



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Análisis de los efectos de la microinyección de EEDQ
en la bursa ovárica de ratas adultas cíclicas en los
diferentes días y horas del ciclo estral sobre la
ovulación espontánea.**

Tesis que para obtener el título de
LICENCIATURA EN BIOLOGIA

Presenta:
Claudia Elvira Juárez Robelo

Director de tesis:
Dr. José Luis Moran Perales



Septiembre 2015

INDICE

Página

Resumen_____	1
Introducción_____	2
1. Morfología y Desarrollo del Ovario_____	3
2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario _____	4
3. Ciclo Estral_____	6
4. Inervación Ovárica_____	9
5. Sistemas Dopaminérgicos del Sistema Nervioso Central_____	10
5.1 Papel de la Dopamina a Nivel Periférico_____	12
5.2 Antagonistas de los Receptores Dopaminérgicos_____	12
6. Propiedades Farmacológicas del EEDQ_____	13
Antecedentes_____	14
Planteamiento del Problema_____	16
Justificación del Estudio_____	18
Hipótesis_____	18
Objetivo General_____	18
Objetivos Específicos_____	19
Materiales y Métodos_____	19
Resultados _____	27
1. Efectos de la microinyección del vehículo en diferentes días y horas del ciclo estral sobre la TEV, la TUD y la TAO._____	27
2. Efectos de la microinyección de EEDQ en diferentes días y horas del ciclo estral sobre la TEV, la TUD y la TAO._____	28
3. Efectos de la microinyección de EEDQ en diferentes días y horas del ciclo estral sobre el número de ovocitos liberados._____	32
4. Efectos de la microinyección de EEDQ en diferentes días y horas del ciclo estral sobre el peso de los ovarios y del útero._____	35
5. Efectos del reemplazo hormonal en los grupos tratados con EEDQ._____	36
Discusión de Resultados_____	36
Conclusiones_____	39
Referencias Bibliográficas_____	40

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis Profesional, Dr. José Luis Morán Perales

A mi compañera de trabajo experimental, Dra. Berenice Venegas Meneses

Investigadores del Laboratorio de Neuroendocrinología del Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del Instituto de Ciencias, BUAP

A todo el personal del Bioterio *Claude Bernard*, en particular a su director, MVZ Carlos Escamilla Weinmann, porque gracias a su trabajo me permitió conocer y respetar a los animales de experimentación con los cuales realice mi trabajo de tesis.

A las Profesoras-Investigadoras de la Escuela de Biología de la BUAP, Dra. Angélica Trujillo Hernández y Dra. Rosalina Reyes Luna, por su desinteresado trabajo de revisión a mi Tesis Profesional y cuyas valiosas sugerencias me permitieron comprender mejor lo importante que es la buena escritura y redacción de trabajos científicos.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres: al Sr. Arturo Juárez Hernández y a la Sra. Juana Robelo Amaro, así como a mi hijo Juan Xiux Gómez Juárez y, por supuesto a mis hermanas Karina y Alejandra.

Gracias por su apoyo...

Resumen

Para analizar el papel funcional del sistema dopaminérgico de los ovarios en los mecanismos conducentes a la ovulación espontánea, ratas adultas que exhibieron tres ciclos estrales regulares consecutivos de cuatro días de duración fueron distribuidas en cuatro grupos experimentales: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro; cada grupo se dividió en diferentes horarios a las 08:00h, 13:00h y 20:00h. Los animales fueron sometidos a laparotomía dorso-lateral bilateral al nivel de la región inguinal con el fin de exteriorizar los ovarios y realizar una microinyección dentro de cada bursa ovárica con 20 μ L de una solución (5mg/ml; diluido en NaCl 0.9%+etanol 96%) del antagonista irreversible de los receptores dopaminérgicos *N-Etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina* (EEDQ). Los grupos vehículo consistieron en animales sometidos a la microinyección de solución salina dentro de las bursas ováricas; otros grupos control recibieron solo la laparotomía bilateral. En aquellos grupos donde la ovulación se vio inhibida, se administró GnRH (3.7 μ g /kg. peso) o 10 μ g de benzoato de estradiol (BE) a las 14:00h del proestro o diestro-2, respectivamente. Todas las ratas se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 de la mañana del estro esperado. Se disecaron los oviductos y se registró el signo de ovulación espontánea. Los tratamientos en los grupos vehículo y control no afectaron la ovulación espontánea y se reunieron en un solo grupo testigo (Vehículo: 30/40 vs. Control: 27/30, ns). La microinyección dentro las bursa ováricas con EEDQ realizada en el día del estro (EEDQ: 7/17 vs. Testigo: 14/16, $p < 0.01$) y del diestro-1 (EEDQ: 3/12 vs. Testigo: 16/24, $p < 0.001$) inhibieron significativamente la ovulación espontánea, lo que no ocurrió en los grupos con EEDQ en el diestro-2 (EEDQ: 7/14 vs. Testigo: 13/16, ns) o en el proestro (EEDQ 12/12 vs. Testigo 14/14, ns). Todos los grupos tratados con GnRH o BE reestablecieron la ovulación (EEDQ: 14/39 vs. GnRH+EEDQ 26/27 $p < 0.0001$), (EEDQ: 14/39 vs. BE + EEDQ 24/25 $p < 0.0001$). Estos resultados sugieren que durante la primera mitad del ciclo estral el sistema dopaminérgico de los ovarios participa en el control de la ovulación espontánea de la rata. Por lo que es posible que el sistema dopaminérgico de los ovarios integre las señales neuroquímicas para la secreción de estrógenos. Además de que haya una participación de otro tipo de receptores para regular las funciones involucradas en la ovulación.

Introducción

La reproducción sexual surge durante la evolución biológica como resultado de las presiones adaptativas de las diferentes especies y llevan a estas a la mejora de sus capacidades adaptativas (Freeman, 1988; Freeman, 1994).

Funciones reproductivas en las hembras y los machos de cualquier especie están en última instancia bajo el control del sistema nervioso. Sin embargo, muchos mecanismos básicos permanecen poco comprendidos. Por ejemplo, el papel que desempeña el sistema nervioso periférico sobre el control de la ovulación sigue representando un enigma que postula que su influencia es determinante en la supervivencia de las especies.

La regulación de las funciones del sistema reproductor en la hembra, es resultado de la interacción de diferentes hormonas secretadas por la adenohipófisis, los ovarios e incluso por otras glándulas endocrinas (neurohipófisis, adrenales, timo y quizá otras), interrelación que ocurre durante el ciclo estral o menstrual (Conn, 1994; Feder, 1981; Fink, 1988) además de los efectos moduladores que ejerce el sistema nervioso por medio de la inervación hacia estos órganos (Bahr et al, 1974; Burden, 1978; Domínguez et al, 1989).

La secreción de las gonadotropinas es regulada por la hormona hipotalámica liberadora de las gonadotropinas: *gonadoliberina* (GnRH), cuya secreción es controlada por diferentes sistemas de neurotransmisores (noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, ácido γ -amino butírico, opioides, encefalinas, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo-VIP, angiotensina II, entre otros) que ejercen sus efectos sobre las neuronas peptidérgicas localizadas principalmente en la región preóptica e hipotalámica anterior, así como en el hipotálamo medio (Freeman, 1988; Freeman, 1994; Kordon et al, 1994). Según la información que se posee, la participación de los diversos sistemas de neurotransmisores en la regulación de la secreción de la GnRH varía durante el ciclo estral (Domínguez et al, 1982; Domínguez et al, 1985; Domínguez et al, 1987; Morán & Domínguez, 1995).

Marco Teórico

Morfología y Desarrollo del Ovario.

El ovario de la rata adulta es un órgano de forma amigdalar y ligeramente aplanado que se encuentra suspendido del ligamento ancho uterino, en su pliegue peritoneal llamado mesovario por el que discurren los vasos sanguíneos que se introducen en el ovario a través del hilio. El ovario está organizado internamente en dos zonas: una zona central llamada médula, la cual está rodeada por una prominente zona periférica conocida como corteza que contiene los folículos en diferentes estadios de maduración y los cuerpos lúteos. En la corteza la foliculogénesis se inicia por ser una región que en su mayor parte esta inervada (Fawcett, 1995) (Figura 1).

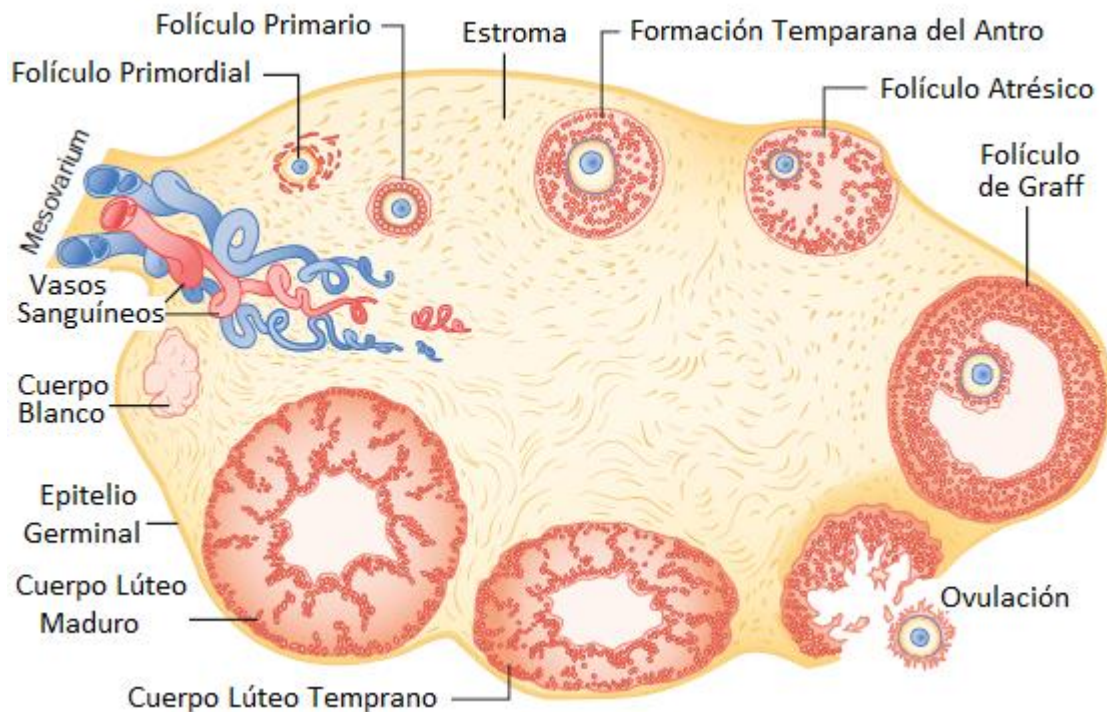


Figura 1. Estructura anatómica típica del ovario de los mamíferos. El ovario consta de una médula por la que transcurren vasos sanguíneos y nervios que conectan con los órganos funcionales de la corteza ovárica: folículos, cuerpos lúteos y tejido intersticial (Modificado de Yen et al, 1999).

