



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Participación del receptor
dopaminérgico DA-2 ovárico en la función estral, la secreción sistémica
de esteroides y gonadotropinas, y la expresión de FSHR/LHR y P450
aromatasa ovárica en ratas adultas
Long-Evans**

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

PRESENTA

Biol. Alejandra Guevara Tlacuilo

Directora

D. en C. Berenice Venegas Meneses

Codirectora

D. en C. Dalia Molina Romero

Asesoras

D. en C. Lorena Milflores Flores

D. en C. Carolina Morán Raya



Facultad de Ciencias Biológicas
BUAP

Febrero 2026



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

H. Puebla de Z. a 29 de enero de 2026

Asunto: Voto Aprobatorio

**Comité Académico del Posgrado
PRESENTE**

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

“Participación del receptor dopaminérgico DA-2 ovárico en la función estral, la secreción sistémica de esteroides y gonadotropinas, y la expresión de FSHR/LHR y P450 aromatasa ovárica en ratas adultas Long-Evans”

Que presenta la estudiante Alejandra Guevara Tlacuilo con número de matrícula (223470513), aspirante al grado de Maestra en Ciencias Biológicas, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: “Estructura y Funcionamiento de los Seres Vivos”, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los VOTOS APROBATORIOS como miembros del Comité de Jurado de Examen de Grado como a continuación se indica:

Tutor Interno: D.C. Lorena Milflores Flores

Tutor Externo: D.C. Carolina Morán Raya

Revisor: D.C. José Luis Morán Perales

Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Heroica Puebla de Zaragoza, enero de 2026

Asunto: CARTA DE NO PLAGIO

Yo, **Alejandra Guevara Tlacuilo**, con número de estudiante **223470513**, adscrita a la Maestría en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, declaro bajo protesta de decir verdad que el trabajo titulado: ***“PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO DA-2 OVARICO EN LA FUNCIÓN ESTRAL, LA SECRECIÓN SISTÉMICA DE ESTEROIDES Y GONADOTROPINAS, Y LA EXPRESIÓN DE FSHR/LHR Y P450 AROMATASA OVÁRICA EN RATAS ADULTAS LONG-EVANS”***

es de mi autoría y constituye producto original de mi propio esfuerzo intelectual y académico.

En tal sentido, cuando por necesidades propias del trabajo desarrollado y para clarificar la redacción ha sido conveniente utilizar textos, imágenes, datos tablas, diseños o gráficas que pertenecen a otros autores, se han agregado las correspondientes citas y referencias bibliográficas para remitir a la fuente original de donde se tomaron.

Asimismo, cetoifico que he respetado en todo momento las normas éticas y académicas relacionadas con el uso de información ajena y la propiedad intelectual.

Estoy consciente de que, en caso de detectarse plagio o fraude académico en el contenido de mi tesis, la institución académica está facultada para invalidar mi trabajo y retirar cualquier grado o reconocimiento obtenido, además de aplicar las sanciones correspondientes, conforme a la normativa vigente.

Me responsabilizo completamente por el contenido del presente trabajo y reafirmo mi compromiso con la integridad académica.



Atentamente

Alejandra Guevara Tlacuilo

Matrícula: 223470513

Maestría en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Correo: gt223470513@alm.buap.mx

Agradezco a **La Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)**, ya que, durante la realización del presente trabajo de investigación, se me brindó el apoyo de la beca con número 4000260 durante el periodo de agosto 2023 - agosto 2025, para realizar mis estudios de maestría.



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

Expreso mi sincero agradecimiento a los laboratorios que me brindaron la oportunidad de trabajar en sus instalaciones, lo cual fue fundamental para el desarrollo y la culminación exitosa de este proyecto.

**LABORATORIO DE INTERACCIONES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES APLICADAS DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA BUAP**



**EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL INSTITUTO DE
CIENCIAS DE LA BUAP**



Contenido

RESUMEN.....	6
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Ovario	2
1.2 Eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario en mamíferos	4
1.3 Desarrollo Folicular	10
1.4 Esteroidogénesis.....	16
1.5 Inervación Ovárica	18
1.6 Catecolaminas en el Ovario	22
1.7 El sulpiride como antagonista específico para receptores dopaminérgicos DA- 2.	24
2. ANTECEDENTES.....	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVO GENERAL	28
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
7. METODOLOGÍA.....	29
8. RESULTADOS	33
8.1 El bloqueo de los receptores DA-2 ováricos afecta la ciclicidad, la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos en ratas adultas.	33
8.3 El bloqueo del receptor DA-2 ováricos afecta la concentración sérica de LH, FSH y la expresión de sus receptores en la rata adulta.	45
8.4 En la etapa del estro vaginal el bloqueo del receptor DA-2 ovárico provoca un aumento en la expresión de P450 aromatasa.	50
8.5 El bloqueo de los receptores DA-2 ováricos en las diferentes etapas del ciclo estral afecta la concentración de hormonas esteroideas: testosterona y estradiol, pero no afecta la concentración de progesterona en el estro vaginal.	52
9. DISCUSIÓN	56
10. CONCLUSIONES.....	61
11. PERSPECTIVAS	62
10. LITERATURA CITADA	62
11. ANEXOS	83

RESUMEN

El presente estudio analizó el papel del receptor dopaminérgico DA-2 sobre la función ovárica mediante su bloqueo farmacológico local con un antagonista dopaminérgico específico (sulpiride), administrado en la bursa ovárica. El objetivo principal fue analizar los efectos de la inhibición de la señalización dopaminérgica ovárica sobre la ciclicidad estral, la ovulación, la secreción sistémica de hormonas gonadotrópicas y esteroideas, así como la expresión de proteínas clave involucradas en la regulación de la función ovárica en ratas adultas de la cepa Long-Evans.

Para llevar a cabo el estudio, ratas adultas fueron asignadas a grupos control, vehículo y tratados con sulpiride administrado directamente en la bursa ovárica. Los animales fueron evaluados al siguiente estro vaginal observado (SPD1) y también cuatro ciclos estrales posteriores a la administración (SPD2). Se analizó la ciclicidad estral y la ovulación, así como las concentraciones séricas de LH, FSH, estradiol, progesterona y testosterona. Asimismo, se determinó la expresión de aromatasa (P450), y de los receptores ováricos de LH (LHR) y FSH (FSHR). Los resultados mostraron que el bloqueo dopaminérgico ovárico alteró la ciclicidad estral, caracterizada por un alargamiento de la etapa de diestro y una disminución en la tasa de ovulación. A nivel sistémico, se observó un aumento significativo en la concentración de LH y una disminución significativa en FSH, estradiol y testosterona. En cuanto a los receptores de LH (LHR), se detectó un incremento en su expresión durante la etapa de estro, así como una disminución en la expresión del receptor de FSH (FSHR) durante el diestro, cambios que fueron particularmente evidentes en el grupo sacrificado cuatro ciclos estrales posteriores. En conjunto, estos resultados sugieren una alteración en la sensibilidad ovárica a las gonadotropinas.

En conjunto, estos hallazgos indican que la señalización dopaminérgica a través del receptor DA-2 en el ovario desempeña un papel relevante en la regulación de la función ovárica, modulando la secreción hormonal sistémica, la esteroidogénesis, la expresión de receptores gonadotrópicos y la ovulación, con efectos que pueden persistir durante varios ciclos estrales.

Palabras clave: función ovárica, gonadotropinas, hormonas esteroideas, ovulación, ciclo estral, sulpiride

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ovario

Es un órgano endocrino intraperitoneal bilateral pareado que se encuentra típicamente en los cuadrantes inferiores izquierdo y derecho del abdomen en roedores, mientras que en humanos se encuentra en la zona de la pelvis. Está ligado al *mesovarium* por el ligamento superior ancho desde el útero hasta la pared de la cavidad pélvica (Gougeon, 2003). Constituye la unidad estructural y funcional del sistema reproductor en hembras, cuyas funciones son reguladas por las gonadotropinas hipofisiarias (Chedrese, 2003).

Los ovarios son los encargados fundamentalmente de la secreción de hormonas esteroideas, como estrógenos, progesterona y andrógenos, así como de hormonas peptídicas, entre las que se incluyen inhibinas, activinas, hormona antimülleriana, así como del desarrollo folicular, la maduración y liberación de los ovocitos para su posible fertilización (Beltz & Moser, 2020). Anatómicamente, consisten en tres regiones: una corteza externa que contiene al epitelio germinal que origina a los folículos, una médula central constituida por un estroma de tejido conectivo laxo y fibroso, y el hilio, que se encuentra alrededor de la zona de unión del ovario al mesovario, y es por la cual se insertan las fibras nerviosas y los vasos sanguíneos en la gónada (Straus & William, 2009) (**Fig.1**).

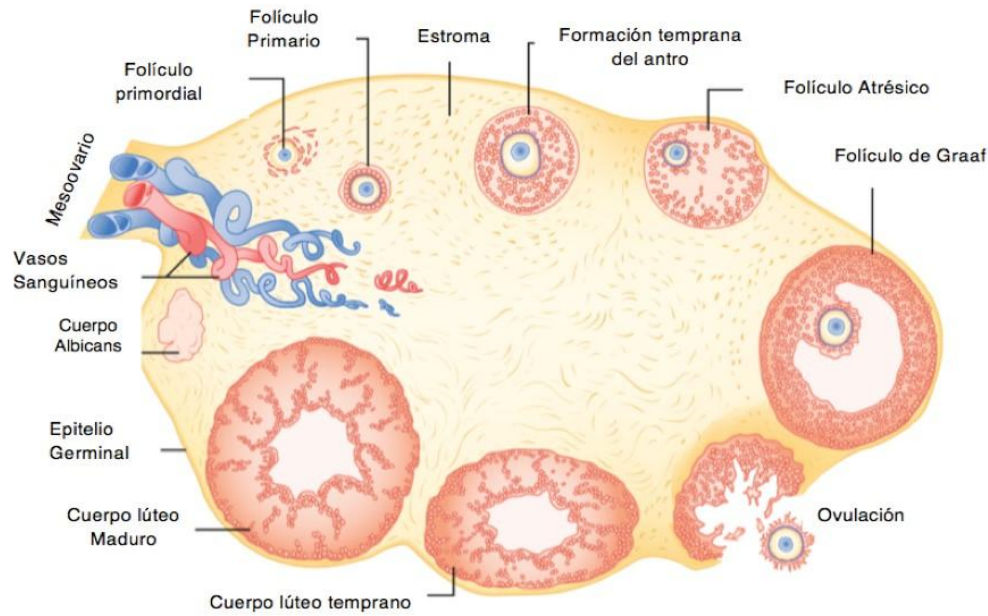


Figura 1. Esquema de la estructura interna del ovario de mamífero. Se muestra las tres regiones, la corteza, la médula y el hilio que contiene vasos sanguíneos y linfáticos. Adaptada de Yen and Jaffe's *"Endocrinology of Reproduction"* (p.156), por J.F. Strauss, R.L. Barbieri, (2009), Saunders/Elsevier.

El ovario es una glándula con funciones gametogénicas y endocrinas, que se encuentran reguladas a través del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Este eje está constituido por neuronas neurosecretoras localizadas en el hipotálamo, la glándula hipófisis y tejido ovárico. Debido a su estructura y función, este eje representa la conexión entre dos sistemas de control homeostático: el sistema nervioso y el sistema endocrino (Somoza, 2020). Este eje coordina un circuito de retroalimentación regulado por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) producida por el hipotálamo; la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) sintetizadas y secretadas en la adenohipófisis y los esteroides sexuales, producidos por el ovario, el cuerpo lúteo y las glándulas suprarrenales (Gordon-Elliot *et al.*, 2017) **(Fig 2)**.

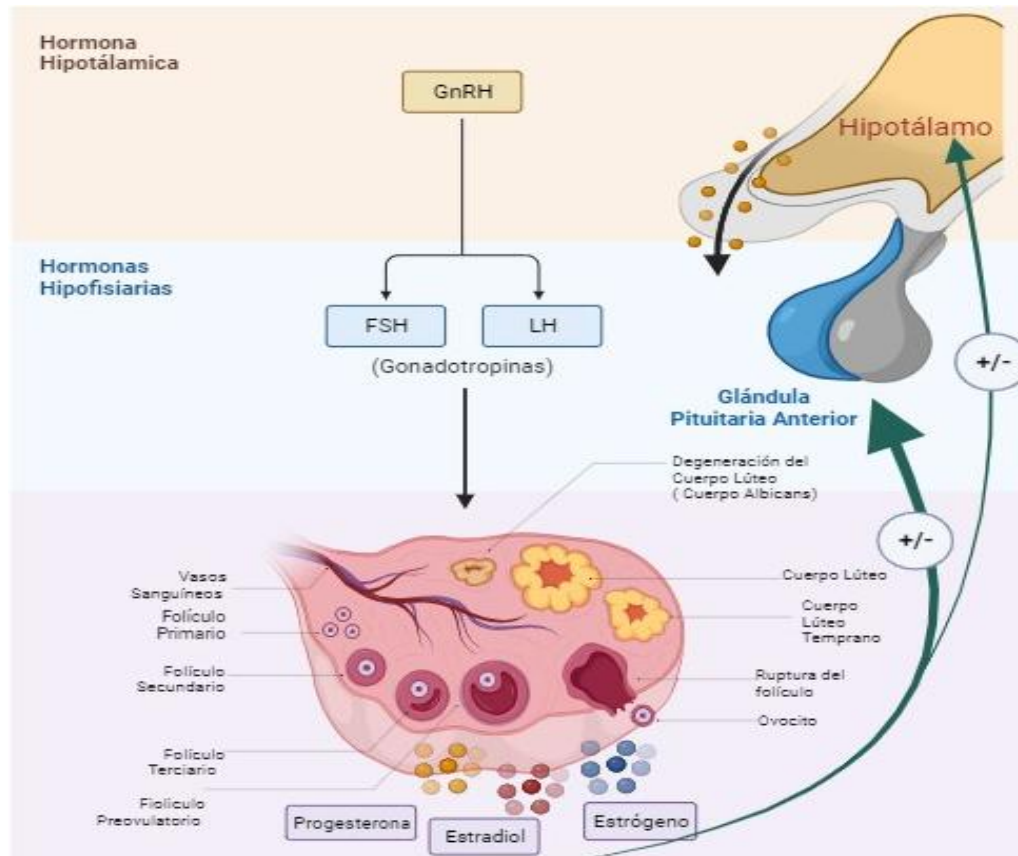


Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hipotálamo es el encargado de producir de manera pulsátil GnRH y a través del sistema porta viajan hacia el lóbulo anterior de la hipófisis, posteriormente esta, libera dos hormonas glicoproteicas, que son FSH y LH, las cuales actúan directamente en el ovario para que este pueda llevar a cabo el desarrollo folicular, la liberación periódica del ovocito y la formación del cuerpo lúteo, el ovario regula estas hormonas liberando hormonas esteroideas (estrógenos) y no esteroideas (inhibina). Adaptada de Yen and Jaffe's "Endocrinology of Reproduction" (p.140), por J.F. Strauss, R.L. Barbieri, (2009), Saunders/Elsevier.

1.2 Eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario en mamíferos

La maduración y liberación de ovocitos en los ovarios de mamíferos adultos se producen en intervalos regulares y predecibles que son específicos de cada especie. En este proceso interviene el hipotálamo, centro nervioso que coordina numerosas actividades del resto del organismo (Filipiak *et al.*, 2016). En el caso particular de la reproducción femenina, el hipotálamo estimula a la glándula hipófisis a liberar hormonas gonadotrópicas (FSH y LH), las cuales actúan directamente en el ovario para poder llevar a cabo la ovulación, la síntesis y secreción de

hormonas esteroides, y así de esta manera regular la reproducción a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Tanriverdi *et al.*, 2003).

La regulación neuroendocrina de la reproducción en los vertebrados establece que el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas involucra una interacción cíclica entre la secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por parte de las neuronas parvocelulares neurosecretoras localizadas en el núcleo arcuato, el núcleo paraventricular y el área preóptica del hipotálamo. La GnRH es transportada a la eminencia media y liberada al sistema porta hipotalámico-hipofisiario, por donde viaja hasta alcanzar a la adenohipófisis, donde actúa sobre los gonadotropos estimulando la liberación LH y FSH al torrente sanguíneo. Las gonadotropinas tienen acciones directas sobre las gónadas femeninas (Gómez-Torres *et al.*, 2014).

La secreción de LH y FSH por la hipófisis es regular y periódica en la mayoría de los mamíferos; este componente rítmico depende de la integridad del área preóptico-supraquiasmática del hipotálamo (Campbell & Turek, 1981). Las hormonas esteroides ováricas actúan solas y en sinergia en complejas relaciones de retroalimentación positiva y negativa para asegurar la liberación periódica de gonadotropinas (Arroyo *et al.*, 2006).

El estradiol modula la frecuencia de los pulsos de GnRH, así como la progesterona disminuye la pulsatilidad de esta hormona (Haisenleder *et al.*, 1991; Magendzo, 2010). La señal estrogénica a nivel de las neuronas es crítica tanto para suprimir la secreción de FSH y LH, así como para coordinar el pico de LH que ocurre antes de la ovulación (Petersen *et al.*, 2016). La pulsatilidad de GnRH también es modulada por la acción local de otros neuropéptidos. Es así como la noradrenalina estimula su secreción y la dopamina, β -Endorfina y opioides la inhiben (Gindoff *et al.*, 1987; Magendzo, 2010).

Regulación del eje H-H-G en el ciclo estral de ratas

La regulación del eje HHG en ratas hembras se realiza a través de las neuronas de GnRH, las cuales están presentes en el área preóptica y ventral del hipotálamo. Los axones de estas neuronas se extienden hacia la eminencia mediana (ME), donde el GnRH se libera en un vaso sanguíneo portal hipofisiario (Moore *et al.*, 2018)

En el hipotálamo, múltiples poblaciones neuronales afectan la liberación de GnRH como las neuronas liberadoras de kisspeptina localizadas en el AVPV (área periventricular). Estas neuronas proyectan y activan las neuronas productoras de GnRH (a través del receptor de kisspeptina, Kiss1r) en el hipotálamo, específicamente en el área preóptica (POA), estimulando la secreción de GnRH (Clarkson & Robinson, 2006).

También las neuronas KNDy (Kisspeptina, Neuroquinina y Dinorfina) del núcleo arcuato (ARC) interactúan con las neuronas de GnRH a nivel terminal en la ME y desempeñan un papel esencial en la generación del pulso de GnRH (Prashar *et al.*, 2023). Las poblaciones neuronales del núcleo supraquiasmático (SNC), neuronas VIP (péptido intestinal vasoactivo) y AVP (Arginina vasopresina) interactúan con las neuronas de GnRH y de kisspeptina en el AVPV en las regiones hipotalámicas y desempeñan un papel esencial en la oleada de GnRH/LH la cual es necesaria para la ovulación (Gotlieb *et al.*, 2020). Durante la oleada de LH las neuronas AVP, mediante la activación de las neuronas de kisspeptina, coordinan en la retroalimentación positiva y eliminan la retroalimentación negativa de estradiol suprimiendo a las neuronas RF-amida péptido-3 (RFRP-3) (Khan & Kauffman, 2012). Durante la oleada de LH las neuronas VIP pueden activar directamente las neuronas de GnRH, al interactuar con sus cuerpos celulares y también suprimen la actividad de las neuronas RFRP-3, las cuales están localizadas en el hipotálamo dorso medial (DMH). Las neuronas que expresan la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (Nnos) localizadas en el órgano vascular de la lámina terminal (OVLt) transmiten señales hormonales y neuronales a las neuronas de GnRH necesarias para la generación de la oleada de GnRH/LH (Prashar *et al.*, 2021). Las hormonas esteroides sexuales proporcionan retroalimentación positiva y negativa a estas poblaciones neuronales del cerebro durante las diversas fases del ciclo reproductivo (**Fig.3**). La señal esteroidea dirigida a las neuronas de GnRH es proporcionada por las neuronas kisspeptina y KNDy que expresan el receptor de estrógeno alfa (ER α) (Lehman *et al.*, 2010). Inicialmente, la retroalimentación negativa provoca la supresión de FSH y la selección del folículo, seguida de una retroalimentación positiva necesaria para la ovulación y la liberación de LH (Knobil *et al.*, 1980).

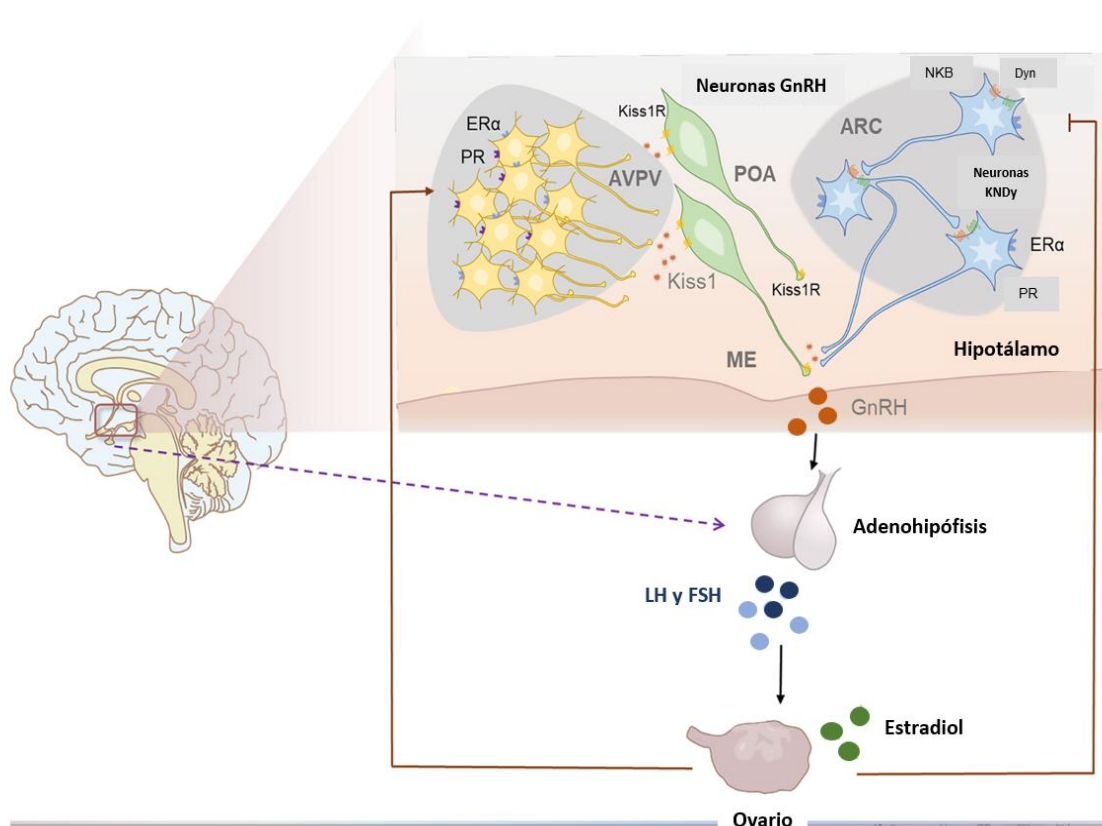


Figura 3. Esquema de la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HPG) en ratas. Las neuronas GnRH están presentes en las áreas preóptica y ventral del cerebro. Sus proyecciones se extienden hacia la eminencia media (ME), donde la GnRH es liberada en los vasos sanguíneos del sistema portal hipofisario. En el hipotálamo, múltiples poblaciones neuronales modulan la liberación de GnRH. Adaptado de “The Role of Kisspeptin in the Control of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Reproduction”, por Q. Xie y Y. Kang, 2022, *Frontiers in Endocrinology*.

A través de esta regulación, el eje HHG lleva a cabo los ciclos reproductivos en las ratas hembra, los cuales son llamados ciclos estrales, los cuales tienen una duración aproximada de 4-5 días; con ovulación espontánea (McMillan, 1998; Freeman, 2006; Goldman, 2007). Las fases del ciclo estral son: Proestro (duración 12-14 horas), Estro (al final del cual ocurre la ovulación, duración 25-27 horas), Diestro-1 y Diestro-2 (duración 55-72 horas) (Martin, 1979; Gorbman *et al.*, 1983; Hebel y Stromberg, 1986).

