el control de los movimientos, la cognición, las emociones, la memoria, la recompensa y el mecanismo de la regulación de la secreción de prolactina por la hipófisis. Varias enfermedades se han relacionado con alteraciones de la transmisión dopaminérgica como trastornos neuropsiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas, principalmente. Los efectos fisiológicos de la dopamina son mediados por proteínas membranales que funcionan como receptores de señales químicas específicas, denominados *receptores dopaminérgicos* (RDA), que tienen expresión generalizada en todo el cerebro de los mamíferos (Rangel-Barajas *et al*, 2015).

De acuerdo con Rangel y colaboradores (2015), los receptores RDA pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Hay cinco subtipos de receptores de mamíferos que se dividen en dos familias según su estructura y de la respuesta biológica. La familia RDA1 incluye a los receptores RDA1 y RDA5, la familia RDA2 consiste en RDA2, RDA3 y RDA4.

Los subtipos RDA1 están acoplados positivamente a la *Adenilato ciclasa* (AC, por sus siglas en inglés) para inducir la acumulación intracelular del *3,5 adenina-monofosfatocíclico* (AMPC) y la activación de la *proteína quinasa dependiente de AMPC* (PKA) (Rangel-Barajas *et al*, 2015) (Figura 9).

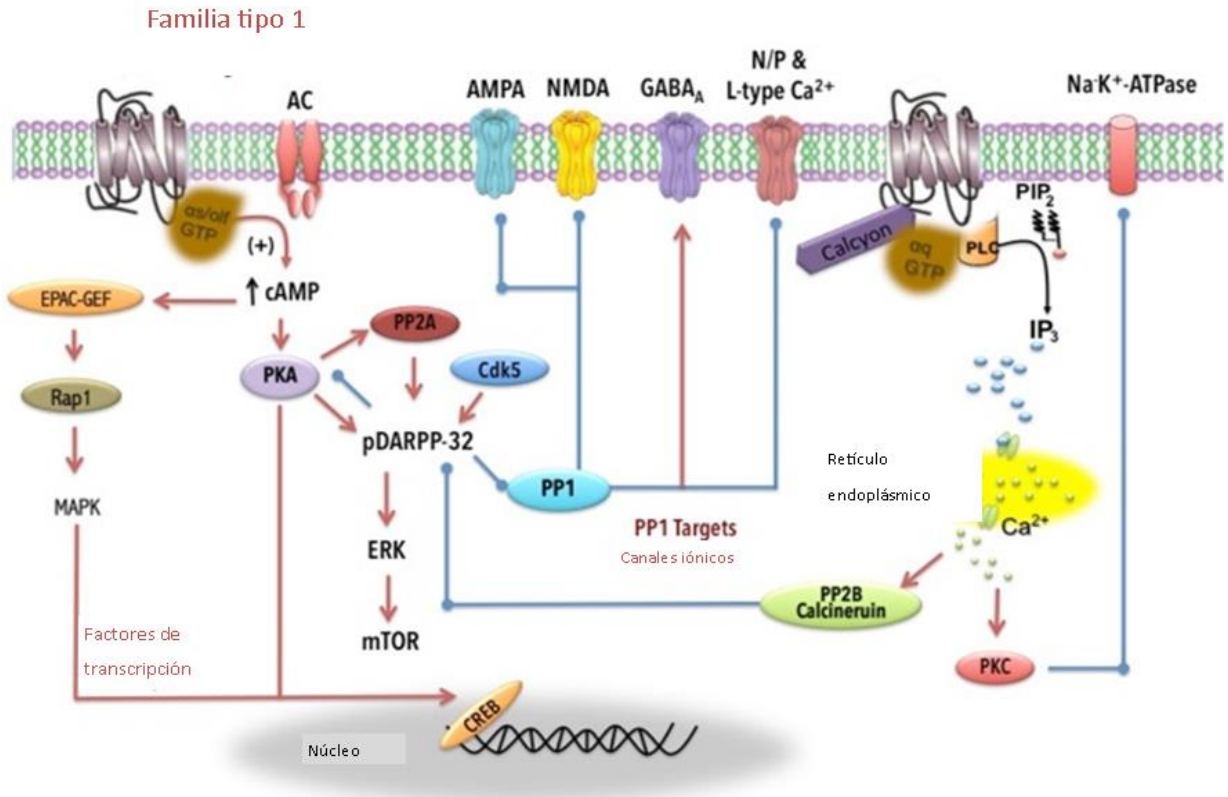


Figura 9. Señalización intracelular de los RDA1. Los efectos estimulantes se indican con flechas rojas y los efectos inhibitorios en líneas azules indican el final con un círculo (Tomado y modificado de Rangel-Barajas *et al*, 2015).

En contraste, los RDA2 están acoplados negativamente a la CA, como resultado de su activación disminuye la acumulación de AMPc y ocurre la modulación de la actividad de PKA y sus efectores. La activación de este receptor está asociada también con otras vías de señalización e incluso, podría actuar de forma diferente dependiendo del área cerebral o bien, de acuerdo con las condiciones fisiológicas (Cooper, 1995) (Figura 10).

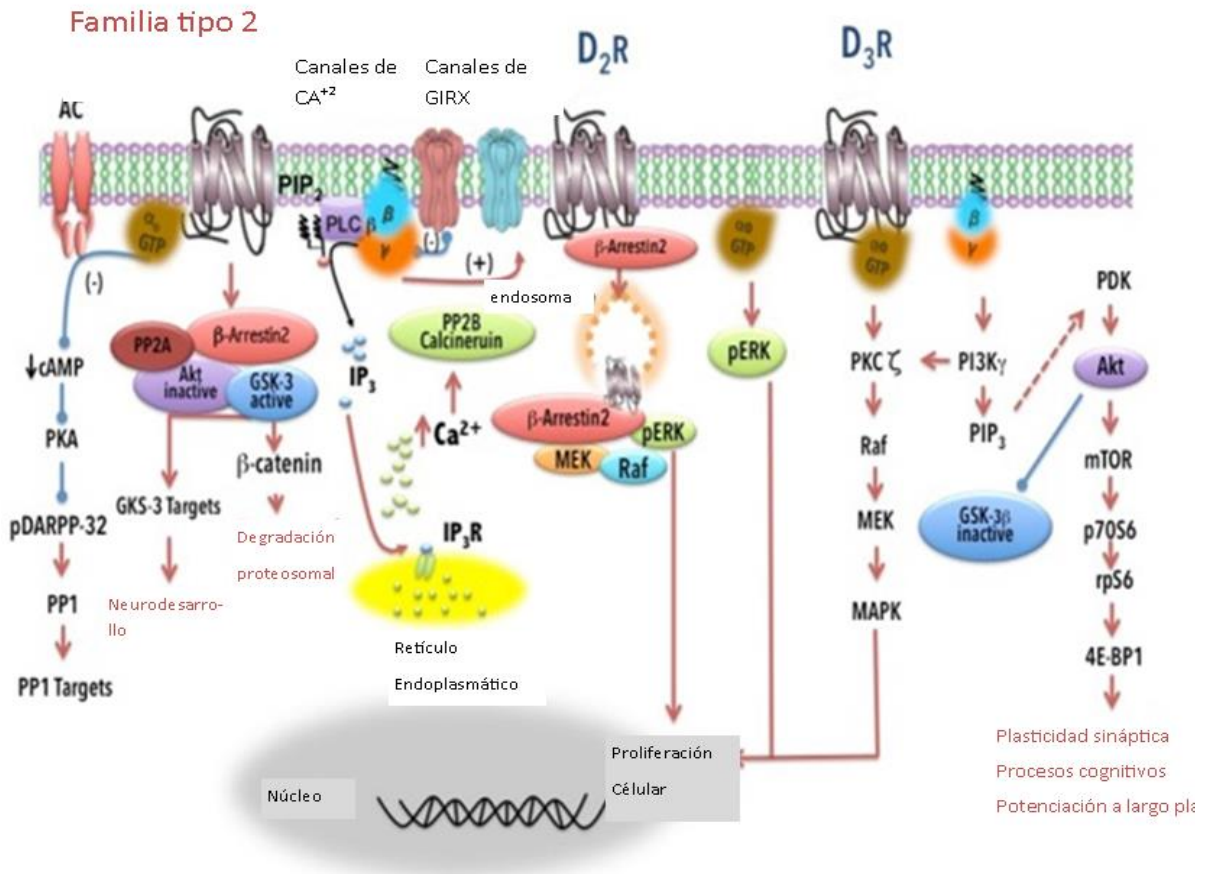


Figura 10. Señalización intracelular de los RDA2. Se producen por una activación compleja de señales intracelulares que están relacionadas con eventos como el neurodesarrollo, la degradación proteosomal, la proliferación celular y el proceso cognitivo. Efectos estimulantes se indican con flechas rojas, las flechas discontinuas rojas indica la activación plausible y los efectos inhibitorios en líneas azules indican el final con un círculo (Tomado y modificado de Rangel-Barajas *et al*, 2015).

2.12 Fosfoproteína regulada por dopamina y mediado por AMPc: DARPP-32

Acrónimo del efecto de la unión al receptor a dopamina, la *fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc* (DARPP-32) es un tercer mensajero celular formado por la unión de dopamina a una subclase de RDA, el cual permite su formación. Como cascada de señalización induce un aumento en el nivel de AMPc intracelular y la activación de PKA y con ello, la fosforilación de la *Treonina 34* de DARPP-32 (Greengard, 2001).

La DARPP-32 es necesaria para mediar las acciones de la dopamina y ha servido para la comprensión de su mecanismo de acción y sus interacciones con otros neurotransmisores, drogas terapéuticas y drogas de abuso (Greengard, 2001).

La DARPP-32 está altamente concentrada en el neostriado (el núcleo caudado y el putamen) y el núcleo accumbens. Las neuronas que contienen DARPP-32 son la única vía eferente para transmitir información fuera de esta región cerebral importante. Estas neuronas deben integrar la información que entra en el neostriado de muchas otras regiones en el cerebro, y la DARPP-32 juega un papel central en este proceso de integración (Dunah *et al*, 2004).

Una vía importante aferente se compone de neuronas que se proyectan desde la corteza para el cuerpo estriado y utilizan glutamato para excitar las neuronas que contienen DARPP-32. La excitabilidad de las neuronas que contienen DARPP-32 se modula por las neuronas dopaminérgicas que se proyectan desde la *sustancia nigra* al neostriado. La regulación de la excitabilidad de las neuronas que contienen DARPP-32 ha proporcionado un modelo útil para el estudio de los mecanismos por los que la transmisión sináptica lenta, como se ejemplifica para la dopamina. La secuencia de DARPP-32 es altamente conservada en los mamíferos (Flores, 2002).

La DARPP-32 es una proteína que consiste en 205 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 32 kDa. Es fosforilada en la *Treonina-34* por la PKA y desfosforilada por la *Proteína fosfatasa 2B* (PP2B). La fosforilación de la DARPP-32 en el residuo de *Treonina-34* cambia profundamente sus propiedades biológicas, convirtiéndola de una molécula inactiva en un potente inhibidor de la *Proteína fosfatasa 1* (PP1), con una CI_{50} (concentración inhibitoria mediana) y K_i (constante de inhibición) de aproximadamente 10^{-9} M. La PP1 tiene una amplia especificidad de sustrato y controla el estado de fosforilación y la actividad de numerosos sustratos fisiológicamente importantes, incluyendo receptores a neurotransmisores, canales iónicos dependientes de voltaje, bombas de iones, y factores de transcripción. Como resultado, los neurotransmisores que aumentan o disminuyen *fosforilación de la treonina-34* de la DARPP-32 inhiben o activan, respectivamente, la PP1, y de ese modo aumentan o disminuyen el estado de fosforilación y la actividad de una gran variedad de efectores fisiológicos que se activan mediante señales en cascada (Svenningsson, 2005).

Las catecolaminas, especialmente noradrenalina, han sido implicadas en el control de la función ovárica, pero si la dopamina tiene una función específica en el ovario aún está por aclararse (Rey-Ares *et al*, 2007).

Los RDA están presentes en células de la granulosa humana con dos miembros de cada subtipo (solo el RDA3 no fue identificado). Además, existen variantes de empalme del receptor: un RDA de forma larga (D2L) y otro RDA en la forma corta (D2S). En las células de la granulosa humana las dos variantes de empalme D2S y D2L, muestran diferencias en la longitud del tercer bucle citoplásmico involucrado en el acoplamiento a las proteínas G (Rey-Ares *et al*, 2007).

2.13 Antagonistas de la dopamina

Los antagonistas dopaminérgicos juegan un papel importante como tratamiento contra diversos padecimientos psiquiátricos y neurológicos, pero también como herramienta de investigación, para entender el origen y desarrollo de estas enfermedades o para crear y mejorar las terapias que involucren a la dopamina (Bahena *et al*, 2000).

2.14 Propiedades farmacológicas de la sulpiride

La *(RS)-N-[(1-etilpirrolidin-2-il)-metil]-2-metoxi-5-sulfamoilbenzamidao*, sulpirida ó sulpiride es un neuroléptico y antipsicótico de la clase de las benzaminas, se utiliza en el tratamiento de una amplia gama de trastornos psicóticos. Es un antagonista dopaminérgico selectivo post sináptico de los receptores de la familia RDA2. No produce efectos secundarios extrapiramidales como otras benzaminas de uso clínico (Martín *et al*, 1996) (Figura 11).

El efecto de la sulpiride ocurre sobre estructuras límbicas, no interactúa significativamente con receptores de otros neurotransmisores. Se presenta como polvo cristalino casi blanco. Insoluble en agua, ligeramente soluble en alcohol y cloruro de metilo. Se disuelve en ácidos minerales e hidróxidos alcalinos (Palomo, 1991).

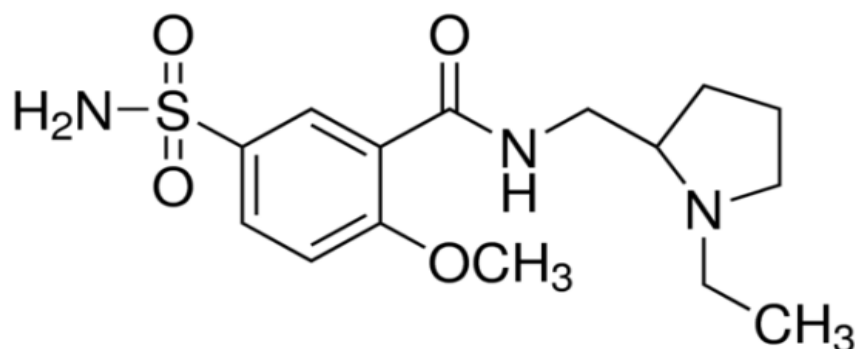


Figura 11. Estructura de la sulpiride; *(RS)-N-[(1-etilpirrolidin-2-il)-metil]-2-metoxi-5-sulfamoil-benzamida*.

2.15 Propiedades farmacológicas del SCH 23390

La *(R)-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina* o SCH-23390, es un potente antagonista dopaminérgico selectivo de los RDA1 con una *K_i* de 0.2 y 0.3 nM para los RDA1 y RDA5, respectivamente. *In vitro*, también se une con alta afinidad a los receptores serotoninérgicos subtipos 5-HT2 y 5-HT1C. Sin embargo, las dosis requeridas para inducir una respuesta similar *in vivo* son 10 veces mayores que las necesarias para inducir la respuesta media en los RDA1. Se ha utilizado ampliamente como una herramienta en la determinación topográfica de receptores cerebrales tipo RDA1 en roedores, primates y seres humanos (Bourne, 2001) (Figura 12).

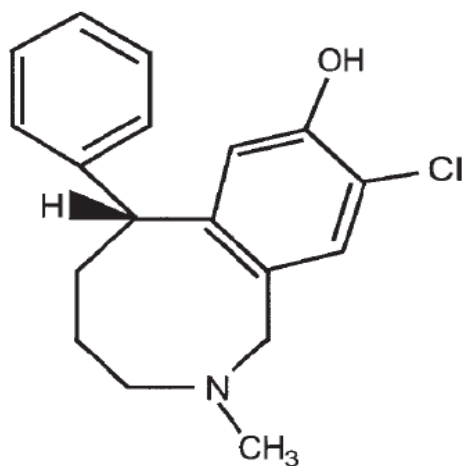


Figura 12. Estructura del SCH 23390; *(R)-(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina*.

2.16 Especies reactivas de oxígeno: ROS

En un ser vivo las *especies reactivas de oxígeno* (ROS, por sus siglas en inglés) y sus antioxidantes permanecen en equilibrio. Cuando se interrumpe el equilibrio hacia el predominio de las ROS, se produce el estrés oxidativo, es decir, un desequilibrio entre los pro oxidantes (especies de radicales libres) y la capacidad de eliminación del organismos o sistemas por medio de los antioxidantes. Las ROS sirven como moléculas de señalización clave en los procesos fisiológicos, pero también tienen un papel en los procesos patológicos (Agarwal *et al*, 2005).

Las ROS afectan múltiples procesos fisiológicos. En las funciones reproductivas femeninas primordiales, son capaces de inducir alteraciones que comprometen la maduración de los ovocitos hasta la fertilización y afectan el desarrollo embrionario y el embarazo (Agarwal *et al*, 2005).

Se ha sugerido que el desbalance del sistema operativo antioxidante determina la disminución de la fertilidad relacionada con la edad. El sistema antioxidante desempeña un papel importante durante el embarazo, el parto normal y en el inicio del trabajo de parto prematuro. La mayoría de los casos de cáncer de ovario aparecen en el epitelio superficial del tumor y se cree que la ovulación repetitiva es el factor causal (Behrman *et al*, 2001).

Las principales ROS son el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}). El radical superóxido se forma cuando los electrones escapan de la cadena de transporte de electrones. La *dismutación* del superóxido da como resultado la formación de peróxido de hidrógeno. El radical hidroxilo es altamente reactivo y puede modificar las purinas y las pirimidinas y, con ello causar rupturas que dañan las cadenas del ADN. Algunas enzimas oxidasa pueden generar directamente el radical peróxido de hidrógeno. En condiciones normales, las moléculas eliminadoras de las ROS conocidas como antioxidantes convierten las ROS en H_2O para evitar la producción y acumulación excesiva radicales libres (Jozwik *et al*. 1999).

Hay dos tipos de antioxidantes en el cuerpo humano: antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos también se conocen

como antioxidantes naturales, neutralizan el exceso de ROS y evitan que dañe la estructura celular y son los siguientes *superóxido dismutasa*, *la catalasa*, *la glutatión peroxidasa* y *la glutatión reductasa*, que también causan la reducción del peróxido de hidrógeno a agua y alcohol (Agarwal *et al*, 2003) (Figura 13).