La médula está formada por tejido conectivo laxo, rico en fibras elásticas que contienen muchos vasos sanguíneos, linfáticos y nervios asociados los cuales atraviesan el tejido conectivo (Cotton, et al, 1983).

El ovario está compuesto de células germinales (ovocitos o huevos) y células somáticas (tecales, granulosa y estroma) (Richards & Pangas, 2010). Por medio de la hormona folículo estimulante se activan los folículos primordiales para su crecimiento en folículos primarios, los cuales están compuestos por una sola capa de células de granulosa (Matsuda, 2012). Las células de granulosa secretan una membrana basal a lo largo de su superficie; las células de la teca derivadas del estroma que rodean a la capa de granulosa y se diferencian en dos capas teca interna y teca externa. Con el desarrollo del folículo la capa de células de granulosa secretan un líquido folicular o fluido antral que es un ultrafiltrado de plasma sanguíneo que forma una cavidad dentro del folículo denominado antro. Característica que determina a un folículo secundario. El estadio final es el folículo terciario, el antro aumenta de tamaño y acumula gran cantidad de factores de crecimiento, hormonas peptídicas y esteroideas, proteínas, metabolitos energéticos y otras sustancias desconocidas (Sutton *et al.*, 2003) rodeado de una delgada capa de células de granulosa, el ovocito es cubierto por el *cumulus oophorus*. Los folículos maduros se localizan en la superficie del ovario.

Eje Hipotálamo- Adenohipófisis-Ovario.

El papel que juega el Sistema Nervioso Central (SNC) y en particular el hipotálamo, como reguladores de la función endocrina y de ovulación del ovario es imprescindible. Los axones de las células neurosecretoras del hipotálamo tienen sus terminales en la eminencia media de la base de esta glándula, que secretan neurohormonas que controlan a su vez la secreción de varias hormonas de la glándula pituitaria anterior que actúan en otros órganos endocrinos como las gónadas (Randall et al, 2002).

La secreción de LH y FSH es controlada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). La liberación de GnRH en los roedores es realizada por neuronas ubicadas en la región preóptica e hipotalámica anterior y es influenciada

por factores internos (p. ej: neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas) y externos (P. ej: fotoperiodo, clima y nutrición) que actúan por distintas vías del SNC y alcanzan los ovarios. La secreción de la GnRH está regulada por acciones de retrocontrol en las cuales el papel de los esteroides gonadales desempeña papeles críticos (Figura 2).

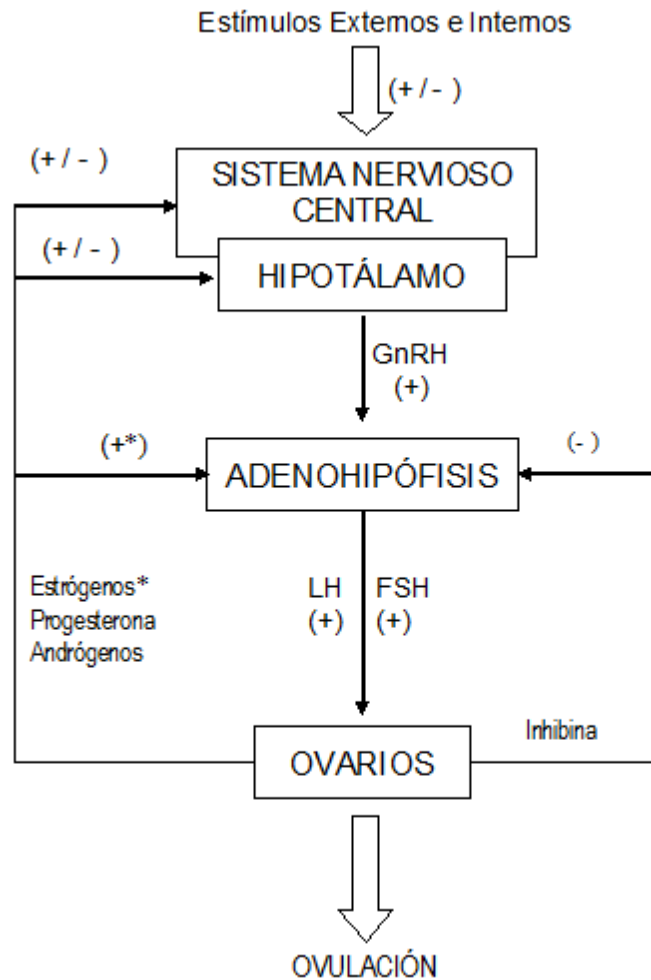


Figura 2. Representación esquemática de la interacción neuroendocrina y endocrina de los componentes del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) induce la secreción de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) que a su vez estimulan la secreción de hormonas ováricas de retrocontrol (esteroides sexuales: estrógenos, progesterona y andrógenos e inhibina) así como la maduración de los folículos y la ovulación. Las flechas indican las acciones estimulantes (+) ó inhibitorias (-) sobre su órgano blanco (Tomado de Sánchez-Criado, 1999).

Con base en el estudio de la biología reproductiva de la rata, actualmente es aceptado que los estrógenos ejercen un efecto *feedback* positivo en los circuitos neuroendocrinos que controlan la secreción de la GnRH, en cambio la progesterona controla la secreción de la GnRH ejerciendo un efecto *feedback* negativo sobre dichos circuitos (Fink, 1988).

Ciclo Estral.

En los roedores de laboratorio como el ratón, el hámster y la rata se exhiben ciclos estrales de aproximadamente cuatro días con ovulación espontánea (McMillan, 1998). En la rata, las fases del ciclo estral tienen duraciones variables que en promedio abarcan cuatro a cinco días, en función de las horas luz a las que se exponen las hembras adultas, mismas que se caracterizan a continuación en cuanto al ambiente hormonal (Feder, 1981; Freeman, 1988 y 1994) y los perfiles de la secreción de las gonadotropinas y de los esteroides sexuales (Figura 3):

- *Diestro-1:* Durante esta fase las concentraciones plasmáticas de LH, FSH, estrógenos y progesterona son basales. En el ovario se observan folículos en todas las etapas de crecimiento. El epitelio vaginal está formado por apenas 2-3 capas de células unidas a una membrana basal; el frotis vaginal revela la presencia de algunas células epiteliales nucleadas, leucocitos polimorfonucleados y mucus. El peso del útero es bajo, reflejo de una irrigación y nutrimento escaso, lo que indica ausencia de líquido de extravasación hacia la luz del órgano.
- *Diestro-2:* Durante la tarde de este día, las concentraciones plasmáticas de FSH, LH y prolactina se mantienen bajas, la concentración plasmática de progesterona caen a sus niveles basales, pero la de estrógenos comienza a incrementarse. Las células del epitelio vaginal comienzan a proliferar y madurar; el frotis vaginal presenta una gran cantidad de leucocitos polimorfonucleados con escasa cantidad de células epiteliales y de descamación. La acción creciente de los estrógenos sobre el útero resulta

en un aumento en la irrigación sanguínea, las capas del epitelio uterino se nutren y proliferan.

- Proestro: Las concentraciones plasmáticas de estrógenos continúan en aumento gradual hasta alcanzar su máxima concentración, seguido de su caída en la tarde (pico preovulatorio de estrógenos). Por su parte, durante la mañana del proestro, las concentraciones de FSH, LH y prolactina se mantienen bajas, cuando se produce la caída brusca de estrógenos, las concentraciones plasmáticas de prolactina y progesterona se incrementan rápidamente hasta alcanzar un máximo (picos preovulatorios de prolactina y progesterona) seguidas de una disminución que alcanza un mínimo en las primeras horas del día del estro. De igual forma la FSH y la LH son liberadas súbitamente. El frotis revela la presencia de células epiteliales bien definidas, de aspecto sano y con muy escaso porcentaje de células de exfoliación.
- Estro: 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. Las capas del epitelio vaginal entran en regresión, produciéndose una descamación generalizada que en el frotis se hace evidente por la presencia de gran cantidad de células sin núcleo y cornificadas. Durante las primeras horas de este día se produce la ovulación; si ocurre la fertilización de los ovocitos, la concentración plasmática de progesterona se mantiene alta asegurando así el implante de los huevos y su desarrollo. De no ocurrir la fertilización, la caída de la concentración plasmática de progesterona en el día del diestro-2, ocasiona una rápida regresión de las capas del endometrio uterino, el líquido de extravasación acumulado en la luz del útero es liberado y la serie de eventos endocrinos se reinician.

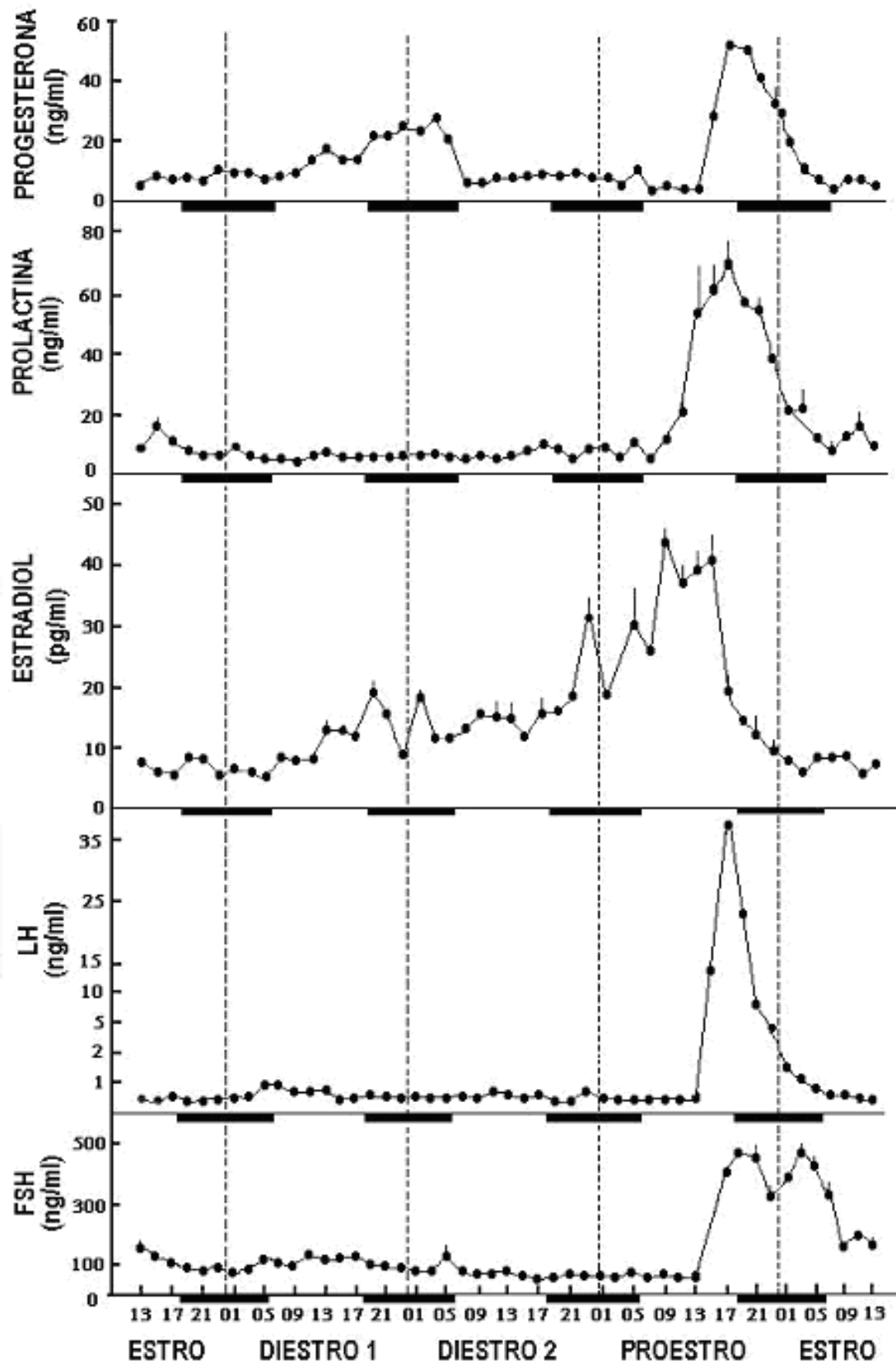


Figura 3. Perfil de la secreción de gonadotropinas y esteroides sexuales en los diferentes días y horas del ciclo estral de la rata (Modificado de Smith et al, 1975)

Inervación Ovárica.