El ciclo estral se divide en dos fases, la fase folicular y la fase lútea. En la fase folicular se da la formación y desarrollo de los folículos hasta la ovulación, mientras que la fase lútea se da la formación del cuerpo lúteo (Byers, *et al.*, 2012).

El progreso del ciclo está relacionado con cambios en el contenido citológico del epitelio de la vagina, por tanto, la toma de muestras continuas se utiliza como indicador biológico de las oscilaciones en la liberación de hormonas ováricas (**Fig. 4**) y a su vez de las gonadotropinas (Hartman, 1944; Goldman *et al.*, 2007).

La etapa del Diestro-1 o Metaestro se caracteriza por ser la etapa de recuperación post-ovulación. Las concentraciones plasmáticas de FSH y LH son basales, aumenta la concentración de progesterona secretada por el cuerpo lúteo recién formado, y la concentración de estrógenos comienza a elevarse (Klein & Schwartz, 1999; Freeman, 2006). El epitelio vaginal está formando la membrana basal y 2-3 capas de células epiteliales están unidas a esta, y en cuanto al frotis vaginal se observan células escamosas y presencia de leucocitos (Goldman *et al.*, 2007; Westwood, 2008).

En la etapa del Diestro-2 (también llamado Diestro) los próximos folículos a ovular ya presentan la etapa antral, la cual se caracteriza por tener una cavidad llamada antro que contiene líquido folicular, hormonas y factores de crecimiento. Lo cual da como resultado un aumento continuo en la secreción de estrógenos, pero no así de FSH y LH, que siguen el mismo patrón de secreción que en Diestro-1 (Freeman, 2006). Continúa la presencia de leucocitos en las muestras del epitelio vaginal y ocasionalmente hay presencia de células basófilas nucleadas, mientras que el cuerpo lúteo llega a su tamaño máximo y comienza su regresión (Klein y Schwartz, 1999; Goldman, *et al.*, 2007; Westwood, 2008).

Durante la etapa del proestro, los estrógenos continúan aumentando gradualmente hasta alcanzar su máxima concentración, hasta que posteriormente se produce su disminución por la tarde. Por su parte, durante la mañana del proestro, las concentraciones de FSH, LH y prolactina se mantienen bajas y cuando se produce la caída brusca de estrógenos, las concentraciones plasmáticas de prolactina y progesterona se incrementan rápidamente hasta alcanzar un máximo, seguidas de una disminución que alcanza un mínimo en las primeras horas del día del estro (Goldman *et al.*, 2007; Westwood, 2008; Venegas *et al.*, 2015).

En la tarde del Proestro la concentración plasmática de LH empieza a aumentar y alcanza su nivel máximo entre las 17:00 y 19:00 h de ese día. El rápido aumento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación. En cuanto a la FSH, su secreción es semejante a la LH, ya que también inicia su incremento desde la tarde de esta fase y, aunque las concentraciones de FSH y LH declinan a sus niveles basales al mismo tiempo, durante la madrugada del estro se produce un aumento secundario de FSH que culmina en la mañana del estro (Freeman, 2006; Goldman, 2007). En esta etapa se observa una gran cantidad de células epiteliales visiblemente nucleadas y distintivamente redondas, las cuales pueden o no aparecer agrupadas, ocasionalmente también se puede observar una pequeña cantidad de células epiteliales escamosas cornificadas (Hubscher, 2005).

Durante las primeras horas del estro se produce la ovulación, las concentraciones plasmáticas de estrógenos, progesterona, LH y prolactina disminuyen al mínimo (niveles hormonales basales), pero no la de FSH, que alcanza un segundo “pico” en la mañana de este día, esta etapa se caracteriza por la presencia de células epiteliales escamosas cornificadas, generalmente se observan agrupadas, sin un núcleo observable y con una forma irregular, el citoplasma es altamente granular (Hubscher, 2005) **(Fig. 4)**.

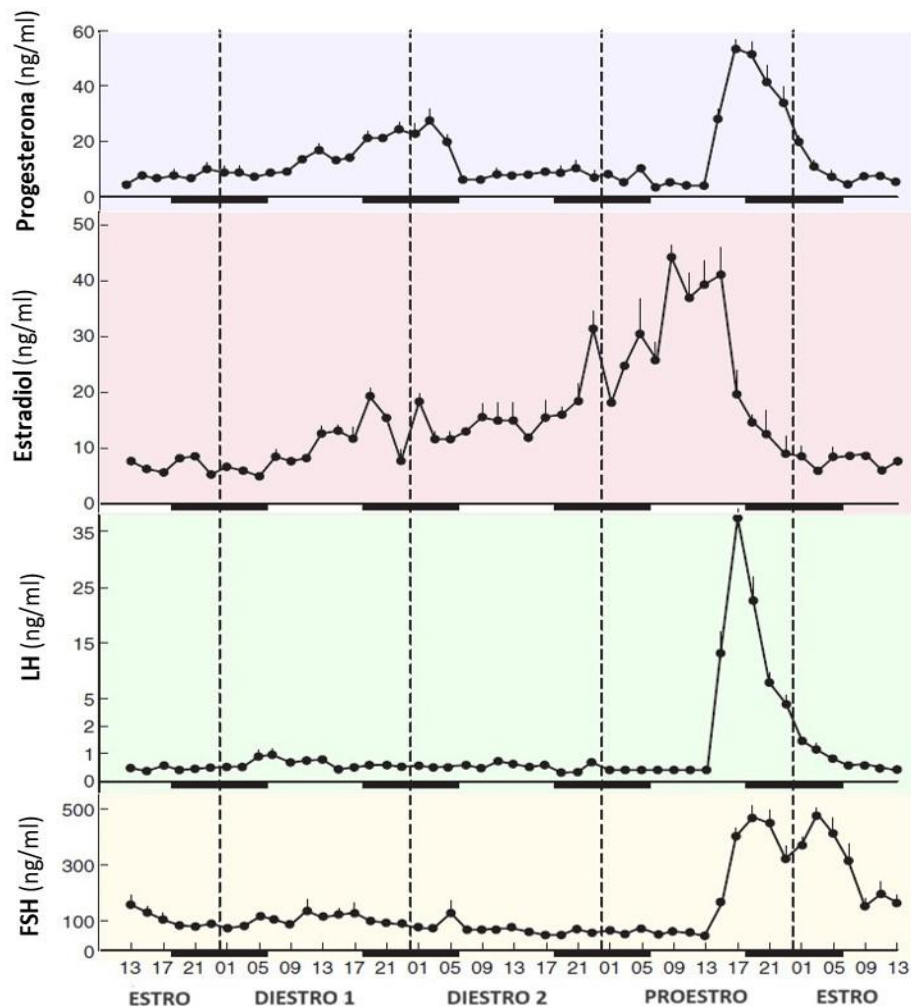


Figura 4. Concentración de hormonas gonadotrópicas y esteroideas durante los cuatro días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan los intervalos de oscuridad. Adaptado de “Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat”, en *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction* (3.ª ed., cap. 43, p. 2334), por J. D. Neill, 2006, Elsevier.

1.3 Desarrollo Folicular

Después de la secreción cíclica de las gonadotropinas hipofisarias LH y FSH, se produce la ovulación, proceso mediante el cual el ovocito es liberado de manera periódica desde el ovario. El ovocito se encuentra contenido dentro del folículo ovárico, el cual constituye la unidad estructural y funcional básica del ovario en los mamíferos (McGee et al., 2000). El folículo ovárico es una estructura tisular compleja, conformada por el ovocito y las células somáticas que lo

rodean, principalmente las células de la granulosa y la teca, cuya organización permite no solo brindar protección física al ovocito, sino también proporcionar soporte metabólico y nutricional necesario para su crecimiento y maduración. Asimismo, el folículo actúa como una unidad endocrina dinámica, responsable de la síntesis y secreción de hormonas esteroideas, incluyendo estrógenos, progesterona y andrógenos, (Hawkins & Matzuk, 2008). El tamaño del folículo cambia drásticamente a medida que avanza el desarrollo del folículo, el tamaño final del folículo preovulatorio es proporcional al tamaño del animal y, por lo tanto, es muy variable. En el caso de ratas, durante el proestro los folículos preovulatorios pueden medir 0.9 mm en comparación con los de las mujeres que pueden medir de 12 a 18 mm de diámetro. Estos folículos distribuyen en la superficie de la corteza ovárica (Yoshida *et al.*, 2009).

La maduración de los folículos ováricos es un proceso complejo que involucra señalización intra y extraovárica; si bien los componentes y mecanismos de la señalización intraovárica se desconocen en gran medida, la participación de FSH y LH en el proceso está bien documentada (Harlow & Hillier, 2002).

La función de la FSH es estimular la maduración del folículo ovárico, lo logra iniciando el crecimiento de las células de la granulosa y promoviendo la transición de los folículos primarios a los folículos secundarios y de Graaf en preparación para la ovulación. La función principal de la LH ocurre en el pico del estro. La LH se libera de forma pulsátil en concentraciones bajas durante la foliculogénesis y aumenta para promover la ovulación (Howles, 2000).

Para su estudio el desarrollo folicular se puede clasificar en las siguientes tres fases según su etapa de desarrollo y dependencia de gonadotropinas (Orisaka *et al.*, 2009): (a) crecimiento folicular a través de las etapas primordial, primaria y secundaria, que es completamente independiente de FSH y LH (fase independiente de gonadotropinas); (b) transición folicular desde la etapa preantral hasta la etapa antral temprana, que, aunque controlada principalmente por reguladores intraováricos, puede ser estimulada por FSH (fase sensible a gonadotropinas); y (c) crecimiento y maduración folicular más allá de la etapa antral temprana, que incluye reclutamiento folicular, selección y ovulación, y depende de FSH y LH (fase dependiente de gonadotropinas).

El proceso de desarrollo de los folículos primordiales, primarios y secundarios no depende de las gonadotropinas hipofisarias y está controlado por reguladores intraováricos (Cattanach *et al.*, 1977). Después del nacimiento, los folículos primordiales permanecen inactivos en los ovarios; sin embargo, eventualmente, un grupo de ellos comienza a crecer y convertirse en folículos primarios (activación de folículos primordiales) (Orisaka *et al.*, 2021). Según estudios en murinos la activación de la vía de señalización del fosfatidilinositol 3-cinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt) (Hsueh *et al.*, 2015), la inhibición de la hormona antimülleriana (AMH) (Durlinger *et al.*, 2002) y factores de crecimiento se han implicado en la activación de folículos primordiales. La vía PI3K/Akt es un sistema de transducción de señales intracelular que induce la proliferación y supervivencia de varias células y se cree que está involucrado en la activación de folículos primordiales en el ovario; sin embargo, aún no se ha esclarecido con claridad cómo se da esta activación para su posterior desarrollo (Pangas & Rajkovic, 2015).

Durante la transición del estadio preantral al antral, los folículos ováricos adquieren progresivamente dependencia a FSH, lo que representa un punto crítico en su desarrollo. En esta etapa, el control del crecimiento folicular cambia de una regulación predominantemente intraovárica, mediada por factores locales, a un control endocrino dependiente de la FSH. La adquisición de la dependencia constituye un evento determinante para el destino folicular, ya que aquellos folículos capaces de responder adecuadamente a la estimulación por FSH continúan su crecimiento y maduración, mientras que aquellos con una respuesta insuficiente son dirigidos hacia la atresia (Kumar *et al.*, 1997) (**Fig. 5**).

Folículo primordial

Histológicamente, un folículo primordial contiene un pequeño ovocito primario (~ 25 µm de diámetro) con una sola capa de células de la granulosa aplanadas o escamosas estrechamente unidas al ovocito y una lámina basal. En virtud de la lámina basal, las células de la granulosa y el ovocito existen dentro de un microambiente en el que no se produce contacto directo con otras

células. Los folículos primordiales y primarios carecen de un suministro de sangre independiente y, por tanto, tienen un acceso limitado al sistema endocrino (Williams *et al.*, 2015).

Folículo Primario

Constan de un ovocito rodeado por una capa de células granulosas que adquieren forma cuboidal (Hirshfield, 1991). El folículo aumenta su tamaño a 40-80 μm , rodeado por 10 a 40 células de la granulosa. Los principales eventos de desarrollo que ocurren en el folículo primario incluyen la formación de los receptores a FSH, el crecimiento y diferenciación de los ovocitos (Fortune, 2003).

Folículo Secundario o Preantral

Los principales cambios que ocurren durante el desarrollo del folículo secundario incluyen la acumulación de un mayor número de células de la granulosa, que forman múltiples capas alrededor del ovocito, y la adquisición de una teca. El desarrollo de un folículo primario a uno secundario completamente desarrollado es el resultado de un proceso regulador autocrino/paracrino activo que involucra factores de crecimiento producidos por el ovocito (Williams *et al.*, 2015)

Folículo Antral

El folículo antral se caracteriza por la presencia de una cavidad denominada “*antro*” la cual contiene un líquido denominado líquido folicular. Este líquido folicular corresponde a un exudado plasmático y está constituido por productos secretados por el ovocito y las células de la granulosa (Fortune, 2003). Además, representa el medio en el que se encuentran inmersos tanto el ovocito como las células de la granulosa, y a través del cual deben difundirse las moléculas reguladoras que participan en la comunicación bidireccional dentro de este microambiente. El inicio de la

formación del antro se distingue por la aparición de una cavidad llena de líquido en uno de los polos del ovocito (Gougeon, 2004).

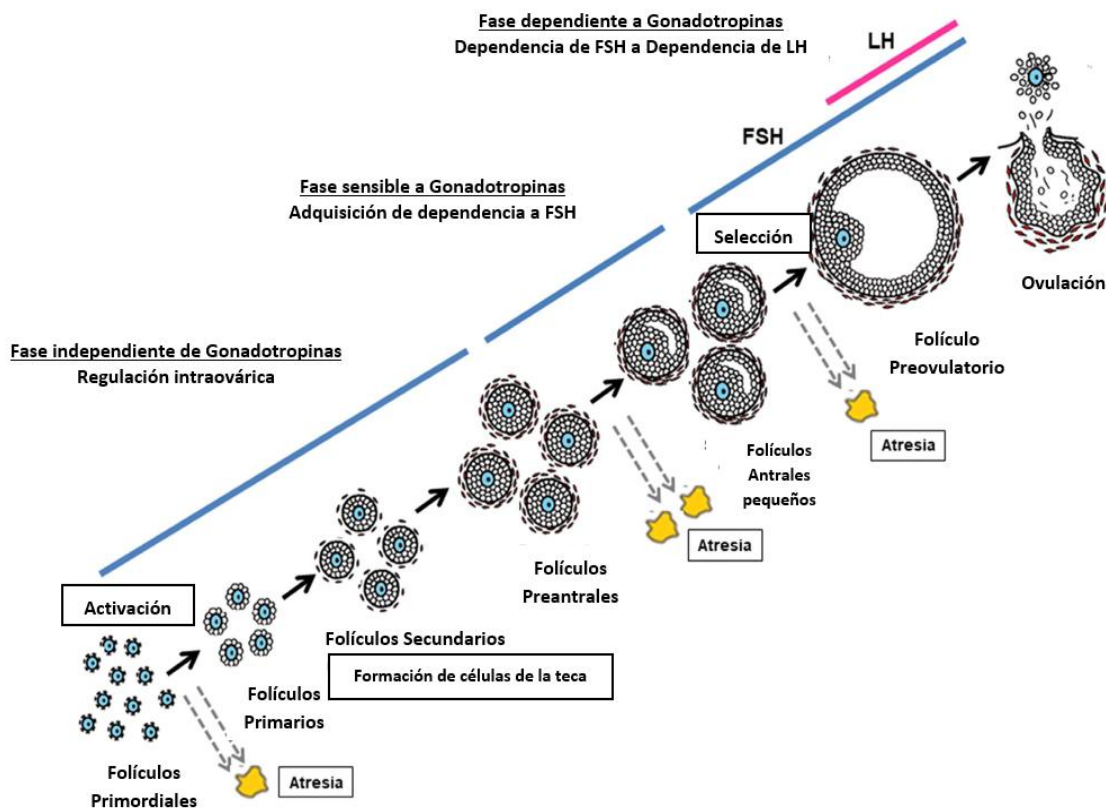


Figura 5. Desarrollo folicular en el ovario. Procesos de activación, selección y ovulación de acuerdo a la dependencia a gonadotropinas. Adaptada de "The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review" (p. 170). Por M. Orisaka, Y. Miyazaki, (2021), *Reproductive Medicine and Biology*.

Receptores de FSH y LH

En la fase del ciclo estral folicular temprana, los niveles séricos de LH son relativamente bajos y, por lo general, se consideran suficientes para mediar la síntesis de androstenediona en las células de la teca (Casarini *et al.*, 2018). Además, se observan concentraciones relativamente altas de los receptores a la hormona folículoestimulante (FSHR) en la superficie de las células de la granulosa,

que también expresan niveles bajos de receptores de la hormona luteinizante (LHR) (Jeppesen *et al.*, 2012); esto sugiere que la interacción entre estos dos receptores modula las señales de las gonadotropinas (Jones, *et al.*, 2018). Así, en las células de la granulosa se requiere una acción sinérgica, dependiente de la FSH y la LH, para asegurar un crecimiento folicular adecuado. A lo largo de este proceso, las células de la teca siguen proporcionando un sustrato de androstenediona para la producción de estrógeno en las células de la granulosa, sustentando así el crecimiento folicular y la maduración/el metabolismo del ovocito (Speroff *et al.*, 2020).

Conforme se reduce la secreción de FSH en la hipófisis y la expresión folicular de FSHR, los niveles de LH aumentan progresivamente, junto con el desarrollo folicular, para pasar a la etapa antral avanzada. En la última parte de esta etapa, el crecimiento folicular depende de las gonadotropinas y del estradiol. Sin embargo, la producción de FSH y LH continúa, induciendo así señales proliferativas y apoptóticas en los folículos dominantes y atrésicos, respectivamente (Casarini *et al.*, 2018). En la fase folicular tardía, los LHR reemplazan por completo a los FSHR en las células de la granulosa del folículo dominante e inducen tanto la ovulación como los cambios de estado metabólico necesarios para la luteinización, es decir, una producción masiva de progesterona dirigida exclusivamente por la LH (Speroff *et al.*, 1989). Durante la fase lútea, la LH mantiene la actividad esteroideogénica y al cuerpo lúteo. La LH induce específicamente una regulación por aumento de los factores de crecimiento que participan en la angiogénesis lútea, como el factor de crecimiento epidérmico vascular EGF-A, así como la regulación por aumento de los ligandos del factor de crecimiento epidérmico (anfirregulina y epirregulina) que, a su vez, modulan la apoptosis en las células de la granulosa luteinizadas y respaldan la supervivencia del cuerpo lúteo (Wang *et al.*, 2002).

OVULACIÓN

En las hembras de los mamíferos, la ovulación es un proceso sincronizado e inducido por un aumento brusco en la secreción de LH por la hipófisis, el cual es estimulado por GnRH (Bakos, 1993; Choi & Smits, 2014). La LH y la FSH actúan de forma complementaria como inductores de la ovulación, debido a que las dos hormonas son liberadas en el mismo lapso en

respuesta a la GnRH, además de que la FSH es requerida para sensibilizar al folículo a la acción de la LH (Kaiser *et al.*, 1997).

Este proceso es dinámico, ya que conlleva cambios en la integridad de la superficie del folículo, inicia con un pico de LH en la etapa preovulatoria, que desencadena diversas vías de señalización y la interacción de diferentes tipos de células, y compartimentos celulares (Duffy *et al.*, 2019). Las funciones principales de estas vías son promover la permeabilidad y aumento del flujo sanguíneo, acelerar la remodelación de la matriz extracelular que conduce a la degradación del ápice folicular y la reestructuración del folículo a cuerpo lúteo, modificar la esteroidogénesis en las células de la granulosa y de la teca para secretar progesterona, y para mantener una presión intrafolicular positiva. La pared folicular finalmente se rompe y el ovocito es expulsado acompañado de células granulosas (corona radiata) (Carrel & Peterson, 2010).

Cerca de la mitad del ciclo, ocurre un considerable aumento en los niveles de estrógenos sobre el umbral, con el fin de estimular por retroalimentación positiva un pico de gonadotropinas principalmente de LH y en menor medida de FSH. El pico de LH es el estímulo dominante para que el folículo ovule y dé origen al cuerpo lúteo. Después del pico preovulatorio de LH, la síntesis de estradiol disminuye mientras que se produce un incremento en la producción de progesterona que es estimulado por la misma LH (Bosch *et al.*, 2021). También desaparecen uniones estrechas, que mantenían unidas las células de la granulosa y la lámina basal. Estas uniones no se ven afectadas en las células que forman parte de la corona radiata. En este fenómeno existe también, un componente mecánico por el rápido incremento en el tamaño del folículo ovárico, luego del cual, el folículo emerge desde la corteza (Leonardi *et al.*, 2012). Luego de la ovulación, el folículo ovárico se transforma en cuerpo lúteo. En este proceso, el ovocito que estaba detenido en profase I, reanuda la meiosis y es ovulado en el estadio de metafase II (Xue Jing *et al.*, 2016).

1.4 Esteroidogénesis

Las hormonas esteroideas se producen en diversos tejidos, las como células testiculares, la corteza adrenal, los ovarios y la placenta; son sintetizadas a partir de moléculas de colesterol. El resultado final depende de las diferentes enzimas que se sintetizan en el tejido específico, generándose así los diversos tipos de esteroides identificados como glucocorticoides,

mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos (Morales *et al.*, 2007). Específicamente en las hembras los estrógenos (E2) y la progesterona (P4), influyen en la secreción de LH/ FSH mediante mecanismos de retroalimentación negativos y positivo que modifican la frecuencia de secreción de estas gonadotropinas que influyen en la misma secreción de estos esteroides (Franco *et al.*, 2006).

La vía esteroidogénica en los ovarios ha sido descrita por la teoría de dos células, dos gonadotropinas. Primero, el colesterol actúa como el precursor principal en el proceso de síntesis; este obteniendo de los capilares sanguíneos, luego se recluta en las células de la teca a través de receptores de lipoproteínas. La proteína reguladora esteroidogénica aguda (StAR) transporta al colesterol a las mitocondrias, donde la clivación de la cadena lateral del colesterol por el citocromo P450 (CYP11a1) resulta en su conversión a pregnenolona (Kahsar-Miller *et al.*, 2001). Posteriormente, la 17 α -hidroxilasa, 20-desmolasa (CYP17a1 o CYP45017 α) cataliza la conversión de pregnenolona a dehidroepiandrosterona (DHEA) y la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD3B) a progesterona. La DHEA y la progesterona se convierten posteriormente en androstenediona por HSD3B y CYP17a1, respectivamente. Es pertinente mencionar aquí que la actividad enzimática de CYP17a1 depende de la estimulación de LH de manera dependiente de la dosis (Penning, 1997). Además, la androstenediona es el precursor principal de la síntesis de testosterona y estrógenos en los ovarios (Rosenfield & Ehrmann, 2016). Se convierte en testosterona a través de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD17B) en las células de la teca o se difunde a las células de la granulosa, donde se convierte directamente en estrona por aromatasa (CYP19A1) o, nuevamente, en testosterona por HSD17B, de la cual finalmente se convierte en estradiol, principalmente por la aromatasa (Simpson *et al.*, 1994). La síntesis de andrógenos y su conversión a estrógenos deben coordinarse para la función ovárica adecuada (**Fig. 6**).