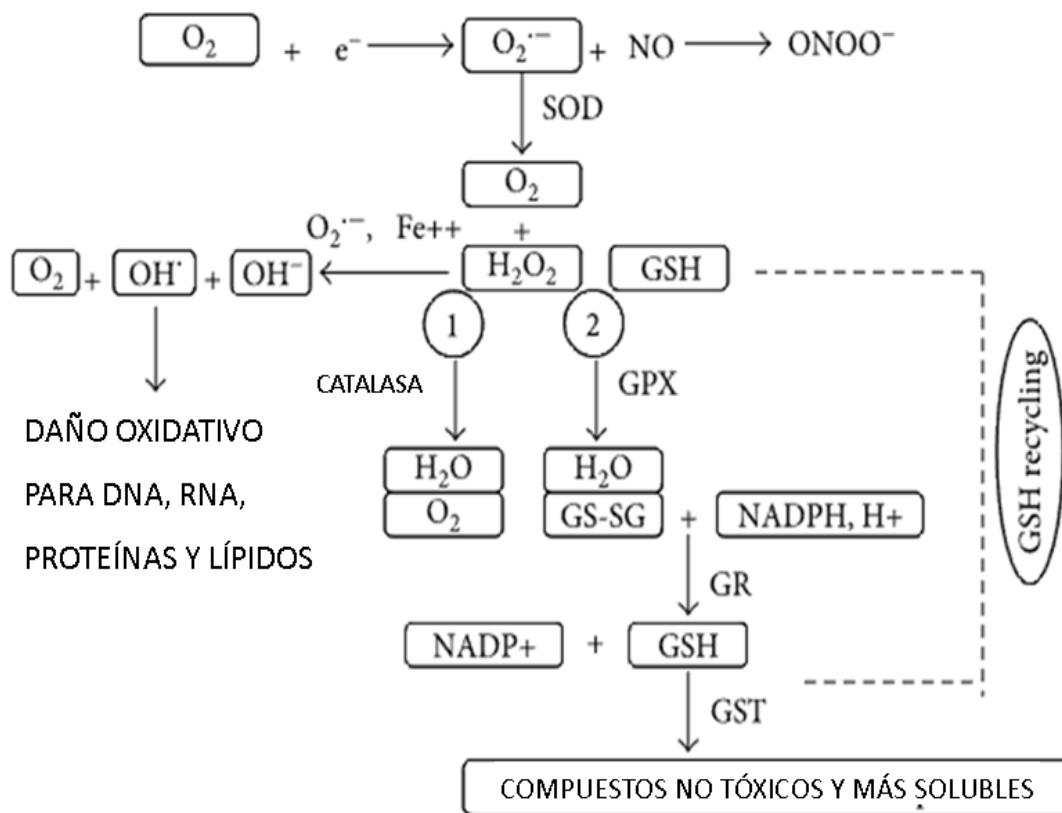


Figura 13. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Y las vías antioxidantes enzimáticas celulares. Las principales enzimas antioxidantes incluyen la superóxido dismutasa(SOD), la catalasa, el glutatión (GSH), la glutatión peroxidasa(GPX), la glutatión reductasa (GR) y la glutatión transferasa (GST) O_2 (dioxígeno), H_2O_2 (peróxido de hidrogeno), NO (óxido nítrico), Fe (hierro), OH^{\cdot} (hidroxilo), H_2O (agua), H^+ (protón), $ONOO^-$ (peroxinitrito) (Tomado y modificado de Wang, 2017).

Los antioxidantes no enzimáticos también se conocen como antioxidantes sintéticos o suplementos dietéticos. El complejo del sistema antioxidante del cuerpo está influenciado así por la ingesta dietética de vitaminas y minerales antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E, el selenio, el zinc, la taurina, la hipotaurina, la transferrina, el glutatión y carotenos. La vitamina C es un antioxidante que rompe la cadena que detiene la propagación del proceso

peroxidativo, esta vitamina también ayuda a reciclar la vitamina E oxidada y el glutatión. La taurina, la hipotaurina y la transferrina se encuentran principalmente en el líquido tubárico y folicular, donde protegen al embrión (Agarwal *et al*, 2005).

2.17 Especies reactivas de oxígeno en el ovario

Se ha mostrado que las ROS ejercen efectos ambivalentes, negativos (alteraciones y patologías graves) o positivos (efectos reostáticos), en los ovarios de los mamíferos (Valko *et al*, 2007).

Los macrófagos, leucocitos y citoquinas son fuentes principales de ROS y están todos presentes en el microambiente del líquido folicular. Están involucradas en el crecimiento folicular, la maduración de los ovocitos y la biosíntesis de esteroides ováricos (Wang, 2017).

El desarrollo de folículos desde la etapa primordial hasta los folículos antrales se acompaña de un marcado aumento en la función metabólica de las células de la granulosa, especialmente por un incremento en la actividad del citocromo P450 por la biosíntesis de esteroides (Richards, 1994). Se producen grandes cantidades de ROS durante el transporte de electrones, lo que indica que las células de la granulosa funcional están relacionadas con el estado pro-oxidante en los folículos. Cuando se forma el folículo preovulatorio, la ovulación ocurre bajo la estimulación de la LH y se requiere la producción de cierta cantidad de ROS para la ovulación y se ha confirmado que la inhibición de la formación de ROS obstaculiza el proceso o induce alteraciones morfológicas en el ovocito (Wang, 2017).

En los folículos preovulatorios, el exceso de antioxidantes afecta la secreción de progesterona estimulada por LH y la expresión génica relacionada con la ovulación. En los folículos preovulatorios, las ROS inducen recambio de prostaglandinas, citoquinas, enzimas proteolíticas y esteroides, lo que produce alteraciones del flujo sanguíneo y la eventual ruptura del folículo (Rizzo *et al*, 2012).

El proceso de la ovulación es comparable a una reacción inflamatoria aguda porque muchos genes y sustancias relacionados con la inflamación se inducen por el aumento de LH en los folículos preovulatorios previo a la ovulación. Con la

excepción de los folículos dominantes que son liberados para su fertilización, los otros folículos en crecimiento experimentarán apoptosis y este proceso es ocasionado por incremento en las ROS. En paralelo, la síntesis de estrógenos inducida por FSH y la regulación positiva de la *catalasa* y el glutatión en folículos en crecimiento, contrarrestan el proceso apoptótico para mantener el equilibrio durante la función ovárica normal (Sugino, 2006).

Durante la fase lútea, se produce una gran cantidad de progesterona para mantener la etapa temprana de la gestación. Si no ocurre el embarazo, el cuerpo lúteo involucre inducido por la acumulación de ROS. Se requiere una caída rápida de la progesterona plasmática para una maduración folicular adecuada en el próximo ciclo reproductivo. La esteroidogénesis es la fuente principal en la producción de ROS y la síntesis de progesterona está restringida al cuerpo lúteo por causa de las ROS. Durante la preñez, la disminución de *superóxido dismutasa 1* induce incremento en la producción de ROS con inhibición de las acciones mediadas por la progesterona y así, la eliminación de las ROS por antioxidantes puede contribuir al mantenimiento de la integridad de las células lúteas y extender la vida útil del cuerpo lúteo antes que la placenta se instale como glándula que soporte la gestación (Wang, 2017).

La catalasa se encuentra predominantemente en los peroxisomas. En los ovarios, la enzima se detectó por primera vez en 1975 por inmunohistoquímica. Se ha demostrado que ella protege al genoma del daño oxidativo. Se sugiere que la distribución y la oscilación de la enzima durante diferentes ciclos ováricos están relacionadas con la regulación de la gonadotropina. Las gonadotropinas como la FSH tienen funciones bien conocidas que son principalmente importantes para la maduración folicular, la diferenciación y la esteroidogénesis. El estrógeno alcanza su mayor concentración en los folículos dominantes, el aumento concomitante de la catalasa y el estradiol en respuesta a la FSH puede sugerir un papel de la enzima en la selección del folículo y la prevención de la apoptosis. Se han detectado altos niveles de expresión de SOD1 y SOD2 en las células de la granulosa y de la teca luteinizadas. La cantidad como la actividad de las tres

isoformas de SOD en el líquido folicular son mayores en los folículos pequeños y medianos que en los grandes. Se requiere SOD1 para neutralizar $O_2^{\bullet-}$ en el citoplasma de los ovocitos. GSH es un tiol de bajo peso molecular que se produce predominantemente en células de mamíferos. GSH mantiene las células en un estado reducido y funciona como un donante de electrones para algunas enzimas antioxidantes (Behrman *et al*, 2001) (Figura 14).

2.18 Indicadores de estrés oxidativo

Como indicadores de estrés oxidativo es común que se analicen sustancias como el malondialdehído (MDA), los 4-hidroxi-alquenes (4-HDA) y los nitritos (NO_2). La peroxidación lipídica con formación de MDA y 4-hidroxinonal, son señales que promueven el aflujo de células inflamatorias. La peroxidación lipídica o lipoperoxidación es la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso por medio del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre. En la mayoría de los casos afecta los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que contienen múltiples dobles enlaces entre los cuales se encuentran los grupos metileno ($-CH_2-$) que poseen hidrógenos particularmente reactivos. Al igual que cualquier reacción con radicales, esta se modela en tres pasos fundamentales: iniciación, propagación y terminación. El MDA es el compuesto orgánico con la fórmula nominal $CH_2(CHO)_2$; es un líquido incoloro y un compuesto altamente reactivo que se produce como el *enol* (Pérez-Aguilar, 2005) (Figura 15).

El 4-HDA es un hidroxialqueno- α , β -insaturado que se produce por peroxidación lipídica en las células. Se encuentra en todos los tejidos animales, y en mayores cantidades durante el estrés oxidativo debido al aumento de la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. Se ha formulado la hipótesis de que el 4-HDA desempeña un papel clave en la transducción de señales celulares, en una variedad de vías desde eventos del ciclo celular hasta la adhesión celular (Awasthi, 2004) (Figura 16).

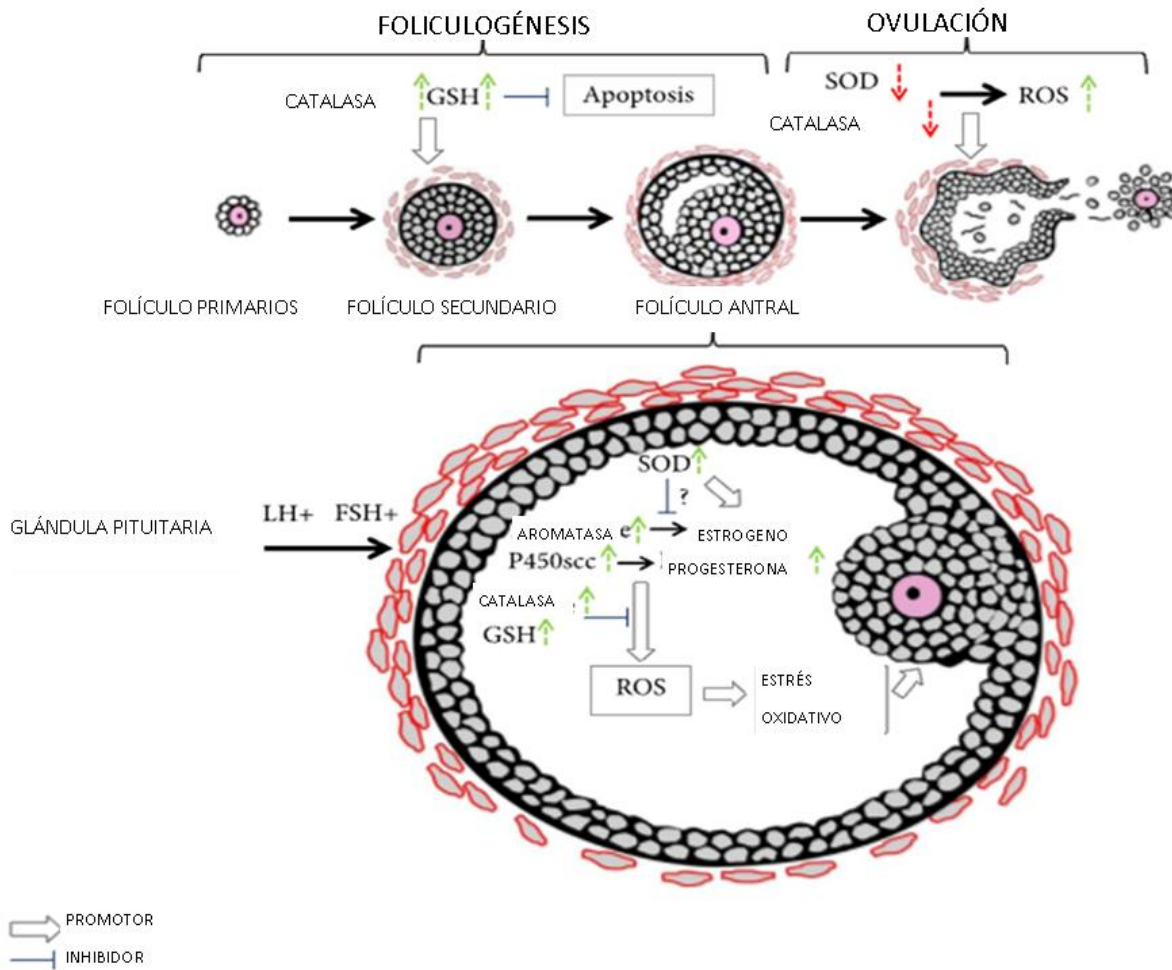


Figura 14. Regulación antioxidante en el desarrollo folicular. El proceso de desarrollo folicular se inicia con folículos primordiales a folículos primarios, seguidos de folículos secundarios y folículos terciarios. Los folículos preovulatorios se forman bajo la estimulación de FSH, y finalmente, la ovulación se desencadena por un aumento de la hormona luteinizante (LH). Todos estos eventos consecutivos y sincronizados están acompañados por la producción de ROS. Los antioxidantes se modulan fuertemente durante este proceso. La expresión de catalasa y GSH en los folículos se mejora con el crecimiento folicular, mientras que la actividad de SOD se reduce en la foliculogénesis. Se demostró que la SOD tiene efectos inhibidores sobre la síntesis de estrógenos al inhibir la actividad de aromatasa inducida por FSH, mientras que la actividad de la enzima SOD se correlaciona positivamente con los niveles de estradiol en el fluido folicular. Se puede producir una gran cantidad de ROS durante la esteroidogénesis, especialmente durante la conversión del colesterol en pregnenolona a través del citocromo P450scc. La gonadotropina induce la regulación positiva de antioxidantes como la catalasa; El GSH en los folículos protege a los ovocitos del estrés oxidativo generado por los procesos metabólicos fisiológicos, como la esteroidogénesis, en el ovario (Tomado de Wang, 2017).

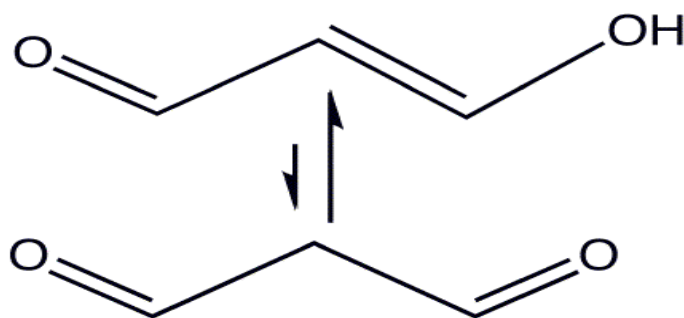


Figura 15. Estructura molecular de MDA. También conocido como malonaldehído, Aldehído malónico; Propanedial; 1,3-Propanedial (Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, 2008).

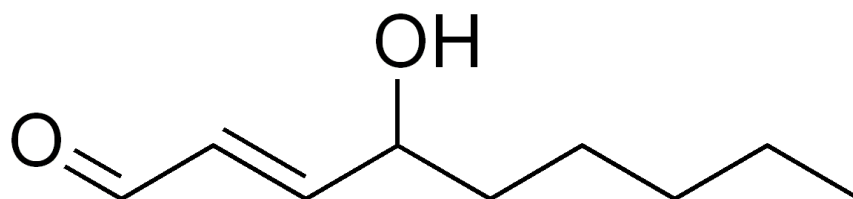


Figura 16. Estructura molecular de HDA-4. También nombrado como 4-Hidroxinonenal, 4-hidroxi-2-nonenal (Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, 2008)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antecedentes que muestran los efectos del bloqueo sistémico de los receptores a dopamina sobre el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, ponen de manifiesto el papel crítico que desempeña la dopamina en la función reproductiva de la rata hembra en relación con las vías de comunicación neuroendocrinas, endocrinas y aparentemente, neurocrinas (Domínguez *et al*, 1987; Morán y Domínguez, 1995; Venegas *et al*, 2015). Sin embargo, queda por esclarecer si el ovario utiliza a la dopamina como un neurotransmisor clásico, o bien, como un neuromodulador y si esto es así, el modo en que se establece dicho papel modulador sobre las funciones primordiales del ovario, que son la secreción de esteroides sexuales y la emisión regular y periódica de gametos fértiles y sanos. Se ha detectado la presencia de dopamina y sus receptores en diferentes compartimentos ováricos, pero se discute su papel funcional en estos tejidos (Aguado *et al*, 1982; Anesetti *et al*, 2001; Bodis *et al*, 1992; Bodis *et al*, 1993; Lara *et al*, 2001; D'Albora y Barcia, 1996; D'Albora *et al*, 2000; Mayerhofer *et al*, 1997; Rey-Ares *et al*, 2007).

Otros trabajos en los que se ha analizado el papel de la dopamina en la periferia postulan que actúa como un modulador de las funciones renales y cardiovasculares (Amneta *et al*, 2002) y es factible que en los ovarios desempeñe funciones semejantes en relación con el flujo sanguíneo en la gónada. Existe un creciente interés por dilucidar las causas de diferentes síndromes y patologías ováricas que producen infertilidad o cuadros de anovulación crónica, como las de tipo hiperandrogénico como síndrome del ovario poliquístico, aquellas causadas por desórdenes periféricos y las que se deben a disfunciones del eje SNC-hipotálamo-adenohipófisis. Si bien una parte de estos trastornos de la función reproductiva de la mujer son ocasionados por deficiencia en los mecanismos de emisión o recepción de señales humorales, otros podrían ser explicados por alteraciones en las señales nerviosas de ingreso y salida por los ovarios, aunque esto último no ha sido demostrado (Parra *et al*, 2007). Si la dopamina detectada en el ovario actuará como un modulador de las acciones de otros neurotransmisores, tal y como lo hacen la noradrenalina y el VIP (Péptido vasoactivo intestinal) (Dissen *et al*, 1993; Hsueh *et al*, 1984; Mayerhofer *et al*, 1997; Ojeda *et al*, 1989), y de las hormonas clásicas que participan en los mecanismos que regulan las funciones ováricas (Adashi y Hsueh, 1981; Aguado *et al*, 1982; Dyer y Erickson, 1985), ello explicaría los cambios sobre la respuesta ovulatoria y sus efectos sobre el desarrollo folicular observados en los estudios del bloqueo sistémico de los receptores a dopamina. Sin embargo, no hay estudios que confirmen la presencia de dopamina en terminales sinápticas, tanto aquellas de origen extrínseco (Lara *et al*, 2002; Lawrence y Burden; 1980; Ojeda y Aguado, 1985) como la proveniente de neuronas ováricas intrínsecas (D'Albora *et al*, 2000) y de las que aún desconocemos su papel funcional en los ovarios.

Por otra parte, diferentes estudios han descrito los efectos de la denervación quirúrgica (Chávez *et al*, 1987; Cruz *et al*, 1986; Domínguez *et al*, 1989) o del bloqueo farmacológico de las señales colinérgicas y catecolaminérgicas (Domínguez *et al*, 1982; Domínguez *et al*, 1985; Domínguez *et al*, 1987) sobre el desarrollo folicular y la ovulación de los ovarios derecho e izquierdo y permiten

postular una virtual conexión entre las estructuras centrales que controlan la secreción de gonadotropinas y su influencia sobre la regulación de las funciones ováricas. Varios estudios apoyan la existencia de esta vía de comunicación directa entre las gónadas y el SNC, particularmente con el hipotálamo (Dissen y Ojeda, 1999; Fukuda *et al*, 1984; Gerandai *et al*, 1998; Mizunauma *et al*, 1983; Nance *et al*, 1983; Nance y Moger, 1982).

No hay evidencias claras que describan el papel funcional de la dopamina detectada en los ovarios. Los diferentes estudios que abordan el análisis del papel de la innervación ovárica sobre las funciones de la gónada se han enfocado en los sistemas noradrenérgicos y peptidérgicos (Aguado, 2002; Ahmed *et al*, 1986; Ben-Jonathan *et al*, 1982; Dees *et al*, 1985; Davoren y Hsueh, 1985; Dissen y Ojeda, 1999; Mayerhofer *et al*, 1997; McNeill y Burden, 1987), funciones que se afectan sensiblemente cuando se modifican las influencias nerviosas que llegan al ovario (Burden, 1985; Lara, 1990). Incluso, se ignora si la dopamina detectada en los compartimentos anatómicos-funcionales del ovario procede de terminales nerviosas o de algún otro tejido ovárico.

4. ANTECEDENTES

Domínguez y colaboradores (1987), evaluaron los efectos de la administración sistémica de un antagonista dopaminérgico en diferentes fases y momentos del ciclo estral sobre la ovulación y la distribución de la población folicular de los ovarios de la rata adulta. En este experimento se utilizaron ratas hembra con ciclos estrales regulares de cuatro días que fueron tratadas con una dosis única de haloperidol (2.5 mg/kg de peso; i.m.), un antagonista no selectivo de los receptores a dopamina, en diferentes horas de cada uno de los días del ciclo estral: diestro-1, diestro-2, proestro y estro; todos ellos se sacrificaron en la mañana del estro esperado. El haloperidol impidió la ovulación espontánea en estos animales cuando se administró en el estro y diestro-1 pero fue menos efectivo cuando se inyectó en el diestro-2 y en el proestro. La población folicular de los ovarios mostró alteraciones en el crecimiento de los folículos que

dependieron del momento en el que se realizó el bloqueo sistémico de los receptores a dopamina. Estos resultados permitieron sugerir que la información dopaminérgica que se genera durante la primera mitad del ciclo estral es fundamental para que la secuencia de eventos neuroendocrinos y endocrinos que culminan con la ovulación ocurra de manera normal.