El ovario de los mamíferos está inervado por una extensa red de nervios simpáticos y parasimpáticos representados por fibras preganglionares y posganglionares originadas en cuerpos celulares en el cuerno intermediolateral de la medula espinal (lumbar-dorsal) y en el nervio vago (Gerendai & Halasz, 1997).

La inervación simpática llega al ovario por medio del nervio ovárico superior y del plexo ovárico (Burden, 1985). El nervio ovárico superior proporciona el mayor aporte de fibras noradrenérgicas al tejido esteroideogénico de la glándula, sus fibras alcanzan la teca externa de los folículos, por lo que se ha sugerido que está íntimamente relacionado con el control de la esteroideogénesis (Aguado, 2002).

La mayoría de las fibras que viajan por el nervio ovárico superior provienen de las neuronas simpáticas post-ganglionares ubicadas en el ganglio celiaco (Klein & Burden, 1988). En tanto que el plexo inerva principalmente a los vasos sanguíneos del ovario (Klein & Burden, 1988; Lawrence & Burden, 1980). Por otra parte, se ha descrito que fibras nerviosas del nervio ovárico y del plexo ovárico superior se introducen en el estroma ovárico y contactan con células intersticiales que indirectamente se relacionan con las células del cuerpo lúteo (Erickson et al, 1985) (Figura 4).

El sistema parasimpático consiste de dos partes: una es derivada del nervio vago y entra en el hilio con la vena sanguínea por la vía del plexo ovárico (Erickson, *et al*; 1985). La otra está representada por fibras preganglionares del tercer o cuarto nervio sacro, estas son derivadas del nervio inferior del hipogástrico (Burden, 1978).

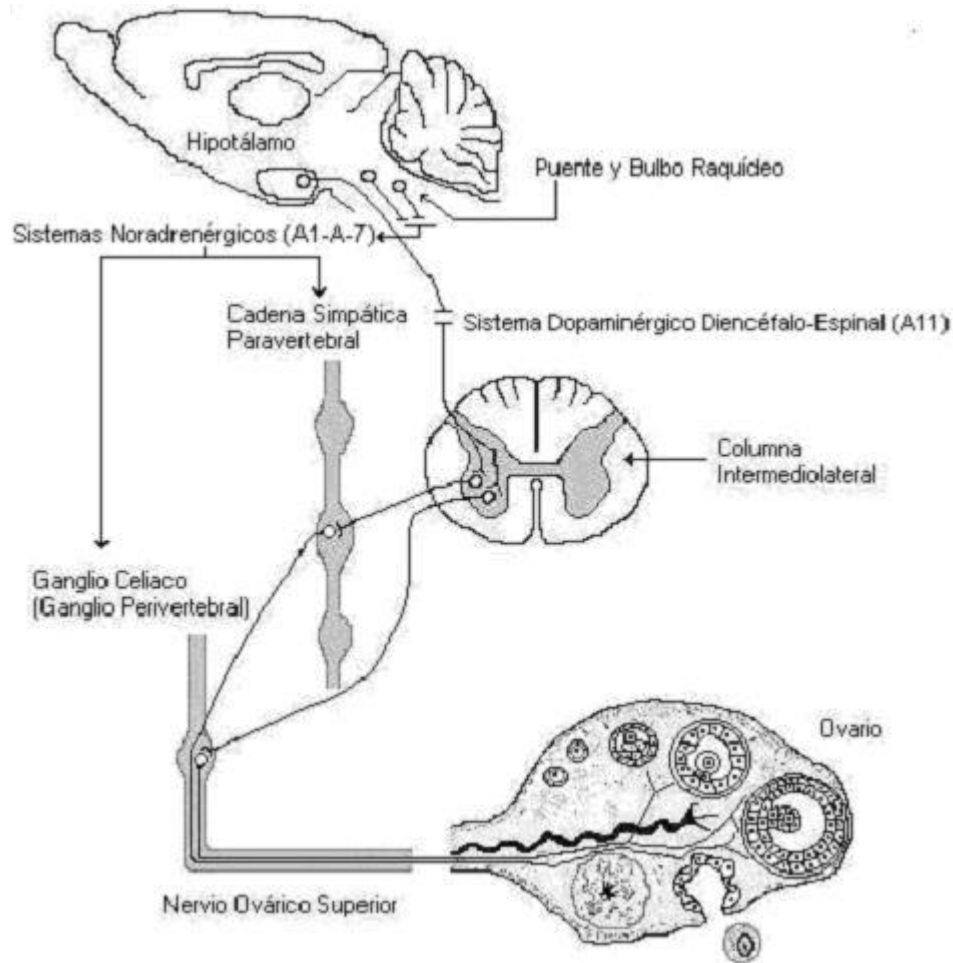


Figura 4. Inervación simpática del ovario vía nervio ovárico superior. Los cuerpos neuronales de las neuronas de primer orden que proyectan al ovario se localizan en el ganglio celiaco y los ganglios de la cadena simpática paravertebral. Estas reciben proyecciones desde neuronas que se localizan: 1) al nivel del tallo cerebral (somatos noradrenérgicos A₁ al A₇); y 2) al nivel de la columna intermediolateral de la médula espinal y que se conectan con neuronas dopaminérgicas (somatos A₁₁) desde el hipotálamo (Modificado de Dissen & Ojeda, 1999).

Sistemas Dopaminérgicos del Sistema Nervioso Central.

La dopamina es una catecolamina endógena cuyo papel como neurotransmisor periférico y central ha sido ampliamente documentada (Tohyama & Takatsuji, 1998).

Los sistemas de neurotransmisión central son diversos y prácticamente todos ellos han sido identificados y ubicados de acuerdo a un mapa neuroquímico que abarca todo el SNC (Björklund et al, 1975). (Figura 5).

Según Dawson y colaboradores (1986), se han descrito más de nueve sistemas dopaminérgicos en el SNC. Los más importantes de acuerdo a la regulación de diferentes funciones corporales son (Tohyama & Takatsuji, 1998):

- *Sistema Mesocortical*, cuyos somas neuronales se localizan en el segmento ventral y la sustancia nigra; su función se encuentra asociada al control y la iniciación del movimiento voluntario.
- *Sistema Tuberoinfundibular*, cuyos somas se localizan principalmente en los núcleos arcuato y periventricular del hipotálamo; su función se relaciona fundamentalmente con el control de la secreción de la prolactina.
- *Sistema incerto-hipotalámico*, con sus somas localizados en el hipotálamo posterior, la zona incerta y el núcleo periventricular; entre sus funciones se encuentra su participación en la regulación de la secreción de la GnRH.

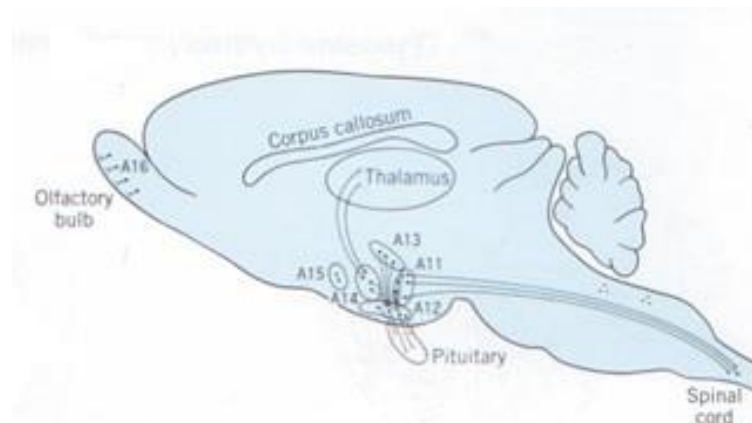


Figura 5. Mapa neuroquímico de los principales sistemas dopaminérgicos del encéfalo de la rata. (Cooper et al, 1991; citado por Tohyama & Takatsuji, 1998).

Algunos estudios de nuestro grupo de trabajo han mostrado que el implante unilateral con haloperidol a las 13:00 hrs en uno de los diferentes días del ciclo estral dentro del hipotálamo anterior disminuyó la tasa de ovulación en animales tratados en estro o diestro-1, lo que no ocurrió cuando los implantes se realizaron en diestro 2 o proestro los animales ovularon (Moran y Domínguez, 1995). Estos resultados permitieron sugerir que existe un sistema dopaminérgico en el hipotálamo anterior que participa en el control de la ovulación y, además que esta participación está lateralizada (Morán y Domínguez, 1997).

Papel de la Dopamina a Nivel Periférico.

La dopamina, a nivel periférico tiene gran importancia en el cuerpo carótido y en el funcionamiento del sistema vascular. Las *pequeñas células altamente fluorescentes* se encuentran a lo largo de la columna paravertebral y regulan algunas de las funciones cardiovasculares descritas por el uso de drogas dopaminérgicas. Por ejemplo, la activación de los receptores dopaminérgicos inducen un efecto ionotrópico positivo. Las neuronas dopaminérgicas también inervan las arterias renales y regulan el balance del ion sodio en el riñón, en las funciones gastrointestinales la dopamina induce vasodilatación. Por lo tanto la vasodilatación es acoplada con la acción ionotrópica positiva en el corazón (Carvey, 1998; Litter, 1988). Además de actuar en otros receptores del sistema cardiovascular como los receptores α y β adrenérgicos (Goldberg, 1978).

La dopamina también participa en el control de diversas funciones cerebrales, tales como la iniciación del movimiento voluntario y la expresión de ciertas conductas (Carvey, 1998). La dopamina en el tubérculo olfatorio es importante en el control de las emociones, la conducta sexual y la agresión, además de participar en el control de la actividad neuroendocrina (Litter, 1988).

Antagonistas de los Receptores Dopaminérgicos.