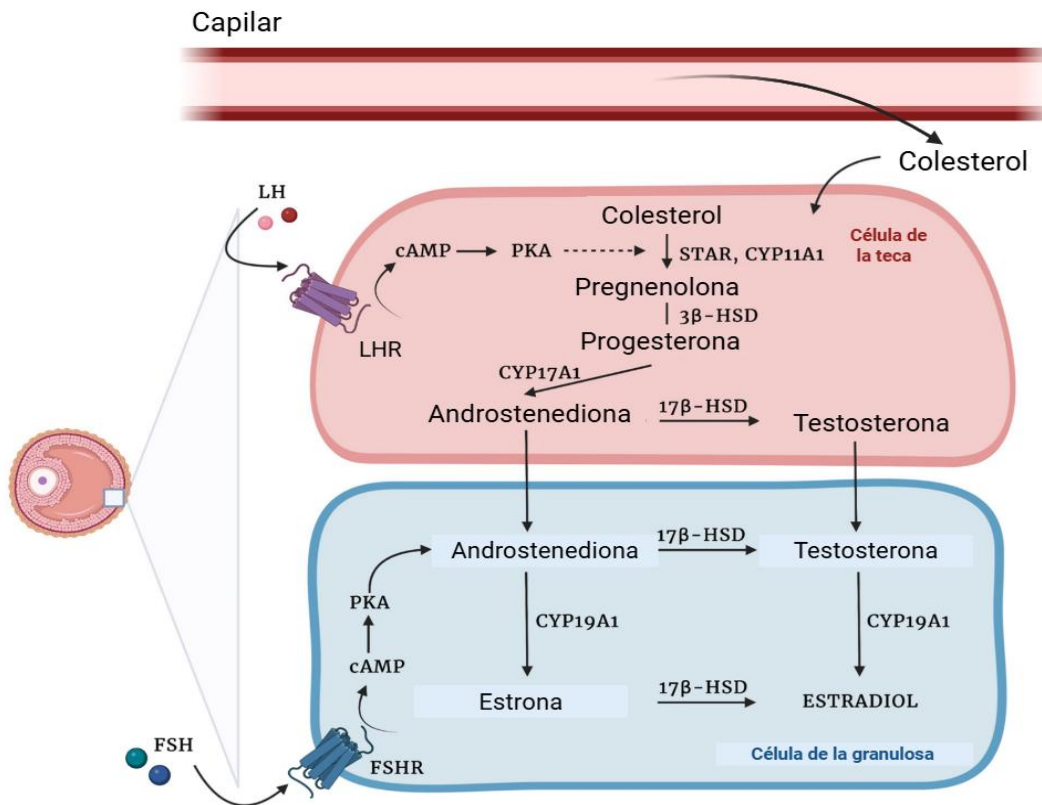


Figura 6. Esquema que representa la esteroidogénesis. Las células de la teca producen andrógenos en respuesta a LH que luego se convierten en estrógenos en las células de la granulosa célula bajo la acción de la FSH, regido diversas enzimas. La síntesis y conversión a los estrógenos debe ser adecuadamente coordinado para una función ovárica normal. Adaptada de “Molecular Mechanisms in the Etiology of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): A Multifaceted Hypothesis Toward the Disease with Potential Therapeutics” (p.20), K. Nisa, N. Tarfeen (2023), *Indian Journal of Clinical Biochemistry*.

1.5 Inervación Ovárica

Desde hace muchos años se sabe que el ovario de los mamíferos está innervado por neuronas extrínsecas a la glándula. En el caso específico de la rata, varios estudios histológicos han revelado la distribución e inervación de los nervios simpáticos (espláncnicos) y parasimpáticos (vagales) (**Fig. 7**), incluidos tanto los aferentes como los eferentes (Burden *et al.*, 1983; Gerendai *et al.*, 2000; Uchida & Kagitani, 2014).

Los nervios simpáticos que inervan el ovario se originan principalmente en los segmentos torácicos inferiores de la médula espinal (T9–T10), y sus fibras descienden a través de la región lumbar, principalmente a nivel de L1–L2, formando el plexo ovárico, mientras que los nervios vagales se originan en las neuronas medulares del núcleo del tracto solitario, el complejo vagal dorsal, el núcleo ambiguo y el área postrema (Burden *et al.*, 1983; Gerendai *et al.*, 1998). Estos nervios extrínsecos llegan al ovario por dos rutas: el nervio del plexo ovárico (NPO) a lo largo de la arteria ovárica y el nervio ovárico superior (NOS) en el ligamento suspensorio (**Fig.7**) (Baljet *et al.*, 1979; Lawrence *et al.*, 1980).

El NPO viaja junto a los vasos sanguíneos, lleva la mayoría de las fibras sensoriales, los nervios con neuropéptido Y (NPY) y el grueso de la inervación noradrenérgica que controla la vasculatura (Baljet & Drukker, 1979; Lawrence y Burden 1980; Dees, *et al.*, 1986; McDonald *et al.*, 1987). La inervación ovárica de tipo simpático por el NOS viaja a través del ligamento suspensorio y entra al ovario por el hilio; innervando folículos, vasos sanguíneos, células intersticiales y células de la teca interna (Araya, 2004). Sin embargo, en algunas especies las fibras nerviosas llegan a los folículos primordiales en desarrollo, pero no penetran en la lámina basal ni en las células granulosas (D'Albora y Barcía, 1996; D'Albora *et al.*, 2000).

La sección uni- o bilateral del NOS modifica la respuesta del ovario a las gonadotropinas (Domínguez *et al.*, 2003), por lo que se postula que la información nerviosa juega un papel importante en la regulación de la secreción hormonal y la ovulación.

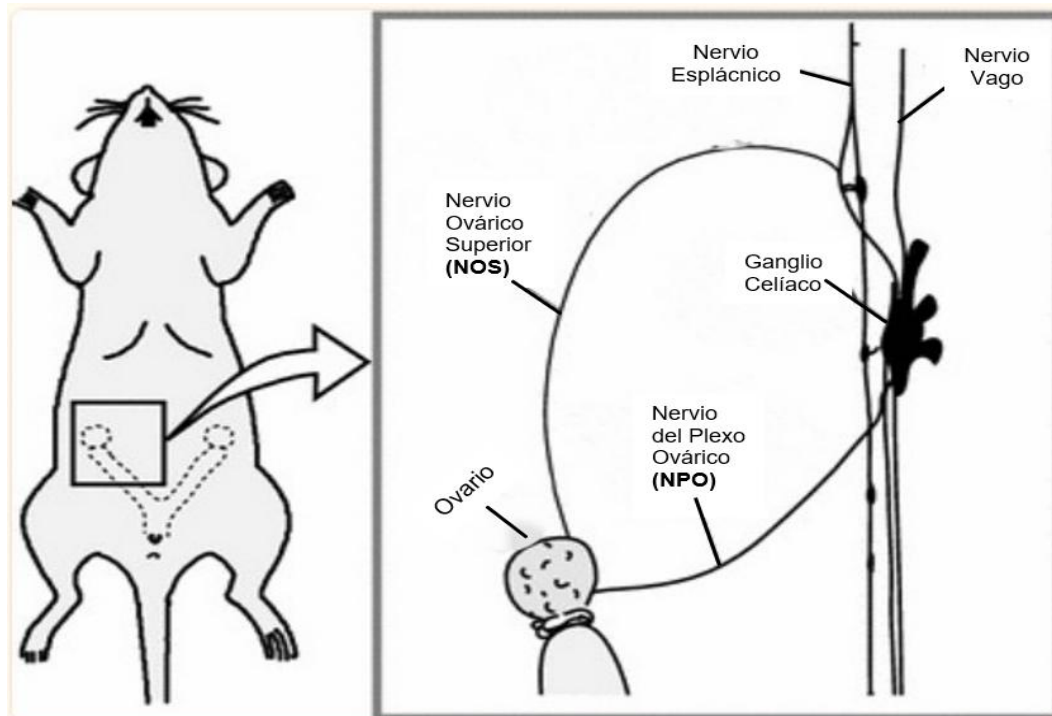


Figura 7. Ilustración esquemática de innervación ovárica en rata. Nervio Ovárico Superior (NOS) y el Nervio del Plexo Ovárico (NPO). Adaptada de “Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation” (p.2) por S. Uchida F. Kagitani (2014). *J. Physiol. Sci.*

La innervación ovárica se establece inicialmente con estructuras foliculares tempranas y se mantiene a lo largo del tiempo, acompañando a los folículos durante todo el proceso de maduración (Hernández *et al.*, 1988). Una vez que ocurre la ovulación, la innervación simpática continúa asociada a las células tecales de los folículos, aunque éstas se transforman en células intersticiales secundarias, las cuales mantienen la capacidad de sintetizar andrógenos ováricos. Se ha comprobado que la pérdida permanente de la innervación simpática lleva a un desarrollo folicular retardado, una respuesta a gonadotrofinas disminuida y marcadas irregularidades en el ciclo estral (McDonald & Ojeda, 1990).

En cuanto a la innervación intrínseca y su participación en el funcionamiento se ha demostrado en diversos órganos (Anetsberger *et al.*, 2018; Hao *et al.*, 2020). La innervación intrínseca del ovario se ha descrito en varias especies (Gilbert 1969; Madekurozwa 2008). Varios estudios han demostrado inequívocamente la presencia de neuronas intrínsecas ováricas en varias especies de mamíferos, incluidas ratas, monos y humanos (D’Albora *et al.*, 2002), en cerdos, se han

identificado estructuras nerviosas, como células neuronales y fibras nerviosas, dentro del ovario (Jana *et al.* 2015). La innervación intrínseca del ovario es provista por neuronas con soma multipolar alojadas principalmente en la médula ovárica; mientras que las localizadas en la corteza están inmersas en la capa de células de la teca, pero no atraviesan la membrana basal y, por lo tanto, no ingresan al interior del folículo ni del cuerpo luteo (D'Albora *et al.*, 2002; Bravo, *et al.*, 2021).

Cada folículo individualmente está innervado principalmente por una fibra neuronal. Incluso en el transcurso de 48 h de una superovulación, la velocidad de crecimiento de un nervio es directamente proporcional al desarrollo de un folículo maduro y las terminaciones nerviosas están concentradas mayormente en la superficie del folículo en desarrollo. Esto sugiere que el desarrollo folicular y la ovulación necesitan no solo un suministro sanguíneo abundante, nutrición y suministro hormonal, sino también un nervio intrínseco, que puede desempeñar un papel en estimular la sensibilidad del inicio del desarrollo folicular y guiar las arteriolas hacia la membrana folicular (Tong *et al.*, 2020).

Respecto a la naturaleza bioquímica de las neuronas intrínsecas del ovario, se ha mostrado que producen neuropéptido Y (NPY), aunque no se ha determinado si también producen otros péptidos (D'Albora *et al.*, 2002). Algunos resultados muestran que en los ovarios de la rata hembra adulta de la cepa Long Evans, existe una innervación intrínseca abundante y, específicamente en la corteza del ovario, cada folículo está asociado a un grupo de neuronas que pudiera influir en su desarrollo. También se han identificado al interior del CL, células que muestran inmunoreactividad a enzimas involucradas en la síntesis de catecolaminas (TH), que seguramente tienen la capacidad de influenciar la regulación y síntesis de progesterona en el CL (Bravo-Benítez *et al.*, 2022).

Al ovario estas fibras nerviosas tanto intrínsecas como extrínsecas aportan neurotransmisores vitales para los ovarios que se originan de neuronas localizadas en el cerebro o en la médula espinal (Burden 1978; Dissen *et al.*, 2004). La presencia de neurotransmisores en el ovario se debe a la existencia de una comunicación neuroanatómica directa entre el sistema nervioso central (SNC) y las gónadas, establecida a través de la innervación periférica autónoma. Esta comunicación se lleva a cabo mediante estructuras como el plexo celíaco, el nervio ovárico

superior, el plexo nervioso ovárico y el nervio vago, los cuales permiten la transmisión de señales nerviosas desde el SNC hacia el ovario (Gerendai *et al.*, 1998). En particular, el nervio vago derecho forma un plexo vagal con microganglios que presentan reactividad a tirosina hidroxilasa, lo que sugiere la participación de neuronas con capacidad catecolaminérgica y colinérgica. A través de estas vías, neurotransmisores como la acetilcolina pueden ser transportados por mecanismos de conducción axonal hasta el ovario, donde actúan como moduladores locales de la función ovárica (Rivera-Castro *et al.*, 2023). Una vez en el tejido ovárico, estos neurotransmisores funcionan como señales intrínsecas que regulan procesos clave como el desarrollo folicular, la función del cuerpo lúteo y la ovulación, evidenciando así el papel fundamental de la innervación periférica en la regulación neuroendocrina del ovario (Urrea *et al.*, 2016).

Las fibras nerviosas catecolaminérgicas están involucradas en el control de la función ovárica (Lara *et al.*, 2002) y, en éstas, la noradrenalina (NA) es el principal neurotransmisor y estimula la liberación de progesterona de las células de la teca. Las fibras noradrenérgicas no sólo alcanzan los vasos sanguíneos y el tejido intersticial, sino que llegan hasta la teca externa de los folículos en desarrollo (Mayerhofer & Fritz, 2002), sin alcanzar las células de la granulosa (Lara *et al.*, 2001).

1.6 Catecolaminas en el Ovario

Las catecolaminas, como la adrenalina y la noradrenalina son hormonas que desempeñan un papel fundamental en la respuesta de "lucha o huida" del cuerpo, que es la respuesta fisiológica al estrés (Maestroni *et al.*, 2020). Actúan sobre las células diana uniéndose y activando receptores acoplados a proteína G (GPCR), incluidos los receptores α -adrenérgicos (subdivididos en subtipos $\alpha 1$ y $\alpha 2$), los receptores β -adrenérgicos (subdivididos en los subtipos $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$) y receptores de dopamina. La activación de estos receptores por las catecolaminas inicia una cascada de señalización que implica la activación de proteínas G, sistemas de segundos

mensajeros, y, en última instancia, conduce a cambios en la expresión génica y en función celular (Dutt *et al.*, 2022; Akinaga *et al.*, 2019).

Las catecolaminas se encuentran presentes en el ovario de los mamíferos y estas están implicadas en muchos aspectos de las funciones ováricas, incluidos el crecimiento folicular, la esteroidogénesis, pero también en estados patológicos (Greiner *et al.*, 2008). Estas catecolaminas derivan de la inervación extrínseca del ovario, participan en la regulación del desarrollo ovárico y de la función gonadal madura (Spicer *et al.*, 1986).

Diversos enfoques experimentales han demostrado que la NA, reconocida por receptores específicos del subtipo β 2-adrenérgico, estimula la esteroidogénesis ovárica por sí sola y facilita el efecto estimulante de las gonadotropinas sobre la producción de esteroides (Aguado *et al.*, 1982; Hernández *et al.*, 1982). La NA también promueve el desarrollo folicular (Lara *et al.*, 1990; Mayerhofer *et al.*, 1997). En contraste con este conjunto de información, se sabe muy poco sobre las posibles contribuciones de la DA a la fisiología ovárica, pero se ha demostrado la presencia de dopamina y sus receptores en diferentes tejidos del ovario (Mayerhofer, *et al.*, 2000; Gay *et al.*, 2004; King, *et al.*, 2005; Rey-Ares *et al.*, 2007). Los estudios han demostrado la presencia de ARNm para receptores DA1 y receptores DA2 en la corteza ovárica de yeguas, humanos, monos y ratas (Mayerhofer *et al.*, 1999; King, *et al.*, 2005; Rey-Ares *et al.*, 2007). La presencia de receptores a la dopamina en diferentes compartimentos ováricos sugiere que puede desempeñar un rol importante en la regulación de las funciones del ovario. Dentro del mismo ovario, la DA puede ejercer diferentes funciones dependiendo de su unión a receptores tipo D1 o tipo D2. Ambos tipos de receptores se han descrito en estructuras ováricas de diferentes especies (Mori *et al.*, 1994; Mayerhofer *et al.*, 1999).

Comúnmente se supone que las catecolaminas llegan al ovario exclusivamente a través de su inervación simpática extrínseca (Mohsin *et al.*, 1979). Sin embargo, en 1980 Lawrence y Burden, encontraron que la denervación ovárica reduce, pero no elimina el contenido de noradrenalina, lo que sugiere la existencia de una fuente intrínseca de catecolaminas. Posteriormente, Ben-Jonathan y colaboradores (1984), postularon que una fuente más de noradrenalina es producida *in situ* por el ovario. Se encontró que las células foliculares son las encargadas de la síntesis de

catecolaminas ya que se encontraron altos niveles de éstas en fluido folicular pero no en suero (Bahr & Ben-Jonathan, 1985). Además, se encontró que las células tecales producen más catecolaminas que las células de la granulosa. Esta teoría fue reafirmada al identificar la presencia de la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas: tirosina hidroxilasa (TH) en ovarios de ratas (D'Albora *et al.*, 2000), monos (Dees *et al.*, 1995) y humanos (Anesetti *et al.*, 2001). Las neuronas intraováricas contienen TH y dopamina β-hidroxilasa (DBH) (Mayerhofer *et al.*, 1998). Existen evidencias que sugieren que los nervios adrenérgicos podrían participar en: 1) ovulación (Jacobowitz & Wallach, 1967), 2), la secreción de gonadotropinas y actividad del ciclo estral y 3) influir en la secreción de hormonas esteroides y el desarrollo de los folículos ováricos (Burden *et al.*, 1985).

1.7 El sulpiride como antagonista específico para receptores dopaminérgicos DA- 2.

Los antagonistas D2 bloquean los receptores dopaminérgicos tipo 2 (DA-2); por lo tanto, reducen la actividad dopaminérgica. El mecanismo de acción de los antagonistas de los receptores DA-2 varía según el tipo específico de medicamento, pero generalmente actúan bloqueando competitivamente los receptores DA-2, impidiendo que la dopamina se una y ejerza su efecto (Martel *et al.*, 2020). Al reducir la actividad dopaminérgica, estos fármacos pueden tener efectos terapéuticos en diversas condiciones como en la hiperprolactinemia y en desórdenes de ovulación, y también para realizar investigaciones acerca de ciertas patologías donde estos receptores están involucrados como el síndrome de ovario poliquístico, anovulación o disfunción lútea (Taketa, 2022)

Uno de los antagonistas que ha sido de gran utilidad para realizar ciertas investigaciones de la fisiología ovárica es el Sulpiride, el cual es un fármaco neuroléptico, que pertenece al grupo de las benzamidas sustituidas, donde se incluyen también fármacos como la sultoprida, tiaprida o metoclopramida (Jenner & Marsden, 1979). Es un antagonista específico de los receptores dopaminérgicos D2, debido a su escasa liposolubilidad, y por tanto a su dificultad para atravesar la barrera hematoencefálica, esté fármaco suele administrarse en dosis altas (Gerlach, 1991). A diferencia de otros neurolépticos como la clozapina o el haloperidol, el sulpiride no interactúa

significativamente con receptores de otros neurotransmisores, por lo que su perfil atípico no parece relacionarse con el bloqueo serotoninérgico, muscarínico o alfa-adrenérgico (Palomo, 1991).

Los antecedentes que muestran los efectos del bloqueo específico de los receptores dopaminérgicos DA-2 utilizando antagonistas sobre el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, ayudan a esclarecer el papel crítico que desempeña la dopamina en la función reproductiva de la hembra en relación con las vías de comunicación endocrina, neuroendocrina y neurocrina (Domínguez *et al.*, 1987; Morán & Domínguez, 1995; Venegas *et al.*, 2015).

2. ANTECEDENTES

Tradicionalmente se acepta que los principales controladores de la función gonadal son diversos mecanismos endocrinos/paracrinós que involucran el eje hipotalámico-pituitario-gonadal. Sin embargo, una creciente colección de evidencia apunta a un mecanismo adicional que controla la función gonadal involucra actividad neuronal autónoma (catecolaminérgica) y posiblemente efectos endocrinos producidos por sustancias químicas neurotransmisoras secretadas por células ováricas no neuronales (Clement, 2016).

Para saber un poco más sobre el efecto de las catecolaminas ováricas, Domínguez y colaboradores (1985) evaluaron sus efectos fisiológicos mediante el uso de antagonistas de sus receptores en los diferentes días del ciclo estral de la rata a distintas horas. Demostraron que el bloqueo farmacológico del receptor de DA (RDA) promueve una falla ovulatoria, que depende del día del ciclo estral y la hora en el que se realiza el bloqueo (Domínguez, *et al.* 1987, Venegas, *et al.*, 2015), además de interrumpir el desarrollo folicular e incrementar la atresia folicular (Ramírez-Ávila, 2001)

En el ovario además de la innervación extrínseca, también tiene innervación intrínseca, en el mono Rhesus la presencia de innervación intrínseca que proviene de células con apariencia similar a la de una neurona, la presencia de innervación intrínseca también se ha demostrado en la rata Wistar (D'Albora y Barcia, 1996; D'Albora *et al.*, 2000). Aunado a esto, algunas de estas células fueron positivas a la tirosina hidroxilasa, lo que indica que son catecolaminérgicas (Dees *et al.*, 1995).

Posteriormente se demostró que en estas células expresa el gen que codifica para la enzima dopamina- β -hidroxilasa, que transforma la dopamina en noradrenalina (Mayerhofer *et al.*, 1998). En cuanto a la innervación intrínseca, Benítez y colaboradores (2022) caracterizaron bioquímica y morfométricamente a las neuronas intrínsecas en ovario de ratas Long Evans CII-ZV adultas jóvenes, de mediana edad y senescentes. Sus resultados confirman que las neuronas están asociadas con las células internas de la teca y la lámina basal. También, sus resultados aportan que la mayoría de las neuronas intrínsecas están asociadas en grupos a todas las estructuras de la corteza ovárica (teca folicular, alrededor del cuerpo lúteo y alrededor de quistes), por lo que se sugiere la participación en la regulación del desarrollo de los folículos y la ovulación asociadas a la morfología y el número de estas neuronas intrínsecas, que varían de acuerdo con la edad, estos cambios se notaron más en las ratas senescentes. En cuanto a los receptores dopaminérgicos Rey-Ares en 2007, encontraron a través de ARNm la presencia de receptores dopaminérgicos D1 y D2 en células de la granulosa de la teca de los folículos ováricos y del cuerpo lúteo en el ovario de rata.

En los resultados de Greiner y colaboradores (2008), se encontraron transportadores de DA y de NA en células de la granulosa de folículos ováricos de rata, su funcionalidad se confirmó en células de la granulosa aisladas y cultivadas *in vitro* bajo condiciones controladas su capacidad de captar, almacenar y liberar estas catecolaminas. Sus resultados en ratas pueden ser relevantes para el ovario humano porque el transportador de dopamina y de NA se encuentran en folículos ováricos humanos y/o células de la granulosa aisladas. Por tanto, las células de la granulosa no neuronales del ovario, después de absorber catecolaminas, pueden servir como compartimento intraovárico de almacenamiento de catecolaminas, liberándolas de forma regulada. Esto sugiere una implicación más compleja de las catecolaminas en las funciones ováricas como se está sospechando actualmente (Saller *et al.*, 2014).

Es por ello que Venegas y colaboradores (2015), mostraron la existencia 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 DA 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.

Se ha observado que la dopamina también puede desempeñar un papel en el control de la foliculogénesis en yeguas. La administración de antagonistas de DA, incluida flufenazina (Nequin, *et al.*, 1993), perfenazina (Bennett *et al.*, 1998), sulpiride (Besognet *et al.*, 1997) y domperidona (Brendemuehl *et al.*, 2000) causó la estimulación de la foliculogénesis en invierno de manera transitoria en las yeguas en anestro, pero con sulpiride no tuvo efecto en yeguas en anestro profundo (Donadeu *et al.*, 2002). Estos efectos potencialmente podrían deberse a la(s) acción(es) de la dopamina en los tejidos ováricos o la hipófisis. Alternativamente, la administración del agonista DA, bromocriptina, resultó en un significativo retraso en el desarrollo estacional de los folículos ováricos y en la ciclicidad (Bennett, *et al.*, 1998).