En otros trabajos, hemos reevaluado la participación de la dopamina en la regulación del ciclo estral y la ovulación espontánea de la rata y así, se confirmaron aquellas observaciones de Domínguez y colaboradores (1987). La administración subcutánea de una dosis única de haloperidol en la primera (Ramírez-Ávila, 2001) o en la segunda mitad del ciclo estral (Pastelín-Rojas, 2003) interrumpe el ciclo estral e inhibe de modo claro la secreción de gonadotropinas y de estrógenos. En dichos experimentos, se confirmó que el desarrollo folicular se ve interrumpido y mostró que los índices de atresia se incrementaron casi de manera absoluta en los animales tratados con el antagonista. Si bien estos efectos pudieran ser explicados por la interrupción de la secreción de gonadotropinas, el reemplazo hormonal fue ineficaz para restablecer la función ovárica (Pastelín-Rojas, 2003), lo que nos permitió suponer que el bloqueo farmacológico de la información dopaminérgica de los ovarios pudiera involucrar de manera directa mecanismos que controlan las funciones ováricas.

Recientemente, Venegas y colaboradores (2015) mostraron la existencia virtual de un sistema dopaminérgico local en el ovario de la rata adulta que participa de modo crítico en la regulación del ciclo estral y la ovulación espontánea, con papeles variables a lo largo del ciclo estral e incluso de acuerdo con la hora del día en que se analiza su función. Sus resultados son altamente concordantes con las observaciones de Domínguez y colaboradores (1987) y muestran los efectos claros de que el antagonismo local de los receptores a dopamina en el ovario inciden directamente sobre el ciclo estral, es decir, la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas por una vía de comunicación que no es exclusivamente hormonal, sino que es muy probable que existan señales nerviosas que se generan desde el

ovario y que alcanzan sitios al nivel central que coordinan y controlan el ciclo estral con la ovulación.

En relación con esto último, se sabe que el ovario recibe fibras nerviosas que ingresan por la médula y se distribuyen hacia la corteza hasta alcanzar el estroma ovárico y la teca folicular (Burden, 1985). Esta inervación proviene del plexo ovárico y del nervio ovárico superior (Lawrence y Burden, 1980). Este último está íntimamente relacionado con el control de la esteroidogénesis ya que sus fibras alcanzan la teca externa de los folículos (Aguado, 2002). Otras fibras se introducen en el estroma ovárico y contactan con células intersticiales que indirectamente se relacionan con las células del cuerpo lúteo (Erickson *et al*, 1985). La mayoría de sus fibras que viajan por el nervio ovárico superior provienen de las neuronas simpáticas post-ganglionares ubicadas en el ganglio celiaco (Klein y Burden, 1988).

Por lo anterior, al antagonizar los receptores a dopamina del ovario podremos analizar el papel funcional de la dopamina y sus múltiples receptores en el eje anatómico-funcional Hipotálamo-Adenohipófisis-Gónada señalados en párrafos anteriores. Algunos antecedentes permiten sugerir que el uso de los antagonistas dopaminérgicos en dosis controladas permitiría analizar de manera puntual las respuestas funcionales de los tejidos ováricos donde la dopamina ejerce sus acciones biológicas (Domínguez *et al*, 1987; Venegas *et al*, 2015).

Existen una gran variedad de fármacos antagonistas dopaminérgicos, que interactúan de manera selectiva, sobre un tipo o subtipo de receptor específico. El neuroléptico sulpiride no produce efectos secundarios extrapiramidales en los seres humanos ni catalepsia en los animales experimentales. Actúa como antagonista del sistema dopaminérgico bloqueando específicamente los RDA2, aunque muestra igualmente una alta afinidad por los RDA3 (Martin *et al*, 1996).

Por otra parte, de acuerdo con estudios anteriores (Domínguez *et al*, 1987; Venegas *et al*, 2015; Venegas *et al*, 2016; González Quiroz *et al*, 2016), el antagonismo hacia los RDA induce alteraciones en el ciclo estral y la ovulación espontánea, incluso demostrado en el modelo de la rata hemicastrada sobre el grado de ovulación compensadora e hipertrofia compensadora del ovario (Letras

Luna *et al*, 2016; Guzmán-Herrera, 2018), sería interesante considerar si ciertos indicadores del estrés oxidativo como el MDA, los 4-HDA y los nitritos, así como las ROS en los tejidos ováricos podrían estar relacionados directamente con esas alteraciones en los parámetros reproductivos de la rata adulta.

5. JUSTIFICACIÓN

Por lo anterior y dado que se cuenta con evidencias experimentales que muestran los efectos del bloqueo central, sistémico y local de los receptores a dopamina que inciden negativamente sobre el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Se han puesto en perspectiva el papel crítico que desempeña la dopamina como señal importante en la función reproductiva de la rata hembra por su participación en la integración de todas las señales de comunicación neuroendocrinas, endocrinas y aparentemente, neurocrinas que modulan la función ovárica (Domínguez *et al*, 1987; Morán y Domínguez, 1995; Venegas *et al*, 2015). Todo indica que la dopamina ejerce un papel estimulante sobre el control de la secreción de las gonadotropinas y en la regulación del ciclo estral, pero hasta el momento no existen estudios que muestren la expresión de los receptores de la dopamina a lo largo del ciclo estral y si dicha expresión presenta cambios en función del ambiente hormonal.

El presente trabajo pretende mostrar un panorama general de la expresión del receptor tipo DA1 a lo largo del ciclo estral de la rata y en diferentes momentos de cada uno de esos días, con la finalidad de poder explicar con mayor claridad el efecto de su antagonismo específico sobre las funciones ováricas observadas en nuestros estudios anteriores, incluso cuando el RDA2 es antagonizado.

6. HIPÓTESIS

La inmunoreactividad de los receptores ováricos a la dopamina presentará diferencias a lo largo del ciclo estral de la rata y el antagonismo específico hacia ellos mostrará cambios en su expresión.

7. OBJETIVO GENERAL

Identificar la expresión de los receptores dopaminérgicos tipo DA1 en los compartimentos ováricos de la rata adulta en los diferentes días del ciclo estral y analizar los efectos del bloqueo farmacológico selectivo de estos receptores sobre su expresión.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la expresión del receptor dopaminérgico DA1 en los compartimentos ováricos, así como la expresión de la DARPP-32, en los diferentes días del ciclo estral de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración: diestro-1, diestro-2, proestro y estro (animales cíclicos).
- Medir la concentración de indicadores de estrés oxidativo estimada en los diferentes días del ciclo estral de animales cíclicos y analizar si existe relación entre la expresión del receptor dopaminérgico DA1 y las concentraciones.
- Analizar los efectos de la microinyección de una dosis única de SCH23390 (antagonista selectivo del receptor DA1) dentro de las bursas ováricas, realizada en el Diestro-1 o el Proestro, de ratas adultas cíclicas sobre la expresión del receptor DA1 y la DARPP-32 en los tejidos ováricos hasta la presencia del siguiente estro esperado.
- Comparar los efectos de la microinyección de una dosis única de sulpiride (antagonista selectivo del receptor DA2) dentro de las bursas ováricas, realizada en el Diestro-1 o el Proestro, de ratas adultas cíclicas sobre la expresión del receptor DA1 y la DARPP-32 en los tejidos ováricos hasta la presencia del siguiente estro esperado.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Animales de Experimentación

Se utilizaron 64 ratas hembras adultas de la cepa CII-ZV, con edades de 90-120 días y con peso corporal de 200-250 g, mantenidas en condiciones de iluminación controlada (14 h luz/10 h oscuridad; luces de las 05:00 h a las 19:00 h) y con libre acceso al agua y al alimento balanceado. Con el fin de controlar las fases del ciclo reproductor, se realizaron los registros del ciclo estral por medio de frotis vaginales que se tomaron diariamente entre las 09:00 y las 10:00 h. Una vez que los animales presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración (diestro-1, diestro-2, proestro y estro; ratas cíclicas) fueron distribuidos en cuatro subgrupos: Estro, Diestro-1, Diestro-2 y Proestro (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos de animales a analizar de acuerdo al tratamiento realizado y el grupo control. Se muestra el número de animales para cada subgrupo de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración (Estro, Diestro-1, Diestro-2 y Proestro). En tres diferentes horarios. Utilizados para la identificación de los receptores a dopamina, así como para la DARPP-32.

Horarios	Estro	Diestro-1	Diestro-2	Proestro
08:00	2	2	2	2
14:00	2	2	2	2
20:00	2	2	2	2

En todos los subgrupos, se destinaron animales para el análisis de las concentraciones de *indicadores de estrés oxidativo* (IEOx) en los ovarios. Se realizó la cuantificación de *malondialdehído* (MDA), *4-hidroxi-alquenas* (4-HDA) y *nitritos* (NO₂).

La cuantificación de MDA y 4-HDA se realizó de manera independiente, sin embargo, cabe aclarar que para su análisis, los datos se unificaron en un solo indicador de lipoperoxidación ya que ambos metabolitos se comportan de modo paralelo.

Otros animales con la misma distribución se destinaron para la identificación de los RDA, así como para la DARPP-32 por medio de técnicas de inmunofluorescencia en los ovarios de estos animales; se realizaron cortes histológicos para buscar los

signos de reacción positivos en diferentes compartimentos foliculares: tecas, granulosa y ovocito.

A un grupo de animales cíclicos (Tabla 3) se les realizó una laparotomía bilateral y se les inyectaron 20 μL de una solución de SCH 23390 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de una solución de sulpiride (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a las 14:00 h del Diestro-1 o del Proestro. Como grupo testigo se utilizaron animales cíclicos a los que se les realizó la inyección de los vehículos (NaCl 0.9 % o ácido ascórbico 0.1 N, respectivamente) en los mismos días y horarios. En todos los animales de estos subgrupos se realizó perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4 % en la mañana del estro esperado. Se disecaron los ovarios y se cortaron en criostato a 14 μm de grosor; los cortes fueron procesados para la identificación de los receptores a dopamina: DA1 y DA2, así como para la DARPP-32 por técnica de inmunofluorescencia en los mismos tejidos ováricos de los animales intactos indicados en la Tabla 2.

Tabla 3. Grupos de animales a analizar de acuerdo al tratamiento realizado con el grupo de antagonistas. Se muestra el número de animales para cada subgrupo de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración (Estro, Diestro-1, Diestro-2 y Proestro). Administrados con el antagonista sulpiride o SCH23390 a las 14:00 h. Sacrificados en el estro esperado a las 09:00 h. Utilizados para la identificación de los receptores a dopamina, así como para la DARPP-32.

	sulpiride		SCH 23390	
	Diestro-1	Proestro	Diestro-1	Proestro
Fármaco	2	2	2	2
Vehículo	2	2	2	2

9.2 Indicadores de estrés oxidativo

Para realizar el análisis de los IEOx, subgrupos de animales fueron sedados con vapores de isoflurano, decapitados y desangrados. Se disecaron los ovarios frescos, se pesaron en balanza de precisión de 0.1 mg en frío e inmediatamente fueron fragmentados con tijeras punta fina (40 cortes repetidos) dentro de un tubo eppendorf. Se agregaron 500 μL de PBS 1X y se homogenizaron durante 2 minutos en frío. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 12 000 rpm durante 40

minutos a 4 °C. El sobrenadante fue recogido y resguardado en un vial 300 de µL para el análisis de los IEOx.

9.3 Identificación de los receptores dopaminérgicos

Una vez cumplidos los 3 ciclos estrales consecutivos, se realizó la eutanasia y procedimiento de autopsia general. Entre las 08:00-09:00, 14:00-15:00 o 20:00-21:00h del Diestro-1, Diestro-2, Proestro o Estro, los animales fueron sedados con una dosis letal de pentobarbital sódico (80 mg/100 g de peso corporal; i.p.) y una vez desensibilizados, fueron sometidos a una perfusión intracardiaca con 200 mL aproximadamente de NaCl 0.9 % hasta observar la clarificación de los órganos. Posteriormente se infundió 200 ml de paraformaldehído 4 % en PBS 1X (buffer de fosfatos; fosfato de sodio monobásico 0.1 nM y fosfato de sodio dibásico 0.1 mM, pH 7.4) para la fijación de los tejidos. Finalizada la perfusión, se disecaron los ovarios y se conservaron en una solución de paraformaldehído 4 % a 4 °C hasta su posterior tratamiento de criopreservación.

Los ovarios previamente fijados fueron lavados con PBS por 24 horas a 4° C y posteriormente colocados en frascos con concentraciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30 %), manteniéndolos en inmersión durante 24 horas a 4° C en cada solución, con el fin de prepararlos para el posterior corte histológico en frío.

9.4 Cortes Histológicos

Los órganos previamente criopreservados se cortaron a 14 micras de grosor usando un criostato (Microm-HM 505N) a una temperatura de -20 °C. Los cortes se colocaron en portaobjetos previamente preparados con una película de *silano*: (3-aminopropil) trietoxisilano (Sigma Co.Cat. A-3648).

9.5 Identificación de los receptores a dopamina y DARPP-32 por inmunofluorescencia

Los cortes histológicos de los ovarios fueron adheridos sobre portaobjetos silanizados y lavados con PBS-1X 3 veces por 10 minutos. Posteriormente, los

cortes se permearon con Tritón al 0.5 % en PBS 1X durante 30 minutos, seguido de un tratamiento con peróxido de hidrogeno durante 5 minutos. Se realizaron 2 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tritón-1X al 0.5 %. A continuación, se bloquearon con albúmina sérica de bovino (BSA) libre de IgGs (Sigma) al 10 % en PBS-Tritón-1X al 0.5 % durante 3 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. En la siguiente etapa, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario en cámara húmeda durante 72 horas a 4 °C. Los anticuerpos que se utilizaron en este estudio fueron anti-DARPP32 (Santa Cruz Biotechnology) (1:100) y, por separado, anti-DA1 (Santa Cruz Biotechnology) (1:100) y anti-DA2 (Santa Cruz Biotechnology) (1:100). Para la inmunodetección indirecta se utilizó un anticuerpo secundario bioespecífico conjugado con fluoresceína 5-isotiocianato (FITC 1:400), durante una hora a 4 °C en cámara húmeda y se protegieron de la luz y Rodamina (1:400) para los DA1R. Finalmente, las preparaciones fueron montadas con medio Vecta-Shield conjugado con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; un intercalador de ácidos nucleicos) en cuarto oscuro. La observación y el análisis de la inmunorreactividad se realizó en un microscopio Olympus BX41 acoplado a una lámpara de fluorescencia y con los filtros azul y verde. El registro de las imágenes observadas se llevó a cabo con una cámara digital DFC-300 FX acoplada al microscopio con el objetivo 40X. Las fotomicrografías fueron obtenidas con ayuda del software *Image-ProPlus 6.3* (Media Cybernetics), se almacenaron en formato *JPG* para su posterior análisis cuantitativo de la inmunorreactividad en las células de los diferentes compartimentos ováricos.

Con las mismas condiciones que en los grupos intactos. Se identificó el ciclo estral regular y posteriormente se utilizó para el análisis de la administración de los antagonistas específicos para los receptores a dopamina, cumplidos los tres ciclos consecutivo, en el Diestro-1 o del día del Proestro a las 14:00 h fueron sedadas con vapores de éter halogenado de *isoflurano* (Sofloran-Vet; PiSA Agropecuaria) para ser sometidos a una laparotomía bilateral y exteriorizar los ovarios; cada ovario fue sujetado con pinza quirúrgica de la bursa ovárica y se realiza una técnica de microinyección de 20 µL de solución con sulpiride o SCH23390 de la

siguiente forma: 1) SCH23390 (5 mg/mL; Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA; Vehículo: NaCl 0.9 %). 2) sulpiride (10 mg/mL; Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA; Vehículo: ácido ascórbico 0.1 % + 1 gota de ácido acético glacial), con una jeringa Hamilton.

La microinyección se realizó con una bomba de perfusión nanomolar a una velocidad de 2.12 μ L/seg, hasta infiltrar 20 μ L de la solución, seguida de 60 segundos de reposo antes de retirar de la bursa la aguja del microinyector. Los grupos testigo se sometieron al mismo procedimiento y recibieron 20 μ L de sus respectivos vehículos. Una vez realizada la microinyección, se limpió el campo quirúrgico con solución antiséptica de solución de clorhexidina 2 % y se devolvió el órgano a la cavidad peritoneal. Las heridas fueron suturadas con seda quirúrgica #000 y finalmente, sobre cada herida suturada se depositó una solución de sulfato de plata en spray como cicatrizante.

Todos los animales con la microinyección de los antagonistas dopaminérgicos fueron sometidos al mismo tratamiento de perfusión y fijación intracardiaca que los grupos de animales intactos cíclicos, pero ellos se sacrificaron en la mañana del estro esperado.

9.6 Análisis Estadístico

La marca positiva de inmunorreactividad a DARPP-32 y al receptor DA1 en los tejidos ováricos, se cuantifico de acuerdo con la intensidad y a la ubicación en los cortes histológicos. La medición de la marca se realizó por cuantificación de píxeles en el área, con el programa Icy copyright 2017; para posteriormente realizar una ANOVA seguida de la prueba Tukey-Kramer Se considerarán estadísticamente significativas aquellas diferencias iguales o menores a $p < 0.05$.

10. RESULTADOS

10.1 Identificación de los receptores DA1 por inmunofluorescencia

El análisis por inmunofluorescencia mostró que el RDA1 se expresó en todos los días del ciclo estral (Figuras 20 y 21); sin embargo, existe una clara diferencia que depende del día e incluso de la hora, en que se identificó su presencia en folículos medianos, principalmente en las células de la teca y en menor grado en las células de la granulosa (Figuras 17, 18 y 19).

La Figura 17 muestra el patrón rítmico en la expresión del RDA1 a lo largo del ciclo estral de la rata, donde se puede observar una expresión máxima del receptor en el día del Estro en la rata adulta con ciclos estrales regulares de cuatro días duración.

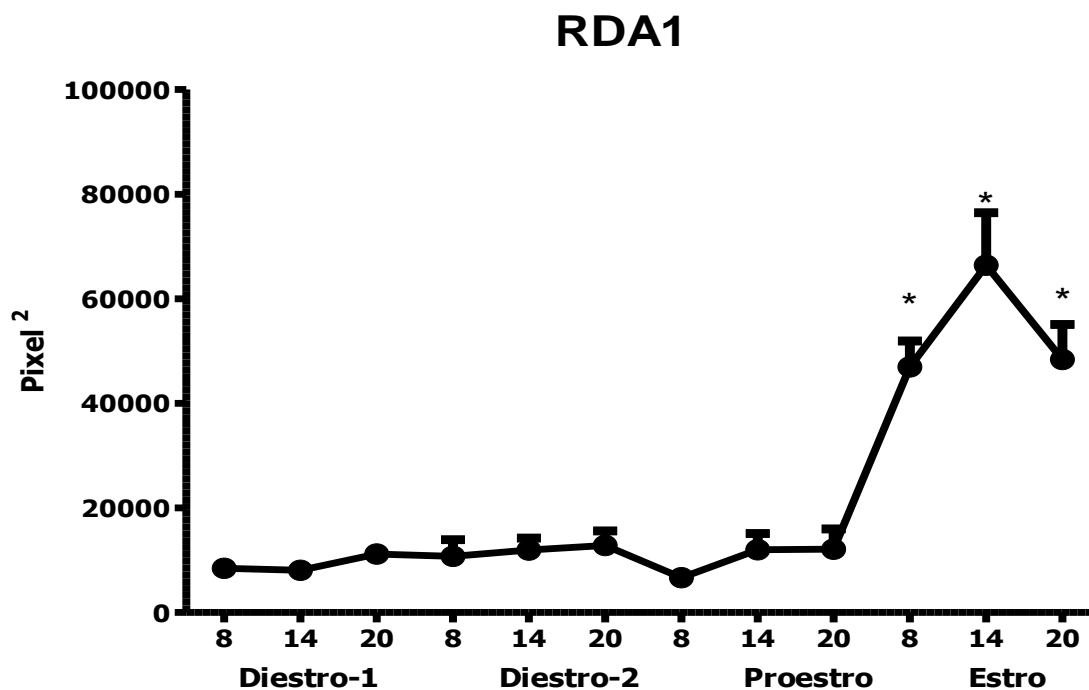


Figura 17. Expresión del receptor RDA1. Se muestra el \pm e.e.m. a las 08:00, 14:00 y 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral obtenida en los ovarios de ratas adultas intactas con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro). El histograma muestra cuantificación promedio en pixeles cuadrados (* $p < 0.01$ comparado con los otros días del ciclo estral; Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

El análisis global del conteo del inmunomarcaje positivo al RDA1 mostró claras diferencias entre los horarios del Estro respecto a los otros días del ciclo, donde la

cantidad de marca fue notablemente mayor en este día del ciclo (Estro: 55210 ± 4781 vs otros días del Ciclo Estral: 30984 ± 4051 , $p < 0.01$; t de Student) (Figura 18).