Existen dos clases de receptores a dopamina que fueron postulados a finales de la década de los 70's para explicar el comportamiento electrofisiológico, bioquímico y farmacológico de los agonistas y antagonistas de la dopamina (Kebabian & Calne, 1979):

- 1) *Receptores Dopaminérgicos Tipo 1 (DA_1)*, acoplados a la activación o estímulo de la adenilatociclasa (AC), y
- 2) *Receptores Dopaminérgicos Tipo 2 (DA_2)*, acoplados de manera inhibitoria a la actividad de la AC o bien, que no están necesariamente acoplados al funcionamiento de la AC.

Cabe mencionar que a la fecha se han identificado receptores múltiples tipo *DA₁-like* (que incluyen a los subtipos DA₁ y DA₅) y *DA₂-like* (que incluyen a los subtipos DA₂, DA₃ y DA₄) (Weiner & Molinoff, 1994).

Se ha observado que la estimulación de los receptores DA₁ produce vasodilatación renal, mesentérica y coronaria, en tanto que la estimulación de los DA₂ determina la reducción de las descargas de noradrenalina (Cavero et al, 1982).

Con base en diferentes criterios bioquímicos y farmacológicos, las características de los subtipos de receptores dopaminérgicos se indican en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Características distintivas de los tipos de receptores dopaminérgicos típicos (Weiner & Molinoff, 1994).
<p>Familia de Receptores del Subtipo Dopamina 1 (DA₁): Incluye a los receptores DA₁ y DA₅ Asociados a la estimulación de la Adenilato Ciclasa Los alcaloides ergot (p.ej. bromocriptina) son antagonistas SKF-38393 es un agonista específico Los neurolépticos como las butirofenonas son usualmente antagonistas Ausente en la pituitaria, pero presente en la tiroides Presente en el cuerpo estriado en neuronas intrínsecas sensibles al ácido kaínico Estudiado con [3H]SCH-23390 o [125I]SCH-23982</p> <p>Familia de Receptores del Subtipo Dopamina 2 (DA₂): Incluye a los receptores DA₂, DA₃ y DA₄ Asociados a la inhibición de la Adenilato Ciclasa El segundo mensajero para los receptores DA₃ y DA₄ permanece desconocido Los alcaloides <i>ergot</i> son agonistas La N-propilnorapomorfin y las aminotetralinas son agonistas selectivos Los neurolépticos como las butirofenonas son potentes antagonistas Presente en la pituitaria Presente en el cuerpo estriado en axones y terminales de las neuronas corticoestriadas Estudiado con [3H]Spiroperidol o [125I]Iodobenzamida</p>

Propiedades del *N*-Etoxicarbonil -2-Etoxi-1,2-DihidroQuinolina (EEDQ).

El EEDQ es utilizado como agente acoplante en la síntesis de péptidos (Referencia 3478; Merck Index, 1976), sin embargo por sus propiedades farmacológicas se utiliza en investigación como antagonista de diversos neurotransmisores. Su fórmula empírica es C₁₄H₁₇NO₃, su peso molecular es de 247.29 g/mol; soluble en dimetilsulfóxido y etanol-agua 1:1 (Figura 6).

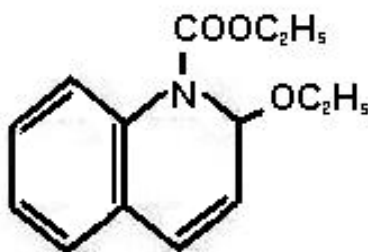


Figura 6. Estructura del 2-Etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ; N-Carbetoxi-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina; N-Etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina; Etiléster del ácido 2-Etoxi-1(2H)-quinolinecarboxílico) (Tomado del Merck Index, 1976).

En el SNC, posee actividad depresiva por lo que se utiliza como analgésico y tranquilizante en animales de experimentación. Con base en estudios farmacológicos, se describe como una neurotoxina dopaminérgica y antagonista específico que se une de manera irreversible a receptores monoaminérgicos como los adrenérgicos, dopaminérgicos (DA₁), muscarínicos y serotoninérgicos (Gozlan et al, 1994; Martel *et al*, 1969; Weissman & Muren, 1971).

Antecedentes

Domínguez y colaboradores (1987) evaluaron los efectos de un antagonista dopaminérgico en diferentes fases del ciclo estral sobre la ovulación y la distribución de la población folicular de los ovarios de la rata adulta. En este experimento se utilizaron ratas con ciclos regulares de cuatro días que fueron inyectadas con haloperidol (2.5 mg/kg de peso; i.m.), a las 13:00 h del estro, diestro1, diestro 2 y proestro. Los animales se sacrificaron en el día del estro esperado. El haloperidol bloqueó la ovulación cuando se administró en el estro y diestro-1 pero fue menos efectivo cuando se administró en el diestro-2 y en el proestro; la población folicular mostró alteraciones en el crecimiento de los folículos ováricos que dependieron del momento del bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico. Estos resultados permitieron sugerir que la información dopaminérgica en la primera mitad del ciclo estral es fundamental para que la secuencia de eventos neuroendocrinos y endocrinos que culminan con la ovulación se lleve a cabo de manera normal.

Se ha re-evaluado la participación de la dopamina en la regulación del ciclo estral y la ovulación espontánea de la rata y hemos confirmado las observaciones de Domínguez y colaboradores (1987). Sin embargo, la administración subcutánea de una dosis única de haloperidol en la primera (Ramírez-Ávila, 2001) ó en la segunda mitad del ciclo estral (Pastelín-Rojas, 2003) interrumpe el ciclo e inhibe de modo claro la secreción de gonadotropinas y de estrógenos. Independientemente del momento del ciclo estral en que se realizó el bloqueo de los receptores dopaminérgicos; el desarrollo folicular se ve interrumpido y los índices de atresia se incrementan casi de manera absoluta en los animales. Si bien estos efectos pudieran ser explicados por la interrupción de la secreción de gonadotropinas, el reemplazo hormonal fue ineficaz para restablecer la función ovárica (Vargas-Torres, 2002), lo que nos permite suponer que el bloqueo farmacológico de la inervación dopaminérgica de los ovarios pudiera involucrar de manera directa los mecanismos que controlan la función ovárica.

Lévesque y Di Paolo (1988) mostraron que en la rata ovariectomizada tratada con estradiol, la densidad de receptores dopaminérgicos en los cuerpos estriados se incrementa significativamente, mientras que la densidad del receptor DA-2 en la adenohipófisis no se modifica. En este modelo, la administración periférica de EEDQ produjo un decremento del 80% en la densidad de receptores DA-1 y DA-2 en el estriado, con una posterior recuperación de la repoblación en el receptor DA-1 pero no del DA-2 en esta estructura cerebral. Por otra parte, tras el tratamiento con EEDQ, ocurrió un decremento del 50% de los receptores DA-2 en la adenohipófisis. Estos resultados permitieron sugerir que el EEDQ puede producir efectos diferenciales cuando se une de modo irreversible al receptor DA-1 respecto a lo que ocurre cuando bloquea al receptor DA-2. En este trabajo se puso de manifiesto que la sola administración de EEDQ en ratas no tratadas con estradiol no se modificaron las concentraciones plasmáticas de prolactina; en cambio, en animales que si recibieron el estímulo estrogénico y que fueron tratadas con EEDQ, las concentraciones plasmáticas de prolactina se incrementan respecto a animales tratados con estradiol que no recibieron EEDQ.

Resultados de nuestro laboratorio, han mostrado que la microinyección intracerebral con EEDQ a las 13:00 h en el hipotálamo anterior de ratas adultas con ciclos regulares de cuatro días de duración indujo cambios en el patrón de la ciclicidad vaginal dentro de los cuatro ciclos estrales que siguen a la microinyección de la neurotoxina, prolongando la duración del primer ciclo estral significativamente, lo que permite sugerir que las señales dopaminérgicas participan en la regulación del ciclo estral al afectar la secreción de gonadotropinas y de esteroides ováricos (Meléndez et al, 2002).

Planteamiento del Problema

De acuerdo a los estudios mencionados anteriormente, es probable que la dopamina desempeñe funciones muy importantes en el control de la ovulación espontánea. Los antecedentes que muestran los efectos del bloqueo sistémico de los receptores dopaminérgicos sobre el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, ponen de manifiesto el papel crítico que desempeña la dopamina en la función reproductiva de la hembra en relación con las vías de comunicación neuroendocrinas, endocrinas y aparentemente, neurocrinas (Domínguez et al, 1987; Morán & Domínguez, 1995). Sin embargo, no existen evidencias claras de que el ovario utilice a la dopamina como un neurotransmisor clásico, o bien, como un neuromodulador.

Se ha detectado la presencia de dopamina y sus receptores en diferentes compartimentos ováricos pero se discute su papel funcional en estos tejidos (Aguado et al, 1982; Anesetti et al, 2001; Bodis et al, 1992; Bodis et al, 1993; Lara et al, 2001; D'Albora & Barcia, 1996; D'Albora et al, 2000; Mayerhofer et al, 1997; Rey-Ares et al, 2007).

La dopamina participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendocrina (Bahena-Trujillo, 2000).

Otros trabajos en los que se ha analizado el papel de la dopamina en la periferia postulan que actúa como un modulador de las funciones renales y

cardiovasculares (Amneta et al, 2002) y es factible que en los ovarios desempeñe funciones semejantes.

La participación de señales neurales en la regulación de la ovulación puede ser explicada por efectos de las hormonas y mediados por neurotransmisores como las catecolaminas y neuropeptidos liberados localmente para influir en la respuesta de los tejidos ováricos a las gonadotropinas.

El ovario recibe inervación abundante de naturaleza catecolaminérgica y peptidérgica que proviene principalmente del nervio ovárico superior y del plexo ovárico (Burden, 1985) y se ha postulado particularmente que noradrenalina tiene una influencia determinante sobre la esteroidogénesis y el desarrollo folicular (Dissen & Ojeda, 1999). Sin embargo, la presencia de receptores a la dopamina en diferentes compartimentos ováricos nos permite sugerir que pudiera desempeñar un rol importante en la regulación de las funciones del ovario.

Se han encontrado niveles de dopamina en el fluido antral de folículos preovulatorios de primates (Bodis et al., 1993). D' Alhora y colaboradores (2000) encontraron neuronas positivas para la enzima tirosina hidroxilasa en ovarios de rata.

En tejido ovárico equino se analizó y se encontró la presencia de los receptores de dopamina del tipo DA₁ y DA₂. (King et al., 2005). Se ha comprobado la expresión de receptores de dopamina en células de la granulosa y tecaes en humano como en rata (Rey-Ares et al., 2007).

De acuerdo a los antecedentes anteriores, no hay evidencias claras que describan el papel funcional de la dopamina presente en los ovarios. Los diferentes estudios que abordan el análisis del papel de la inervación ovárica sobre las funciones de la gónada se han enfocado en los sistemas noradrenérgicos y peptidérgicos (Aguado, 2002; Ahmed et al, 1986; Ben-Jonathan et al, 1982; Des et al, 1985; Davoren & Hsueh, 1985; Dissen & Ojeda, 1999; Mayerhofer et al, 1997; McNeill & Burden, 1987), funciones que se afectan sensiblemente cuando se modifican las influencias nerviosas que llegan al ovario (Burden, 1985; Curry et al, 1984; Curry et al, 1984b; Lara et al, 1990).