A pesar de que los receptores de DA se encuentran en el ovario, principalmente en las células de la granulosa, no existe suficiente información sobre el significado funcional de la unión de la DA a sus receptores DA-1 y DA-2 en la regulación de las funciones del ovario (Mayerhofer *et al.*, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

Existe un creciente interés por esclarecer las causas de diferentes síndromes y patologías ováricas que producen infertilidad o cuadros de anovulación crónica causados por desórdenes periféricos o disfunciones del eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario (Gerendai, *et al.*, 2009).

En estudios recientes se ha demostrado que la DA y sus receptores (DA-1 y DA-2) juegan un papel muy importante en la regulación y secreción de hormonas gonadotrópicas y esteroideas. Se sabe que el bloqueo de estos receptores desencadena una alteración significativa en la ovulación y en el desarrollo folicular, esto debido a un desajuste en la secreción y regulación de las hormonas que llevan a cabo estos procesos (progesterona, testosterona, estradiol, FSH y LH). De acuerdo a algunos resultados obtenidos por Venegas *et al.*, 2015 el bloqueo de receptores dopaminérgicos

DA-1 y DA-2 en las bursas ováricas de ratas en diferentes días y horas del ciclo estral sugieren que en la primera mitad del ciclo estral, la unión de la DA a sus receptores dopaminérgicos ováricos, generan señales neuroendocrinas que se requieren en la regulación de la liberación espontánea de GnRH y de la síntesis de estradiol, lo cual depende del tipo de receptor dopaminérgico activado.

Por ello, el papel fisiológico de la DA y sus receptores en el ovario pueden participar en los mecanismos reguladores de la función reproductiva, por lo tanto, hace falta profundizar en el papel que tiene la DA en la regulación de la síntesis de hormonas esteroideas y gonadotrópicas. Por lo anterior, el presente estudio tiene como finalidad analizar el efecto del bloqueo de los receptores DA-2 sobre la concentración de las hormonas esteroides: progesterona, testosterona y estradiol, así como las hormonas gonadotrópicas y sus receptores en el ovario de rata adulta.

4. HIPÓTESIS

El bloqueo del receptor dopaminérgico DA-2 modifica la ovulación y la concentración de las hormonas esteroideas y gonadotrópicas en suero sanguíneo sistémico de hembras adultas de rata de la cepa Long Evans.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del bloqueo local del receptor DA-2 en el ovario sobre la secreción de hormonas esteroideas y gonadotrópicas en el suero sanguíneo sistémico de hembras adultas de rata de la cepa Long Evans.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Analizar la ciclicidad y la tasa de animales ovulantes con bloqueo local de los receptores DA-2 ováricos.
- II. Cuantificar la concentración de las hormonas esteroides testosterona, progesterona y estradiol sistémico en el suero sanguíneo de ratas con bloqueo local de los receptores DA-

2 ováricos.

- III. Medir la concentración de hormonas gonadotrópicas FSH y LH sistémicas en el suero sanguíneo de ratas con bloqueo local de los receptores DA-2 ováricos.
- IV. Cuantificar los receptores a FSH y LH ováricos en ratas con bloqueo local de los receptores DA-2 ováricos a lo largo del ciclo estral.
- V. Determinar la expresión de la enzima P450 aromatasa en el ovario con bloqueo local de los receptores DA-2 ováricos en los diferentes días del ciclo estral.

7. METODOLOGÍA

Sujetos de Experimentación

Todos los procedimientos descritos en el presente estudio fueron desarrollados de acuerdo con la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio) y fueron aprobados por el Comité del Bioterio “Claude Bernard” y el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Clave del proyecto 100527253-UALVIEP-24/3).

Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa Long Evans de 200-250 g de peso, las cuales fueron mantenidas en condiciones controladas de iluminación con 14 h de luz por 10 h de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a las 19:00) y temperatura (22 ± 2 °C) con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron colocados en grupos de cinco en cajas de acrílico.

Control y Seguimiento de Ciclo Estral

Con el fin de monitorear las fases del ciclo reproductor, se realizaron registros del ciclo estral por medio de la citología vaginal, los cuales se tomaron diariamente a entre las 9:00 y 10:00 h. Una

vez que los animales presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración (diestro-1, diestro-2, proestro y estro) se dividieron en los diferentes grupos experimentales.

Grupos experimentales

Grupo Control (n = 20): Procedimiento de laparotomía sin inyección de antagonista en los diferentes días del ciclo estral: diestro-1 (n=5), diestro-2 (n=5), proestro (n=5) y estro (n=5). Los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal observado.

Grupo Vehículo (n = 20): Inyección de ácido ascórbico al 0.1% en los diferentes días del ciclo estral: diestro-1 (n =5), diestro-2 (n=5), proestro (n=5) y estro (n = 5). Posteriormente los animales se sacrificaron al siguiente estro vaginal observado.

Grupo Experimental SPD1 (n = 20): Laparotomía e inyección de sulpiride antagonista específico de los receptores dopaminérgicos DA-2 en los diferentes días del ciclo estral: diestro-1 (n=5), diestro-2 (n=5), proestro (n=5) y estro (n=5). Los animales serán sacrificados al siguiente estro vaginal observado.

Grupo Experimental SPD2 (n = 20): Laparotomía e inyección de sulpiride antagonista específico de los receptores dopaminérgicos DA-2 en los diferentes días del ciclo estral: diestro-1 (n = 5), diestro-2 (n=5), proestro (n=5) y estro (n=5). Los animales fueron sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección en el estro vaginal observado.

Preparación del fármaco

El sulpiride (SPD) ((RS)-(±)-Sulpiride; TOCRIS, Bio-Techne), antagonista selectivo de los receptores DA-2, se preparó a una concentración de 10 mg/mL. Para su dilución se empleó una solución de ácido ascórbico al 0.1% como vehículo, añadiendo una gota de ácido acético glacial con pipeta Pasteur para facilitar su completa disolución.

Procedimiento Quirúrgico

Las cirugías se realizaron en animales anestesiados con isoflurano inhalado. Una vez anestesiados

los animales, se les realizó una incisión dorsal en el lado izquierdo y derecho que abarque piel y músculo, posteriormente se exteriorizó el ovario respectivo y se localizó la bolsa que lo recubre (bursa ovárica), en donde se introdujo una jeringa Hamilton de 25 μ L (Hamilton, USA) con una aguja de 29 mm, y con ayuda de una bomba de infusión nanomolar Nano-Injector, Stepper Motorized (Stolting Co., USA), calibrada se administró [200 μ g/20 μ L] en 20 segundos, de sulpiride (antagonista de los receptores dopaminérgicos DA-2) de acuerdo al grupo experimental a trabajar. Esta microinyección se realizó a las 13:00 h de cada día del ciclo estral.

Para poder tener un índice de comparación, se realizó un grupo con cirugía simulada (Grupo Control) en el cual únicamente se realizó una incisión de piel y músculo en la parte dorsal del lado izquierdo y derecho, exteriorizando el ovario. Respecto al grupo vehículo, se le administraron 20 μ L de ácido ascórbico al 0.1% en la bursa ovárica y se procedió a suturar (Venegas *et al.*, 2015). Posterior a la cirugía, la herida se trató con clorhexidina al 2% y los animales fueron devueltos a su caja correspondiente. Al día siguiente de la cirugía se retomó la toma del frotis vaginal hasta el momento del sacrificio correspondiente. Los animales fueron sacrificados al proestro y estro vaginal dependiendo del grupo experimental.

Autopsia

Los animales que presentaron un estro en la citología vaginal fueron pesados en una balanza granataria para posteriormente ser sacrificados entre las 9:00 y 11:00 h por decapitación previo a anestesia con isoflurano. Se obtuvo la sangre del tronco y se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, posteriormente se obtuvo el suero y este se almacenó a -20°C hasta el momento de la cuantificación de hormonas esteroides y gonadotrópicas. Se disecó al animal y se obtuvieron los órganos siguientes: ovarios, oviductos, adrenales, útero, hipófisis y cerebro, los cuales fueron pesados y almacenados a -80 °C, hasta el momento de su análisis. La ovulación fue analizada en los oviductos en fresco.

Las hormonas esteroides y gonadotrópicas se cuantificaron en suero sanguíneo mediante la técnica de quimioluminiscencia. Para el análisis estadístico se tomó en consideración la determinación de hormonas esteroides y gonadotrópicas de un grupo intacto (n = 7). Los ovarios de los animales de cada grupo experimental fueron almacenados a -80°C para su posterior

cuantificación de los receptores a LH y FSH, así como la P450 aromatasa por la técnica de Western blot.

Determinación de la expresión de la P450 aromatasa y de los receptores LH y FSH por la técnica de Western blot.

Para el análisis de la P450 aromatasa y los receptores de LH, FSH por Western blot se colocó el ovario izquierdo con 750 µL de solución buffer RIPA para su lisis (50 mM de Tris-HCl pH 8, 0.5% de deoxicolato de sodio, 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 0.1% de SDS, 1% de Tritón X100). Después de 5 min de incubación sobre hielo, la muestra se lisó con un homogeneizador (DAIHAN-brand ® Homogenizing Stirrer, "HS-30E") durante 1 minuto, posterior a ello, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. (Eppendorf Centrifuge 5420). Se recolectó el sobrenadante y se cuantificó la concentración total de proteínas utilizando el método de Bradford.

Las muestras fueron incubadas a 95 °C en un thermoblock (UVITEC CAMBRIDGE) durante 5 minutos, posteriormente, se colocaron en frío. Después, las muestras fueron cargadas en gel de poliacrilamida al 10% para su separación por SDS-Page. Se colocaron 30 mg de proteína por carril y se realizó un corrimiento electroforético utilizando una cámara de electroforesis vertical (BioRad). Las proteínas se separaron a 100 V durante 120 minutos en buffer de corrimiento. Posteriormente, se realizó la electrotransferencia, donde las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Immobilon-P) en un transblot (BioRad) durante 1 hora a 100 V. La membrana fue tratada con una solución de Tris Buffer Salino (TBS-T) y con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% durante 2 horas, transcurrido ese tiempo se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno, para después realizar la inmunodetección con los respectivos anticuerpos.

La membrana se incubó con el anticuerpo primario con una concentración de 0.25 µg/mL para anti-LHR rabbit (Thermo Fisher Scientific, PA5-79598) y 1:2000 para anti-FSHR rabbit (Thermo Fisher Scientific, PA5-50963), los anticuerpos fueron diluidos en TBS-T y se dejaron incubar durante la noche en refrigeración. Después se realizaron tres lavados con PBS 1X durante 10 minutos, para posteriormente incubar con el anticuerpo secundario IgG anti-rabbit durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se realizaron lavados a la membrana nuevamente 3 veces

con TBS-T durante 10 minutos. Por último, para el revelado de las bandas se utilizó luminol y un fotodocumentador (UVIttec Ltd.Cambrige-Alliance Q9 Advanced), la señal fue capturada directamente desde la membrana de Western blot mediante una cámara CCD de alta sensibilidad para revelar las bandas de proteínas inmunorreactivas. La inmunoreactividad se cuantificó por densitometría con el software ImageJ (National Institutes of Health versión).

La actina (43 kDa), una proteína que se expresa constitutivamente, y fue tomada como referencia en las mismas membranas para la comparación con los grupos.

Análisis Estadístico

Los datos analizados se presentan como la media $\pm$ el error estándar. Los datos del número de ovocitos se analizaron por pruebas de normalidad y un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías comparando el día del ciclo estral respecto al grupo control y vehículo una prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey, mientras que para la comparación de los pesos de los órganos extraídos se realizó mediante una prueba *t-Student*. Los datos de la concentración de hormonas gonadotrópicas y esteroideas fueron analizados mediante una ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey – Kramer. Las diferencias cuya probabilidad es menor o igual a 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa GraphPad Prism Versión 8.

8. RESULTADOS

8.1 El bloqueo de los receptores DA-2 ováricos afecta la ciclicidad, la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos en ratas adultas.

La figura 8 muestra el seguimiento del ciclo estral en los cuatro grupos experimentales. Los animales del grupo control y vehículo mantuvieron un ciclo estral regular de cuatro días tanto

antes como después de la intervención quirúrgica, independientemente del día del ciclo estral en que se realizó la cirugía.

Se observó que el 100% de los animales a los que se les administró SPD en las bolsas ováricas durante el diestro-1 y fueron sacrificados al siguiente estro vaginal (grupo SPD1), mostraron un ciclo estral prolongado de cinco días, caracterizado por un día adicional de diestro (**Fig. 8A**). En contraste, la inyección de SPD durante las fases de diestro-2, proestro o estro no indujo alteraciones significativas en la ciclicidad de los animales (**Fig. 8A, 8B, 8C y 8D**).

Para los animales inyectados con SPD en el diestro-1 y sacrificados después de completar cuatro ciclos estrales después de la administración (grupo SPD2), el 100% de los organismos presentó inicialmente dos ciclos regulares de cuatro días, seguidos de dos ciclos irregulares con una duración aproximada de seis días. Esta irregularidad se manifestó por la presencia de dos días más de diestro, lo cual es indicativo de aciclicidad (**Fig. 8A**). Cuando la administración de SPD se realizó en el diestro-2 o proestro, el 60% y 20% de los animales presentaron un primer ciclo irregular, principalmente por una extensión de la fase de diestro; sin embargo, los tres ciclos subsiguientes se regularon a una duración de cuatro días (**Fig. 8B y 8C**). Finalmente, no se detectaron cambios en la ciclicidad de los animales a los que se les administró SPD durante el estro y que fueron evaluados a lo largo de cuatro ciclos estrales postinyección (**Fig. 8D**).

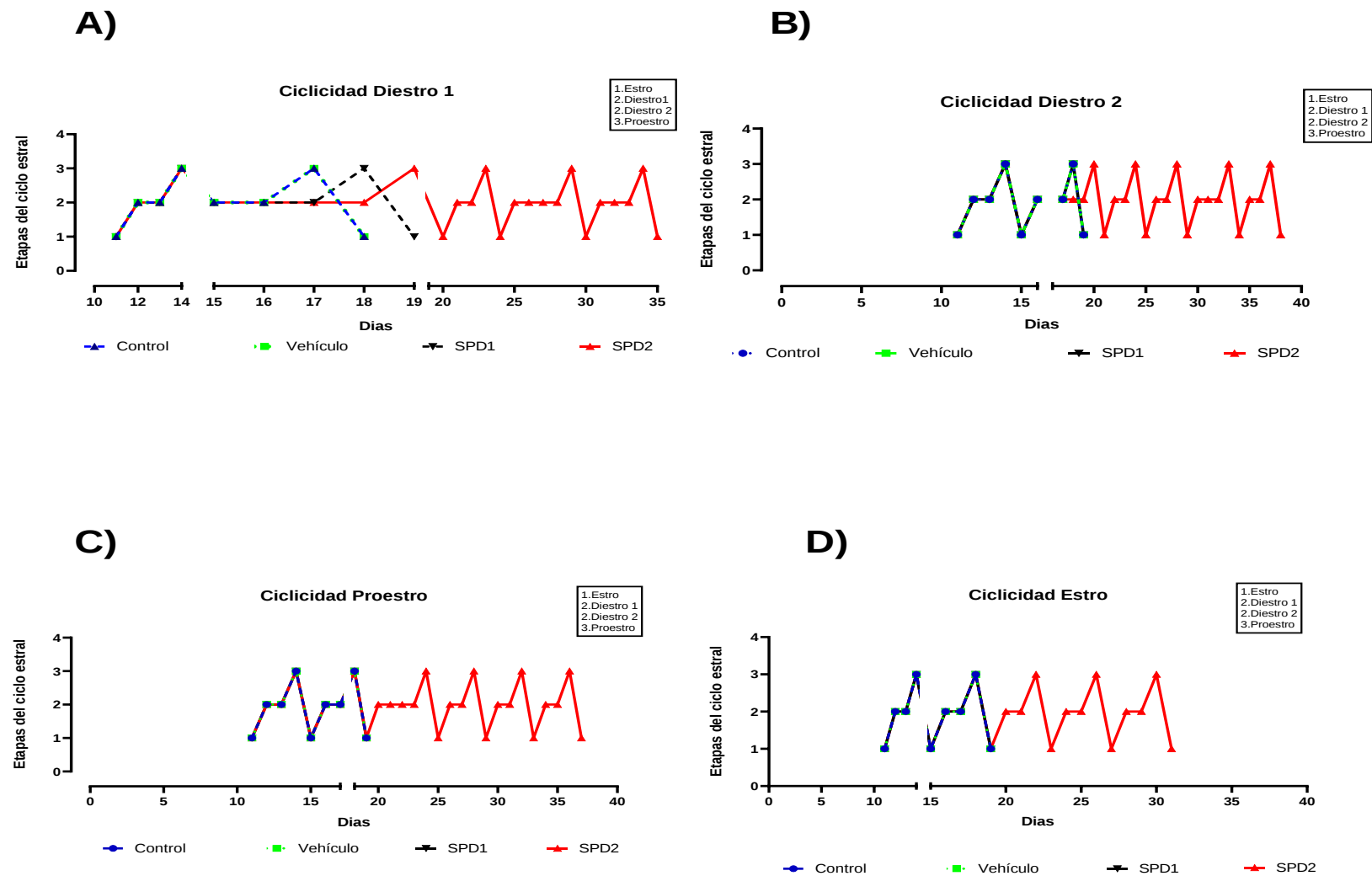


Figura 8. Ciclicidad registrada de los diferentes grupos después del procedimiento quirúrgico y administración del vehículo o de Sulpiride durante las diferentes etapas del ciclo estral.

En los grupos control (animales sometidos a laparotomía bilateral) y vehículo (tratados con ácido ascórbico al 0.1% en las bolsas ováricas), la tasa de animales ovulantes (TAO) fue consistentemente del 100% en todas las etapas del ciclo estral evaluadas (D1: 5/5; D2: 5/5; P: 5/5; E: 5/5) (**Fig. 9**).

Al evaluar la ovulación en el ciclo estral posterior a la inyección de SPD, se observó que los animales a los que se les administró el antagonista durante el proestro o el estro vaginal mantuvieron una TAO del 100%. Sin embargo, la inyección de SPD en las fases de diestro 1 y diestro 2 resultó en una TAO del 60% y 40% respectivamente, presentando una diferencia significativa respecto al grupo control y vehículo ($p < 0.0001$ con una prueba exacta de Fisher) (**Fig. 9**).

La evaluación de la ovulación en animales que recibieron SPD y fueron sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección mostró una disminución en la TAO del 40 y 60% en aquellos animales tratados durante el diestro 1 y diestro 2 (D1: 3/5, D2: 4/5). El grupo tratado en diestro-1 presentó una diferencia significativa respecto al grupo control y vehículo ($p < 0.0001$ con una prueba exacta de Fisher). Por el contrario, la administración de SPD en proestro y estro no afectó la TAO (P: 5/5, E: 5/5) (**Fig. 9**).

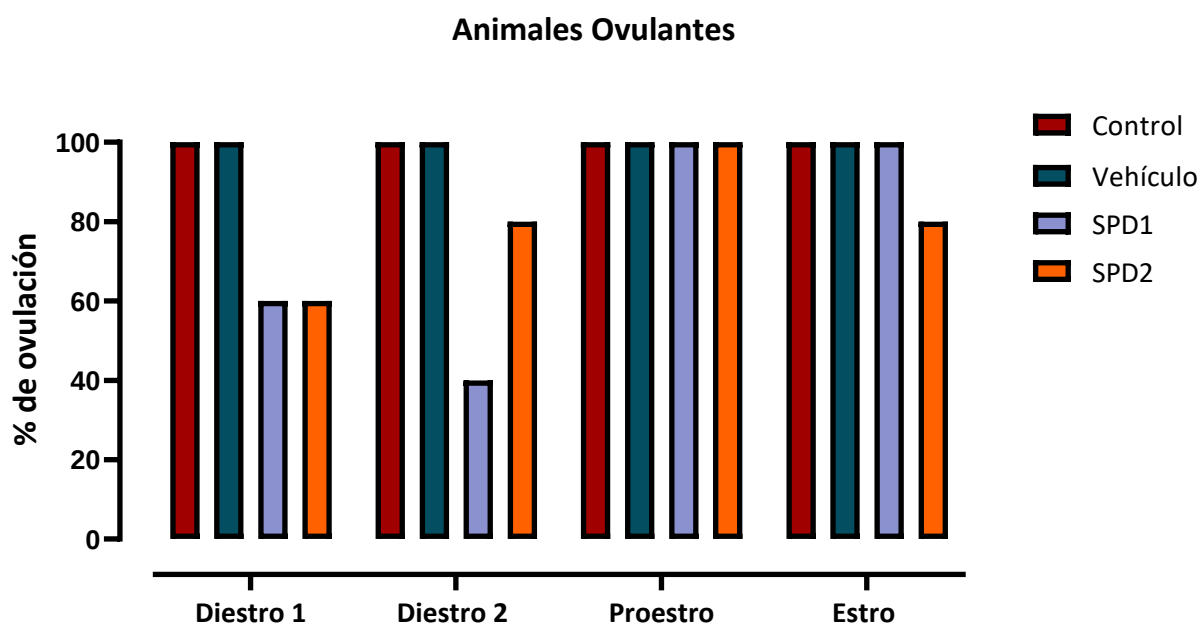


Figura 9. Porcentaje de animales ovulantes de los diferentes grupos en las diferentes etapas del ciclo estral, después del procedimiento quirúrgico, y la inyección del vehículo y del antagonista de los receptores dopaminérgicos DA-2. * $p < 0.05$ con una prueba exacta de Fisher

El análisis del número de ovocitos liberados en el grupo control reveló que la laparotomía bilateral no alteró significativamente este parámetro, independientemente del día del ciclo en que se realizó la cirugía (D1: 9.75 ± 1.49 ; D2: 12.25 ± 1.10 ; P: 12.75 ± 0.85 ; E: 14.75 ± 0.47 ovocitos; análisis ANOVA seguido de una prueba post hoc de Tukey).

En el grupo que recibió la administración del vehículo, el diestro-2 se asoció con un número significativamente mayor de ovocitos en comparación con las fases de proestro y estro (D2: 14.8 ± 1.57 vs. P: 9.43 ± 1.04 y E: 8.50 ± 1.50 ovocitos; análisis ANOVA seguido de un test post hoc de Tukey post hoc $p < 0.05$). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en el número de ovocitos cuando la administración se realizó en diestro-1 (12.5 ± 1.78 ovocitos) con respecto a los tratados en diestro-2, proestro y estro (D2: 14.8 ± 1.57 vs. P: 9.43 ± 1.04 y E: 8.50 ± 1.50 ovocitos; $p > 0.05$). Adicionalmente, el número de ovocitos no varió en los animales tratados en el proestro (P: 9.43 ± 1.04 ovocitos) y el estro (E: 8.50 ± 1.50 ovocitos, análisis ANOVA seguido de un test post hoc de Tukey, $p > 0.05$; **Fig. 10**).

En el contexto de la administración de SPD, los animales inyectados durante la fase de diestro-1 y que ovularon, mostraron un número de ovocitos significativamente reducido tanto cuando fueron sacrificados al siguiente estro vaginal (SPD1: 2.80 ± 1.20 ovocitos), como cuatro ciclos estrales después de la administración (SPD2: 4.80 ± 2.58 ovocitos) en comparación con el grupo vehículo correspondiente (12.50 ± 1.78 ovocitos). Es importante destacar que estas cantidades no presentaron diferencias significativas respecto al grupo control (9.75 ± 1.49 ovocitos; análisis ANOVA con un test post hoc de Tukey, $p < 0.01$; **Fig. 10**).

Para la inyección de SPD en la fase de diestro-2, los animales ovulantes evidenciaron una disminución significativa en el número de ovocitos cuando el sacrificio se realizó en el siguiente estro vaginal (SPD1: 1.80 ± 1.2 ovocitos) en comparación con los grupos vehículo (14.0 ± 1.57 ovocitos) y control (12.25 ± 1.11 ovocitos) (ANOVA seguido de un test post hoc de Tukey $p < 0.01$). En contraste, el número de ovocitos en los animales sacrificados cuatro ciclos estrales después de la administración (8.80 ± 2.63 ovocitos) no mostró diferencias significativas con el

vehículo y control (ANOVA seguido de un test post hoc de Tukey $p > 0.05$). Además, se encontró una diferencia significativa en el número de ovocitos al comparar los animales sacrificados al siguiente ciclo estral con aquellos sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección.