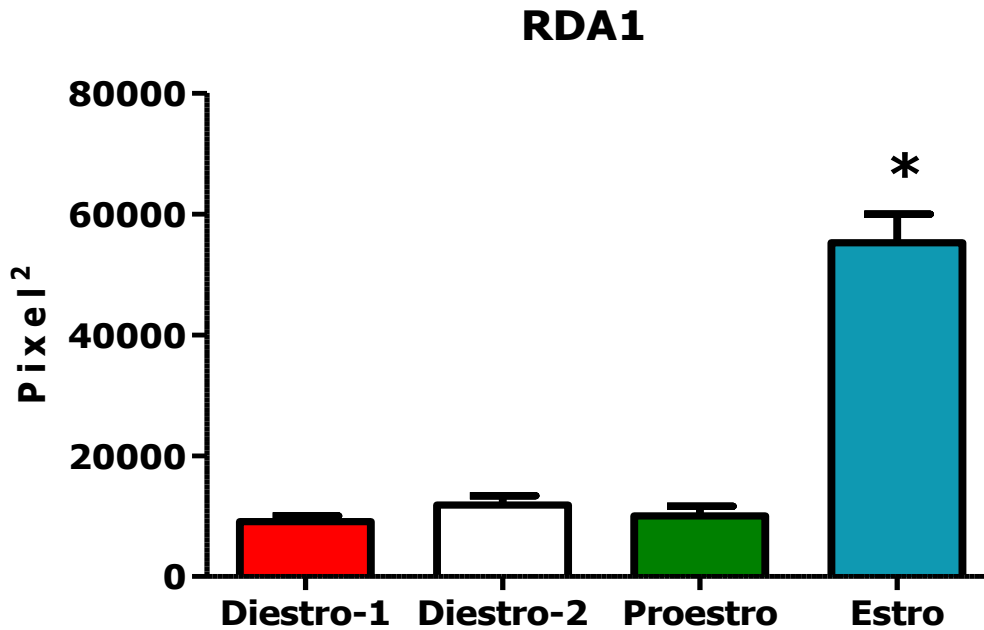


Figura 18. Cuantificación global del receptor RDA1. Se grafica el \pm e.e.m. en los diferentes días del ciclo estral en los ovarios de ratas adultas intactas con ciclos estrales regulares de cuatro días (D1: Diestro-1; D2: Diestro-2; P: Proestro y E:Estro). Las barras muestran el conteo de marca inmunopositiva al receptor estimada en pixeles cuadrados ($*p < 0.001$ comparado con los otros días del ciclo estral; Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

Este rasgo se mantuvo, independientemente de la hora en que se realizó el conteo de la marca del receptor (Figura 19).

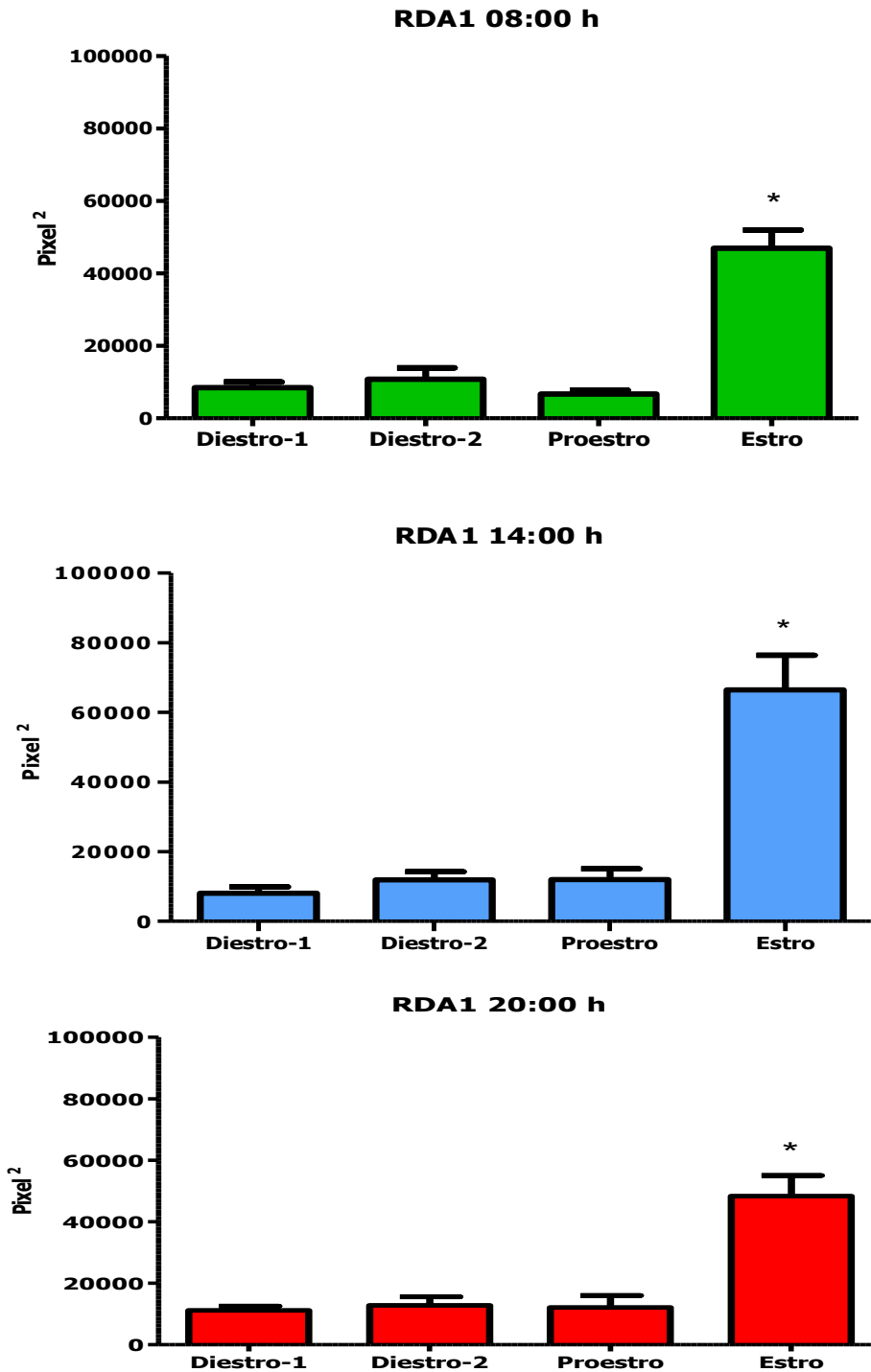


Figura 19. Cuantificación global del receptor RDA1 en tres horarios Se muestra el \pm e.e.m. a las 08:00, 14:00 y 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral en los ovarios de ratas adultas intactas con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro). Las barras muestran el conteo de marca inmunopositiva al receptor estimada en pixeles cuadrados (* $p < 0.01$ comparado con los otros días del ciclo estral; Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

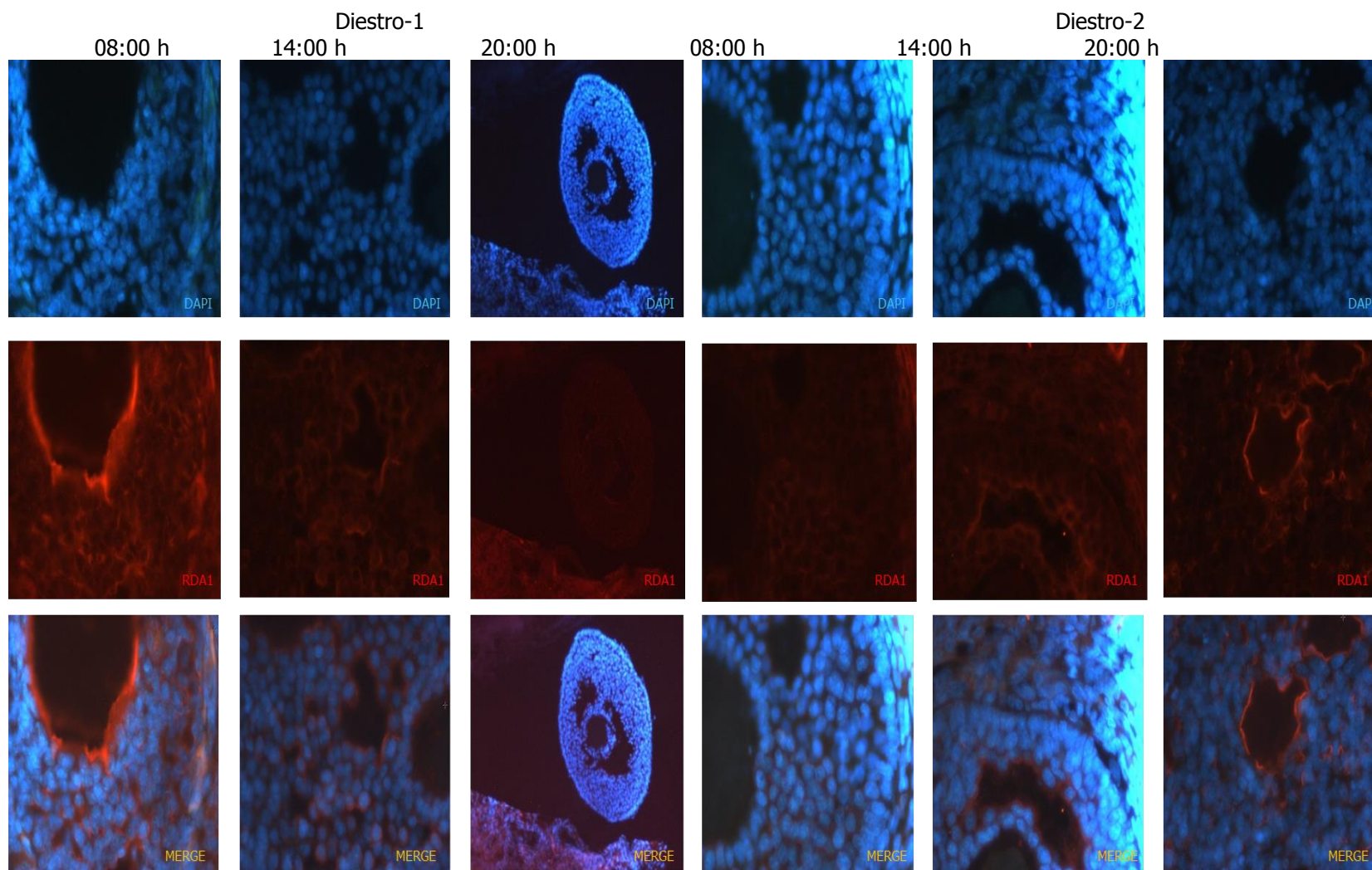


Figura 20. Inmunofluorescencia del receptor RDA1 observada en los cortes histológicos a 40X de los ovarios de ratas adultas intactas, con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diastro-1, Diastro-2, Proestro y Estro). En las imágenes se muestran datos de animales en los días del Diastro-1 y del Diastro-2, a las 08:00, 14:00 y 20:00 h.

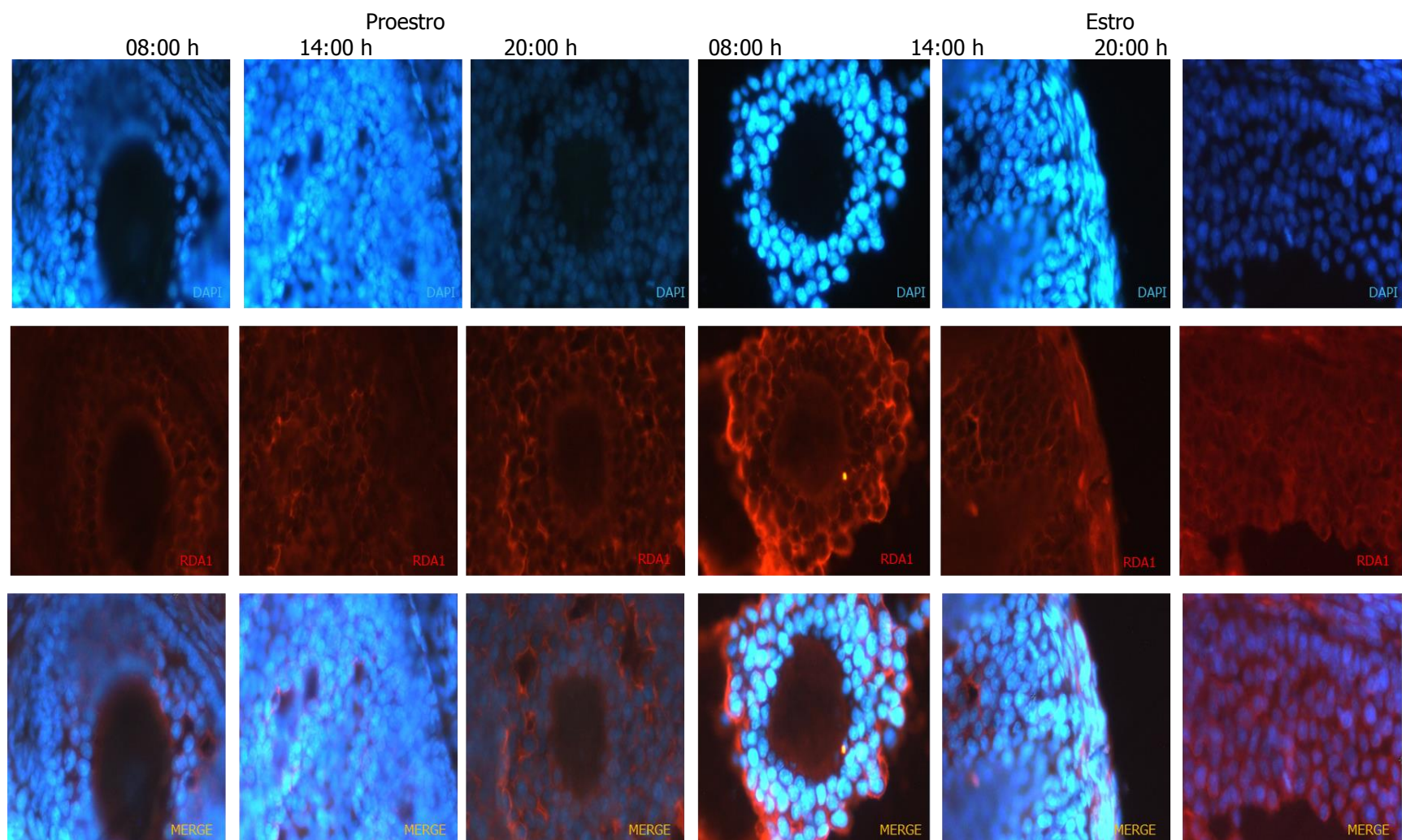


Figura 21. Inmunofluorescencia del receptor DAR1 observada en los cortes histológicos a 40X de los ovarios de ratas adultas intactas, con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro). En las imágenes se muestran datos de animales en los días del Proestro y del Estro, a las 08:00, 14:00 y 20:00 h.

10.2 Identificación de DARPP-32 por inmunofluorescencia

El análisis por inmunofluorescencia mostró que la DARPP-32 también se expresó en todos los días del ciclo estral (Figuras 25 y 26) y al igual que el RDA1, también la proteína tiende a expresarse con mayor claridad en el día del estro independientemente de la hora en la que se realizó la medición (Figuras 22, 23 y 24).

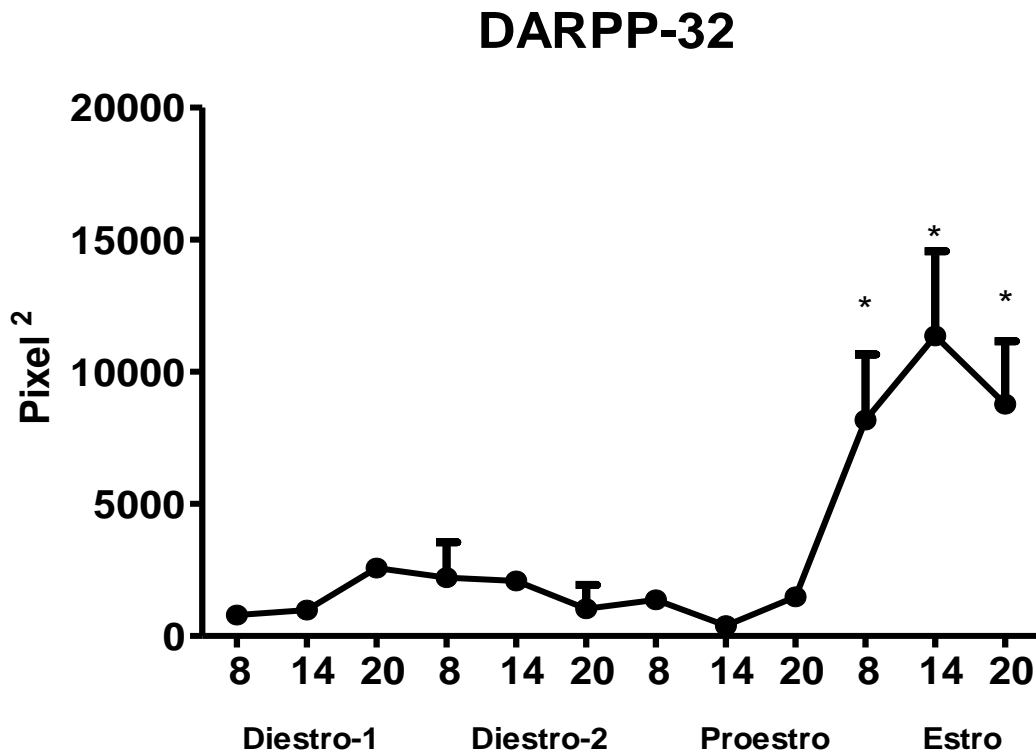


Figura 22. Expresión de la DARPP-32. La cuantificación de la DARPP-32 \pm e.e.m. obtenida de los ovarios de ratas adultas intactas, con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro). Los datos se muestran en pixel² y se cuantificaron a las 08:00, 14:00 y 20:00 horas (* $p < 0.05$ comparado con los otros días del ciclo estral; Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

De igual forma, el análisis global del conteo del inmunomarcaje positivo a la DARPP-32 mostró claras diferencias entre los horarios del Estro respecto a los otros días del ciclo, donde la cantidad de marca fue notablemente mayor en este día del ciclo (Estro: 10022.59 ± 1864.3 vs otros días del ciclo estral: 4318 ± 361.67 , $p < 0.001$; t de Student) (Figura 23).