Justificación del Estudio

Con base en todos estos antecedentes, particularmente en aquellos en los que se muestra que el bloqueo sistémico y central de los receptores a la dopamina sobre las funciones que conducen a la ovulación, podemos plantear que este neurotransmisor/neuromodulador participa activamente en el control de las funciones ováricas. Existen evidencias de la presencia de dopamina y sus receptores en los tejidos ováricos pero el papel funcional de esta señal química aún no ha sido descrito. Aparentemente, esta participación varía a lo largo del ciclo estral e incluso en el momento del día en que se analiza su función.

Por lo anterior, en el presente estudio se analizaron los efectos del bloqueo irreversible de los receptores dopaminérgicos a las 8:00; 13:00; 20:00 h, inducido por la microinyección de EEDQ dentro de las bursas ováricas, en diferentes días del ciclo estral de la rata adulta, evaluando la respuesta ovulatoria y la secreción de gonadotropinas, esta última estimada por los cambios en el patrón de ciclicidad vaginal.

Hipótesis

El bloqueo irreversible de los receptores a la dopamina inducido por la inyección local del antagonista dopaminérgico EEDQ dentro de las bursas ováricas afectará la ovulación espontánea de la rata adulta, lo que dependerá del día y de la hora del ciclo estral en que se realice el bloqueo farmacológico.

Objetivo General

Analizar los efectos del bloqueo irreversible de los receptores a la dopamina inducido por la inyección local del antagonista dopaminérgico EEDQ dentro de las bursas ováricas sobre la ovulación espontánea de ratas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración.

Objetivos Específicos

- 1) Analizar los efectos del bloqueo irreversible de los receptores a la dopamina inducido por la inyección local del antagonista dopaminérgico EEDQ dentro de las bursas ováricas sobre la secreción de gonadotropinas, estimada por el aspecto del frotis vaginal, a las 8:00, 13:00 y 20:00 h de los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta.
- 2) Analizar los efectos del bloqueo irreversible de los receptores a la dopamina inducido por la inyección local del antagonista dopaminérgico EEDQ dentro de las bursas ováricas sobre la ovulación espontánea, a las 8:00, 13:00 y 20:00 h de los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta.
- 3) En los casos donde se observen modificaciones en la ovulación espontánea al bloqueo irreversible de los receptores dopaminérgicos de los ovarios, analizar los efectos del reemplazo hormonal de la señal hipotalámica (GnRH) u ovárica (estradiol) sobre la respuesta ovulatoria.

Materiales y Métodos

Material Biológico.

Se utilizaron 125 ratas hembras adultas de 90 a 120 días de edad de la cepa CII-ZV del Bioterio Claude Bernard, con pesos corporales de 200 a 250 gramos. Los animales fueron alojados en condiciones de 14 h luz / 10 h oscuridad (luces de las 05:00 a las 19:00 h) y con libre acceso a agua y alimento balanceado.

Registro del Ciclo Estral.

Se realizó el registro del aspecto de los cambios del epitelio vaginal por medio de frotis obtenidos de la piel de la vagina; el registro se realizó diariamente entre las 9:00 y 10:00 h a lo largo del experimento. En el estudio, sólo se utilizaron animales que presentaron al menos tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro (animales cíclicos) y entonces fueron distribuidos en los diferentes grupos experimentales.

Grupos Experimentales.

Todos los animales cíclicos fueron distribuidos en grupos experimentales por cada día del ciclo estral (grupos con histología vaginal en: diestro-1, diestro- 2, proestro o estro) y en tres horarios diferentes en cada día del ciclo estral (8:00, 13:00 y 20:00 h).

- **Grupos con EEDQ.** Ratas con ciclos estrales regulares a los que se les administraron 20 μ L de solución de EEDQ (5mg/ml ovario; diluido en etanol+ solución de NaCl 0.9% 1:1: vehículo) dentro de cada bursa ovárica.
- **Grupo Vehículo.** Ratas con ciclos estrales regulares a los que se les administró solución salina dentro de cada bursa ovárica.
- **Grupo Control.** Animales cíclicos a los que se les realizó la laparotomía bilateral e inspección del ligamento que sostiene al útero sin exteriorizar los ovarios.

Preparación del Fármaco.

De acuerdo a la información que proporciona la literatura, el EEDQ (Cat. 14983-7; Sigma Aldrich Inc.) se preparó a una concentración de 5mg/ml y para su dilución se utilizó una mezcla 1:1 de etanol 96% y solución salina 0.9% (Hess et al, 1988; Levant et al, 1997).

Preparación de Hormonas.

- *Solución Stock de LHRH (40 μ g/ml):* se pesaron 2 mg de GnRH sintética (LHRH, Cat. L-1898; Sigma Inc.) y se diluyeron en 10 ml de agua destilada; la solución se aforo a 50 ml.
- *Solución de GnRH sintética:* Se tomó 1 ml de solución stock y se aforo hasta 5 ml de agua destilada; la concentración de la solución resultante es de 8 μ g/ml.
- *Solución de Benzoato de Estradiol.* De acuerdo a Everett y Sawyer (1949) se pesaron en balanza de precisión (0.1 mg) 20 mg de cristales de Benzoato de Estradiol (BE; Sigma Products Inc., Catálogo: B-8515, β -Estradiol 3-benzoate). Los cristales se disolvieron en 100 μ L de acetona seguido de la

incorporación de 900 μ L de aceite vegetal de canola (*Solución Stock* a concentración final de: 20 mg/ml). Inmediatamente, se tomaron 10 μ L de la solución *stock* de BE y se aforó a 1 ml (1000 μ L) con aceite vegetal de canola puro (*Solución Oleosa* a concentración final de: 0.2 mg/ml). La solución oleosa de BE se guardó en frasco ámbar con sello de goma (cada mililitro de solución oleosa alcanza para 40 dosis recomendadas de BE de 10 μ g que equivalen a 100 u.i. de estrógeno por cada una).

Procedimiento Quirúrgico (Laparotomía Bilateral) para la Microinyección.

1. Para la realización de la laparotomía bilateral se utilizó una máquina afeitadora con cuchillas del No. 40, una mesa de disección, una bomba de perfusión nanomolar conectada a un microinyector motorizado, una jeringa Hamilton de 100 μ L, una fuente de luz conectada a dos conductores de fibra óptica, solución de clorhexidina 2% (CLH 2%), material quirúrgico diverso (una tijera iris de disección, una tijera punta fina, una pinza hemostática, dos pinzas de disección de punta fina, seda quirúrgica #00, bisturí, gasa quirúrgica estéril)(Fotografía 1).
2. Todos los animales fueron sedados con éter y una vez inmobilizados, se les rasuró el área ventral lateral de ambos lados, desde la pierna hasta la primera costilla en ambos lados del cuerpo (Fotografía 2).
3. Los animales afeitados se colocaron en posición de costado sobre su lado izquierdo en una cama plana limpia y desinfectada con espray de solución CLH 2% y se estableció el campo quirúrgico (Fotografía 3).
4. Se inició la cirugía laparoscópica tomando como referencia la última costilla y el punto de flexión de la pierna (Fotografía 4).
5. Se limpió la piel con gasa saturada con CLH 2% y se realizó una incisión de aproximadamente 0.5 cm sobre la piel (Fotografía 5).
6. Con la ayuda de una pinza hemostática, la fisura sobre la piel se expandió y se removió la grasa subcutánea empleando una tijera quirúrgica de punta fina (Fotografía 6).

7. Con la maniobra anterior, se localiza el músculo abdominal en la región más cercana al ovario y se realiza un corte quirúrgico de aproximadamente 2mm hasta atravesar peritoneo (Fotografía 7).
8. Con ayuda de una pinza hemostática, se amplió la herida con el fin de ubicar la grasa blanca que rodea al ovario y el útero (Fotografía 8).
9. Se prepara y calibra la bomba de perfusión nanomolar para que se inyecten 20 μ L de solución de EEDQ o del vehículo (Fotografía 9).
10. Con una pinza de punta fina, se jaló la grasa y se exteriorizó el ovario izquierdo y se procedió a realizar la microinyección (Fotografía 10).
11. Para realizar la microinyección se empleó una bomba de perfusión nanomolar conectada a una jeringa Hamilton de 100 μ l y una aguja hipodérmica del No. 25; se sujetó firmemente la bursa ovárica izquierda con una pinza fina y se dirigió la punta de la aguja hasta ingresar a través de la pared de la bursa al espacio entre el tejido ovárico y esta última; se realizó la microinyección de 20 μ L de EEDQ o del vehículo a una velocidad de 1.25 μ L/seg dentro de la bursa ovárica.
12. Antes de retirar la aguja del microinyector, se dejó reposar durante 20 segundos el tejido; se rehidrató el ovario con espray de CLH 2% y se devolvió a la cavidad corporal el ovario y los tejidos exteriorizados (Fotografía 11).
13. Se realizó la sutura de la incisión sobre el músculo abdominal con seda quirúrgica #00 y un punto en cruz; se limpió la herida con gasa saturada con CLH 2% (Fotografía 12)
14. Se sutura la incisión de la piel con seda quirúrgica #0 con 2 puntos sencillos y se limpió la herida con gasa saturada con CLH 2% (Fotografía 13).
15. Finalmente, se colocan una gota de azul piritánico como cicatrizante (Fotografía 14).
16. Este proceso se repite de la misma forma para la microinyección del EEDQ o del vehículo en el ovario derecho (Fotografía 15).
17. El registro del ciclo estral se reanudó a la mañana siguiente hasta el día de la eutanasia (estro esperado) (Ver imágenes en los recuadros siguientes).



Equipo y materiales utilizados para la realización de la técnica de microinyección de fármacos activos dentro de las bursas ováricas.



Procedimiento de sujeción e inmovilización de los animales de experimentación con el fin de realizar la sedación de los mismos con vapores de éter etílico.



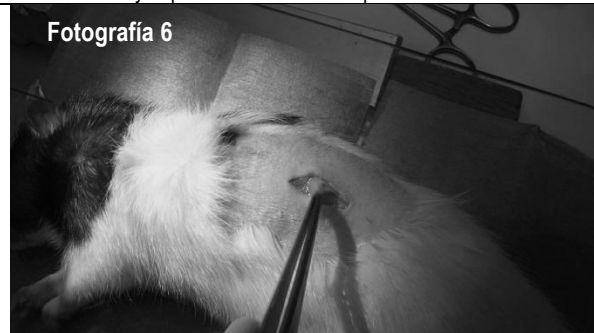
Una vez sedado el animal se procede a rasurar la región latero-dorsal en ambos lados del cuerpo.