En los animales que recibieron SPD durante la fase de proestro, se observó una disminución significativa en el número de ovocitos liberados cuando el sacrificio se realizó en el siguiente estro vaginal (SPD1: 4.60 ± 1.33 ovocitos) en comparación con el grupo control (14.12 ± 0.85 ovocitos; ANOVA seguido de un test post hoc de Tukey $p < 0.05$). Sin embargo, no se identificaron diferencias significativas en este parámetro al comparar el grupo SPD1 con el grupo vehículo (9.43 ± 2.40 ovocitos) ni con el grupo SPD sacrificados cuatro ciclos estrales después de la administración (SPD2: 9.40 ± 2.40 ovocitos; **Fig. 10**).

El análisis del número de ovocitos en el grupo administrado con SPD durante la fase de estro vaginal reveló una disminución estadísticamente significativa en los animales sacrificados tanto al siguiente estro vaginal (SPD1: 6.20 ± 1.43 ovocitos), como cuatro ciclos estrales posteriores a la administración (SPD2: 7.00 ± 2.81 ovocitos), en comparación con el grupo control (14.75 ± 0.48 ovocitos). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al comparar estos grupos de SPD con el grupo vehículo (8.50 ± 1.50 ovocitos; análisis ANOVA seguido de una prueba post hoc de Tukey $p < 0.05$; **Fig. 10**). En el contexto de la administración de SPD, se determinó que no existen diferencias significativas en el número de ovocitos liberados, independientemente del día del ciclo estral en que se realizó la inyección.

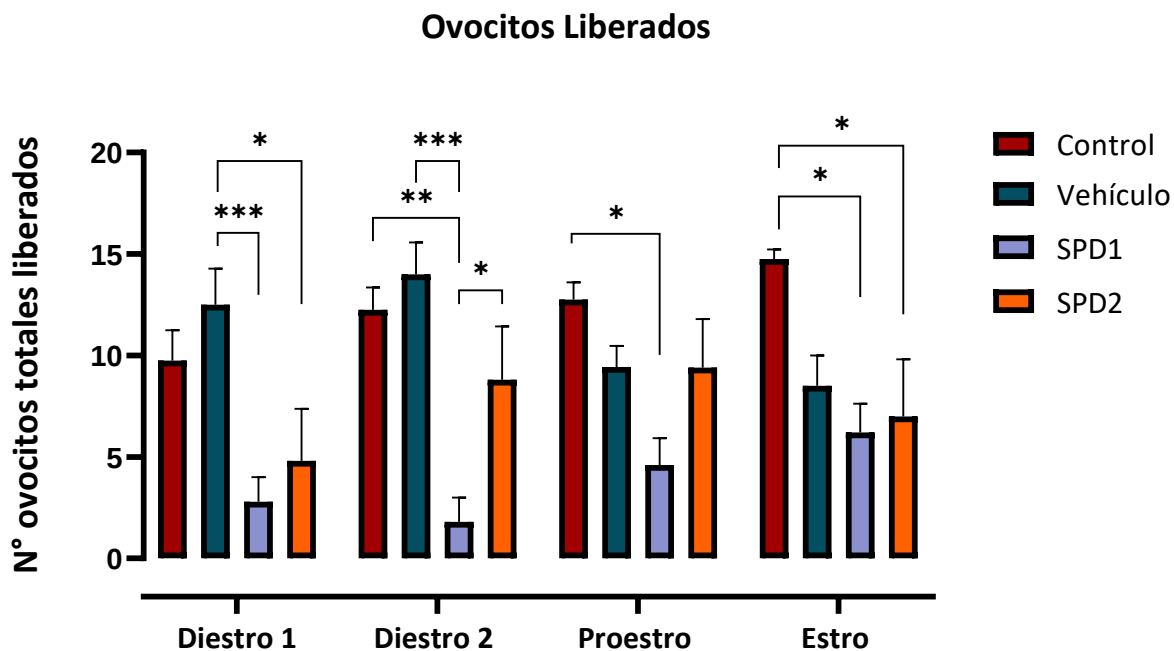


Figura 10. La gráfica muestra la media $\pm$ EEM del número de ovocitos totales liberados (A) así como también el número de ovocitos liberados del ovario derecho (B) e izquierdo (C) de los grupos experimentales inyectados en los diferentes días del ciclo estral y sacrificados en el estro vaginal observado. ANOVA de 2 vías, y una prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Se analizó el número de ovocitos liberados por cada ovario. Respecto al ovario derecho (OD), se observó que la laparotomía bilateral no modificó el número de ovocitos liberados en el grupo control (D1: 5.0 ± 1.22 ; D2: 7.25 ± 1.10 ; P: 6.0 ± 0.91 ; E: 6.75 ± 1.10 ovocitos), ni en el grupo vehículo (D1: 5.66 ± 0.88 ; D2: 7.00 ± 1.02 ; P: 4.71 ± 0.56 ; E: 3.75 ± 0.85 ovocitos). En el grupo inyectado con SPD y sacrificado al ciclo estral siguiente (SPD1), se registró una disminución estadísticamente significativa en el número de ovocitos liberados. Esta disminución se presentó al inyectar en el diestro 1, en comparación con el grupo vehículo (Vh: 5.66 ± 0.88 vs. SPD1: 1.40 ± 0.60 ovocitos; $p = 0.0419$), y al inyectar en el diestro 2, en comparación con el grupo control (7.25 ± 1.10 ovocitos; $p = 0.0135$) y con el grupo vehículo (7.00 ± 1.02 ovocitos; $p < 0.0001$). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos liberados por el OD cuando la inyección se realizó en el proestro (Control: 6.00 ± 0.91 ; Vehículo: 4.71 ± 0.56 vs. SPD1: 2.40 ± 0.74 ovocitos) y el estro vaginal (Control: 6.75 ± 1.10 ; Vehículo: 3.75 ± 0.85 vs. SPD1: 3.60 ± 1.36 ovocitos). Al analizar los animales inyectados con SPD en el diestro 2 y sacrificados

cuatro ciclos estrales posteriores (SPD2), se observó un aumento estadísticamente significativo en el número de ovocitos liberados con respecto al grupo SPD1 (SPD1: 1.20 ± 0.73 vs. SPD2: 5.00 ± 1.51 ovocitos; $p=0.0055$). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de ovocitos liberados por el OD en el grupo SPD2 cuando la inyección se realizó en el diestro 1, proestro y estro, en comparación con los grupos control, vehículo y SPD1 (**Tabla 1**).

En el caso del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (OI), no se mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control (D1: 4.75 ± 1.49 ; D2: 5.25 ± 0.25 ; P: 6.25 ± 0.47 ; E: 8.00 ± 1.22 ovocitos) y el grupo vehículo (D1: 6.83 ± 1.01 ; D2: 7.00 ± 0.90 ; P: 4.71 ± 0.86 ; E: 4.75 ± 1.81 ovocitos), independientemente del día del ciclo estral en que se realizó la inyección. En los grupos inyectados con SPD y sacrificados al ciclo estral siguiente (SPD1), se encontró una disminución estadísticamente significativa del número de ovocitos liberados por el OI de los animales inyectados en el diestro 1 respecto al grupo vehículo (Vehículo: 6.83 ± 1.01 vs. SPD1: 1.80 ± 1.11 ovocitos; $p = 0.0135$), y los inyectados en el estro con respecto al grupo control (Control: 8.00 ± 1.22 vs. SPD1: 2.20 ± 1.74 ovocitos; $p = 0.0369$). Al analizar los animales inyectados con SPD en el diestro 2 y sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores (SPD2), se encontró una disminución en el número de ovocitos liberados por el OI (SPD2: 1.20 ± 0.73 ovocitos) respecto al grupo vehículo (7.00 ± 0.90 ovocitos; $p = 0.0003$) y control (5.25 ± 0.25 ovocitos; $p = 0.0174$). Cuando el SPD se inyectó en el diestro 1 y los animales se sacrificaron cuatro ciclos estrales posteriores, también se observó una disminución significativa del número de ovocitos liberados por el OI (SPD2: 1.40 ± 0.60 ovocitos) con respecto al grupo vehículo (6.83 ± 1.01 ovocitos; $p = 0.0073$). De igual manera, si la inyección se realizó en el proestro, hubo una disminución significativa del número de ovocitos liberados por el OI (SPD2: 2.20 ± 0.80 ovocitos) respecto al grupo control (6.25 ± 0.47 ovocitos; $p = 0.0462$). Finalmente, no se detectó diferencia significativa en el número de ovocitos liberados cuando el SPD se inyectó en el estro y los animales se sacrificaron a los cuatro ciclos estrales posteriores.

Al analizar el número de ovocitos liberados del ovario derecho respecto al ovario izquierdo se observó que la microinyección en las etapas de diestro 1, proestro y estro no modificó la liberación de ovocitos entre el ovario izquierdo y el derecho. Sin embargo, en la etapa de diestro

2, se detectó una disminución significativa en el número de ovocitos liberados del ovario izquierdo respecto al ovario derecho en el grupo con inyección de SPD sacrificado cuatro ciclos posteriores (SPD2: OD =5.00±1.51 vs OI =1.20±0.73; $p = 0.02$) (**Tabla 1**). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA seguido de una prueba *post hoc* de Tukey.

Tabla 1. Número de ovocitos liberados ± e.e.m en el ovario derecho (OD) e izquierdo (OI) y totales (OD+OI) en los animales de los diferentes grupos experimentales (n=5). Los datos presentados corresponden a la mañana del siguiente estro vaginal observado.

Ovocitos liberados (OD y OI)								
	CONTROL		VEHÍCULO		SPD1		SPD2	
Día del ciclo	OD	OI	OD	OI	OD	OI	OD	OI
Diestro 1	5.00 ± 1.22	4.75 ± 1.49	5.66 ± 0.88 ^a	6.83 ± 1.01 ^b	1.40 ± 0.60 ^a	1.80 ± 1.11 ^b	3.00 ± 1.67	1.40 ± 0.60 ^b
Diestro 2	7.25 ± 1.10 ^c	5.25 ± 0.25 ^f	7.00 ± 1.02 ^d	7.00 ± 0.90 ^g	1.20 ± 0.73 ^{c,d,e}	3.80 ± 1.31	5.00 ± 1.51 ^e	1.20 ± 0.73 ^{f,g,*}
Proestro	6.00 ± 0.91	6.25 ± 0.47 ^h	4.71 ± 0.56	4.71 ± 0.86	2.4 ± 0.74	3.60 ± 0.98	5.80 ± 1.80	2.20 ± 0.80 ^h
Estro	6.75 ± 1.10	8.00 ± 1.22 ⁱ	3.75 ± 0.85	4.75 ± 1.81	3.60 ± 1.36	2.20 ± 1.74 ⁱ	5.20 ± 1.82	2.60 ± 1.07

Letras iguales se consideran estadísticamente significativas $p < 0.05$.

* $p < 0.05$ respecto al ovario derecho vs. Ovario izquierdo

$p < 0.05$ comparando el peso del ovario derecho e izquierdo respecto al día del ciclo estral en que fueron tratados los animales (ANOVA de dos vías seguida de la prueba pos-hoc de Tukey)

El peso de los ovarios también fue analizado en los diferentes grupos experimentales. Se observó que la laparotomía bilateral no afectó el peso del ovario derecho (OD) de los animales en las distintas etapas del ciclo estral. Al inyectar el vehículo (ácido ascórbico al 0.1%) en las fases de diestro 1, diestro 2 y proestro, no se encontró diferencia significativa en el peso del ovario derecho. No obstante, sí se detectó que el OD presentó un menor peso en los animales

inyectados con el vehículo en el diestro 2 (11.69 ± 0.77 mg) con respecto a aquellos inyectados en el estro vaginal (16.04 ± 0.39 mg; $p = 0.0484$). Los análisis estadísticos se realizaron mediante ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Tukey (**Tabla 2**).

Se observó que la administración de SPD no indujo efectos sobre el peso del ovario derecho (OD) e izquierdo (OI) respecto al grupo control y vehículo en los animales sacrificados al ciclo estral siguiente, independientemente del día del ciclo estral en que se realizó la inyección. Al evaluar a los animales tratados con SPD y sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección (SPD2), no hubo diferencias estadísticamente significativas en el peso del ovario derecho de los animales inyectados en diestro 1, diestro 2 y proestro. No obstante, se observó una disminución estadísticamente significativa en el peso del ovario derecho en la etapa de estro (10.36 ± 1.27 mg), en comparación con el peso del ovario derecho del grupo vehículo (ácido ascórbico al 0.1%) (16.04 ± 0.39 mg; $p = 0.0259$). En el caso del ovario izquierdo de los animales tratados con SPD y sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores a la inyección, no se observaron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control y vehículo, independientemente del día del ciclo en que se realizó la inyección. Al realizar la inyección de SPD en el estro vaginal, se observó una disminución estadísticamente significativa en el peso del ovario derecho e izquierdo al comparar los animales sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores con aquellos sacrificados al siguiente ciclo estral posterior a la inyección (OD SPD1: 15.54 ± 0.99 mg vs. SPD2: 10.36 ± 1.27 mg; $p = 0.0153$; OI SPD1: 16.11 ± 1.13 mg vs. SPD2: 9.905 ± 1.1 mg; $p = 0.0249$). Los análisis estadísticos se realizaron mediante un ANOVA de dos vías con una prueba *post hoc* de Tukey (**Tabla 2**).

La laparotomía no afectó el peso del útero al compararlo con el grupo control, independientemente del día del ciclo en que se realizó la cirugía (**Tabla 2**). La inyección de SPD en los diferentes días del ciclo estral en los animales sacrificados al ciclo estral siguiente no afectó el peso del útero al compararlo con los grupos control y vehículo. En cuanto a los animales inyectados con SPD en diestro 1, diestro 2 y proestro y sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el peso del útero. Sin embargo, se observó que los animales inyectados con SPD en el estro vaginal y sacrificados cuatro ciclos posteriores (SPD2) presentaron una disminución estadísticamente significativa en el peso

del útero (107.2 ± 9.1 mg) al compararlo con los grupos control (167.6 ± 8.10 mg; $p = 0.0006$), vehículo (163.2 ± 9.40 mg; $p = 0.0017$) y con el grupo SPD sacrificado al siguiente estro vaginal observado (146.7 ± 6.0 mg; $p = 0.0282$). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey (**Tabla 2**).

Tabla 2. Peso relativo de los ovarios (mg/100 g de peso corporal) y peso relativo del útero (mg/100 g de peso corporal) $\pm$ e.e.m en los animales de los diferentes grupos experimentales (n=5). Los datos presentados corresponden a la mañana del siguiente estro vaginal observado.

PESO OVARIO								
	CONTROL		VEHÍCULO		SPD1		SPD2	
	Ovario Derecho (mg)	Ovario Izquierdo (mg)	Ovario Derecho (mg)	Ovario Izquierdo (mg)	Ovario Derecho (mg)	Ovario Izquierdo (mg)	Ovario Derecho (mg)	Ovario Izquierdo (mg)
Diestro 1	14.15	15.87	13.91	14.70	12.96	14.29	13.02	12.98
	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.19	1.77	1.99	1.48	0.86	1.18	0.77	1.42
Diestro 2	16.71	13.16	11.69	12.9873	15.27	14.18	13.69	13.42
	±	±	±	±	±	±	±	±
	2.63	2.65	0.77 ^d	0.96	1.67	2.98	1.58	1.63
Proestro	16.09	16.14	14.03	15.94	14.44	12.82	12.48	11.14
	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.27	1.99	2.01	1.41	1.42	0.39	0.51	0.38
Estro	13.30	13.28	16.04	13.56	15.54	16.11	10.36	9.905
	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.59	0.88	0.39 ^{a, d}	0.64	0.99 ^b	1.13 ^c	1.27 ^{a, b}	1.1 ^c
PESO ÚTERO								
	CONTROL		VEHÍCULO		SPD1		SPD2	
Diestro 1	155.6 ±7.04		156.0 ± 8.90		150.2 ± 5.92		138.4±11	
Diestro 2	139.7 ± 15.53		150.8 ± 13.38		148.7 ± 20.9		144.7±7.7	
Proestro	154.0 ± 14.26		150.5 ± 9.16		143.7± 8.0		165.8±7.2	
Estro	167.6 ± 8.10 ^a		163.2 ± 9.40 ^b		146.7 ± 6.0 ^c		107.2±9.1 ^{a, b, c}	
Letras iguales se consideran estadísticamente significativas p < 0.05.								
p < 0.05 comparando el peso del ovario derecho e izquierdo respecto al día del ciclo estral en que fueron tratados los animales (ANOVA de dos vías seguida de la prueba pos-hoc de Tukey)								

8.3 El bloqueo del receptor DA-2 ováricos afecta la concentración sérica de LH, FSH y la expresión de sus receptores en la rata adulta.

El análisis de la concentración sérica de las hormonas gonadotrópicas FSH y LH se realizó en el estro vaginal de todos los grupos experimentales. Al analizar la concentración de LH, se observó que la laparotomía bilateral no afectó la concentración de esta gonadotropina, independientemente del día en que se realizó la cirugía. Asimismo, la inyección de SPD en los animales sacrificados al siguiente ciclo estral no modificó la concentración de LH, independientemente del día del ciclo en que se realizó la inyección. En el caso de los animales administrados con SPD en diestro 1, proestro y estro, y sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores, no se observó un efecto sobre la concentración de LH. No obstante, la inyección de SPD en diestro 2 en los animales sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores, aumentó significativamente la concentración de LH (19.46 ± 2.70 pg/mL), en comparación con el grupo control (4.56 ± 1.21 pg/mL; $p = 0.0001$), el grupo vehículo (3.20 ± 0.73 pg/mL; $p = 0.0001$) y el grupo SPD sacrificado al siguiente ciclo estral (SPD1) (5.03 ± 2.14 pg/mL; $p = 0.0001$). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey (**Fig. 11A**).

Se realizó el análisis para la identificación de la expresión de los receptores de LH (LHR) ováricos en los diferentes grupos experimentales de los animales sacrificados en el estro vaginal. Se identificaron las bandas correspondientes a LHR con un peso molecular de 78 kDa, las cuales se normalizaron con la banda de la proteína β -actina, de 43 kDa (**Fig. 11B**). Los resultados muestran que la laparotomía bilateral en las diferentes etapas del ciclo estral no afectó la expresión de los LHR. La inyección de SPD en diestro 1 y diestro 2 en los animales sacrificados al siguiente estro vaginal (SPD1) no modificó la expresión de los LHR. Cuando la inyección de SPD se realizó en proestro y los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal, se observó un aumento en la expresión de LHR (SPD1: 1.42 ± 0.35 UA de LHR) respecto al grupo control (0.869 ± 0.19 UA de LHR), sin cambios significativos en el grupo vehículo (0.651 ± 0.05 UA de LHR). La inyección de SPD en estro vaginal en los animales sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores, mostró un

aumento en la expresión de LHR (SPD1: 1.71 ± 0.33 UA de LHR) respecto al grupo control (0.489 ± 0.05 UA; $p = 0.0002$) y al grupo vehículo (0.756 ± 0.04 UA de LHR; $p = 0.0041$). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey (**Fig. 11C**).

Al analizar la inyección de SPD en diestro 2 y proestro en los animales sacrificados cuatro ciclos estrales posteriores, no se observaron diferencias significativas en la expresión de LHR respecto al grupo control y vehículo. Sin embargo, cuando la inyección de SPD se realizó en diestro 1, se observó un aumento en la expresión de LHR (1.365 ± 0.20 UA de LHR) respecto al grupo vehículo (0.607 ± 0.01 UA de LHR; $p = 0.0313$). Además, cuando la inyección se realizó en estro vaginal, este aumento (1.711 ± 0.33 UA de LHR) se mantuvo al compararlo con el grupo vehículo (0.756 ± 0.04 UA de LHR; $p = 0.0041$) y con el grupo control (0.489 ± 0.05 UA de LHR; $p = 0.0002$) (**Fig. 11C**).

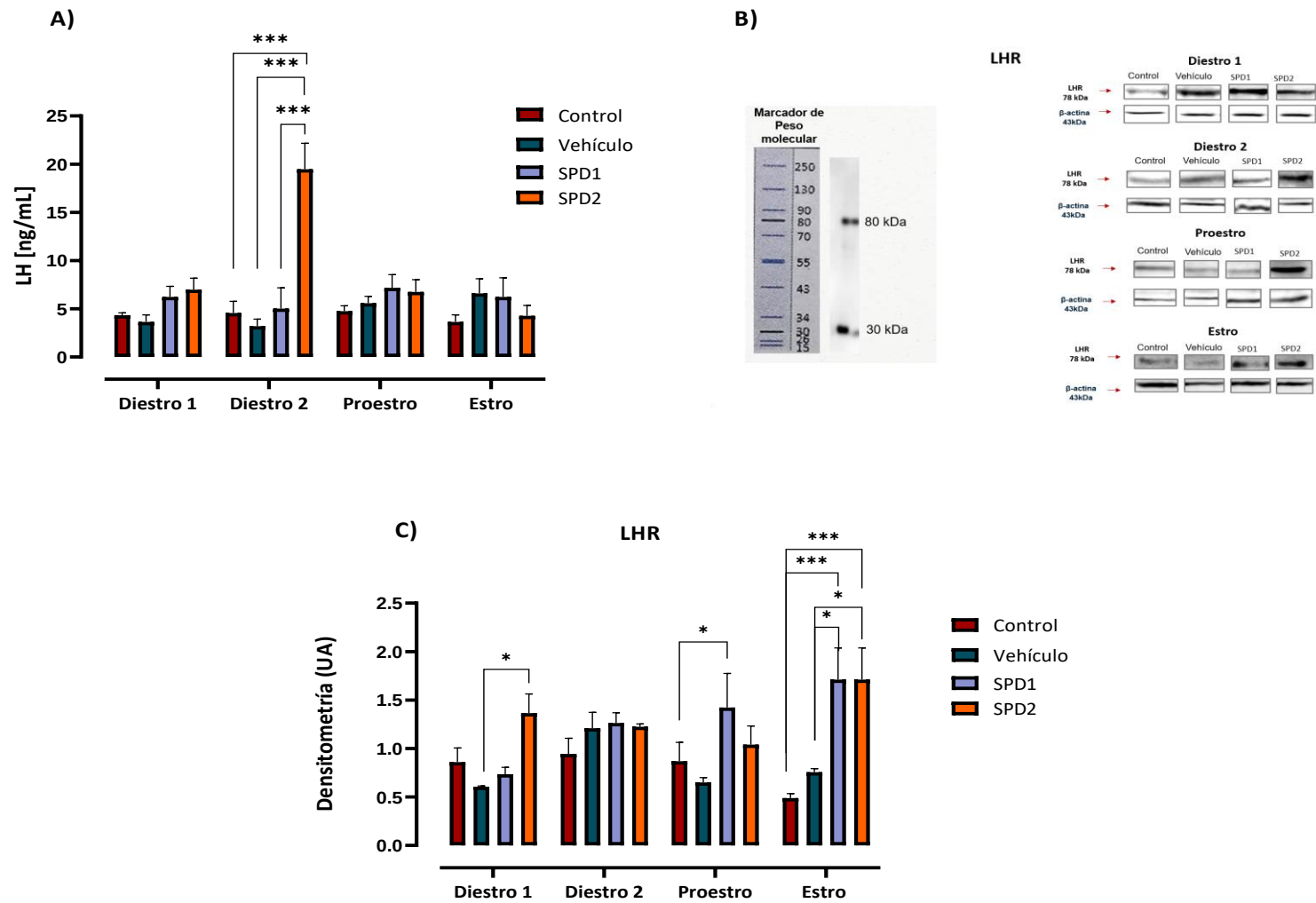


Figura 11. Se representa la media $\pm$ EEM de la concentración de LH (ng/mL) en suero sanguíneo en el estro observado con bloqueo de DA-2 en las diferentes etapas del ciclo estral (A). Intensidad de bandas proteicas detectadas de LHR en el estro observado con bloqueo de DA-2 en las diferentes etapas del ciclo estral (B). Densitometría de LHR donde hubo diferencias significativas en diestro 1, proestro y estro (C). ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

En cuanto a la concentración sérica de FSH se mostró que la laparotomía bilateral no afectó la concentración de esta gonadotropina, independientemente del día en que se realizó la cirugía. Respecto a los animales administrados con SPD en la etapa de diestro 1, proestro y estro sacrificados al siguiente ciclo estral (SPD1) no se modificó la concentración de FSH; no obstante, cuando los animales fueron administrados con SPD en la etapa de diestro 2 y sacrificados al siguiente ciclo estral, se observó una disminución estadísticamente significativa de la concentración de FSH (1.35 ± 0.18 pg/mL) respecto al grupo control (3.14 ± 0.43 pg/mL $p = 0.0001$) y al grupo vehículo (2.63 ± 0.29 pg/mL $p = 0.004$). Respecto a los animales administrados con SPD en la etapa de diestro 1, proestro y estro que fueron sacrificados cuatro ciclos posteriores (SPD2), no hubo cambios estadísticamente significativos en la concentración de FSH; sin embargo, cuando los animales fueron administrados con SPD en diestro 2 y sacrificados cuatro ciclos posteriores hubo una disminución estadísticamente significativa en la concentración de FSH (1.67 ± 0.13 pg/mL) respecto al grupo control (3.14 ± 0.43 pg/mL $p = 0.0004$) y al grupo vehículo (2.63 ± 0.29 pg/mL $p = 0.0296$). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey (**Fig. 12A**).