DARPP-32

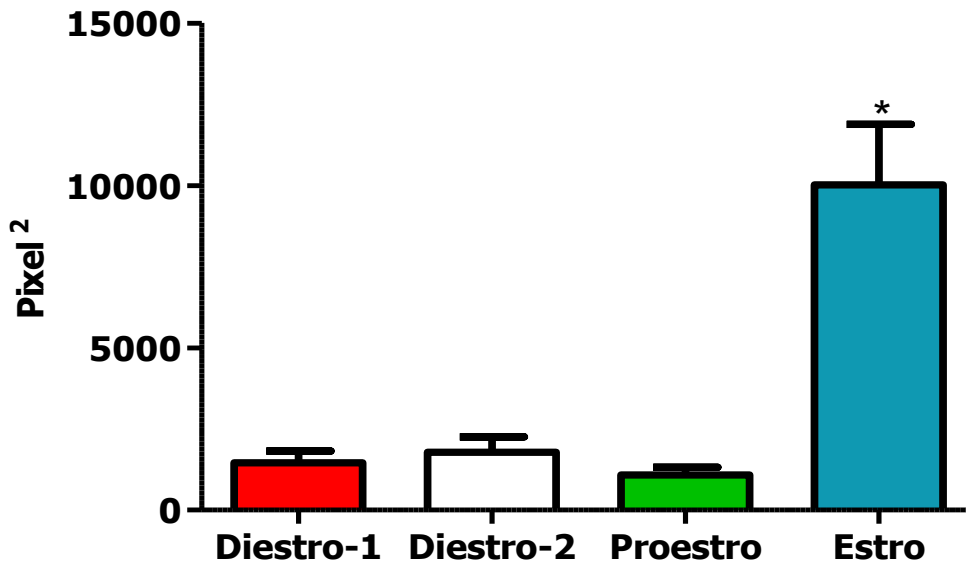


Figura 23. Cuantificación global de la DARPP-32. Se muestra el \pm e.e.m. en los diferentes días del ciclo estral en los ovarios de ratas adultas intactas con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro). Las barras muestran el conteo de marca inmunopositiva al receptor estimada en pixeles cuadrados (* $p < 0.001$ comparado con los otros días del ciclo estral; Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

En la Figura 24, se muestra el comportamiento de la expresión de la DARPP-32 en los tres diferentes horarios, donde las diferencias están claramente marcadas en los horarios del día del Estro, pero no entre los otros días del ciclo estral.

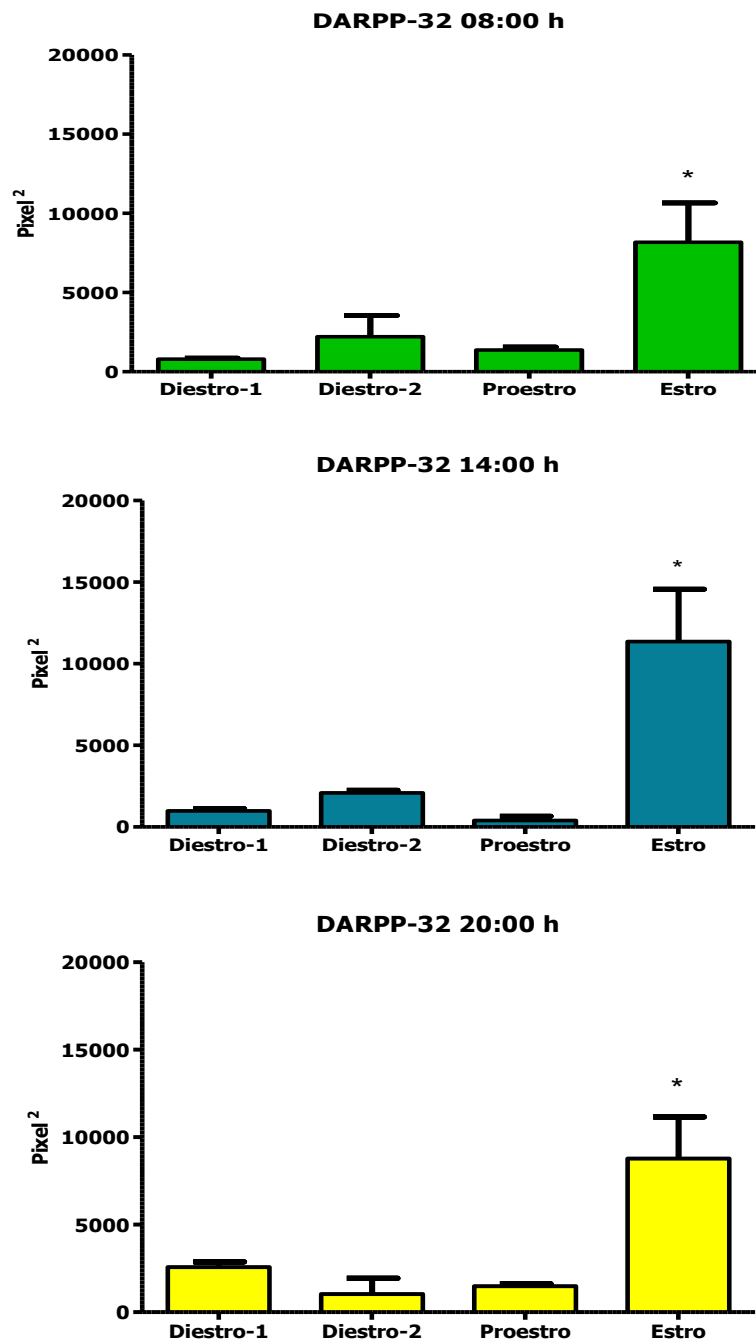


Figura 24. Cuantificación de la DARPP-32 en tres horarios. Se muestra el \pm e.e.m. obtenida de los ovarios de ratas adultas intactas, con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro). Las barras se muestran en pixel² y se cuantificaron a las 08:00, 14:00 y 20:00 horas. ANOVA seguida de la prueba Tukey-Kramer (* $p < 0.01$ comparado con los otros días del ciclo; Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

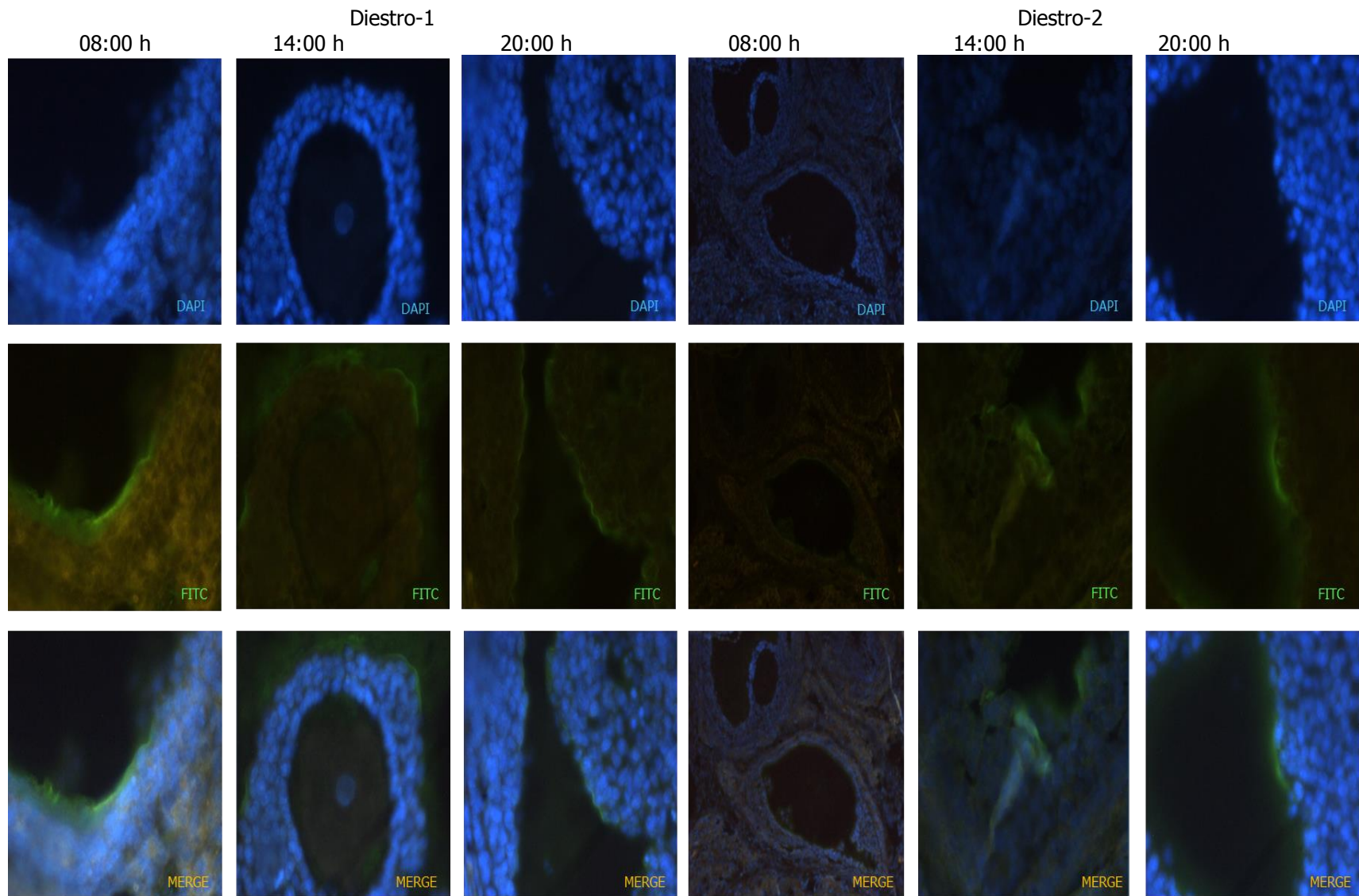


Figura 25. Inmunofluorescencia de la proteína DARPP-32 observada en los cortes histológicos a 40X de los ovarios de ratas adultas intactas, con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro). En las imágenes se muestran datos de animales en los días del Diestro-1 y del Diestro-2, a las 08:00, 14:00 y 20:00 h.

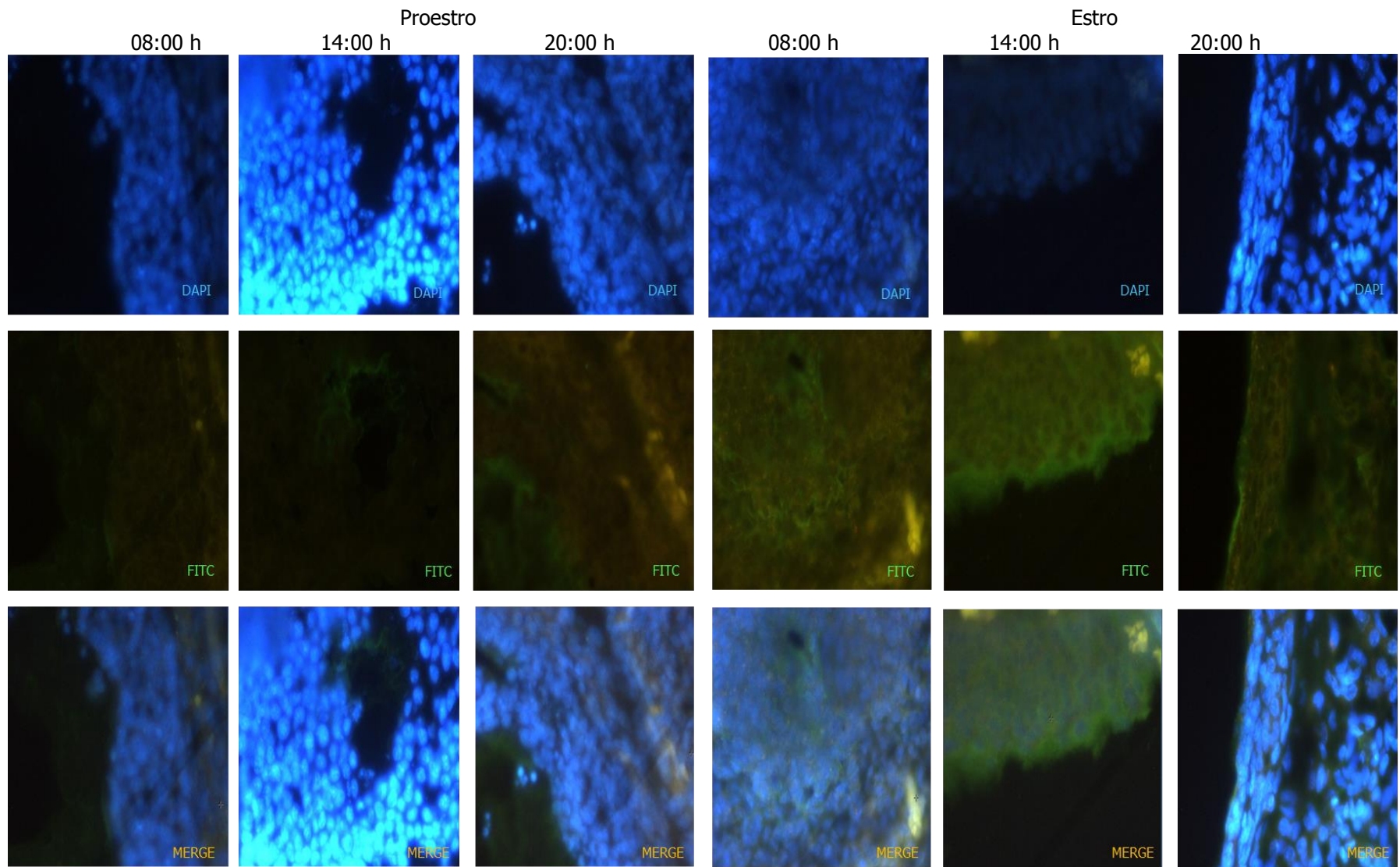


Figura 26. Inmunofluorescencia del receptor RDA1 observada en los cortes histológicos a 40X de los ovarios de ratas adultas intactas, con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro). En las imágenes se muestran datos de animales en los días del Proestro y del Estro, a las 08:00, 14:00 y 20:00 h.

10.3 Análisis de indicadores de estrés oxidativo

El análisis de los indicadores de estrés oxidativo a lo largo del ciclo estral en el ovario fue realizado con el propósito de tener un panorama relativamente completo de los cambios que ocurren en la generación de estas señales intracelulares y su posible relación con la ovulación espontánea en animales cíclicos intactos. El análisis estadístico de las concentraciones de los indicadores de estrés oxidativo fue semejante entre el ovario izquierdo y el derecho de cada subgrupo, por lo que se decidió reunir esos datos en uno solo en los diferentes horarios de los días del ciclo estral.

En la Figuras 27 y 30 se muestra un claro comportamiento fluctuante en la expresión de los indicadores de estrés oxidativo a lo largo del ciclo estral. En la tarde del Diestro-2, se observó un pico en la concentración de los indicadores de lipoperoxidación, que no se observó en otros momentos del ciclo estral (Figura 27). En tanto, la concentración de nitritos mostró comportamientos muy variables a lo largo del ciclo estral y en cada día del ciclo, es decir, cambios aparentemente circádicos notablemente diferentes, que a lo largo del Proestro son los más evidentes, respecto a los otros días del ciclo (Figura 27).

Es notable que a las 20:00 h de los diferentes días del ciclo estral, los indicadores de estrés oxidativo mostraron invariablemente valores cercanos a cero o ausencia total (Figuras 27 y 30).

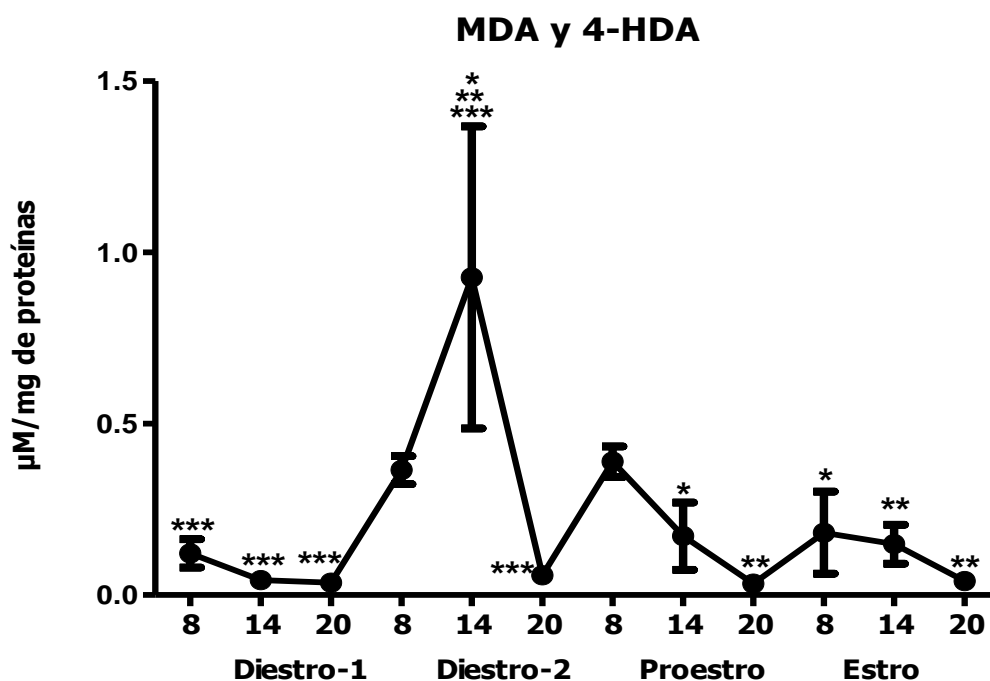


Figura 27. Concentraciones de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenes (4-HDA). Se grafica el \pm e.e.m. en homogenados frescos de los ovarios obtenidos de ratas adultas con ciclo estrales regulares de cuatro días (D1: Diestro-1; D2: Diestro-2; P: Proestro y E: Estro). El perfil se obtuvo del muestreo a las 8:00, 14:00 y 20:00 a lo largo del ciclo estral. Las unidades se expresan en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína (* $p < 0.05$: D2-14 vs P-14 y D2-14 vs E-8; ** $p < 0.01$: D2-14 vs P-20; D2-14 vs E-14 y D2-14 vs E-20; *** $p < 0.001$ D-1-8 vs D2-14; D1-14 vs D2-14; D1-20 vs D2-14 y D2-14 vs D2-20; ANOVA seguida de la prueba Tukey-Kramer).

Como se observa en la figura anterior, la generación de indicadores de lipoperoxidación es mayor en el día del Diestro-2 y desciende gradualmente a valores mínimos hasta el Diestro-1 (Figura 28). Sin embargo, los cambios significativos dependen de la hora, ya que a las 14:00 h del Diestro-2 ocurren los principales cambios (Figura 29).

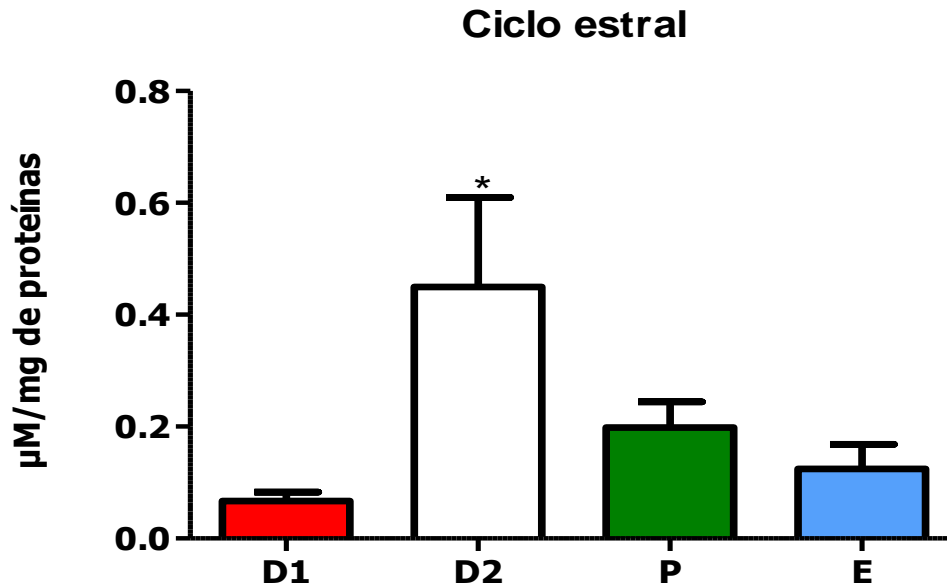


Figura 28. Concentración global de malondialdehído (MDA). Se grafica el \pm e.e.m. y 4-hidroxialquenoales (4-HDA) \pm e.e.m. en los homogenados frescos de los ovarios obtenidos de ratas adultas con ciclo estrales regulares de cuatro días (D1: Diestro-1; D2: Diestro-2; P: Proestro y E: Estro). El perfil se obtuvo del muestreo a lo largo del ciclo estral. Las unidades se expresan en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína (* $p < 0.05$ comparado con D1 y E; ANOVA seguida de la prueba Tukey-Kramer).