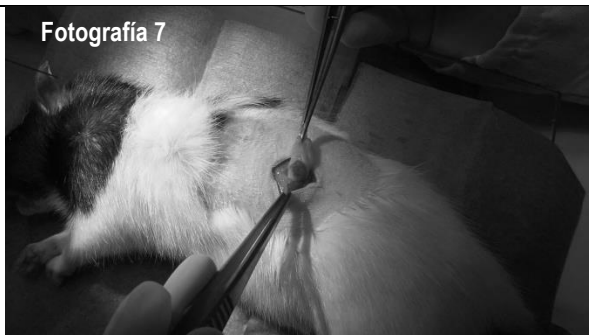
Ubicación de la zona donde se localiza el ovario. Se palpa la última costilla y el punto de flexión de la pierna.



Se realiza una incisión en la piel de aproximadamente 0.5 cm.



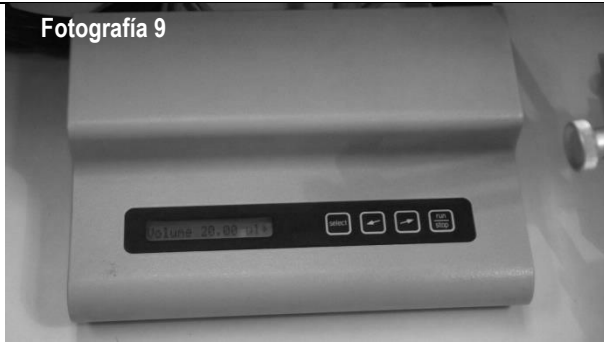
Se retira la grasa subcutánea con el fin de exponer el músculo abdominal dorsal.



Se realiza un corte sobre el músculo abdominal dorsal y se visualiza la grasa blanca corporal, signo de la localización precisa del útero y ovarios, unidos al ligamento suspensor.



Se exterioriza el ovario izquierdo acompañado de la grasa blanca que lo rodea; se hidrata y se limpia la zona con clorhexidina 2%. Se ubica la zona de la bursa ovárica.



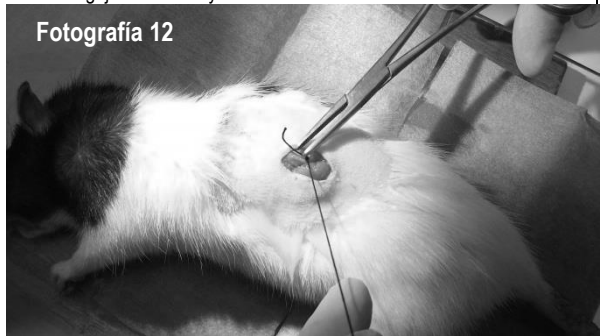
Fotografía 9
Se prepara la bomba de perfusión nanomolar calibrada de acuerdo al volumen y jeringa Hamilton que se utiliza.



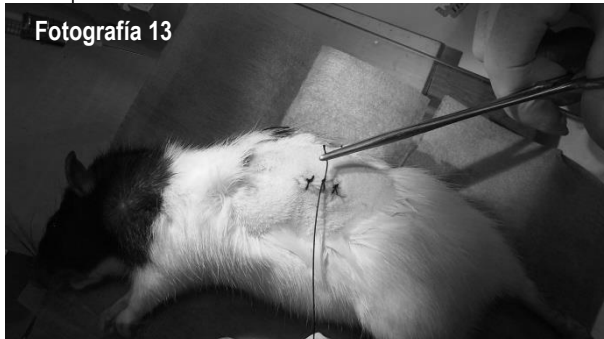
Fotografía 10
Se realiza la microinyección de la solución de EEDQ hasta infiltrar 20 μ L de solución en cada bursa ovárica. Cuando la bomba termina su ciclo, se mantiene sujeto el ovario con la jeringa durante 30 segundos antes de retirar la aguja del microinyector.



Fotografía 11
Se reingresa el ovario (siempre unido al ligamento y su grasa blanca) a la cavidad peritoneal.



Fotografía 12
Se realiza una sutura en cruz reuniendo los pliegues de la incisión con seda quirúrgica, limpiando con solución de clorhexidina 2%.



Fotografía 13
Se realizan los puntos de sutura necesarios sobre la piel del primer corte. Los puntos de sutura se realizan de modo individual (no continuo).



Fotografía 14
Se vuelve a limpiar la zona con solución de clorhexidina 2% y finalmente se agrega una gota de azul tripano como cicatrizante.



Fotografía 15
El procedimiento de la cirugía laparoscópica y la microinyección se repite para el ovario derecho.



Fotografía 16
En esta fotografía se muestra el resultado final de la técnica quirúrgica utilizada en los experimentos realizados.

Procedimiento de Autopsia (Eutanasia).

Entre las 9:00 – 10:00 h de la mañana del estro esperado y previa sedación en cámara de vapores de cloroformo, todos los animales fueron sacrificados por decapitación.

A la autopsia, se disecaron los oviductos, los ovarios y el útero. En cada oviducto se buscaron los signos de ovulación con ayuda de un estereomicroscopio y todos los casos donde se observaron signos de ovulación, se contó el número de ovocitos liberados (NOL).

La tasa de animales ovulantes (TAO) se analizó empleando la siguiente fórmula:

$$TAO = \frac{\text{No. de ratas que presentan el signo}}{\text{No. de ratas en el grupo}} \times 100$$

Los ovarios y el útero fueron pesados en balanza de precisión de 0.1 mg y los datos se expresaron en miligramos/100 gramos peso corporal. En todos los casos se registró la tasa de útero distendido (TUD) como índice de la alteración de la secreción de estrógenos se analizó utilizando la siguiente formula:

$$TUD = \frac{\text{No. de ratas que presentan el signo}}{\text{No. de ratas en el grupo}} \times 100$$

El aspecto de frotis vaginal de los animales fue utilizado como índice de la eventual modificación de la secreción de gonadotropinas y esteroides ováricos (Sánchez y Domínguez 1995). La tasa de estro vaginal (TEV) se analizó de la siguiente forma:

$$TEV = \frac{\text{No. de ratas que presentaron frotis vaginal característico de estro}}{\text{No. de ratas en el grupo}} \times 100$$

Reemplazo Hormonal.

En aquellos grupos experimentales en los que se observaron cambios significativos en la TAO, se aplicaron los siguientes tratamientos hormonales:

- *RH de la Señal Hipotalámica.* Grupos con microinyección bilateral del EEDQ se les administró una dosis única de GnRH sintética (3.7 µg/Kg de peso; i.m.) a las 14:00 hrs del proestro esperado y los animales fueron sacrificados a la mañana siguiente entre las 09:00 y 10:00h.
- *RH de la Señal Ovárica.* Grupos con microinyección bilateral del EEDQ se les administró una dosis única de BE (10 µg/animal; i.m.) a las 14:00 hrs del diestro-2 esperado y los animales fueron sacrificados en la mañana del estro esperado entre las 09:00 y 10:00h.

En todos los casos, el procedimiento de autopsia se realizó de la forma indicada líneas arriba y se buscó la presencia del NOL en los oviductos y se estimó la TAO.

Análisis Estadístico.

Todos los datos de las tasas de animales ovulantes, de estro vaginal y de útero distendido se analizaron usando la Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher. Los resultados del conteo del número de ovocitos liberados fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; en aquellos en que se compararon pares de medias, se utilizó la U de Mann-Whitney. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias que fueron iguales o menores a 0.05.

Resultados

Efectos de la microinyección del vehículo en diferentes días y horas del ciclo estral sobre la TEV, la TUD y la TAO.

Los efectos de la microinyección del vehículo a las 08:00, 13:00 y 20:00 h en uno de los diferentes días del ciclo estral no modificó la TEV en la mañana del estro esperado entre los distintos grupos (Vehículo: 31/40 vs. Control: 28/30, ns) ni respecto a los animales control (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos de la microinyección de 20 µL de solución de etanol + solución salina (1:1) (vehículo) en la bursa ovárica derecha e izquierda de ratas adultas cíclicas sobre la **tasa de estro vaginal** en la mañana del estro esperado. La microinyección del vehículo se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral y todos los animales mostraron al menos tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración (estro: E, diestro-1: D-1, diestro-2: D-2 y proestro: P) antes de la microinyección. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

Tasa de Estro Vaginal												
Grupos Experimentales	8:00h				13:00h				20:00h			
	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P
Control	2/2	3/4	2/2	2/2	2/2	4/4	2/2	2/2	2/2	3/4	2/2	2/2
Vehículo	2/2	1/4	2/2	2/2	4/5	4/4	6/6	4/4	2/3	1/4	1/2	2/2

En cuanto a la presencia de los signos de distensión del útero, cómo índice de alteración de la secreción de estrógenos, no se encontraron diferencias en la TUD entre los grupos que recibieron la microinyección del vehículo y los controles con laparotomía bilateral en ninguno de los días del ciclo estral (Control: 4/30 vs. Vehículo 7/40, ns) (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la microinyección de 20µLde EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol + solución salina (1:1) (vehículo) de dentro de la bursa ovárica derecha e izquierda de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) sobre la **tasa de útero distendido**. La microinyección del EDDQ se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

Tasa de Útero Distendido												
Grupos Experimentales	8:00h				13:00h				20:00h			
	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P
Control	0/2	1/4	0/2	0/2	0/2	2/4	0/2	0/2	0/2	1/4	0/2	0/2
Vehículo	0/2	0/4	0/2	0/2	1/5	0/4	2/6	0/4	1/3	2/4	1/2	0/2

Los resultados anteriores se correlacionaron directamente con la TAO, ya que tampoco se observaron cambios significativos en la respuesta ovulatoria de los animales tratados con el vehículo respecto a los animales del grupo control (Tabla 3).

Tabla 3. Efectos de la microinyección de 20 µL de solución de etanol + solución salina (1:1) (vehículo) en la bursa ovárica derecha e izquierda de ratas adultas cíclicas sobre la **tasa de animales ovulantes** en la mañana del estro esperado. La microinyección del vehículo se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral y todos los animales mostraron al menos tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración (estro: E, diestro-1: D-1, diestro-2: D-2 y proestro: P) antes de la microinyección. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

Tasa de Animales Ovulantes												
Grupos Experimentales	8:00h				13:00h				20:00h			
	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P
Control	2/2	3/4	2/2	2/2	2/2	3/4	2/2	2/2	2/2	3/4	2/2	2/2
Vehículo	2/2	2/4	2/2	2/2	4/5	4/4	4/6	4/4	2/3	1/4	1/2	2/2

Los efectos de la microinyección del vehículo a las 08:00, 13:00 y 20:00 h en uno de los diferentes días del ciclo estral no modificó la TAO en la mañana del estro esperado (Vehículo: 30/40vs. Control: 27/30, ns) en ninguno de los grupos ni respecto a los animales del grupo control.

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió reunir los datos de la TEV, TUD y de la TAO en un solo grupo testigo para los análisis posteriores.

Efectos de la microinyección de EEDQ en diferentes días y horas del ciclo estral sobre la TEV, la TUD y la TAO.