Por otra parte, se realizó el análisis de la identificación de la expresión de los receptores de FSH (FSHR) ováricos. Se observaron las bandas correspondientes a FSHR con un peso molecular de 75 kDa, las cuales se normalizaron con la banda de la proteína β -actina, de 43 kDa (**Fig. 12B**). Los resultados muestran que la laparotomía bilateral en las diferentes etapas del ciclo estral no afectó la expresión de los FSHR. En los animales administrados con SPD y sacrificados al siguiente estro vaginal (SPD1) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los FSHR independiente del día del ciclo estral en que se realizó la inyección. Respecto a los animales administrados con SPD en la etapa de diestro 2, proestro y estro que fueron sacrificados en estro vaginal cuatro ciclos posteriores (SPD2) no afectó la expresión de los receptores FSHR; sin embargo, cuando se administró SPD en la etapa de diestro 1 y se sacrificaron cuatro ciclos posteriores hubo una disminución estadísticamente significativa en la expresión de los receptores (0.53 ± 0.11 UA de FSHR) respecto al grupo vehículo (1.27 ± 0.12 UA de FSHR $p = 0.0109$). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey (**Fig. 12C**).

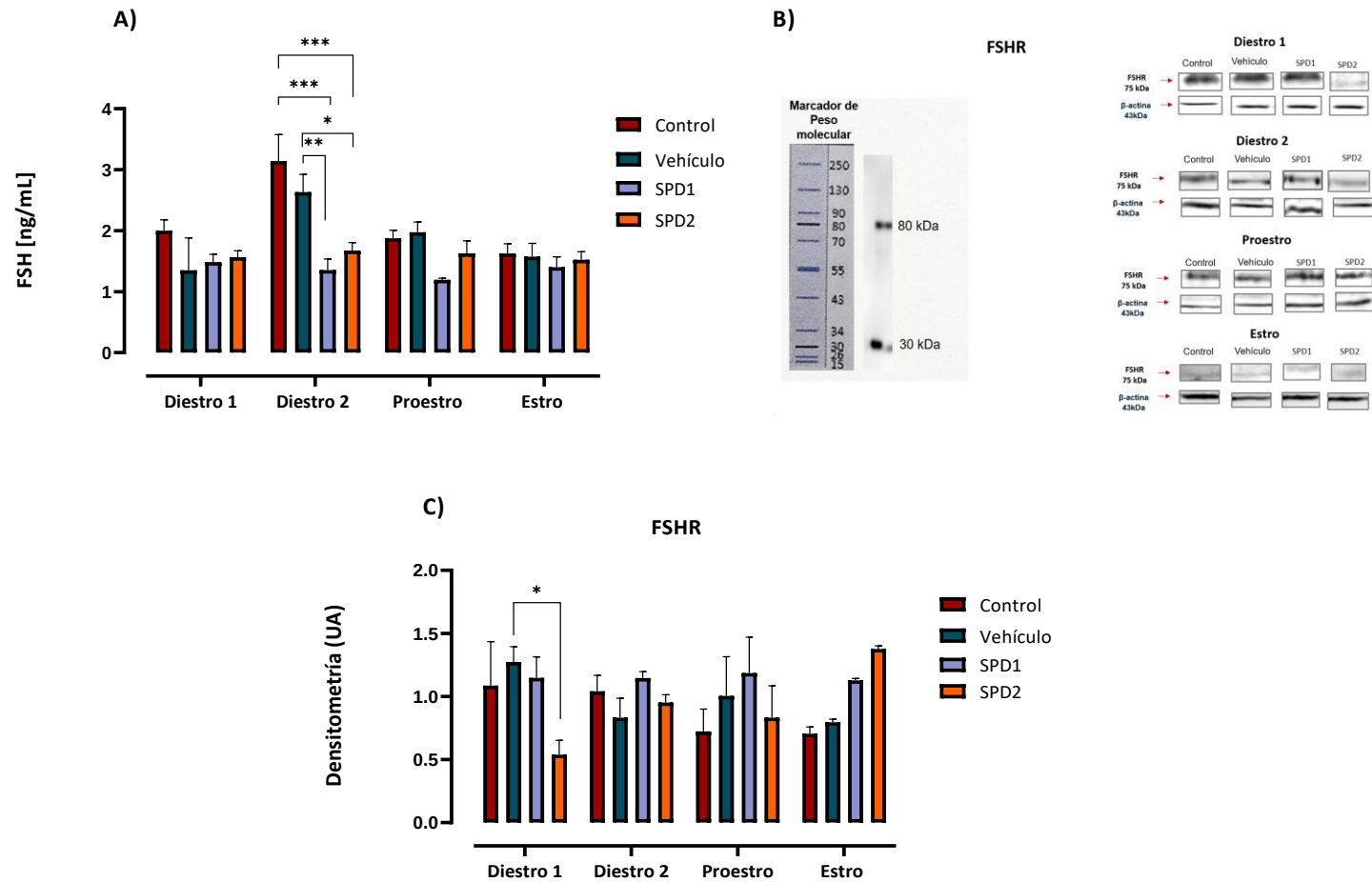


Figura 12. Se representa la media $\pm$ EEM de la concentración de FSH (ng/mL) en suero sanguíneo en el estro observado con bloqueo de DA-2 en las diferentes etapas del ciclo estral (A). Intensidad de bandas proteicas detectadas de FSHR en el estro observado con bloqueo de DA-2 en las diferentes etapas del ciclo estral (B). Densitometría de FSHR donde en diestro 1 hubo diferencias significativas (C). ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

8.4 En la etapa del estro vaginal el bloqueo del receptor DA-2 ovárico provoca un aumento en la expresión de P450 aromatasa.

Respecto a la determinación de la expresión de P450 aromatasa, se identificaron las bandas específicas con un peso molecular de 35 kDa, las cuales se normalizaron con la banda de la proteína β -actina, de 43 kDa. (**Fig.13B**). Los resultados muestran que la laparotomía bilateral no afectó la expresión de P450 aromatasa independientemente del día del ciclo estral en que se realizó la cirugía. Respecto a los animales administrados con SPD y sacrificados al siguiente estro vaginal (SPD1) no afectó la expresión de P450 aromatasa independientemente del día del ciclo estral en que se realizó la inyección. Tampoco en los animales que fueron administrados con SPD en la etapa de diestro 1, diestro 2 y proestro sacrificados cuatro ciclos posteriores (SPD2). Sin embargo, cuando se realizó la administración de SPD en la etapa del estro vaginal y se sacrificaron al estro vaginal cuatro ciclos posteriores se observó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de P450 aromatasa (1.24 ± 0.08 UA de P450 aromatasa) respecto al grupo control (0.66 ± 0.05 UA de P450 aromatasa $p = 0.0404$). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey (**Fig.13A**).

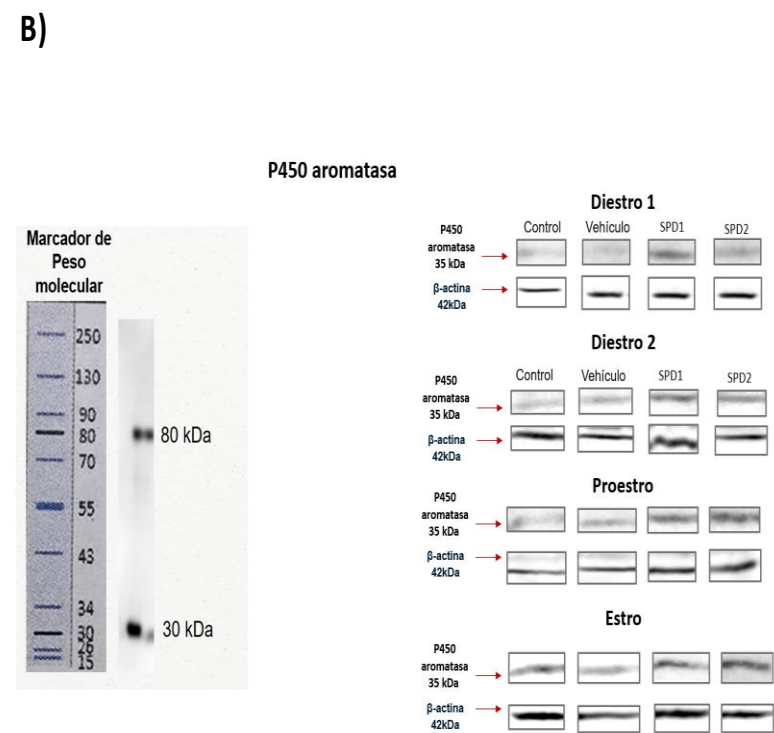
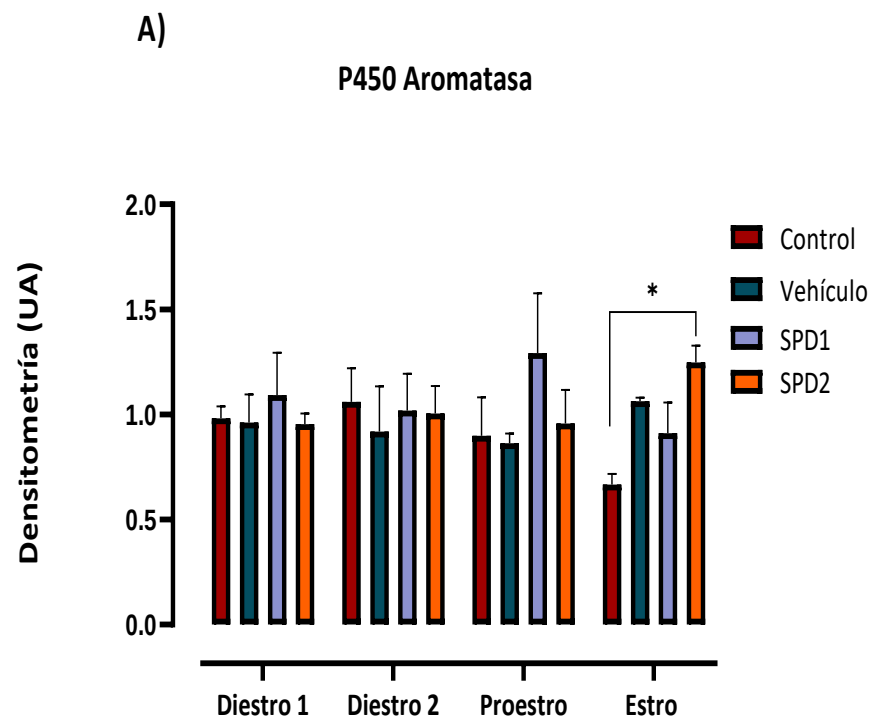


Figura 13. Se representa la media $\pm$ EEM de los niveles de P450 aromatasa analizados en el estro observado, con bloqueo de los receptores DA-2 en las diferentes etapas del ciclo estral (A). Intensidad de la banda de la enzima p450 aromatasa en el estro observado con bloqueo local de los receptores DA-2 (B). Los valores representan la densidad relativa normalizada. * $p < 0.05$ ANOVA de dos vías.

8.5 El bloqueo de los receptores DA-2 ováricos en las diferentes etapas del ciclo estral afecta la concentración de hormonas esteroideas: testosterona y estradiol, pero no afecta la concentración de progesterona en el estro vaginal.

El análisis de la concentración sérica de las hormonas esteroideas progesterona, testosterona total y 17β -estradiol, se realizó en el estro vaginal de todos los grupos experimentales. Al analizar los resultados de la concentración sérica de progesterona, se observó que la laparotomía bilateral no afectó la concentración de esta hormona, independientemente del día del ciclo estral en que se realizó la cirugía. Además, en los animales a los que se administró SPD y fueron sacrificados en el estro vaginal siguiente (SPD1), así como en aquellos sacrificados cuatro ciclos posteriores (SPD2), se observó que el bloqueo de la dopamina no modifica la concentración de progesterona. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey (Fig. 14).

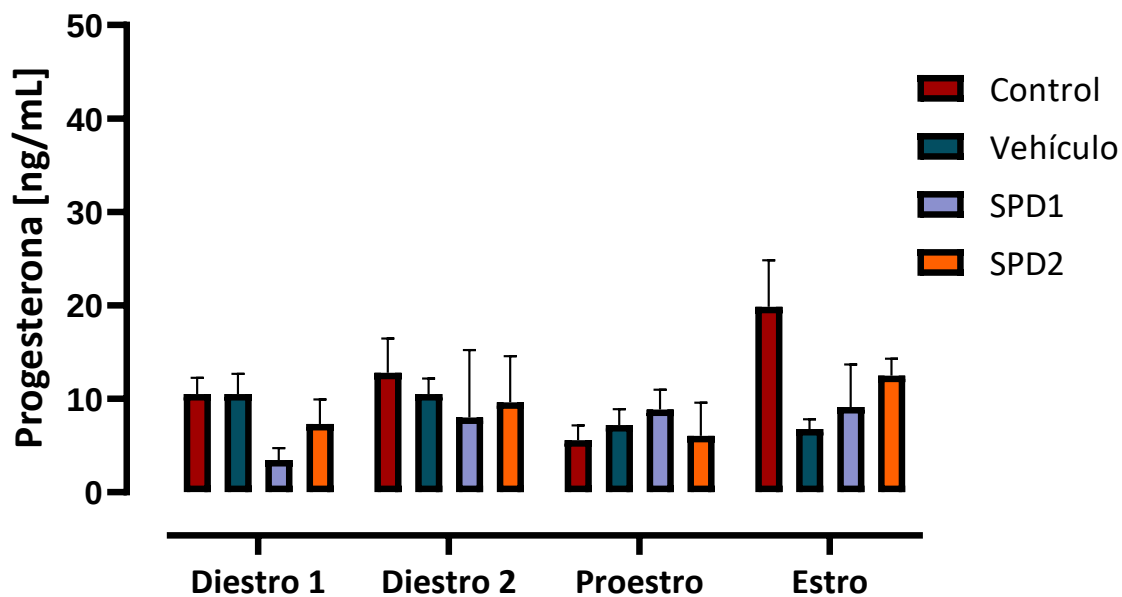


Figura 14. Se muestra la media $\pm$ EEM de la concentración de progesterona (ng/mL) sanguíneo en el estro observado con bloqueo de DA-2 en las diferentes etapas del ciclo estral. ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey. NS= sin diferencias significativas.

En el caso de la testosterona total, los resultados indican que cuando se realiza la laparotomía bilateral con inyección del vehículo (ácido ascórbico al 0.1%) en la etapa de diestro 1 (0.08 ± 0.01 pg/mL), diestro 2 (0.09 ± 0.01 pg/mL), proestro (0.11 ± 0.01 pg/mL) y estro (0.10 ± 0.02 pg/mL) provoca una disminución estadísticamente significativa respecto al grupo control (1.32 ± 0.07 p < 0.0001). De manera similar se observó que el bloqueo de la dopamina en los animales sacrificados al siguiente ciclo estral (SPD1) en la etapa de diestro 1 (0.20 ± 0.01 pg/mL), diestro 2 (0.17 ± 0.06 pg/mL), proestro (0.24 ± 0.03 pg/mL) y estro (0.19 ± 0.05 pg/mL) tienen una disminución en la concentración de testosterona total respecto al grupo control (1.32 ± 0.07 pg/mL p = < 0.0001). Finalmente, los animales que se les bloqueó la dopamina en la etapa de diestro 1 (0.20 ± 0.03 pg/mL), diestro 2 (0.29 ± 0.06 pg/mL), proestro (0.21 ± 0.02 pg/mL), y estro (0.21 ± 0.06 pg/mL) y fueron sacrificados cuatro ciclos posteriores en el estro vaginal, tuvieron una disminución estadísticamente significativa respecto al grupo control (1.32 ± 0.07 pg/mL p = < 0.0001). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey (**Fig. 15**).

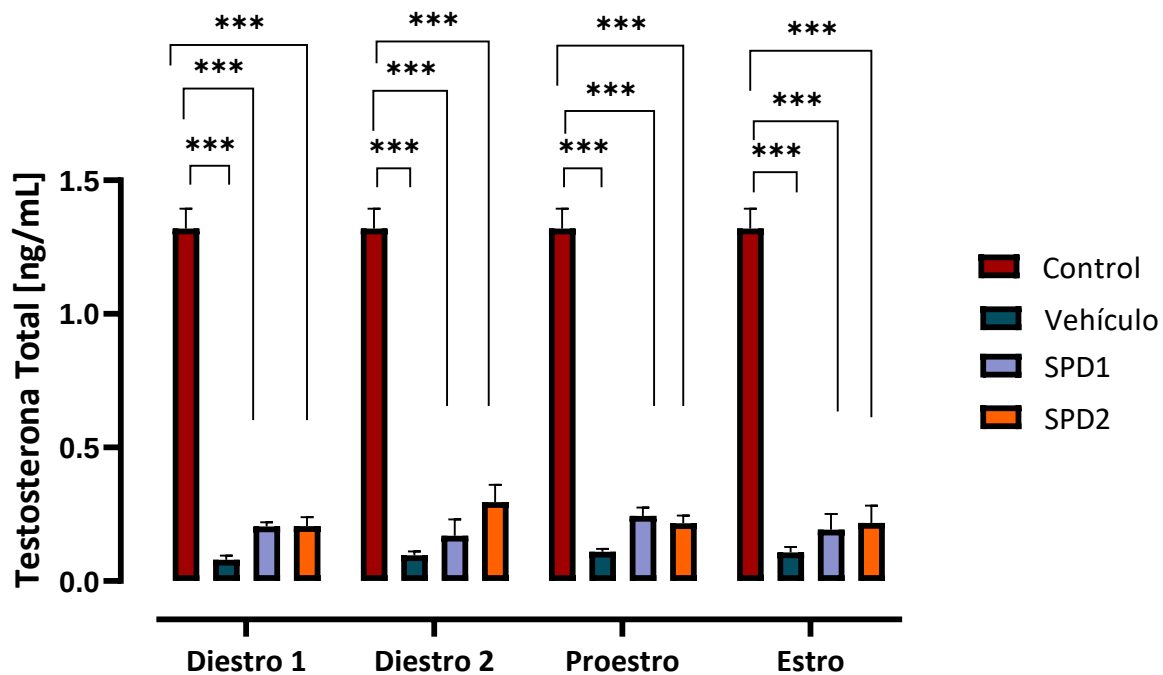


Figura 15. Se muestra la media $\pm$ EEM de la concentración de testosterona total (ng/mL) en suero sanguíneo con bloqueo de los receptores DA-2 las diferentes etapas del ciclo estral, y sacrificados al estro vaginal observado. Análisis ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. *** $p < 0.0001$

En cuanto a la concentración de 17β -estradiol, los resultados muestran que la laparotomía bilateral con inyección del vehículo (ácido ascórbico al 0.1%) en las etapas de diestro 1, proestro y estro no afecta la concentración de esta hormona. Sin embargo, cuando el vehículo se administró en la etapa de diestro 2, se observó una disminución estadísticamente significativa en la concentración de estradiol (64.87 ± 13.05 pg/mL) en comparación con el grupo control (134.90 ± 26.26 pg/mL; $p = 0.0044$).

En los animales en los que se bloqueó la dopamina en diestro 1 (SPD1: 21 ± 0.37 pg/mL vs. control: 96.02 ± 3.59 pg/mL; $p = 0.0004$) y diestro 2 (SPD1: 16.74 ± 1.18 pg/mL vs. control: 134.90 ± 26.26 pg/mL; $p < 0.0001$), y que se sacrificaron en el siguiente estro vaginal, también se observó una disminución estadísticamente significativa respecto al control.

Cuando el bloqueo dopaminérgico se realizó en proestro, se observó una disminución significativa en la concentración de estradiol (21.02 ± 1.50 pg/mL) respecto al grupo control (91.97 ± 24.88 pg/mL; $p = 0.0008$) y al grupo vehículo (74.55 ± 14.85 pg/mL; $p = 0.0162$). De manera similar, cuando la administración de SPD ocurrió en estro, la concentración hormonal (19.84 ± 1.30 pg/mL) mostró una disminución significativa en comparación con el control (148.62 ± 26.01 pg/mL; $p < 0.0001$) y el vehículo (129.00 ± 28.11 pg/mL; $p < 0.0001$).

Respecto a los animales tratados con SPD y sacrificados cuatro ciclos posteriores (SPD2), aquellos tratados en diestro 1 (20.70 ± 0.71 pg/mL) presentaron una disminución significativa en la concentración de estradiol en comparación con el grupo control (96.02 ± 3.39 pg/mL; $p = 0.0004$). Asimismo, los animales tratados en diestro 2 (23.85 ± 3.59 pg/mL) y sacrificados cuatro ciclos después mostraron una disminución estadísticamente significativa en la concentración de estradiol respecto al grupo control (134.90 ± 26.26 pg/mL; $p < 0.0001$).

De igual forma, cuando los animales fueron administrados con SPD en proestro y sacrificados cuatro ciclos posteriores (22.32 ± 0.63 pg/mL), se observó una disminución estadísticamente significativa en la concentración de estradiol en comparación con el grupo control (91.97 ± 24.88 pg/mL) y el grupo vehículo (74.55 ± 14.85 pg/mL; $p = 0.0010$). Por otro lado, en los animales tratados con SPD en estro y sacrificados cuatro ciclos posteriores (18.77 ± 2.00 pg/mL), también se registró una disminución significativa en la concentración de estradiol respecto al grupo control (148.62 ± 26.01 pg/mL; $p < 0.0001$) y al grupo vehículo (129.00 ± 28.11 pg/mL; $p < 0.0001$). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc de Tukey (**Fig. 16**).