En cuanto a la concentración de nitritos y sus fluctuaciones a lo largo del ciclo estral (Figura 30), las diferencias observadas se encuentran marcadas y desplazadas hacia el día del Proestro, ya que en este día del ciclo la concentración de nitritos fue mayor respecto al día del Diestro-1, día en donde se detectaron concentraciones promedio menores (Figura 31).

Al analizar estas fluctuaciones en la concentración de los nitritos de acuerdo con la hora del día, hubo un claro incremento en la producción de nitritos a las 08:00h respecto a lo que ocurre a las 14:00 y 20:00 h (Figura 32).

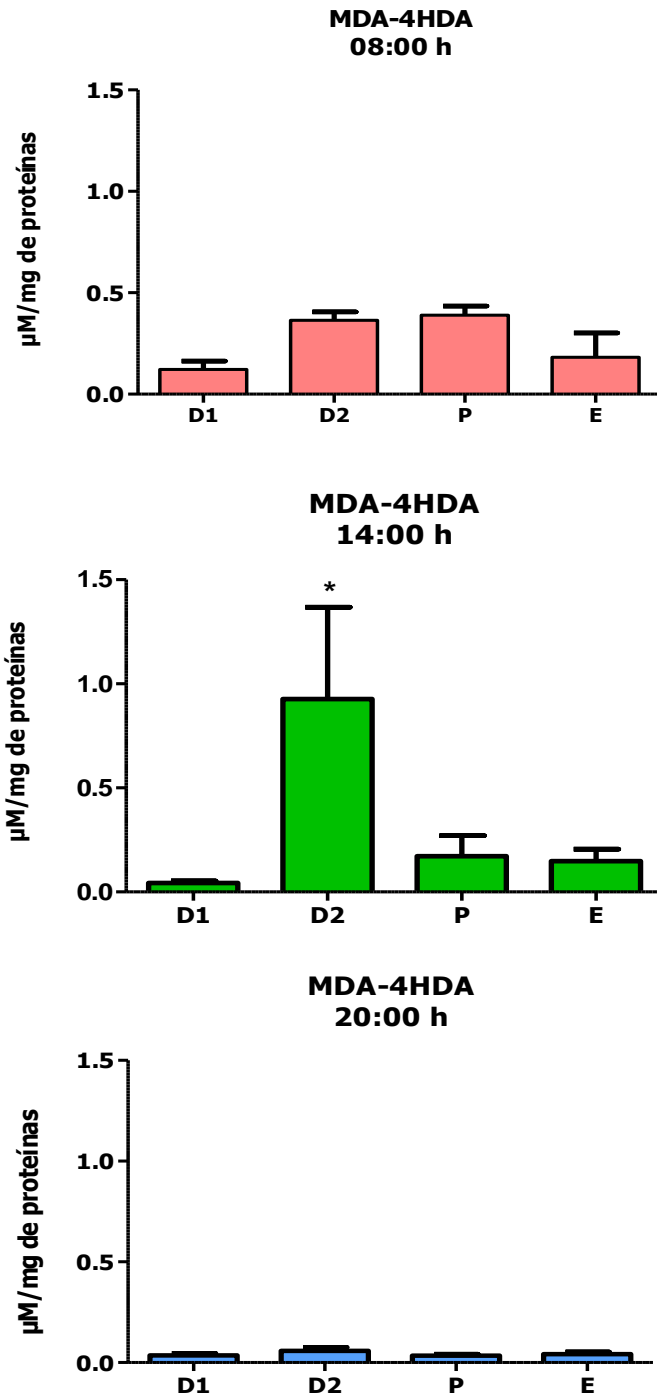


Figura 29. Concentraciones de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenoales (4-HDA) en tres horarios. Se grafica el \pm e.e.m. en homogenados frescos de los ovarios obtenidos de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (D1: Diestro-1; D2: Diestro-2; P: Proestro y E: Estro). El perfil se obtuvo del muestreo a las 08:00, 14:00 y 20:00 h a lo largo del ciclo estral. Las unidades se expresan en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína (* $p < 0.05$ comparado con D1; ANOVA seguida de la prueba Tukey-Kramer).

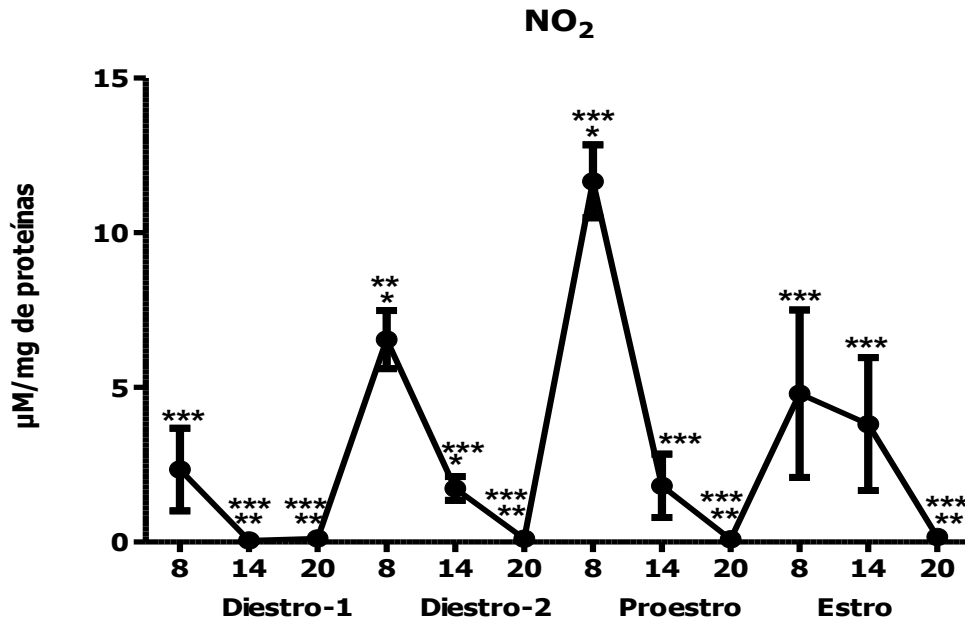


Figura 30. Concentraciones de nitritos (NO₂). Se grafica el ± e.e.m. en homogenados de los ovarios frescos obtenidos de ratas adultas con ciclo estrales regulares de cuatro días (D1: Diestro-1; D2: Diestro-2; P: Proestro y E: Estro). El perfil se obtuvo del muestreo a las 8:00, 14:00 y 20:00h a lo largo del ciclo estral. Las unidades se expresan en µM/mg de proteína. (*p<0.05 D2-8 vs D2-14 y D2-8 vs P-8; ** p<0.01 D1-14 vs D2-8; D1-20 vs D2-8; D2-8 vs D2-20; D2-8 vs P-20 y D2-8 vs E-20; ***p<0.001 D1-8 vs P-8; D1-14 vs P-8; D1-20 vs P-8; D2-14 vs P-8; D2-20 vs P-8; P-8 vs P-14; P-8 vs P-20; P-8 vs E-8; P-8 vs E-14 y P-8 vs E-20; ANOVA seguida de la prueba Tukey-Kramer).

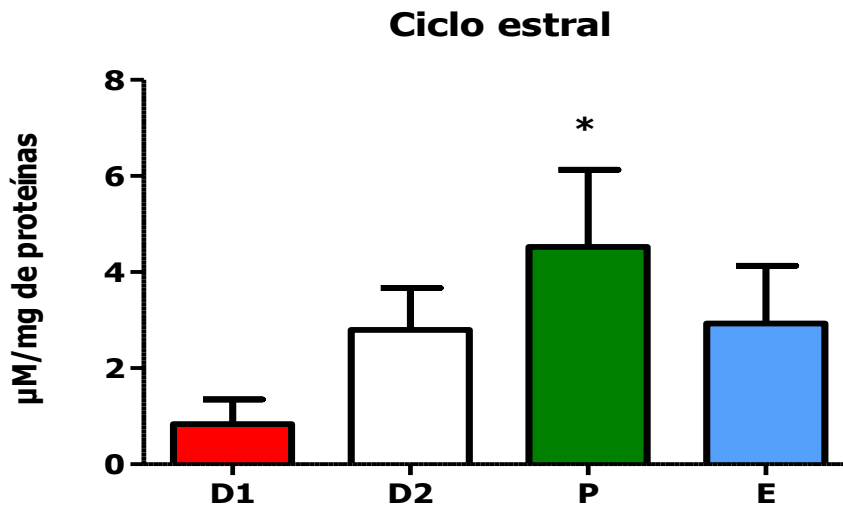


Figura 31. Concentraciones de nitritos (NO₂) global. Se grafica el ± e.e.m. en homogenados de los ovarios frescos obtenidos de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (D1: Diestro-1; D2: Diestro-2; P: Proestro y E: Estro). El perfil se obtuvo del muestreo a las 8:00, 14:00 y 20:00h a lo largo del ciclo estral. Las unidades se expresan en µM/mg de proteína (*p<0.01: P vs D1; ANOVA seguida de la prueba Tukey-Kramer).

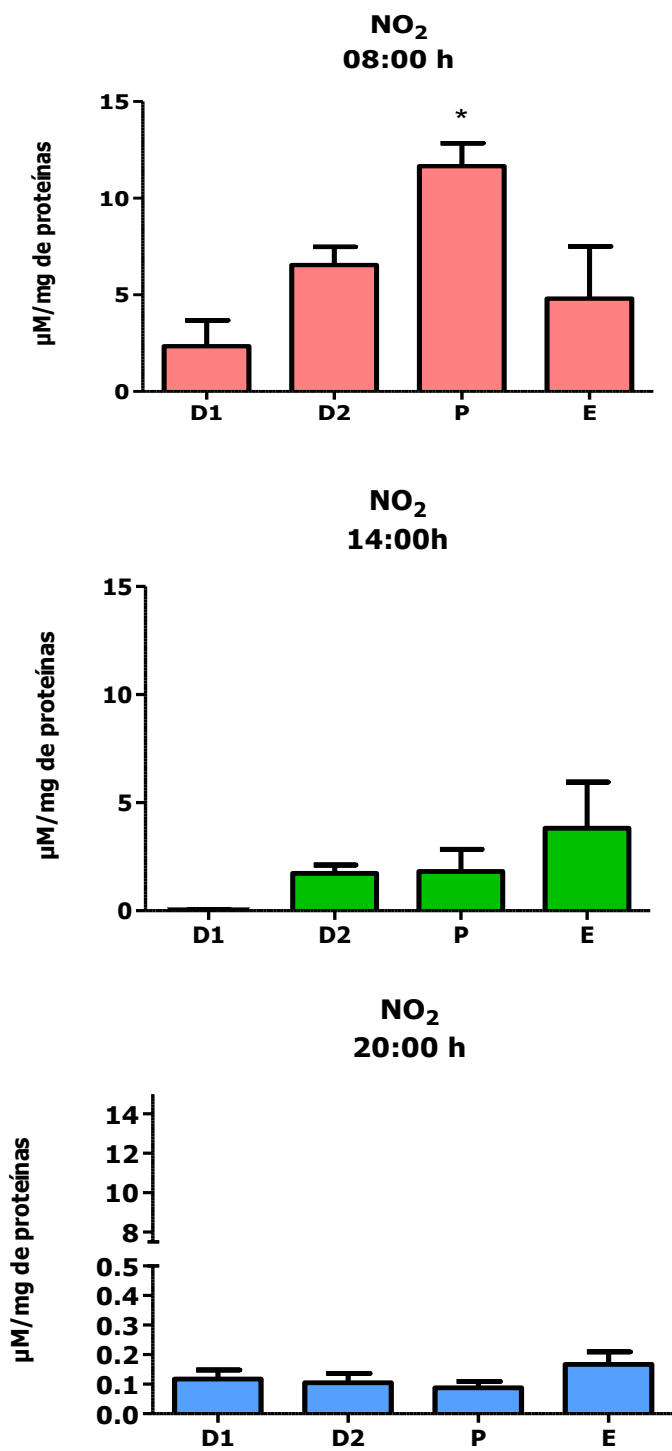


Figura 32. Concentraciones de nitritos (NO₂) en tres horarios. Se grafica el \pm e.e.m. en homogenados de los ovarios frescos obtenidos de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (D1: Diestro-1; D2: Diestro-2; P: Proestro y E: Estro). El perfil se obtuvo del muestreo a las 8:00, 14:00 y 20:00 h a lo largo del ciclo estral. Las unidades se expresan en $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína (* $p < 0.01$ comparado con D1; ANOVA seguida de la prueba Tukey-Kramer).

10.4 Identificación de RDA1 por inmunofluorescencia en grupos con administración de antagonistas específicos del receptor

En la Figura 34 se muestra la inmunofluorescencia para el RDA1 después del antagonismo específico con sulpiride o SCH23390 a las 14:00 h del día del Diestro-1 o Proestro. Se observa que existe un marcaje mayor en los animales tratados con los antagonistas en el Proestro y menor en los tratados en Diestro-1.

Al analizar el conteo de la marca inmunopositiva se observó que el tratamiento con sulpiride en el día del Proestro indujo una disminución en la expresión del receptor respecto al grupo de animales intactos (control), lo que no ocurrió por el tratamiento con SCH23390 en este día. En cambio, la microinyección con los antagonistas en el Diestro-1 es significativamente menor respecto al control y a los tratamientos en el día del Proestro (Figura 33).

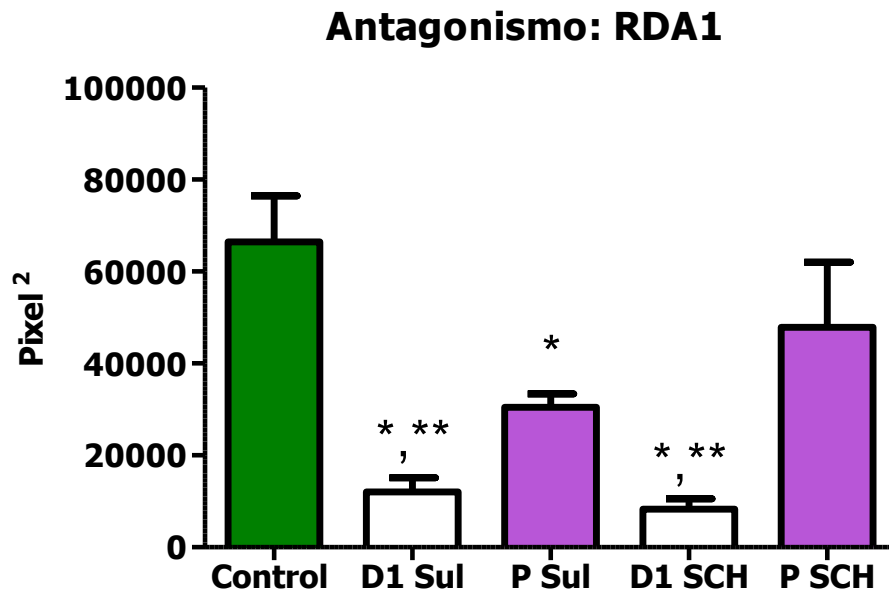


Figura 33. Expresión del receptor RDA1 posteriormente a la administración de los antagonistas. Cuantificación en píxeles^2 del receptor RDA1 \pm e.e.m. luego de la administración de antagonistas específicos de los receptores a dopamina en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días y que se sacrificaron en la mañana del estró esperado, luego de la microinyección con $20 \mu\text{L}$ de solución de SCH23390 (5 mg/ml) o sulpiride (10 mg/ml) dentro de las bursas ováricas, a las 14:00 h del Diestro-1 (D1) o Proestro (P) (* $p < 0.001$ comparado con el grupo Control; ** $p < 0.05$ comparado con los tratamientos en Proestro; Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

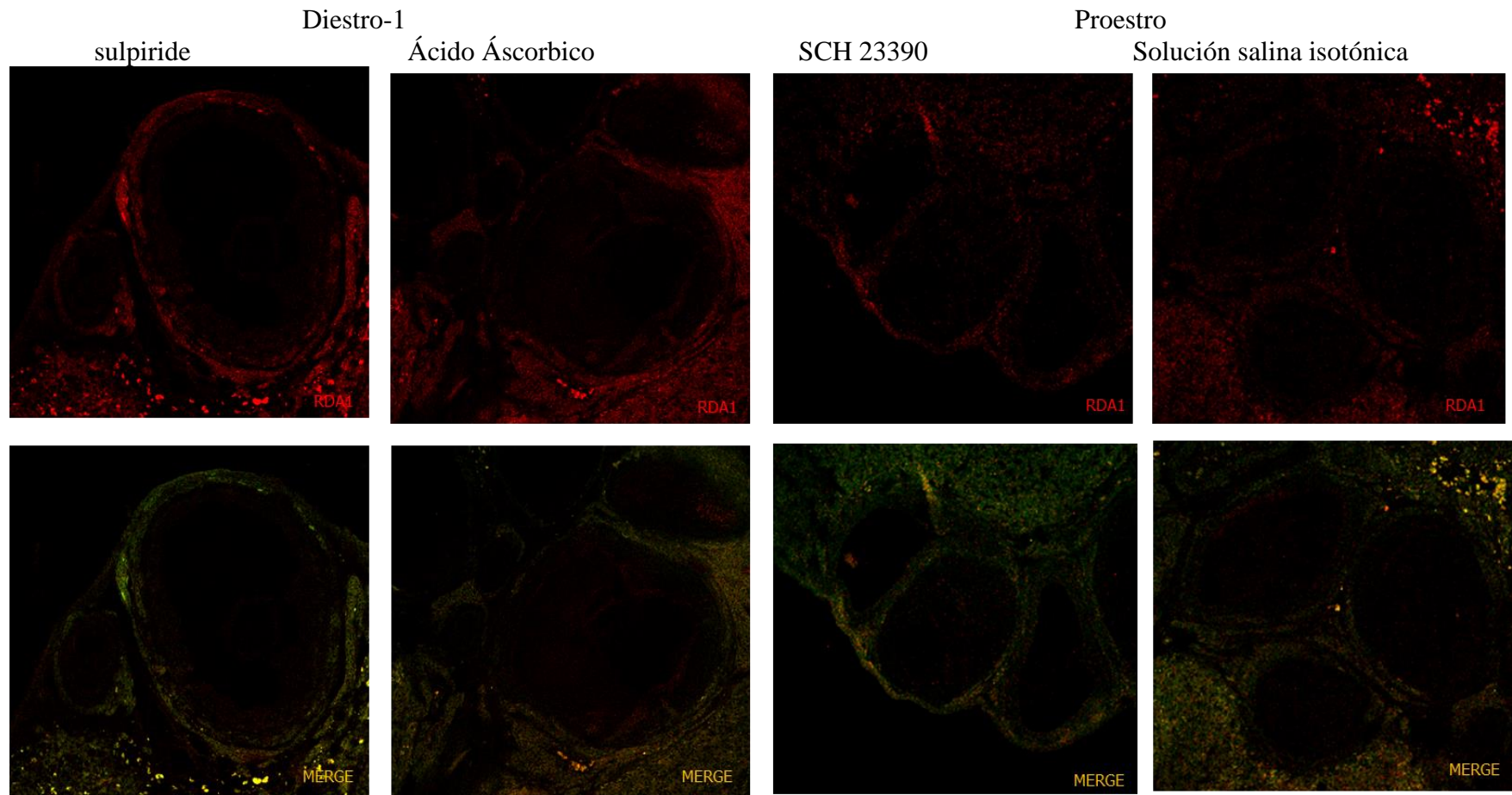


Figura 34. Inmunofluorescencia del receptor RDA1 observada en los cortes histológicos a 10X de los ovarios de ratas adultas intactas, con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro) posteriormente administradas con un antagonista específico sulpiride y SCH 23390, en Diestro-1 y Proestro a las 14 h. En las imágenes se muestran datos de animales sacrificados en el Estro esperado a las 09:00h.

10.5 Identificación de DARPP-32 por inmunofluorescencia en grupos con administración de antagonistas específicos del receptor

En la Figura 36 se muestra la inmunofluorescencia para la DARPP-32 después del antagonismo específico con sulpiride o SCH23390 a las 14:00 h del día del Diestro-1 o Proestro. Se observa que existe un marcaje mayor en los animales tratados con los antagonistas en el proestro y menor en los tratados en Diestro-1.