Los efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos inducido por la microinyección del EEDQ sobre la TEV mostraron diferencias que dependieron de la hora y de la fase del ciclo estral en que se realizó el bloqueo farmacológico de los receptores a la dopamina. De manera general, se observó que la TEV en los animales tratados con EEDQ es menor respecto a los grupo testigo (Testigo 57/70 vs. EEDQ 32/51; $p < 0.04$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher); esta diferencia es notoriamente clara cuando la inyección de EEDQ se realiza en los días del estro y del diestro 1 (EEDQ: 11/29 vs. Testigo: 30/40; $p < 0.001$), lo que no ocurrió cuando se bloquearon los receptores dopaminérgicos en el diestro 2 o

proestro (EEDQ: 21/26 vs. Testigo: 27/30, ns). Por otra parte, existe una notable ausencia del signo del estro vaginal en los animales tratados con el EEDQ a las 13:00h durante la primera mitad del ciclo estral (EEDQ: 1/9 vs. Testigo: 14/15, $p < 0.0001$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher). Sin embargo, solo en el grupo tratado a las 13:00 del día del diestro 1 mostró ausencia significativa del estro vaginal respecto a su grupo testigo (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de la microinyección de 20 μ L de solución de EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol + solución salina (1:1) dentro de la bursa ovárica derecha e izquierda de ratas adultas cíclicas sobre la **tasa de estro vaginal** en la mañana del estro esperado. La microinyección (EEDQ) se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral y todos los animales mostraron al menos tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración (estro: E, diestro-1: D-1, diestro-2: D-2 y proestro: P) antes de la microinyección. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

Tasa de Estro Vaginal												
Grupos Experimentales	8:00h				13:00h				20:00h			
	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P
Testigo	4/4	4/8	4/4	4/4	6/7	8/8	8/8	5/6	4/5	4/8	2/4	4/4
EEDQ	5/8	0/4	2/4	4/4	1/5	0/4*	5/6	4/4	2/4	3/4	2/4	4/4
* $p < 0.05$ comparado con el grupo Testigo (Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher)												

No se encontraron diferencias significativas en la TUD en los animales tratados con EEDQ en los diferentes días del ciclo estral ni en los distintos horarios, sin embargo, de manera global se observó mayor frecuencia en este signo en los animales tratados con el antagonista comparado con el grupo testigo (EEDQ: 19/55 vs. Testigo: 8/70; $p < 0.003$, Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher). El análisis de la TUD respecto a la hora de la microinyección mostró un incremento en los animales tratados con el antagonista a las 08:00h (EEDQ 08:00: 7/20 vs Testigo: 0/20, $p < 0.01$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher), lo que no ocurrió en los grupos tratados a las 13:00 h (EEDQ 13:00: 5/19 vs Testigo: 4/29, ns) o a las 20:00 h (EEDQ 20:00: 6/16 vs Testigo: 4/21, ns) (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de la microinyección de 20µL de EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol + solución salina (1:1) dentro de la bursa ovárica derecha e izquierda de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) sobre la **tasa de útero distendido**. La microinyección del EEDQ se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

Tasa de Útero Distendido												
Grupos Experimentales	8:00h				13:00h				20:00h			
	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P
Testigo	0/4	0/8	0/4	0/4	1/7	1/8	2/8	0/6	1/5	2/8	1/4	0/4
EEDQ	3/8	1/4	3/4	0/4	1/5	1/4	3/6	0/4	1/4	3/4	2/4	0/4

Al analizar los datos de manera global, la microinyección de EEDQ dentro de las bursas ováricas disminuyó la TAO (EEDQ: 29/55 vs. Testigo: 57/70, $p < 0.001$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher). Sin embargo, la respuesta ovulatoria dependió de la hora, de la fase del ciclo ovárico y del día del ciclo estral en que se realizó la microinyección (Tabla 6) (Figura 1)

Con base en la hora en que se realizó la microinyección del antagonista, la administración de EEDQ realizada a las 13:00h disminuyó la TAO comparado con su grupo testigo (EEDQ: 7/19 vs Testigo: 25/29, $p < 0.005$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher), lo que no se observó cuando la microinyección del antagonista se realizó en otro horario (08:00h: EEDQ = 11/20 vs. Testigo = 17/20, ns; 20:00h: EEDQ = 11/16 vs. Testigo = 15/21, ns) (Figura 7).

Tabla 6. Efecto de la microinyección de 20µL de EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol + solución salina (1:1) dentro de la bursa ovárica derecha e izquierda de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) sobre la **tasa de animales ovulantes**. La microinyección del EEDQ se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

Tasa de Animales Ovulantes												
Grupos Experimentales	8:00h				13:00h				20:00h			
	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P	E	D1	D2	P
Testigo	4/4	5/8	4/4	4/4	6/7	7/8	6/8	6/6	4/5	4/8	3/4	4/4
EEDQ	5/8	0/4	2/4	4/4	0/5*	0/4*	3/6	4/4	2/4	3/4	2/4	4/4

* $p < 0.02$ comparado con su grupo Testigo; prueba de Probabilidad Exacta de Fisher

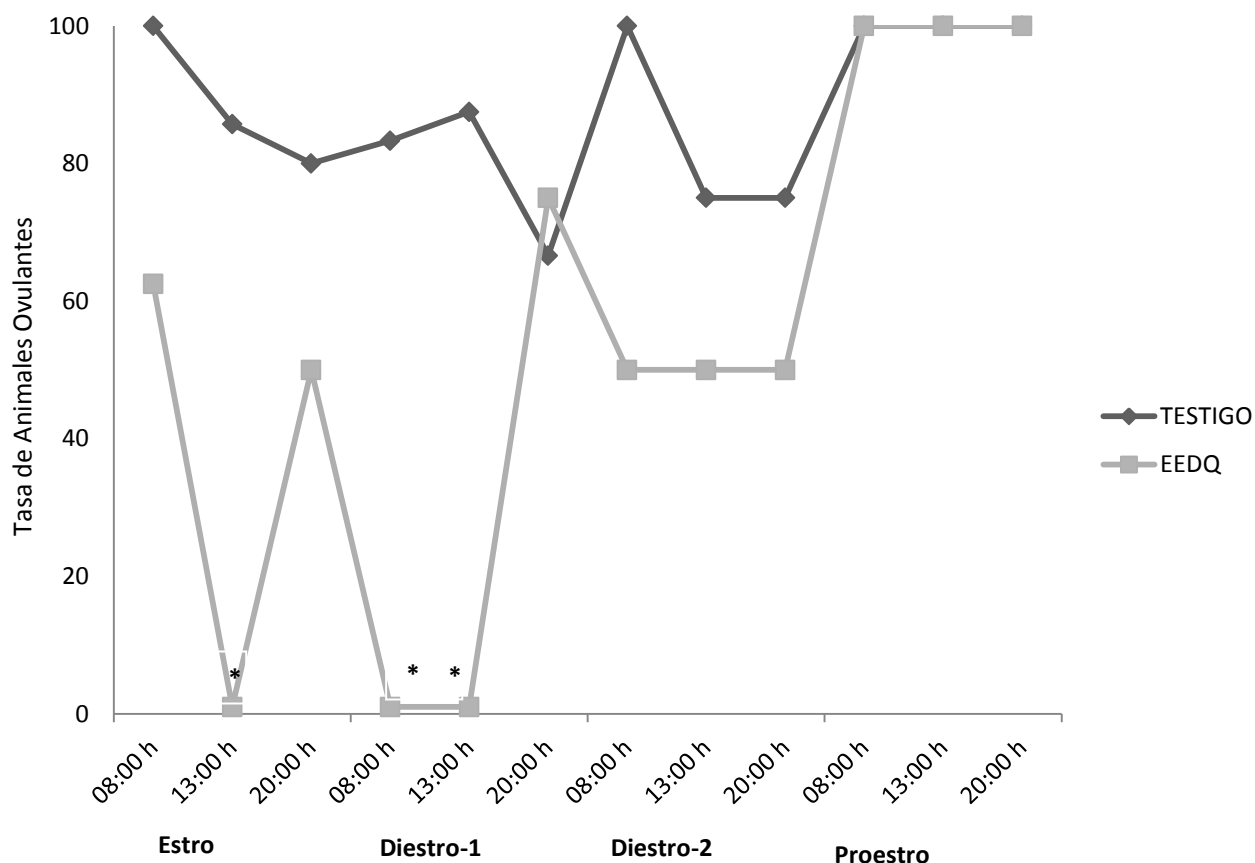


Figura 7. Efecto de la microinyección de 20 μ L de EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol + solución salina (1:1) dentro de la bursa ovárica derecha e izquierda de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) sobre la **tasa de animales ovulantes**. La microinyección del EEDQ se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado (* $p < 0.05$ respecto al grupo testigo).

En lo referente a la fase del ciclo, la microinyección de la solución de EEDQ a las 13:00h realizada durante la primera mitad del ciclo estral, es decir en los días del estro y diestro-1, bloqueó de manera absoluta la ovulación espontánea, (EEDQ: 0/9 vs. Testigo: 13/15, $p < 0.0001$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher); esta diferencia es incluso significativa cuando se compara con las microinyecciones del antagonista realizadas en la mañana o en la noche (13:00h: 0/9 vs. EEDQ a las 08:00: 5/12 y 20:00h: 5/8, $p < 0.05$ y 0.01, respectivamente; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher). El bloqueo absoluto de la ovulación espontánea observado en los grupos tratados con EEDQ a las 13:00 de la primera mitad del ciclo estral es diferente comparado con las microinyecciones realizadas durante la segunda mitad del ciclo estral, es decir en los días del diestro-2 y

proestro, (EEDQ a las 13:00h del estro y del diestro-1: 0/9 vs. EEDQ a las 13:00h del diestro-2 y del proestro: 7/10, $p < 0.01$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

Efectos de la Microinyección de EEDQ en Diferentes Días y Horas del Ciclo Estral Sobre el Número de Ovocitos Liberados.

Los datos recabados en diferentes épocas trabajando con la Cepa CII-ZV que se cría en el Bioterio *Claude Bernard* de la BUAP, nos muestran que el total del NOL en un animal intacto con ciclos regulares de cuatro días de duración descarga una cuota de 11.7 ± 0.3 ovocitos. Cuando se comparó este dato con el total del NOL en los grupos control con laparotomía bilateral y los grupos con microinyección del vehículo, en los diferentes días y horas del ciclo estral, no se observaron diferencias significativas en la cuota ovulatoria (Animales Cíclicos Intactos (N=26): 11.7 ± 0.3 ovocitos vs. Control con Laparotomía Bilateral (N=27): 13.2 ± 0.5 ovocitos o Vehículo (N=30): 11.5 ± 0.5 ; ns) (Tabla 7).

Tabla 7. Media \pm e.e.m. del **número de ovocitos liberados** en los animales que recibieron laparotomía bilateral y una microinyección bilateral con 20 μ L de etanol + solución salina (1:1; vehículo) de dentro de cada bursa ovárica de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro). La microinyección del vehículo se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

	Número de Ovocitos Liberados		
	08:00 h	13:00 h	20:00 h
Control Absoluto (N=26)	11.7 ± 0.3		
Grupos Experimentales	08:00 h	13:00 h	20:00 h
Control en Estro	14.5 ± 1.5	13.5 ± 0.5	9.0 ± 4.0
Vehículo en Estro	13.0 ± 1.0	11.3 ± 2.3	9.5 ± 1.5
Control en Diestro-1	11.3 ± 0.7	12.7 ± 1.5	15.3 ± 1.2
Vehículo en Diestro-1	10.0 ± 5.0	13.8 ± 1.8	9
Control en Diestro-2	13.0 ± 1.0	13.0 ± 2.0	9.0 ± 3.0
Vehículo en Diestro-2	11.0 ± 1.0	15.3 ± 1.3	13
Control en Proestro	13.5 ± 0.5	15.5 ± 1.5	15.0 ± 1.0
Vehículo en Proestro	8.0 ± 1.0	11.8 ± 2.3	9.0 ± 1.0

Tomado en cuenta este resultado, se decidió reunir los datos del NOL por ambos ovarios en un solo grupo testigo.