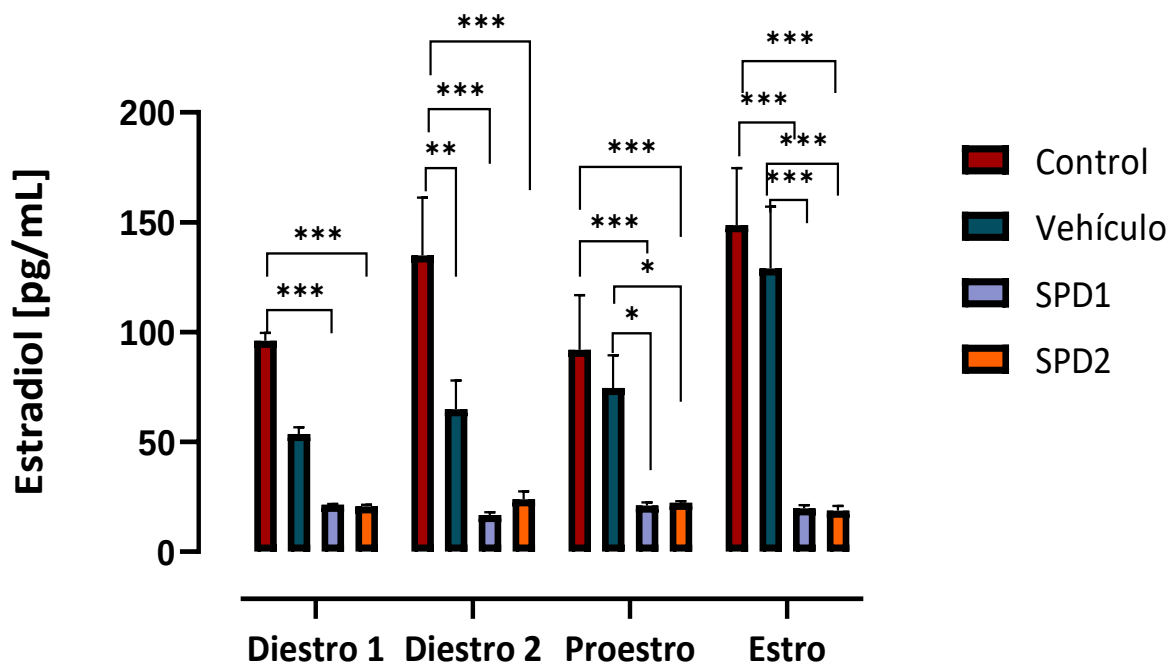


Figura 16. Concentración de estradiol (pg/mL) en suero sanguíneo con bloqueo de los receptores DA-2 las diferentes etapas del ciclo estral, y sacrificados al estro vaginal observado. Análisis ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$

9. DISCUSIÓN

En conjunto, los resultados muestran que la señalización dopaminérgica en el ovario actúa como un regulador que depende de la etapa del ciclo estral, siendo más evidente cuando el bloqueo ocurre durante el diestro 1 y el diestro 2. Esta sensibilidad se refleja en la prolongación del diestro, la disminución en la proporción de animales que ovulan y una reducción importante en el número de ovocitos liberados, incluso en los animales que sí lograron ovular. Estos efectos funcionales están directamente sustentados por los resultados obtenidos y representan la evidencia más sólida de la participación de la dopamina ovárica en la regulación fase-dependiente de la ovulación.

La posibilidad de que la dopamina actúe de manera local en el ovario está respaldada por estudios que han demostrado la presencia de receptores dopaminérgicos en células ováricas, principalmente en las células de la granulosa, donde se han identificado receptores tipo DA-2

(Rey-Ares *et al.*, 2007). Asimismo, se ha confirmado la expresión de estos receptores en células de la granulosa y de la teca en ratas (Ferrero *et al.*, 2014). Esto apoya la idea de que la dopamina puede actuar dentro del ovario regulando la producción de hormonas esteroideas y la respuesta a las gonadotropinas. En este contexto, los resultados del presente estudio apoyan de manera consistente, aunque no demuestran de forma directa, que la dopamina participa en la regulación local de procesos como desarrollo y selección folicular, y ovulación. De forma similar, en nuestro grupo de investigación se ha reportado que la administración intrabursal de sulpiride altera la ovulación de manera dependiente de la etapa del ciclo estral, y que este efecto puede revertirse con GnRH o estradiol, lo que confirma la importancia funcional de la señalización dopaminérgica en la reproducción (Venegas-Meneses *et al.*, 2015). El hecho de que la prolongación del diestro, la disminución en la proporción de animales que ovulan y la reducción en el número de ovocitos liberados se observen principalmente cuando el bloqueo ocurre en diestro 1 y 2 sugiere que esta etapa es clave para la preparación del folículo antes de la ovulación.

Un hallazgo relevante fue la diferencia observada entre el ovario derecho y el izquierdo en algunos grupos experimentales, particularmente una menor liberación de ovocitos por el ovario izquierdo tras el bloqueo dopaminérgico. Se ha descrito que la función ovárica está regulada por la inervación simpática, principalmente a través del nervio ovárico superior, y que existen diferencias funcionales entre ambos ovarios que pueden variar según la etapa del ciclo estral (Domínguez *et al.*, 2011; Rosas *et al.*, 2018). Además, la interrupción de estas vías nerviosas puede modificar la ovulación y la secreción de esteroides (Sloboda *et al.*, 2009) y aunque en el presente estudio no se evaluó directamente la inervación ovárica ni la distribución del fármaco, la diferencia observada entre el ovario derecho e izquierdo no constituye un hallazgo aislado. Por el contrario, es congruente con evidencia anatómica y funcional previa que documenta la existencia de una asimetría en la regulación ovárica. Se ha demostrado que el ovario derecho presenta un mayor número de fibras simpáticas aferentes en comparación con el izquierdo (Klein y Burden, 1988), así como diferencias en su conexión con los ganglios prevertebrales, particularmente con el ganglio celíaco–mesentérico superior (Morán *et al.*, 2009; Pastelín *et al.*, 2017). Asimismo, diversos estudios han mostrado que el nervio ovárico superior modula de

manera diferencial la secreción de hormonas esteroideas y la ovulación según el lado (Morales-Ledesma *et al.*, 2010; Rosas *et al.*, 2018).

En este contexto, el tratamiento bilateral empleado en este trabajo no solo permitió evaluar el efecto del bloqueo dopaminérgico en ambas gónadas, sino también evidenciar que dicho efecto no se manifiesta de manera uniforme, sino sobre un sistema con organización funcionalmente lateralizada. Estos hallazgos refuerzan la importancia de considerar la asimetría ovárica como un componente fisiológico relevante en la interpretación de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la función reproductiva.

En cuanto al perfil hormonal, el aumento tardío de la concentración sérica de LH observado en los animales tratados en diestro 2 y evaluados cuatro ciclos después sugiere una alteración persistente en los mecanismos de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Una explicación posible es que la disminución sostenida de estradiol reduzca la retroalimentación negativa sobre este eje, lo que podría modificar la secreción basal o pulsátil de GnRH y, en consecuencia, de LH. No obstante, esta relación representa una asociación funcional y no demuestra una relación causal directa. Además, es importante considerar que las gonadotropinas se midieron en estro, por lo que los cambios observados reflejan niveles basales y no el pico preovulatorio de LH. Al comparar estos resultados con estudios de administración sistémica de sulpiride, se observa que el tratamiento sistémico provoca hiperprolactinemia y una disminución de LH y FSH, acompañada de alteraciones reproductivas más severas (Mostafapour *et al.*, 2014). Este efecto se explica por el bloqueo directo de receptores DA-2 a nivel hipofisario, interfiriendo con la regulación central del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Fitzgerald *et al.*, 2008; Petersenn *et al.*, 2023). En contraste, en el presente estudio el bloqueo se realizó de manera local en el ovario, sin una inhibición directa sobre la hipófisis. El aumento observado de LH, junto con la disminución de FSH, sugiere que el eje pudo haber activado mecanismos compensatorios en respuesta a cambios periféricos en la esteroidogénesis, la producción de factores ováricos como la inhibina o en la sensibilidad a las gonadotropinas, generando cambios en la retroalimentación hacia el eje hipotálamo-hipófisis sin involucrar un bloqueo hipofisario directo. De esta manera, el bloqueo dopaminérgico local no reproduce el patrón endocrino del tratamiento sistémico.

La disminución significativa de FSH observada cuando el tratamiento se realizó en diestro 2, tanto de manera inmediata como cuatro ciclos después del bloqueo dopaminérgico, es un hallazgo importante. La FSH es esencial para la maduración de los folículos, la selección de folículos antrales y la producción de estrógenos en las células de la granulosa (Liu *et al.*, 2019). De acuerdo con el modelo clásico de “dos células/dos gonadotropinas”, la LH estimula la producción de andrógenos en las células de la teca, mientras que la FSH promueve su conversión a estrógenos en las células de la granulosa mediante la activación de p450 aromatasa (Hillier, 1994). Por lo tanto, una disminución sostenida de FSH durante una etapa crítica del ciclo puede contribuir a las alteraciones foliculares y a la reducción en la ovulación observadas en este estudio, aunque no se puede descartar la participación de otros factores intraováricos que no fueron evaluados.

Los cambios observados en la expresión de los receptores de gonadotropinas apoyan esta interpretación. La disminución del receptor de FSH (FSHR) detectada en diestro 1 en animales evaluados cuatro ciclos después del bloqueo indica una menor capacidad de las células de la granulosa para responder a la FSH, lo cual concuerda con la disminución de estradiol. Se ha demostrado que la expresión de FSHR es necesaria para la producción de estrógenos y para que el folículo adquiriera la capacidad de responder adecuadamente a las gonadotropinas, así como para regular la expresión del receptor de LH (LHR) durante el desarrollo folicular (Kishi *et al.*, 2018). En contraste, el aumento de LHR observado en algunas condiciones, especialmente en estro, podría representar un mecanismo compensatorio para mantener la respuesta ovárica a la LH en un contexto de alteración local de la señal dopaminérgica.

En relación con la esteroidogénesis, los resultados muestran una disminución constante del estradiol sérico en los grupos tratados, mientras que la progesterona no presentó cambios significativos. La ausencia de cambios en progesterona puede interpretarse de dos formas: por un lado, sugiere que la función del cuerpo lúteo no fue el principal blanco del bloqueo dopaminérgico local; por otro, debe considerarse que las muestras hormonales se obtuvieron en estro, una fase en la que la progesterona normalmente se encuentra en niveles bajos, lo que limita la detección de posibles alteraciones en la función lútea. Este patrón concuerda con

estudios que indican que la regulación neural del ovario afecta principalmente la producción de estrógenos y andrógenos, más que la producción de progesterona (Morales-Ledesma *et al.*, 2015; Morales-Ledesma *et al.*, 2018).

El análisis de la expresión de la enzima P450 aromatasa añade complejidad a la interpretación de los resultados. Aunque se observó un aumento de esta enzima en estro de manera tardía, el estradiol sérico permaneció disminuido. Esto sugiere que la cantidad de aromatasa no siempre se relaciona directamente con la producción de estradiol. La regulación de la aromatasa depende no solo de su expresión, sino también de la disponibilidad de andrógenos, la actividad de la enzima, el tipo y número de células presentes en el folículo (Stocco, 2008). Por lo tanto, es posible que, a pesar del aumento de aromatasa en una etapa tardía, la producción efectiva de estradiol esté limitada por otros factores funcionales como la disponibilidad de andrógenos precursores, la actividad catalítica real de la enzima, la adecuada estimulación por FSH, o el estado funcional de las células de la granulosa dentro del folículo.

Finalmente, es importante considerar que el procedimiento quirúrgico y el uso del vehículo intrabursal mostraron efectos sobre algunos parámetros hormonales, lo que indica que la manipulación del ovario por sí sola puede influir en la esteroidogénesis. Esto resalta la importancia de interpretar los efectos del bloqueo dopaminérgico comparando directamente los grupos tratados con sulpiride y los tratados con el vehículo.

En conjunto, los resultados de este estudio muestran que la señalización dopaminérgica mediada por los receptores DA-2 en el ovario desempeña un papel regulador importante y dependiente de la fase del ciclo estral en la ciclicidad y la ovulación en la rata hembra Long Evans. En este estudio se demostró de manera directa que el bloqueo de los receptores DA-2 en el ovario altera la ciclicidad estral y reduce la ovulación. Estos efectos funcionales se observaron principalmente cuando el bloqueo ocurrió durante diestro 1 y diestro 2, lo que sugiere que estas etapas representan una ventana crítica para la regulación ovárica.

Los cambios observados en las concentraciones de LH, FSH, estradiol y testosterona, así como en la expresión de los receptores FSHR, LHR y de la enzima P450 aromatasa, son consistentes con

los efectos funcionales observados y sugieren posibles mecanismos involucrados en la alteración de la ovulación. Sin embargo, estos datos no permiten establecer una relación causal directa entre las alteraciones hormonales o moleculares y la disminución de la ovulación, ya que no se evaluaron de manera específica intervenciones que permitieran confirmar dichos mecanismos como la restauración farmacológica de LH o FSH, la evaluación de la actividad enzimática funcional de la aromatasas, o estudios que demostraran la reversibilidad del efecto observado.

En conjunto, este trabajo amplía la comprensión del control local de la función ovárica y del papel de la dopamina como modulador periférico de la función reproductiva en la rata hembra. Asimismo, abre la posibilidad de futuras investigaciones orientadas a definir con mayor precisión los mecanismos celulares y hormonales mediante los cuales la dopamina regula la función ovárica en este modelo experimental.

10. CONCLUSIONES

- El bloqueo local de los receptores dopaminérgicos DA-2 en el ovario mediante la administración de un antagonista específico (sulpiride) en la bursa ovárica altera la ciclicidad estral, prolongando la fase de diestro 1, reduciendo la tasa de ovulación y el número de ovocitos liberados.
- El aumento de LHR en estro en los grupos tratados con sulpiride podría representar un mecanismo compensatorio, en el que los folículos intentan responder al pico preovulatorio de LH a pesar de la alteración dopaminérgica, lo que se correlaciona con el incremento tardío de LH y testosterona observada en el grupo SPD2.
- La disminución de estradiol observada en todos los grupos, acompañada de las modificaciones en los niveles de FSH, indica una alteración tanto en la esteroidogénesis ovárica como en la regulación gonadotrópica, lo que podría contribuir a la disminución de la ovulación.
- En conjunto, los resultados indican que el papel del receptor DA-2 y de la dopamina actúan como un modulador periférico clave en la función ovárica, que influye tanto en la

expresión de receptores gonadotrópicos como en la esteroidogénesis. Esto sugiere que la dopamina actúa como un integrador entre señales neuronales y hormonales, participando en la regulación de la ciclicidad estral y la ovulación.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar si la manipulación dopaminérgica local podría ser una diana terapéutica para restaurar la ovulación.
- Monitorear al modelo más allá de cuatro ciclos para ver si los cambios son reversibles, se estabilizan o progresan hacia una disfunción ovárica crónica.

10. LITERATURA CITADA

1. Aguado, L. I. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microscopy Research and Technique*, 59(6), 462–473. <https://doi.org/10.1002/jemt.10232>
2. Aguado, L. I., Petrovic, S. L., & Ojeda, S. R. (1982). Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: Characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*, 110(4), 1124–1132. <https://doi.org/10.1210/endo-110-4-1124>
3. Akinaga, J., García-Sáinz, J. A., & S. Pupo, A. (2019). Updates in the function and regulation of α_1 -adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology*, 176(14), 2343–2357. <https://doi.org/10.1111/bph.14617>

4. Amiram Magendzo, N. (2010). Anovulación y disfunción ovulatoria e infertilidad. *Revista médica Clínica Las Condes*, 21(3), 377–386. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(10\)70548-4](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(10)70548-4)
5. Anesetti, G., Lombide, P., D'Albora, H., & Ojeda, S. (2001). Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell and tissue research*, 306(2), 231–237. <https://doi.org/10.1007/s004410100451>
6. Anetsberger, D., Kürten, S., Jabari, S., & Brehmer, A. (2018). Morphological and immunohistochemical characterization of human intrinsic gastric neurons. *Cells, Tissues, Organs*, 206(4–5), 183–195. <https://doi.org/10.1159/000500566>
7. Araya, V., Jara, P., & Lara, H. E. (2004). Cerebro, estrés y ovario poliquístico. Participación de la inervación simpática en el desarrollo del síndrome del ovario poliquístico. *Endocrinología y nutrición: organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición*, 51(8), 473–477. [https://doi.org/10.1016/s1575-0922\(04\)74649-5](https://doi.org/10.1016/s1575-0922(04)74649-5)
8. Arroyo Ledezma, J., Gallegos-Sánchez, J., Villa Godoy, A., & Valencia Méndez, J. (2006). Sistemas neurales de retroalimentación durante el ciclo reproductivo anual de la oveja: Una revisión. *Interiencia*, 31(1), 8–15. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006000100004
9. Bahr, J. M., & Ben-Jonathan, N. (1985). Elevated catecholamines in porcine follicular fluid before ovulation. *Endocrinology*, 117(2), 620–623. <https://doi.org/10.1210/endo-117-2-620>
10. Bakos, O., Lundkvist, Ö., & Bergh, T. (1993). Transvaginal sonographic evaluation of endometrial growth and texture in spontaneous ovulatory cycles—a descriptive study. *Human Reproduction* (Oxford, England), 8(6), 799–806. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138145>
11. Balen, A. H., Conway, G., Homburg, R., & Legro, R. (2005). *Polycystic ovary syndrome: A guide to clinical management*. CRC Press.
12. Baljet, B., & Drukker, J. (1979). The extrinsic innervation of the abdominal organs in the

- female rat. *Cells, Tissues, Organs*, 104(3), 243–267. <https://doi.org/10.1159/000145073>
13. Beltz, A. M., & Moser, J. S. (2020). Ovarian hormones: a long overlooked but critical contributor to cognitive brain structures and function. En *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1464, Número 1, pp. 156–180). Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/nyas.14255>
 14. Bennett, B. D., & Wilson, C. J. (1998). Synaptic regulation of action potential timing in neostriatal cholinergic interneurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(20), 8539–8549. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-20-08539.1998>
 15. Besognet, B., Hansen, B. S., & Daels, P. F. (1997). Induction of reproductive function in anestrus mares using a dopamine antagonist. *Theriogenology*, 47(2), 467–480. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00005-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00005-8)
 16. Birch Petersen, K., Pedersen, N. G., Pedersen, A. T., Lauritsen, M. P., & la Cour Freiesleben, N. (2016). Mono-ovulation in women with polycystic ovary syndrome: a clinical review on ovulation induction. *Reproductive Biomedicine Online*, 32(6), 563–583. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.03.006>
 17. Bosch, E., Alviggi, C., Lispi, M., Conforti, A., Hanyaloglu, A. C., Chuderland, D., Simoni, M., Raine-Fenning, N., Crépieux, P., Kol, S., Rochira, V., D’Hooghe, T., & Humaidan, P. (2021). Reduced FSH and LH action: implications for medically assisted reproduction. *Human Reproduction* (Oxford, England), 36(6), 1469–1480. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab065>
 18. Bravo-Benitez, J. M., Cruz, Y., Lucio, R. A., Venegas, B., Díaz, A., Morales-Ledesma, L., Domínguez, R., & Morán, C. (2022). Intrinsic innervation of the ovary and its variations in the rat senescence process. *Journal of Molecular Histology*, 53(2), 347–356. <https://doi.org/10.1007/s10735-022-10069-7>
 19. Bravo-Benítez, J. M., Rojas, A. M., Mirto-Aguilar, N., Gómez, Y. C., & Raya, C. M. (2021). El cuerpo lúteo, nuevos mecanismos de regulación y su asociación con la infertilidad. *Revista eNeurobiología*, 12(30).

20. Brendemuehl, James & Cross, D. (2000). Influence of the dopamine antagonist domperidone on the vernal transition in seasonally anoestrous mares. *Journal of reproduction and fertility. Supplement.* 185-93.
21. Burden, H. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. *Catecholamines as hormone regulators*, 18, 261-265.
22. Burden, H. W., & Lawrence, I. E., Jr. (1978). Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat. *The Anatomical Record*, 190(2), 233–241. <https://doi.org/10.1002/ar.1091900207>
23. Burden, H. W., Leonard, M., Smith, C. P., & Lawrence, I. E., Jr. (1983). The sensory innervation of the ovary: A horseradish peroxidase study in the rat. *The Anatomical Record*, 207(4), 623–627. <https://doi.org/10.1002/ar.1092070410>
24. Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS One*, 7(4), e35538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
25. Campbell, C. S., & Turek, F. W. (1981). Cyclic function of the mammalian ovary. *En Biological Rhythms* (pp. 523–545). Springer US.
26. Casarini, L., Santi, D., Simoni, M., & Potì, F. (2018). ‘spare’ luteinizing hormone receptors: Facts and fiction. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 29(4), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.01.007>
27. Cattanach, B. M., Iddon, C. A., Charlton, H. M., Chiappa, S. A., & Fink, G. (1977). Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature*, 269(5626), 338–340. <https://doi.org/10.1038/269338a0>

28. Chedrese, J., (2003). Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: efecto de los esteroides. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16(2), 171-182.
29. Choi, J., & Smits, J. (2014). Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 383(1–2), 203–213.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.12.009>
30. Clarkson, J., & Herbison, A. E. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 147 (12), 5817–5825.
<https://doi.org/10.1210/en.2006-0787>
31. Clement F. (2016). Multiscale mathematical modeling of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Theriogenology*, 86(1):11–21.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.063>.
32. D’Albora, H., Anesetti, G., Lombide, P., Dees, W. L., & Ojeda, S. R. (2002). Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microscopy Research and Technique*, 59(6), 484–489.
<https://doi.org/10.1002/jemt.10231>
33. D’Albora, H., Lombide, P., & Ojeda, S. R. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell and Tissue Research*, 300(1), 47–56.
<https://doi.org/10.1007/s004419900130>
34. Dees, W. L., Ahmed, C. E., & Ojeda, S. R. (1986). Substance P- and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology*, 119(2), 638–641. <https://doi.org/10.1210/endo-119-2-638>
35. Dees, W. L., Hiney, J. K., Schultea, T. D., Mayerhofer, A., Danilchik, M., Dissen, G. A., & Ojeda, S. R. (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology*, 136(12), 5760–5768. <https://doi.org/10.1210/endo.136.12.7588334>

36. Dissen, G., Garcia-Rudaz, C., & Ojeda, S. (2009). Role of neurotrophic factors in early ovarian development. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(01), 024–031.
<https://doi.org/10.1055/s-0028-1108007>
37. Domínguez, R., Flores, A., & Cruz-Morales, S. E. (2011). Hormonal and neural mechanisms regulating hormone steroids secretion. In A. Hassan (Ed.), *Steroids: Basic science* (pp. 3–34). InTech.
38. Domínguez, R., Gaitán, C. M., Méndez, S. A., & Ulloa-Aguirre, A. (1987). Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *The journal of endocrinology*, 113(1), 37–44. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1130037>
39. Domínguez, R., Morales, L., & Cruz, M. E. (2003). Ovarian asymmetry. *Ann Rev Biomed Sci*, 5(95-104), 408.
40. Donadeu, F. X., & Thompson, D. L., Jr. (2002). Administration of sulpiride to anovulatory mares in winter: effects on prolactin and gonadotropin concentrations, ovarian activity, ovulation and hair shedding. *Theriogenology*, 57(2), 963–976.
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00696-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00696-3)
41. Duffy, D. M., Ko, C., Jo, M., Brannstrom, M., & Curry, T. E., Jr. (2019). Ovulation: Parallels with inflammatory processes. *Endocrine Reviews*, 40(2), 369–416.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00075>
42. Durlinger, A. L. L., Gruijters, M. J. G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T. J., Grootegoed, J. A., & Themmen, A. P. N. (2002). *Anti-Müllerian Hormone Inhibits Initiation of Primordial Follicle Growth in the Mouse Ovary*.
43. Ferrero, H., García-Pascual, C. M., Gómez, R., Delgado-Rosas, F., Cauli, O., Simón, C., & Pellicer, A. (2014). Dopamine receptor 2 activation inhibits ovarian vascular endothelial growth factor secretion in vitro: Implications for treatment of ovarian hyperstimulation