La cuantificación de la marca inmunopositiva es estadísticamente mayor en los grupos tratados en Proestro respecto a los que recibieron la microinyección en Diestro-1 y el grupo de animales intactos (Figura 35).

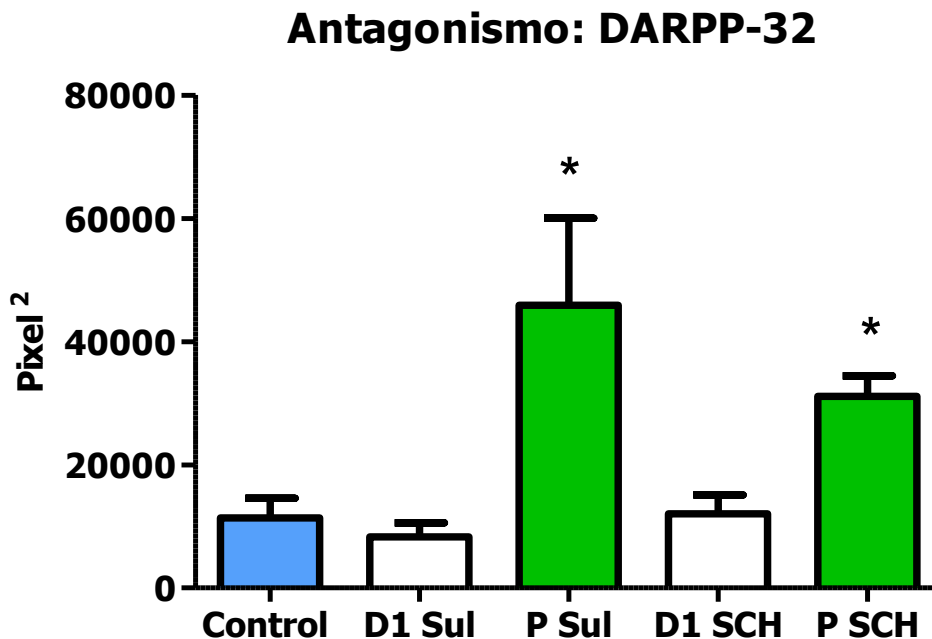


Figura 35. Expresión de la DARPP-32 posteriormente a la administración de los antagonistas. Cuantificación en pixeles² de la proteína DARPP-32 \pm e.e.m. luego de la administración de antagonistas específicos de los receptores a dopamina en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días y que se sacrificaron en la mañana del estro esperado, luego de la microinyección con 20 μ L de solución de SCH23390 (5 mg/ml) o sulpiride (10 mg/ml) dentro de las bursas ováricas, a las 14:00 h del Diestro-1 (D1) o Proestro (P) (* $p < 0.05$ comparado con el tratamiento en Diestro-1; Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

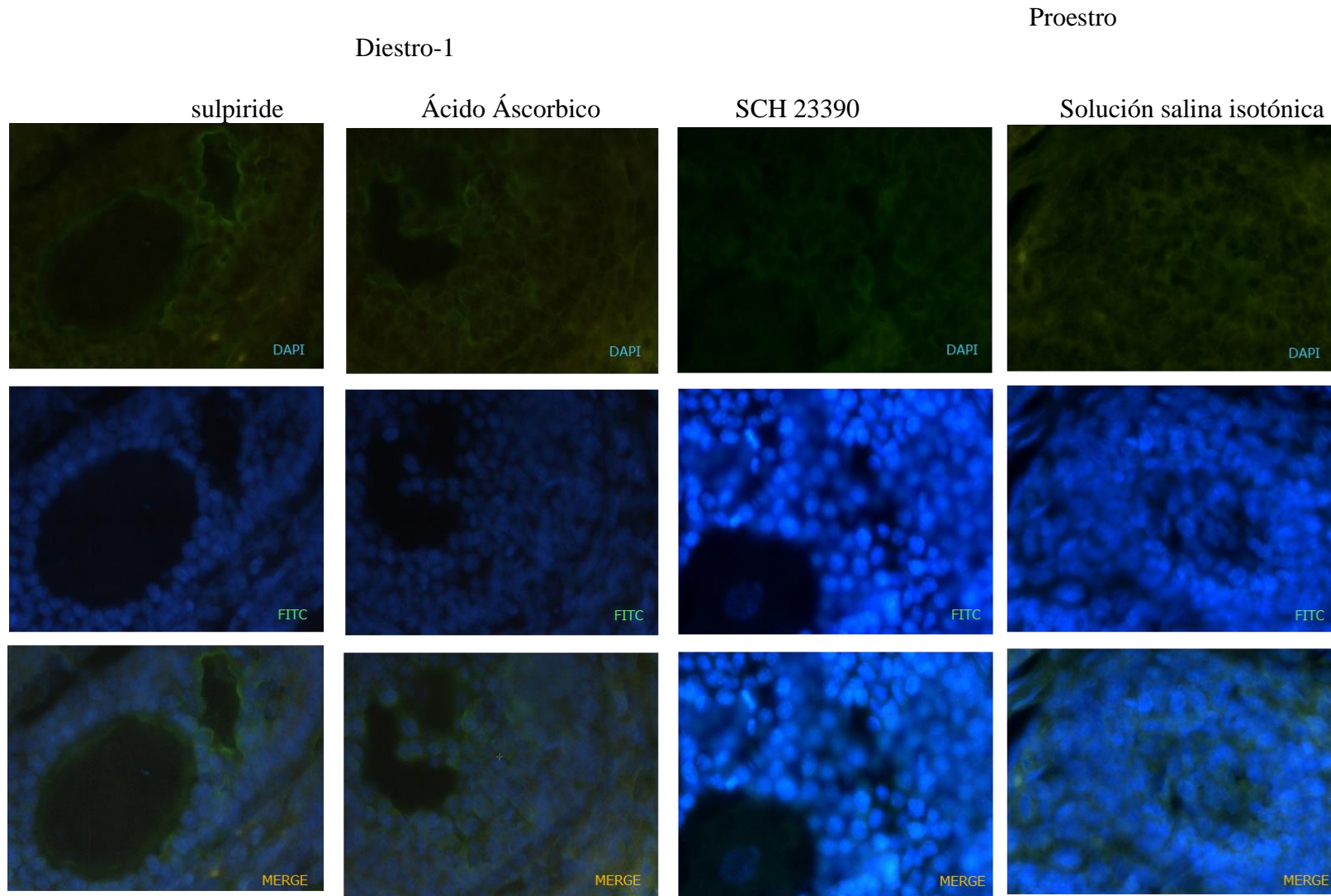


Figura 36. Inmunofluorescencia de la proteína DARPP-32 observada en los cortes histológicos a 10X de los ovarios de ratas adultas intactas, con ciclos estrales regulares de cuatro días (Diestro-1, Diestro-2, Proestro y Estro) posteriormente administradas con un antagonista específico Sulpiride y SCH 23390, en Diestro-1 y Proestro a las 14 h. En las imágenes se muestran datos de animales sacrificados en el Estro esperado a las 09:00h.

11. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio mostraron de manera consistente que la expresión del RDA1 y de la proteína DARPP-32 varía durante el ciclo estral pero que se presentan los mayores índices en el día del Estro. Por otra parte, se observó un comportamiento fluctuante y de tipo circádico en la producción de indicadores de estrés oxidativo a lo largo el ciclo estral de la rata adulta. Tanto los indicadores de lipoperoxidación como los nitritos mostraron cambios dinámicos a lo largo de cada uno de los días del ciclo estral, lo cual pone de manifiesto la intensa actividad ovárica para que las principales funciones de la gónada: la secreción de esteroides sexuales y la ovulación, ocurran de manera sistemática y cíclica.

11.1 Identificación del receptor dopaminérgico 1 y de la DARPP-32, en los diferentes días del ciclo estral

En la rata adulta con ciclos estrales de cuatro días de duración, la expresión del receptor RDA1 mostró un patrón rítmico donde la máxima marca del receptor ocurre a lo largo del día del Estro, principalmente en las células de la teca folicular. Prácticamente, la expresión del receptor RDA1 se mantiene baja pero constante hasta la mañana del día del Estro, cuando ocurre un ascenso súbito a lo largo del día, que probablemente se inicia desde la noche del Proestro, alcanza un pico en la tarde y comienza a descender hacia la noche hasta alcanzar la mínima expresión a partir del Diestro-1.

Se ha descrito que el papel de los receptores a la dopamina es importante para que el ciclo estral ocurra de manera normal y se sincronice con la ovulación, que es una de las principales funciones del ovario. Cuando se bloquearon los receptores DA1 con SCH23390 en la mañana y en la noche del Diestro-1, el ciclo estral se desfasó y la ovulación no ocurrió en la mañana del estro esperado (Venegas et al, 2015); En otro trabajo, se ha mostrado que el bloqueo específico del RDA1 retarda la ovulación 24 horas (Guzmán-Herrera, 2018), del mismo modo que ocurre al antagonizar al RDA2 con sulpiride (Letras *et al*, 2016). Estos resultados indican que los receptores a la dopamina presentes en el ovario son

esenciales para que el ciclo estral se regule, ocurran las señales ováricas mediadas por la dopamina que a su vez controlan el funcionamiento del eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario y culminen con la ovulación cíclica en la rata. Nuestros datos permiten sugerir que el incremento de la expresión del RDA1 a lo largo del día del Estro y que se observa principalmente en las células de la teca es necesaria para que en el Diestro-1 se presenten las condiciones necesarias que determinan la ovulación, donde quizá otros receptores a la dopamina participen en el ensamblaje de las señales que inciden en el funcionamiento del eje.

El comportamiento de la proteína DARPP-32 respecto a la expresión del RDA1 es paralela, es decir, nuestros datos confirman que existe una relación directa entre el receptor y esta señal intracelular. Se sabe que la activación del RDA1 permite la fosforilación de la DARPP-32 vía AMPc (Rangel-Barajas *et al*, 2015). En este sentido, nuestros resultados son coherentes con lo esperado.

Queda por analizar qué ocurriría con la expresión de los RDA en un análisis de barrido a lo largo del ciclo estral tomando en cuenta el tamaño folicular y la atresia, ya que no se sabe si existe una relación funcional entre el sistema dopaminérgico ovárico y este fenómeno que ocurre en cualquier etapa del desarrollo de los folículos. Por otra parte, sería interesante analizar la relación entre los RDA y el funcionamiento de los cuerpos lúteos, ya que el compartimento luteal también juega un papel crítico en la regulación del ciclo estral.

Se ha demostrado que, en concentraciones no tóxicas, la dopamina inhibe fuertemente y de manera selectiva las actividades permeabilizantes vasculares y angiogénicas inducidas por el *factor de permeabilidad vesicular* (VPF) / *factor de crecimiento endotelial* (VEGF). La dopamina actúa a través de los RDA2 para inducir la endocitosis del receptor-2 del VEGF que es fundamental para promover la angiogénesis, evitando así la unión de VPF / VEGF, la fosforilación del receptor y los pasos de señalización posteriores (Nagy *et al*, 2001). La dopamina revierte la fosforilación del protooncogén de la *Tirosin-Proteín Cinasa* o Src, que según Marinissen y Gutkind (2001), es un mediador clave para múltiples vías de

señalización intracelular, que regulan funciones celulares críticas como, la vía estimulada por noradrenalina (Schettini *et al*, 2006).

11.2 Indicadores de estrés oxidativo (MDA y 4-HDA; Nitritos) a lo largo del ciclo estral

La expresión de los indicadores de estrés oxidativo a lo largo del ciclo estral mostró un comportamiento variable, incluso de forma horaria. En la tarde del Diestro-2, se observó una concentración pico en la concentración de los indicadores de lipoperoxidación, que no se observó en otros momentos del ciclo estral. Por su parte, la concentración de nitritos mostró comportamientos muy variables a lo largo del ciclo estral y en cada día del ciclo, es decir, cambios aparentemente circádicos notablemente diferentes, que a lo largo del Proestro fueron los más evidentes respecto a los otros días del ciclo.

Es notable que a las 20:00 h de los diferentes días del ciclo estral, todos los indicadores de estrés oxidativo mostraron sus menores índices respecto a los otros horarios. Esto posiblemente está relacionado con el periodo en que los animales se encuentran en mayor actividad, lo cual sugiere que sus sistemas antioxidantes estén son activos por tanto, más eficaces que en el periodo con luces encendidas. Cuando el sistema metabólico se encuentra en mayor actividad, las mitocondrias median en la producción controlada de especies reactivas de oxígeno (ROS) para la señalización *redox*, regulan los niveles de Ca^{++} citosólico que participa en la biosíntesis de aminoácidos, generan calor a través de la termogénesis y actúan como guardianes de la apoptosis y señalización necrótica, de ahí la importancia de estos procesos y otros en el mantenimiento de la homeostasis celular. Debido a la estrecha conexión entre los ritmos circadianos y el metabolismo, se ha propuesto que varias funciones mitocondriales pueden ser reguladas por el reloj circadiano, y posiblemente sirvan como un coordinador central entre el reloj y el metabolismo de la energía celular (Langmesser-Albrecht, 2006).

De acuerdo con lo anterior, se ha propuesto la existencia de relojes circadianos en el ovario relacionados con el *timing* de la ovulación espontánea (Espey y Richards,

2002; Karman y Tischkau, 2006; Richards et al, 2002; Selix y Menaker, 2009). Shkolnik y colaboradores (2011), mostraron que la generación de ROS son indispensable para que la ovulación ocurra de manera normal, esto implica que los diferentes compartimentos de la corteza ovárica deben preparar las condiciones óptimas para que las gonadotropinas interactúen con sus receptores en sus tejidos blanco, incidan en el metabolismo de las células de la teca, de la granulosa y en el propio ovocito y que conduzcan a la ruptura de la pared folicular y la liberación de los gametos.

Existen otros genes asociados al metabolismo que también muestran oscilaciones circadianas en la expresión. Estos incluyen genes que codifican el receptor de glucagón, la glucoquinasa, el glucagón, Glut2, la proteína de transporte de glucosa-6-fosfato, la piruvato-quinasa y la piruvato deshidrogenasa (Fleur *et al*, 2001). Otras enzimas metabólicas tales como la glucosa-6-fosfatasa, acetil-CoA carboxilasa, citocromo oxidasa, lactato deshidrogenasa, sintasa de ácidos grasos, y la glucógeno fosforilasa también se ha demostrado que se expresa activa rítmicamente (Froy, 2007). Estos datos respaldan la idea de que el metabolismo celular está muy influenciado por la producción rítmica y la actividad de las proteínas mitocondriales (Hoang, 2009). Lo anterior nos permite sugerir un análisis de lo que ocurre en el ovario a lo largo del ciclo estral y si se presenta de manera circadiana.

Selix y Menaker (2010) proponen la existencia de genes reloj que sincronizan los eventos cíclicos que ocurren en el eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario. Uno de los genes implicados en el ciclo de retroalimentación accesoria que sustenta la ritmicidad celular, DEC1(sharp2), se expresa en el ovario de rata y es inducido temporalmente por eCG y HCG en células de la teca y la granulosa (Yamada *et al*, 2004). En el ovario, DEC1 parece actuar como un represor y altera directa o indirectamente la expresión de genes en el ovario, como el receptor de la hormona folículo estimulante, la prostaglandina, endoperoxidasa, sintasa-2 y otros genes dependientes de gonadotropina. Dado el ritmo circadiano esperado de la expresión de DEC1 en el ovario, es interesante especular que puede haber una activación

circadiana de los procesos celulares a nivel ovárico en el momento de la ovulación de acuerdo con nuestros resultados y su análisis (Michael, 2006).

Queda pendiente estudiar los mecanismos fisiológicos que controlan el estrés oxidativo en la gónada en los diferentes días del ciclo estral, es decir, analizar los cambios que ocurren en los mecanismos antioxidantes en función del ciclo ovárico: fase luteal y fase folicular.

11.3 Relación entre la expresión del receptor dopaminérgico 1 y los indicadores de estrés oxidativo

Nuestros resultados muestran que aparentemente no existe correlación directa entre las altas expresiones del RDA1 y la DARPP-32, que ocurren a lo largo del día del Estro, con los ritmos en la generación de los indicadores de estrés oxidativo, cuyos mayores índices ocurrieron para los indicadores de lipoperoxidación en el Diestro-2 y para los nitritos en el Proestro, respectivamente. Sin embargo, es preciso señalar que si el re arranque del nuevo ciclo estral requiere de la activación del RDA1 y de toda la cascada de señalización intracelular y la concomitante serie de respuestas intracelulares en los tejidos ováricos, nuestros resultados podrían indicar que la vida del cuerpo lúteo, está marcada por la activación del RDA1, lo que condicionaría el inicio de la fase folicular en un ambiente *redox* más propicio para que las células de la granulosa desempeñen su papel esteroideogénico y la conducción de la ovulación cíclica en un ambiente adecuado. Resultados de nuestro grupo de investigación han mostrado consistentemente que el bloqueo específico y no específico de los RDA, retrasan la ovulación espontánea cuando se interrumpe la señal dopaminérgica al inicio del ciclo estral, es decir, durante la fase luteal respecto al mismo bloqueo otros momentos del ciclo estral y ovárico (Domínguez et al, 1987; González et al, 2017; Letras et al, 2016; Venegas et al, 2015, Venegas et al, 2017).

Es necesario profundizar en el estudio del papel de la dopamina en el ovario ya que su participación podría estar relacionada con el desarrollo de patologías que comprometen la fertilidad en la hembra (Moreno-Smith *et al*, 2011). La dopamina

podría jugar un papel muy importante en el control de la angiogénesis, necesaria para la adecuada distribución de nutrientes celulares y el uso de la energía, así como para verter hormonas a la circulación periférica (Han *et al*, 2006). Un estudio de estrés crónico en un modelo patogénico en la rata, mostró que los niveles de dopamina disminuyen significativamente en comparación con animales no estresados (Thanker *et al*, 2006) ; En condiciones normales, la dopamina y el RDA2 produjeron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral y la densidad de la microvasculatura del tumor, así como un efecto estimulante sobre la apoptosis; en cambio, cuando se utilizó al antagonista del RDA2: *eticloprida*, se revirtieron estos efectos (Moreno-Smith *et al*, 2011). En otros estudios *in vitro*, también se ha observado que la dopamina inhibe significativamente la viabilidad celular, estimula la apoptosis, pero reduce los niveles de AMPc e inhibe la activación de Src quinasa inducida por VPF/VEGF y noradrenalina (Moreno-Smith, 2012).

11.4 Antagonismo de los receptores a dopamina y sus efectos sobre la expresión del RDA1 y de la DARPP-32 en Diestro-1 o Proestro.

En nuestro estudio, analizamos los efectos de un estrés agudo por el el bloqueo de los receptores RDA con SCH23390 o sulpiride sobre la expresión del RDA1 y la DARPP32. Con base en los antecedentes señalados en líneas anteriores, confirmamos que el bloqueo farmacológico específico de los RDA en el Diestro-1 (fase luteal del ciclo ovárico) inhibe la ovulación en la mañana del estro esperado pero que si dicho bloqueo se realiza en el Proestro (fase folicular del ciclo ovárico) la presencia del estro vaginal y la ovulación ocurren acompañados de una mayor expresión del RDA1 y de la DARPP32. Esto nos permite sugerir que durante la fase luteal, el RDA1 en los tejidos ováricos juega un papel fundamental en la regulación del ciclo estral al incidir en los mecanismos que conducen a la ovulación.

Si bien en el presente estudio no se contempló el análisis de los indicadores de estrés oxidativo en los animales con bloqueo local de los RDA, se cuenta con resultados que indican que los indicadores de lipoperoxidación se elevan al doble

apenas 4 horas después de la microinyección con sulpiride y 12 horas después de la administración de SCH23390, manteniéndose en esos niveles hasta 16 horas después del antagonismo local a las 14:00 h del Diestro-1; el Proestro no se ha analizado (Letras, 2018). Estos hallazgos nos permiten sugerir que la integridad de los RDA, cuya participación es diferente a lo largo del ciclo estral, es necesaria para que ocurra la ovulación cíclica en la rata.

Los resultados del presente estudio nos conducen a plantear la posibilidad de analizar y describir lo que ocurre en un modelo de estrés agudo luego de la microinyección de los antagonistas dopaminérgicos, donde la generación de los indicadores de estrés oxidativo se exagera y podrían permitir relacionarlos con la falla ovulatoria en la mañana del estro esperado observada cuando se antagonizan los RDA.

Por otra parte, es necesario saber si el antagonista dopaminérgico elegido sigue una cinética de tipo competitiva, con ello se podría soslayar el hecho de que la dopamina endógena interactúe sobre el receptor dopaminérgico sin importar la concentración de dopamina en el medio, independientemente del día y de la hora de su administración.

Al cuantificar la marca inmunopositiva del receptor RDA1 se pudo inferir que por la competitividad que ejerce el antagonista con la dopamina, aun fue posible detectar marca. Esto se podría deber a que el sistema intenta restablecer las funciones mediadas por la dopamina y probablemente el sistema permite la exposición emergente de otros RDA en la periferia de la célula. Este fenómeno ha sido propuesto por algunos investigadores con la finalidad de restablecer funciones ante una lesión o ausencia de señales extracelulares esenciales (Yoshikawa *et al*, 2009). El tráfico de receptores a compartimentos endosomales permite la desfosforilación y el reciclaje del receptor a la superficie (Boulay y Rabet, 2005). En nuestro modelo, esto es quizá lo que permitió la expresión de DARPP-32 pese a la presencia de los antagonistas en el Diestro-1.

12. CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo permiten concluir que:

- 1) La expresión del receptor DA1 y de la proteína DARPP-32 varía durante el ciclo estral, presentándose en mayores índices en el día del Estro.
- 2) La expresión de la proteína DARPP-32 ocurre en modo paralelo al receptor DA1, es decir, existe una relación directa entre la activación del receptor y la señal intracelular inducida por la ocupación del receptor DA1.
- 3) Existen indicadores activos del sistema antioxidante en el tejido ovárico con comportamiento circádico y con fluctuaciones variables que presentan mayor eficacia durante la fase oscura del fotoperiodo.
- 4) Los mayores índices de estrés oxidativo ocurren al final de la fase luteal del ciclo ovárico y durante la fase folicular que anteceden a los principales procesos que condicionan la ovulación cíclica.
- 5) La activación del receptor DA1 y de la proteína DARPP-32 constituyen eventos que anteceden a los procesos metabólicos que se manifiestan en el estrés oxidativo en fases críticas que controlan la ovulación cíclica en la rata.
- 6) El antagonismo de los receptores DA produce cambios tanto en la expresión del receptor DA1 como en la DARPP-32 que dependen del momento del ciclo estral u ovárico en que se interrumpe la señal dopaminérgica.

13. PERSPECTIVAS

Realizar la identificación y cuantificación de enzimas del sistema antioxidante en los diferentes compartimentos del ovario de la rata adulta en los diferentes días del ciclo estral y en distintos horarios. Con ello, se podrá identificar las zonas activas o menos activas de acuerdo con los horarios, ya que aparentemente nuestros resultados muestran cambios muy dinámicos a lo largo del ciclo estral, con los cuales se podrá ampliar un esquema global del funcionamiento bioquímico del ovario y relacionarlo con los eventos endócrinos que regulan su funcionamiento.

Con este proyecto, se tuvo la oportunidad de explorar por medio de técnicas de Biología Molecular el comportamiento de algunos indicadores de la expresión de los transcritos para receptores a dopamina de la rata adulta, tanto RDA1 como RDA2 (en su forma corta y forma larga) por PCR. Al momento, se cuenta con la técnica de homogenización de ovario de rata para la extracción del RNA total; también se dispone de los primer's para la identificación de los receptores a dopamina. Por lo que se contempla la posibilidad de realizar el análisis de los cambios de la expresión de los transcritos a lo largo del ciclo estral de la rata.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ❖ Adashi E.Y; Hsueh, A.J.W. Stimulation of β -adrenergic responsiveness by folliclestimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 1981. 108: 2170-2178.
- ❖ Agarwal, A; Gupta, S; Sharma, K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005. 3:28.
- ❖ Agarwal, A; Saleh, RA; Bedaiwy, MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003. 79:829–843.
- ❖ Aguado, L.I; Petrovic, S.L; Ojeda, S.R. Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*. 1982. 11: 1124-1132.
- ❖ Aguado, L.I. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech*. 2002. 59: 462-473.
- ❖ Ahmed, C.E; Dees, W.L; Ojeda, S.R. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology*. 1986. 118: 1682-1689.
- ❖ Anesetti, G. P; Lombide, H; D'Albora; Ojeda, S.R. Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res*. 2001. 306: 231-237.
- ❖ Amneta, F.A; Tayebati, S.K; Zaccheo, D. The peripheral dopaminergic system: morphological analysis, functional and clinical applications. *Ital J Anat Embryol*. 2002. 107: 145-67.
- ❖ Awasthi, YC; Yang, Y; Tiwari, NK; Patrick, B; Sharma, A; Li, J; Awasthi, S. Regulación de la señalización mediada por 4-hidroxinonenal por la glutatión S-transferasas. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004. 37 (5): 607 - 619.

- ❖ Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaño, J. (2000). Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Biomed 11(1)*, 39-60.
- ❖ Behrman, HR; Kodaman, PH; Preston, SL; Gao, S. Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig.* 2001. 8:S40–42.
- ❖ Ben-Jonathan, N. Braw; Laufer, R.H; Reich, N; Bahr, R; Tsafiriri, J.N. Norepinephrine in graafian follicles is depleted by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 1982. 110: 457-461.
- ❖ Bodis, J; Bognár, Z; Hartmann, G; Török, A. Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecology Obstetric Invest.* 1992. 33: 165-7.
- ❖ Bodis, J; Tinneberg, H.R; Török, A; Cledon, P; Hanf, V. Effect of noradrenaline and dopamine on progesterone and estradiol secretion of human granulosa cells. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1993. 129: 165-168.
- ❖ Boulay, F; Rabet, M.J. The chemoattractant receptor FPR and C5aR. Same functions different fates. *Traffic:* 2005. 6: 83-86.
- ❖ Bourne JA. SCH 23390: the first selective dopamine D1-like receptor antagonist. 2001. *CNS Drug Rev.* 7(4): 399-414.
- ❖ Bulnes M. Servicio de obstetricia y ginecología hospital universitario. *Manual de Obstetricia.* 2000.1-30.
- ❖ Burden, H.W. The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: *Catecholamines as Hormone Regulators.* Eds. Weiner. Serono Symposia Publications. Raven Press. New York. 1985. 262-278.
- ❖ Chavez, R; Cruz, M.E; Dominguez. Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J Endocrinology.* 1987. 113: 397 401.
- ❖ Cruz, M.E; Chavez, R; Dominguez, R. Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vaginerves. *La Revista de Investigación Clínica.* 1986. 38: 167 171.
- ❖ Cooper, DM; Mons, N; Karpen, JW. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature.* 1995. 374: 421-424.
- ❖ Cornil, CA; Ball, GF. Balthazart, J. Functional significance of the rapid regulation of brain estrogens. *Brain Res.* 2006. 1126(1): 2–26.

- ❖ D'albora, H; Barcia, J. Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci Lett.* 1996. 205: 65-67.
- ❖ D'albora, H; Lombide, P; Ojeda, S.R. Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 2000. 300: 47-56.
- ❖ Davoren, J.B; Hsueh, A.J.W. Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod.* 1985. 33: 37-52.
- ❖ Dees, W.L; Hiney, J.K; Mcartur, N.H; Johnson, G.A; Disse, G.A; Ojeda, S.R. Origin and ontogeny of mammalian ovarian neurons. *Endocrinology.* 2006. 147: 3789-3796.
- ❖ Dissen, GA; Ojeda, S. Ovarian innervation. *Encyclopedia of reproduction.* E. Knobil JD Neil. Academia Press. New York. 1999. 583-589.
- ❖ Dissen, G. A; Paredes, A; Romero, C; Les Dees, W; Ojeda, S. R. Neural and Neurotrophic Control of Ovarian Development. In *The Ovary.* Second Edition 2003. 3-23.
- ❖ Dyer, C.A; Erickson, G.F. Norepinephrine amplifies human chronic gonadotrophin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology.* 1985. 116: 1645-1652.
- ❖ Domínguez, C.R; Riboni, R; Zipitria, L; Revilla, D. Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat. *Endocrinology.* 1982. 95: 175-180.
- ❖ Domínguez, C.R; Zipitria, L; Riboni, R; Revilla, D. Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation throughout the oestrous cycle of the rat. *J Interdis Cycle Res.* 1985. 16: 285-294.
- ❖ Domínguez, C. R; Gaitan, C.M; Mendez, S.A; Ulloa-Aguirre, A. Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *J Endocrinol.* 1987. 113: 37-44.
- ❖ Dominguez, R; Cruz, M.E; Chávez, R. Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. *Growth Factors and the Ovary.* Edt. A.N. Hirshfield. Plenum Press. New York. 1989. 321-325.
- ❖ Hoang, Y.D; Nakamura, B.N; Luderer, U. Follicle-Stimulating Hormone and Estradiol Interact to Stimulate Glutathione Synthesis in Rat Ovarian Follicles and Granulosa Cells, *biology of reproduction.* 2009. 81: 636-646.

- ❖ Jozwik, M; Wolczynski S; Szamatowicz, M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod.* 1999. 5:409–413.
- ❖ Morán, J.L; Domínguez, A. Effects of the unilateral implant of haloperidol at the preoptic-anterior hypothalamic area, ovulation. *Endocrine.* 1995. 3: 399-401
- ❖ Domínguez R; Cruz-Morales, S.E. The Ovarian Innervation Participates in the Regulation of Ovarian Functions. *Endocrinol Metabol Syndrome.* 2011. S4: 001.
- ❖ Dunah, AW; Sirianni, AC; Fienberg, AA; Bastia, E; Schwarzschild, MA; Standaert, DG. Dopamine D1-dependent trafficking of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors requires Fyn protein tyrosine kinase but not DARPP-32. *Mol Pharmacol.* 2004. 65: 121–129.
- ❖ Drummond, AE. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 2006. S4:001.
- ❖ Eckert, E; Randall, D; Burggren, W; *Animal physiology. Mechanisms and adaptations.* New York. WH. Freeman and company. 1988. 100-110.
- ❖ Erickson GF. Dissociation of Endocrine and Gametogenic Ovarian Function. *Perimenopause, Serono Symposia, Springer-Verlag.* 2012. 101-103.
- ❖ Fleur, S.E; Kalsbeek, A; Wortel, J; Fekkes, M.L; Buijs, R.M. A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus. *Diabetes.* 2001. 50: 1237–1243,
- ❖ Flores-Hernández, J; Cepeda, C; Hernández-Echeagaray, E; Calvert, CR; Jokel, ES; Fienberg, AA; Greengard, P; Levine, MS. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: Role of D1 receptors and DARPP-32. *J Neurophysiol.* 2002. 88: 3010–3020.
- ❖ Freeman ME. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *Physiology of 1975. Reproduction.* 2006. 2327-2388.
- ❖ Froy, O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol.* 2007. 28: 61–71.
- ❖ Fukuda, M; Yamanouchi, K; Nakano, H. Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: Unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neurosci Lett.* 1984. 51: 365 370.
- ❖ García-Sevilla, JA; Meana, JJ. Transmisión catecolaminérgica. *Fármacos agonistas catecolaminérgicos.* En: *Farmacología Humana.* 5º ed. Barcelona, Masson. 2008. 295-320.

- ❖ Gerendai, I; Tóth, I.E; Boldogkői, Z; Medceczky, I; Halász, B. Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technic. *Neuroendocrinol.* 1988. 68: 244-256.
- ❖ González-Karla, Morán-José Luis, Handal-Anabella & Reynoso-Alejandro. El bloqueo farmacológico de los receptores ováricos a la dopamina altera el ciclo estral y la ovulación en la rata adulta. *Revista de Sistemas Experimentales.* 2016. 3(7):27-45.
- ❖ Greengard, P. The Neurobiology of Slow Synaptic Transmission. *Science.* 2001. 1024-1030.
- ❖ Guzmán-Herrera, N. Antagonismo del receptor DA-1 inducido por SCH-23390 en el tejido ovárico de la rata adulta hemicastrada: Análisis de la ovulación compensadora. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Enero, 2018.
- ❖ Guyton, A. Tratado de fisiología médica. Décima edición. 2000. 30-34.
- ❖ Han L.Y; Charles N; Landen, J. G; Trevino, J; Halder, Y.G. Lin, A; Kamat, T. Antiangiogenic and Antitumor Effects of Src Inhibition in Ovarian Carcinoma. *Cancer Res.* 2006. 66(17): 8633–8639.
- ❖ Hsueh, A.J.W; Adashi, E.Y; Jones, P.B.C; Welsh, T.H. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 1984. 5: 76-127.
- ❖ Karman, B.N; Tischkau, S.A. Circadian clock gene expression in the ovary; Effects of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 2006. 75: 624-632.
- ❖ Klein, J.T; Burden, H.W. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating rat ovary. *Neurosci Lett.* 1988. 85: 217-222.
- ❖ Langmesser, S; Albrecht, U. Life time-circadian clocks, mitochondria and metabolism. *Chronobiol Int.* 2006. 23: 151–157.
- ❖ Lara, H.E; Mcdonald, J.K; Ahmed, C.E; Ojeda, S.R. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and functioning rats. *Endocrinology.* 1990. 127: 2199-2209.
- ❖ Lara, HE; Porcile, A; Espinoza, J; Romero, C; Luza, SM; Fuhrer, J; Miranda, C; Roblero, L. Release of Norepinephrine from Human Ovary. Coupling to Steroidogenic Response. *Endocrine.* 2001. 187–192.
- ❖ Lawrence, I.E; Burden, H.W. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the ovary. *Anat Rec.* 1980. 196: 51-59.

- ❖ Lacia-Espinoza, J; Hernández,M.E; Aranda, G.E; Rojas, A.F; Manzo, J; Coria, J.A; Yereña, C.E; Aguilar, A. The role of estrogens and their receptors in prevention and promotion of proliferative diseases in the prostatic gland. *Neurobiología*. 2013. 4(8):300813.
- ❖ Marc, AF; Speroff L. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 8th edition. Lippincott Williams y Wilkins. 2005. 110.
- ❖ Martín, CR. *Endocrine Physiology*. Ney York. 1979. Oxford University Press.
- ❖ Martín, LM; Caño, A; Navarro, JF. Efectos de la administración de dosis altas de sulpiride sobre la conducta agonista en ratones machos. 1996. 161-166.
- ❖ Mayerhofer, A; Dissen, G.A; Costa, M.E. Ojeda, S.R. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. 1997. 178: 3320-3329.
- ❖ Mcneill, D.L. Burden, H.W. Neuroptides in sensory perykarya projecting to the ovary. *Am J Anat*. 1987. 179: 269-276.
- ❖ McLaughlin, EA; McIver, SC. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*. 2009. 137: 1–11
- ❖ Mizunuma, H; Palatis, L.R; Mccann, M. Effect of unilateral orchidectomy on plasma FSH concentration: Evidence for direct neural connection between testes and CNS. *Neuroendocrinol*. 1983. 37: 291 296.
- ❖ Montes, GS; Luque EH. Effect of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. 1988. *Acta anatomica* 133: 192-199.
- ❖ Moreno-Smith et al. Dopamine blocks stress mediated ovarian carcinoma growth. *Clin Cancer Res*. 2012. 3649-59.
- ❖ Nance, D.M; Moger, W.H. Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemicastration. *Brain Res Bull*. 1982. 8: 299 -302.
- ❖ Nance, D.M; White J.P; Moger, W.H. Neural regulation of the ovary: Evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control. *Brain Res Bull*. 1983. 10: 353-355.
- ❖ Norma, WA; Litwack, G. *Hormones*. Academic Press.
- ❖ Ojeda, S; Aguado, L. *Adrenergic control of the pubertal ovary: involvement of local innervation and circulating catecholamines*. Serono Symposia Publications. Raven Press. New York. 1985.

- ❖ Ojeda, SR; Lara, H; Ahmed, CE. Potential relevance of vasoactive intestinal peptide to ovarian physiology. *Seminar in Reproductive Endocrinology*. 1989. 7: 52-60.
- ❖ Orizaba-Chávez B; Alba-Jasso,G.A; Ocharán-Hernández, M.E. Farmacocinética de la progesterona. *Rev Hosp Jua Mex*. 2013. 80(1): 59-66.
- ❖ Palomo, T. bases neuroquímicas de la esquizofrenia, farmacología del SNC. 1991. 5: 5-16.
- ❖ Parra, C; Fiedler, J.L; Luna, S.L; Greiner, M; Padmanabhan, V; Lara, H; Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrous cycle and in the development of estradiol valerate-induced polycystic ovary. *Reproduction*. 2007. 133: 147-154.
- ❖ Pastelín Rojas, C. Efectos del bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico durante la segunda mitad del ciclo estral sobre la función ovárica de la rata adulta. Tesis Profesional. 2003. Biología, BUAP.
- ❖ Petersen, S.L; Ottem E.N; Carpenter, C.D. Direct and Indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod*. 2003. 1771-8.
- ❖ Pérez-Aguilar, F. Etiopathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. Agosto 2005. 21(1): 27-41.
- ❖ Puglisi-Allegra, S; Imperato, A; Angelucci, L; Cabib, S. Acute stress induces time-dependent responses in dopamine mesolimbic system. *Brain Res*. 1991. 554:217–22.
- ❖ Rangel-barajas, C; Coronel, I; Florán, B; Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging and Disease*. 2015. 6(5): 349-68.
- ❖ Rey-Ares, V; Lazarov, N; Berg, D; Berg, U; Kunz, L; Mayerhofer, A. Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Rep Biol Endocrinol*. 2007. 5:40.
- ❖ Richards, JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*. 1994. 725–751.
- ❖ Rizzo, A; Roscino, MT; Binetti, F; Sciorsci,RL. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012. 344–352.
- ❖ Shkolnik, K; Tadmor, A; Ben-Dor, S; Nevo, N; Galiani, D; Dekel, D; Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011. 108(4): 1462–1467.
- ❖ Strauss, J.F; Williams, C.J. The ovarian life cycle. *Reproductive Endocrinology: Physiology, pathophysiology and clinical management*. 2009. 156-193.

- ❖ Svenningsson, P; Nairn, AC; Greengard, P. DARPP-32 Mediates the Actions of Multiple Drugs of Abuse. *The AAPS Journal*. 2005. 7(2): E353–E360.
 - ❖ Tresguerres, JAF; Lopez-Calderon, A; Martín, AI. Estructura y función de la corteza suprarrenal. Dieguez C, Yturriaga R. *Glándulas suprarrenales*. Madrid: McGraw-Hill. Interamericana. 2008. 20-33.
 - ❖ Sugino, N. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Animal Science Journal*. 2006. 556–565.
 - ❖ Valko, M; Leibfritz, D; Moncol, J; Cronin, MT; Mazur, M; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2007. 44–84.
 - ❖ Venegas-Menés, B; Padilla, J.F; Juárez, C.E; Morán, J.L; Morán, C; Rosas-Murrieta, N.H; Handal, A; Domínguez, R. Effects of ovarian dopaminergic receptor on ovulation. *Endocrine*. 2015. ISSN 1355-008X.
 - ❖ Venegas Meneses Berenice, Claudia Elvira Juárez Robelo, Anabella Handal Silva, José Luis Morán Perales. Efectos del bloqueo irreversible de los receptores dopaminérgicos del ovario sobre la ovulación espontánea de la rata adulta. *Revista de Ciencias de la Salud*. 2017. 4(11): 11-23.
 - ❖ Wang, S; He, G; Chen, M; Zuo, T; Xu, W; Liu, X. The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. *Hindawi. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. ID 4371714.
 - ❖ Wilking, M; Ndiaye, M; Mukhtar,H; Ahmad, N. Circadian Rhythm Connections to Oxidative Stress: Implications for Human Health. *Antioxidants y redox signaling*. 2013. 19, 192–208.
- Yoshikawa, T; Sellix, M; Pezuk, P. Menaker M. Timing of the ovary circadian clocks is regulated by gonadotrophins. *Endocrinology*. 2009. 9: 4338-4347.