- syndrome with dopamine receptor 2 agonists. *Fertility and Sterility*, 101(5), 1411–1418.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.01.031>
44. Filipiak, Y., Viqueira, M., & Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(202), 2–2.
http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092016000200002
 45. Fitzgerald, P., & Dinan, T. G. (2008). Prolactin and dopamine: What is the connection? *Journal of Psychopharmacology*, 22(2_suppl), 12–19.
<https://doi.org/10.1177/0269216307087148>
 46. Fortune, J. E. (2003). The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 78(3–4), 135–163. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00088-5)
 47. Franco, J. G., Jr, Baruffi, R. L. R., Mauri, A. L., Petersen, C. G., Felipe, V., Cornicelli, J., Cavagna, M., & Oliveira, J. B. A. (2006). GnRH agonist versus GnRH antagonist in poor ovarian responders: a meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*, 13(5), 618–627.
[https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60651-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60651-7)
 48. Freeman, M. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *En Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (pp. 2327–2388). Elsevier.
 49. Garnett, K., Wang, J., & Roy, S. K. (2002). Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: Follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and Progesterone1. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1593–1604.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005470>
 50. Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkői, Z., Medveczky, I., & Halász, B. (2000). CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 80(1–2), 40–45. [https://doi.org/10.1016/s0165-1838\(00\)00071-0](https://doi.org/10.1016/s0165-1838(00)00071-0)

51. Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkői, Z., Medveczky, I., & Halász, B. (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology*, 68(4), 244–256. <https://doi.org/10.1159/000054372>
52. Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84–97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
53. Gómez-Torres, N., Aguilera-Reyes, U., & Galicia-Castillo, O. (2014). Las orexinas dos péptidos hipotalámicos: Su localización y acción en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 15(6).
54. Gordon-Elliott, J.S., Ernst, C.L., Fersh, M.E., Albertini, E.S., Lusskin, S.I., & Altemus, M. (2017). *The Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis and Women's Mental Health: PCOS, Premenstrual Dysphoric Disorder, and Perimenopause*.
55. Gotlieb, N., Moeller, J., & Kriegsfeld, L. J. (2020). *Development and Modulation of Female Reproductive Function by Circadian Signals* (pp. 413–446). https://doi.org/10.1007/978-3-030-40002-6_16
56. Gougeon, A. (2003). Dynamics for Human Growth: Morphologic, Dynamic and Functional Aspects. *The ovary*, 2, 25-43.
57. Gougeon, A. (2004). Dynamics of human follicular growth: Morphologic, dynamic, and functional aspects. *En The Ovary* (pp. 25–43). Elsevier.
58. Grasa, P., Ploutarchou, P., & Williams, S. A. (2015). Oocytes lacking O -glycans alter follicle development and increase fertility by increasing follicle FSH sensitivity, decreasing apoptosis, and modifying GDF9:BMP15 expression. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(2), 525–539. <https://doi.org/10.1096/fj.14-253757>

59. Greiner, M., Paredes, A., Rey-Ares, V., Saller, S., Mayerhofer, A., & Lara, H. E. (2008). Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 149(10), 4988–4996. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1661>
60. Haisenleder, D. J., Dalkin, A. C., Ortolano, G. A., Marshall, J. C., & Shupnik, M. A. (1991). A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: Evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology*, 128(1), 509–517. <https://doi.org/10.1210/endo-128-1-509>
61. Hao, M. M., Fung, C., Boesmans, W., Lowette, K., Tack, J., & Vanden Berghe, P. (2020). Development of the intrinsic innervation of the small bowel mucosa and villi. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 318(1), G53–G65. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00264.2019>
62. Harlow, C. R., & Hillier, S. G. (2002). Connective tissue growth factor in the ovarian paracrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187(1–2), 23–27. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00702-x](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00702-x)
63. Hartman CG. 1944. Some new observations on the vaginal smear of the rat. *Yale J Biol Med*, 17:99-111.
64. Hawkins, S.M. & Matzuk, M.M. (2008). The Menstrual Cycle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135: 10-18. <https://doi.org/10.1196/annals.1429.018>
65. Hernandez, E. R., Jimenez, J. L., Payne, D. W., & Adashi, E. Y. (1988). Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via β_2 -adrenergic theca-interstitial cell recognition sites. *Endocrinology*, 122(4), 1592–1602. <https://doi.org/10.1210/endo-122-4-1592>
66. Hillier, S. G., Whitelaw, P. F., & Smyth, C. D. (1994). Follicular oestrogen synthesis: The “two-cell, two-gonadotrophin” model revisited. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 100(1–2), 51–54. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90278-X](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90278-X)

67. Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. En K. W. Jeon & M. Friedlander (Eds.), *International Review of Cytology* (Vol. 124, pp. 43–101). Elsevier.
68. Howles, C. M. (2000). Role of LH and FSH in ovarian function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 161(1–2), 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00219-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00219-1)
69. Hsueh, A. J. W., Kawamura, K., Cheng, Y., & Fauser, B. C. J. M. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. En *Endocrine Reviews* (Vol. 36, Número 1, pp. 1–24). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1020>
70. Hsueh, A. J. W., McGee, E. A., Hayashi, M., & Hsu, S. Y. (2000). Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163(1–2), 95–100. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00245-2](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00245-2)
71. Hubscher, C. H., Brooks, D. L., & Johnson, J. R. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, 80(2), 79–87. <https://doi.org/10.1080/10520290500138422>
72. Jacobowitz, D., & Wallach, E. E. (1967). Histochemical and chemical studies of the autonomic innervation of the ovary. *Endocrinology*, 81(5), 1132–1139. <https://doi.org/10.1210/endo-81-5-1132>
73. Jana, B., Meller, K. A., Czajkowska, M., & Całka, J. (2018). Long-term estradiol-17 β exposure decreases the cholinergic innervation pattern of the pig ovary. *Anatomischer Anzeiger [Annals of Anatomy]*, 216, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.11.010>
74. Jeppesen, J. V., Nielsen, M. E., Kristensen, S. G., & Yding Andersen, C. (2012). Concentration of activin A and follistatin in follicular fluid from human small antral follicles associated to gene expression of the corresponding granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356(1–2), 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.051>

75. Jones, A. S. K., & Shikanov, A. (2019). Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *Journal of Biological Engineering*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0134-3>
76. Kahsar-Miller, M. D., Conway-Myers, B. A., Boots, L. R., & Azziz, R. (2001). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the ovaries of healthy women and those with polycystic ovary syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185(6), 1381–1387. <https://doi.org/10.1067/mob.2001.118656>
77. Kaiser, U. B., Jakubowiak, A., Steinberger, A., & Chin, W. W. (1997). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology*, 138(3), 1224–1231. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.4968>
78. Khan, A. R., & Kauffman, A. S. (2012). The role of kisspeptin and RFamide-related peptide-3 neurones in the circadian-timed preovulatory luteinising hormone surge. *En Journal of Neuroendocrinology* (Vol. 24, Número 1, pp. 131–143). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02162.x>
79. Kishi, H., Kitahara, Y., Imai, F., Nakao, K., & Suwa, H. (2018). Expression of the gonadotropin receptors during follicular development. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(1), 11–19. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12075>
80. Klein, S. y Schwartz, N. (1999). Estrous cycle. p. 127-136. In: Knobil E. and Neill JD. (eds.). *Encyclopedia of Reproduction Vol. 2*. Academic Press. USA.
81. Knobil, E., Plant, T. M., Wildt, L., Belchetz, P. E., & Marshall, G. (1980). Control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science (New York, N.Y.)*, 207(4437), 1371–1373. <https://doi.org/10.1126/science.6766566>
82. Kumar, T. R., Wang, Y., Lu, N., & Matzuk, M. M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature genetics*, 15(2), 201–204. <https://doi.org/10.1038/ng0297-201>

83. Lara, H. E., Dorfman, M., Venegas, M., Luza, S. M., Luna, S. L., Mayerhofer, A., Guimaraes, M. A., Rosa E Silva, A. A. M., & Ramírez, V. D. (2002). Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microscopy Research and Technique*, 59(6), 495–502. <https://doi.org/10.1002/jemt.10229>
84. Lara, H. E., McDonald, J. K., & Ojeda, S. R. (1990). Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology*, 126(1), 364–375. <https://doi.org/10.1210/endo-126-1-364>
85. Lara, H. E., McDONALD, J. K., Ahmed, C. E., & Ojeda, S. R. (1990). Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology*, 127(5), 2199–2209. <https://doi.org/10.1210/endo-127-5-2199>
86. Lara, Hernán E., Porcile, A., Espinoza, J., Romero, C., Luza, S. M., Fuhrer, J., Miranda, C., & Roblero, L. (2001). Release of norepinephrine from human ovary: Coupling to steroidogenic response. *Endocrine*, 15(2), 187–192. <https://doi.org/10.1385/endo:15:2:187>
87. Lawrence IE Jr, Burden HW. 1980. The origin of the extrinsic adren-ergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 196:51–5
88. Lawrence, I. E., Jr, & Burden, H. W. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*, 196(1), 51–59. <https://doi.org/10.1002/ar.1091960106>
89. Lehman, M. N., Coolen, L. M., & Goodman, R. L. (2010). Minireview: Kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: A central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. En *Endocrinology* (Vol. 151, Número 8, pp. 3479–3489). <https://doi.org/10.1210/en.2010-0022>

90. Leonardi, C. E. P., Pfeifer, L. F. M., Rubin, M. I. B., Singh, J., Mapletoft, R. J., Pessoa, G. A., Bairy, A. M., & Silva, C. A. M. (2012). Prostaglandin F2 α promotes ovulation in prepubertal heifers. *Theriogenology*, 78(7), 1578–1582. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.030>
91. Letras Luna, D. E., & Letras Luna, D. E. (2015). *Estudio del bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos sobre el ciclo estral y la ovulación en el modelo de la rata adulta hemicastrada*. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/fb69b3a8-74e4-48b7-8892-06d1e4892eab>
92. Madekurozwa, M. C. (2008). An immunohistochemical study of ovarian innervation in the emu (*Dromaius novaehollandiae*). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 75(1), 59-65.
93. Maestroni, G. J. M. (2020). Adrenergic modulation of hematopoiesis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 15(1), 82–92. <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09840-7>
94. Magendzo, N. (2010). Anovulación y disfunción ovulatoria e infertilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 21. 377-386. 10.1016/S0716-8640(10)70548-4.
95. Martel, J. C., & Gatti McArthur, S. (2020). Dopamine receptor subtypes, physiology and pharmacology: New ligands and concepts in schizophrenia. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 1003. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01003>
96. Mayerhofer, A., & Fritz, S. (2002). Ovarian acetylcholine and muscarinic receptors: Hints of a novel intrinsic ovarian regulatory system. *Microscopy Research and Technique*, 59(6), 503–508. <https://doi.org/10.1002/jemt.10228>
97. Mayerhofer, A., Fritz, S., Grünert, R., Sanders, S. L., Duffy, D. M., Ojeda, S. R., & Stouffer, R. L. (2000). D1-receptor, DARPP-32, and PP-1 in the primate corpus luteum and luteinized granulosa cells: Evidence for phosphorylation of DARPP-32 by dopamine and human chorionic gonadotropin. *The Journal of Clinical Endocrinology and*

Metabolism, 85(12), 4750–4757. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.12.7084>

98. Mayerhofer, A., Frungieri, M. B., Bulling, A., & Fritz, S. (1999). Sources and function of neuronal signalling molecules in the gonads. *Medicina (B Aires)*, 59(5 Pt 2), 542-5.
99. Mayerhofer, A., Smith, G. D., Danilchik, M., Levine, J. E., Wolf, D. P., Dissen, G. A., & Ojeda, S. R. (1998). Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: Evidence for a cell–cell regulatory loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10990–10995. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10990>
100. McDonald, J. K., Dees, W. L., Ahmed, C. E., Noe, B. D., & Ojeda, S. R. (1987). Biochemical and immunocytochemical characterization of neuropeptide Y in the immature rat ovary. *Endocrinology*, 120(5), 1703–1710. <https://doi.org/10.1210/endo-120-5-1703>
101. Mohsin, S., & Pennefather, J. N. (1979). The sympathetic innervation of the mammalian ovary. A review of pharmacological and histological studies. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 6(3), 335–354. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1979.tb01255.x>
102. Moore, A. M., Prescott, M., Czielesky, K., Desrozier, E., Yip, S. H., Campbell, R. E., et al. (2018). Synaptic innervation of the GnRH neuron distal dendron in female mice. *Endocrinology*, 159(9), 3200–3208. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00505>
103. Morales, L., Ricardo, B., Bolaños, A., Chavira, R., & Domínguez, R. (2007). Ipsilateral vagotomy to unilaterally ovariectomized pre-pubertal rats modifies compensatory ovarian responses. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-24>
104. Morales-Ledesma, L., Linares, R., Rosas, G., & Domínguez, R. (2010). Unilateral section of the superior ovarian nerve restores ovulation in rats with estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome. *Biology of Reproduction*, 82(3), 551–557. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080085>

105. Mori, H., Arakawa, S., Ohkawa, T., Ohkawa, R., Takada, S., Morita, T., & Okinaga, S. (1994). The involvement of dopamine in the regulation of steroidogenesis in rat ovarian cells. *Hormone Research*, 41(1), 36–40. <https://doi.org/10.1159/000183941>
106. Morán, C., Cruz, M. E., & Morales-Ledesma, L. (2009). Asymmetrical neural connections of the ovaries with the celiac–superior mesenteric ganglia in the rat. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7, 59. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-59>
107. Mostafapour, S., Zare, S., Sadrkhanlou, R. A., Ahmadi, A., & Razi, M. (2014). Sulpiride-induced hyperprolactinemia in mature female rats: Evidence for alterations in the reproductive system, pituitary and ovarian hormones. *International Journal of Fertility & Sterility*, 8(2), 193–206.
108. Neill, J.D. & Plant, T.M. & Pfaff, D.W. & Challis, J.R.G & de Kretser, David & Richards, J.S. & Wassarman, P.M. (2006). Knobil and neill's physiology of reproduction.
109. Nequin, L. G., King, S. S., Johnson, A. L., Gow, G. M., & Ferreira-Dias, G. M. (1993). Prolactin may play a role in stimulating the equine ovary during the spring reproductive transition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 13(11), 631–635. [https://doi.org/10.1016/s0737-0806\(07\)80391-1](https://doi.org/10.1016/s0737-0806(07)80391-1)
110. Nisa, K. U., Tarfeen, N., Mir, S. A., Waza, A. A., Ahmad, M. B., & Ganai, B. A. (2024). Molecular Mechanisms in the Etiology of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): A Multifaceted Hypothesis Towards the Disease with Potential Therapeutics. *Indian journal of clinical biochemistry: IJCB*, 39(1), 18–36. <https://doi.org/10.1007/s12291-023-01130-7>
111. Orisaka, M., Miyazaki, Y., Shirafuji, A., Tamamura, C., Tsuyoshi, H., Tsang, B. K., & Yoshida, Y. (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. En *Reproductive Medicine and Biology* (Vol. 20, Número 2, pp. 169–175). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12371>

112. Orisaka, M., Miyazaki, Y., Shirafuji, A., Tamamura, C., Tsuyoshi, H., Tsang, B. K., & Yoshida, Y. (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in follicle development: A mini-review. *Reproductive medicine and biology*, 20(2), 169–175. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12371>
113. Orisaka, M., Tajima, K., Tsang, B. K., & Kotsuji, F. (2009). Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. En *Journal of Ovarian Research* (Vol. 2, Número 1). <https://doi.org/10.1186/1757-2215-2-9>
114. Pangas, S. A., & Rajkovic, A. (2015). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* (Vol. 1, pp. 947–995). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00021-1>
115. Pastelín-rojas, C. (2003). Efectos del bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico durante la segunda mitad del ciclo estral sobre la función ovárica de la rata adulta. Tesis Profesional. Biología, BUAP.
116. Pastelín, C. F., Morales-Ledesma, L., & Domínguez, R. (2017). Neural asymmetry between ovaries and the celiac–superior mesenteric ganglion: Functional implications. *Journal of Ovarian Research*, 10, 29. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0327-9>
117. Penning TM (1997) Molecular endocrinology of hydroxysteroid de-hydrogenase. *Endocrine Rev* 18:281–305
118. Petersenn, S., Fleseriu, M., Casanueva, F. F., et al. (2023). Diagnosis and management of prolactin-secreting pituitary adenomas: A Pituitary Society international consensus statement. *Nature Reviews Endocrinology*, 19, 722–740. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00886-5>
119. Peterson, C. M., Carrell, D. T., Varner, M., Stanford, J., Croughan, M., & Louis, G. B. (2010). The environment and reproduction: Endocrine disruption, reproductive impairment, and epigenetics. En *Reproductive Endocrinology and Infertility* (pp. 781–

803). Springer New York.

120. Prashar, V., Arora, T., Singh, R., Sharma, A., & Parkash, J. (2021). Interplay of KNDy and nNOS neurons: A new possible mechanism of GnRH secretion in the adult brain. En *Reproductive Biology* (Vol. 21, Número 4). Elsevier Sp. z o.o.
<https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100558>
121. Prashar, V., Arora, T., Singh, R., Sharma, A., & Parkash, J. (2023). Hypothalamic Kisspeptin Neurons: Integral Elements of the GnRH System. En *Reproductive Sciences* (Vol. 30, Número 3, pp. 802–822). Institute for Ionics. <https://doi.org/10.1007/s43032-022-01027-5>
122. Ramírez-Ávila B. (2001). Efectos de la administración secuencial de GnRH sobre la ovulación en ratas adultas con bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico. (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
123. Rey-Ares, V., Lazarov, N., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., & Mayerhofer, A. (2007). Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-40>
124. Rivera-Castro, M. E., Pastelín, C. F., Bravo-Benítez, J., & Morán, C. (2023). Organization of the subdiaphragmatic vagus nerve and its connection with the celiac plexus and the ovaries in the female rat. *Brain Sciences*, 13(7), 1032.
<https://doi.org/10.3390/brainsci13071032>
125. Rosas, G., Linares, R., Ramírez, D. A., Vieyra, E., Trujillo, A., Domínguez, R., & Morales-Ledesma, L. (2018). The neural signals of the superior ovarian nerve modulate in an asymmetric way the ovarian steroidogenic response to the vasoactive intestinal peptide. *Frontiers in Physiology*, 9, 1142. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01142>
126. Rosenfield, R. L., & Ehrmann, D. A. (2016). The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited. En *Endocrine Reviews* (Vol. 37, Número 5, pp. 467–520). Endocrine Society.
<https://doi.org/10.1210/er.2015-1104>

127. Saller, S., Kunz, L., Berg, D., Berg, U., Lara, H. E., Urra, J., Hecht, S., Pavlik, R., Thaler, C. J., & Mayerhofer, A. (2014). *Dopamine in human follicular fluid is associated with cellular uptake and metabolism-dependent generation of reactive oxygen species in granulosa cells: Implications for physiology and pathology. Human Reproduction*, 29(3), 555–567. <https://doi.org/10.1093/humrep/det422>
128. Sanderson, J. T. (2006). The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 94(1), 3–21. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl051>
129. Simpson, E. R., Mahendroo, M. S., Means, G. D., Kilgore, M. W., Hinshelwood, M. M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C. R., & Michael, M. D. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine reviews*, 15(3), 342–355. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-3-342>
130. Sloboda, D. M., Howie, G. J., Pleasants, A., Gluckman, P. D., & Vickers, M. H. (2009). Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. *PLOS ONE*, 4(8), e6744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006744>
131. Somoza, Gustavo M. (2020). El eje hipotálamo-hipofisario en los mamíferos: Las hormonas hipotalámicas relacionadas con el control de las gonadotropinas hipofisarias. *Grupo Asís*, 8-11.
132. Speroff, L., Taylor, H.S., Pal, L. and Deli, E. (2020). Chronic anovulation and polycystic ovary syndrome. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 9th ed. Baltimore, MD: William Lippincot William and Wilkins, pp: 940–1049.
133. Spicer, L. J. (1986a). Catecholaminergic regulation of ovarian function in mammals: Current concepts. *Life Sciences*, 39(19), 1701–1711. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(86\)90088-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(86)90088-3)
134. Stocco, C. (2008). Aromatase expression in the ovary: Hormonal and molecular regulation. *Steroids*, 73(5), 473–487. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.01.017>

135. Strauss, J. F., III, & Williams, C. J. (2009). The ovarian life cycle. En Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology (pp. 155–190). Elsevier.
136. Taketa Y. (2022). *Luteal toxicity evaluation in rats*, Journal of Toxicologic Pathology, p. 7-17, Online ISSN 1881-915X <https://doi.org/10.1293/tox.2021-0058>
137. Tetkova, A., Susor, A., Kubelka, M., Nemcova, L., Jansova, D., Dvoran, M., Llano, E. Del, Holubcova, Z., & Kalous, J. (2019). *FSH administration affects amino acid metabolism in mammalian oocytes*. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox117/5530562>
138. Tong, X., Liu, Y., Xu, X., Shi, J., Hu, W., Ma, T., Cui, P., Lu, W., Pei, Z., Xu, M., Zhang, F., Li, X., & Feng, Y. (2020). Ovarian innervation coupling with vascularity: The role of electro-acupuncture in follicular maturation in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Frontiers in Physiology*, 11, 474. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00>
139. Uchida, S., & Kagitani, F. (2014). Effects of electrical stimulation of autonomic nerves to the ovary on the ovarian testosterone secretion rate in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 180, 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.10.007>
140. Urrea, J., Blohberger, J., Tiszavari, M., Mayerhofer, A., & Lara, H. E. (2016). In vivo blockade of acetylcholinesterase increases intraovarian acetylcholine and enhances follicular development and fertility in the rat. *Scientific Reports*, 6, 30129. <https://doi.org/10.1038/srep30129>
141. Venegas-Meneses, B., Padilla, J. F., Juárez, C. E., Morán, J. L., Morán, C., Rosas-Murrieta, N. H., Handal, A., & Domínguez, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*, 50(3), 783–796. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0636-4>
142. Vieyra-Valdez, E., Linares-Culebro, R., Rosas-Gavilán, G., Ramírez-Hernández, D., Domínguez-Casalá, R., & Morales-Ledesma, L. (2020). Roles of the cholinergic system and vagal innervation in the regulation of GnRH secretion and ovulation: Experimental evidence. *Brain Research Bulletin*, 165, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.09.009>

143. Wang, X.-J., Xiong, G.-P., Luo, X.-M., Huang, S.-Z., Liu, J., Huang, X.-L., Xie, Y.-Z., & Lin, W.P. (2016). Dibutyl phthalate inhibits the effects of follicle-stimulating hormone on rat granulosa cells through down-regulation of follicle-stimulating hormone Receptor1. *Biology of Reproduction*, 94(6), 144, 1–13.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.136002>
144. Westwood, F. R. (2008). The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to ataging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375–384.
<https://doi.org/10.1177/0192623308315665>
145. Yoshida, M., Sanbuissyo, A., Hisada, S., Takahashi, M., Ohno, Y., & Nishikawa, A. (2009). Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34(Special), S189–S197. <https://doi.org/10.2131/jts.34.s189>

11. ANEXOS



La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Facultad de Ciencias Biológicas
otorga la presente

CONSTANCIA

A: **Guevara Tlacuilo Alejandra**

Por la impartición de la ponencia titulada:
"Papel del Receptor Dopaminérgico DA-2 en la Secreción de Hormonas Esteroideas y
Gonadotrópicas en el Ovario de Rata Adulta de la Cepa Long Evans"
Dentro del marco de la celebración del Tercer Coloquio de la Maestría en Ciencias Biológicas
El 13 de noviembre del 2024, de forma presencial.

Dr. Salvador Galicia Isasmendi
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a de 13 de noviembre del 2024



La Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

A través de la Facultad de Ciencias Biológicas
otorga la presente

CONSTANCIA

A: **C. Alejandra Guevara Tlacuilo**

Por participar en Divulgación de la Ciencia: "Lotería Interactiva"
Dentro del marco de la celebración del 3er Coloquio de la Maestría en Ciencias Biológicas
El 13 de noviembre de 2024, de forma presencial

Dr. Salvador Galicia Isasmendi
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 13 de noviembre de 2024