El análisis global de los efectos de la microinyección bilateral del EEDQ en las bursas ováricas mostro una reducción significativa del NOL global respecto al testigo (EEDQ (n=29): 8.8 ± 0.6 ovocitos vs Testigo (57): 11.7 ± 0.5 ; $p < 0.0004$, Prueba de U de Mann-Whitney).

Al analizar este parámetro respecto a la fase del ciclo ovárico, la disminución en el NOL en los grupos tratados con EEDQ sigue siendo significativa (EEDQ 1ª Mitad del Ciclo: 8.2 ± 0.9 , EEDQ 2ª Mitad del Ciclo: 9.2 ± 0.8 vs Testigo: 11.7 ± 0.5 ; $p < 0.05$, Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn).

Así mismo, se observaron diferencias en el NOL en función de la hora del día en que se realizó la microinyección del EEDQ; el NOL de los animales tratados a las 08:00 h fue significativamente menor respecto al testigo (EEDQ 08:00h: 7.1 ± 0.7 ovocitos vs Testigo: 11.7 ± 0.5 ovocitos; $p < 0.001$ Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn), sin cambios significativos a las 13:00 y 20:00 h (EEDQ 13:00h: 10.5 ± 1.3 ovocitos y EEDQ 20:00h: 9.2 ± 0.9 ovocitos vs Testigo: 11.7 ± 0.5 ovocitos, ns).

Sin embargo, al analizar el NOL en función del día del ciclo estral y de la hora entre los grupos testigo y con microinyección del EEDQ dentro de las bursas ováricas, estas diferencias no se revelaron en el análisis integral de la ovulación (Tabla 8).

Tabla 8. Media \pm e.e.e.m. del **número de ovocitos liberados** por los ovarios de los animales que recibieron una microinyección bilateral de 20 μ L de EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol + solución salina (1:1) dentro de cada bursa ovárica de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro). La microinyección del EEDQ se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

Grupos Experimentales	Número de Ovocitos Liberados		
	8:00h	13:00h	20:00h
Testigo en Estro	13.7 \pm 0.8	12.3 \pm 1.2	9.2 \pm 1.7
EEDQ en Estro	7.5 \pm 1.0	0	11.5 \pm 1.5
Testigo en Diestro-1	10.8 \pm 1.6	12.4 \pm 0.6	13.7 \pm 1.7
EEDQ en Diestro-1	0	0	8.3 \pm 1.2
Testigo en Diestro-2	12 \pm 0.8	13.6 \pm 0.8	12.6 \pm 0.3
EEDQ en Diestro-2	8.0 \pm 2.0	10.6 \pm 2.4	8.5 \pm 3.5
Testigo en Proestro	10.7 \pm 1.7	12.1 \pm 1.3	14.0 \pm 0.5
EEDQ en Proestro	6.2 \pm 1.1	12.0 \pm 0.7	9.0 \pm 1.7

Tabla 9. Media \pm e.e.e.m. del **peso relativo de los ovarios** (mg/100g peso corporal) de los animales que recibieron una microinyección bilateral de 20 μ L de EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol + solución salina (1:1) dentro de cada bursa ovárica de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro). La microinyección del EEDQ se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

Grupos Experimentales	Peso de los Ovarios					
	8:00h		13:00h		20:00h	
	OI	OD	OI	OD	OI	OD
Testigo en Estro	12.6 \pm 1.1	11.9 \pm 1.1	11.5 \pm 1.2	11.3 \pm 1.1	11.7 \pm 0.6	11.5 \pm 0.6
EEDQ en Estro	13.6 \pm 0.4	14.1 \pm 1.1	14.6 \pm 0.8	12.9 \pm 0.6	13.5 \pm 1.4	14.2 \pm 1.9
Testigo en Diestro-1	13.1 \pm 1.2	12.4 \pm 0.5	12.8 \pm 1.1	11.3 \pm 0.8	10.3 \pm 0.3	10.6 \pm 0.7
EEDQ en Diestro-1	12.2 \pm 0.7	11.1 \pm 0.4	10.0 \pm 0.3	10.7 \pm 1.1	10.7 \pm 0.2	14.6 \pm 1.4
Testigo en Diestro-2	12.3 \pm 1.2	12.4 \pm 1.8	10.8 \pm 0.6	11.5 \pm 0.6	8.5 \pm 0.6	9.3 \pm 0.3
EEDQ en Diestro-2	12.5 \pm 1.2	14.5 \pm 2.9	10.5 \pm 0.5	12.1 \pm 0.2	11.6 \pm 0.4	10.8 \pm 0.8
Testigo en Proestro	12.0 \pm 1.4	11.1 \pm 0.9	13.6 \pm 0.2	12.9 \pm 0.7	11.4 \pm 0.8	10.9 \pm 1.1
EEDQ en Proestro	10.4 \pm 1.3	11.8 \pm 0.4	14.0 \pm 0.9	13.8 \pm 0.3	12.4 \pm 0.2	10.9 \pm 0.1

Efectos de la Microinyección de EEDQ en Diferentes Días y Horas del Ciclo Estral Sobre el Peso de los Ovarios y del Útero.

No se observaron cambios significativos en el peso de los ovarios, en la masa ovárica ni en el peso del útero de los animales que fueron tratados con la microinyección de la solución de EEDQ dentro de las bursas ováricas (Tablas 9 y 10).

Tabla 10. Media \pm e.e.e.m. de la **masa ovárica y peso del útero** de los animales que recibieron una microinyección bilateral de 20 μ L de EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol + solución salina (1:1) de dentro de cada bursa ovárica de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro). La microinyección del EEDQ se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro.

Grupos Experimentales	Masa Ovárica			Peso de Útero		
	8:00h	13:00h	20:00h	8:00h	13:00h	20:00h
Testigo en Estro	24.5 \pm 1.4	22.8 \pm 1.7	23.2 \pm 1.0	164.2 \pm 8.7	181.6 \pm 14.5	169.7 \pm 19.4
EEDQ en Estro	27.1 \pm 0.9	27.5 \pm 0.9	27.7 \pm 1.1	164.2 \pm 8.4	176.6 \pm 22.8	171.5 \pm 24.5
Testigo en Diestro-1	25.5 \pm 2.6	24.1 \pm 1.2	20.9 \pm 0.9	183.4 \pm 8.0	173.9 \pm 6.0	182.8 \pm 9.0
EEDQ en Diestro-1	23.3 \pm 1.8	20.7 \pm 0.6	25.3 \pm 0.6	166.7 \pm 10.3	153.5 \pm 15.6	190.9 \pm 2.8
Testigo en Diestro-2	24.7 \pm 2.1	22.3 \pm 0.6	17.8 \pm 1.6	155.6 \pm 12.9	161.4 \pm 6.9	195.4 \pm 3.9
EEDQ en Diestro-2	27.0 \pm 1.4	22.6 \pm 1.1	22.4 \pm 0.3	195.9 \pm 11.1	167.1 \pm 9.6	195.2 \pm 19.4
Testigo en Proestro	23.1 \pm 1.5	26.5 \pm 2.0	22.3 \pm 1.1	175.2 \pm 27.8	173.3 \pm 11.4	187 \pm 25.6
EEDQ en Proestro	22.2 \pm 1.2	27.8 \pm 1.0	23.3 \pm 2.1	153.5 \pm 11.6	162.8 \pm 9.0	196.5 \pm 15.9

Efectos del Reemplazo Hormonal en los grupos tratados con EEDQ.

En aquellos grupos donde se observó una TAO menor o igual al 50%, se realizó el reemplazo de la señal hipotalámica con GnRH sintética o el reemplazo de la señal ovárica con BE.

En los diferentes grupos tratados con GnRH o BE se observó una recuperación significativa de la TAO (EEDQ: 14/39 vs. EEDQ+GnRH: 26/27 o EEDQ+BE: 24/25; $p < 0.0001$, Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher) (Figura 2).

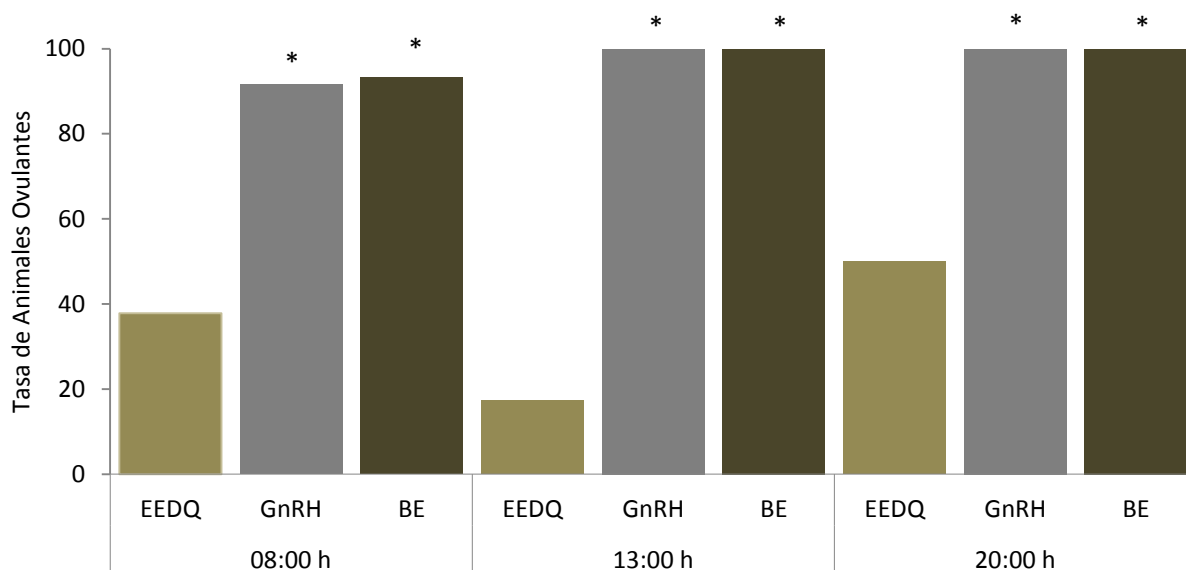


Figura 2. Efecto de la microinyección de 20 μ L de EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol + solución salina (1:1) dentro de la bursa ovárica derecha e izquierda de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) sobre la **tasa de animales ovulantes**. Comparado con la administración de GnRH o BE en los grupos donde la TAO con EEDQ fue menor o igual del 50% (* $p < 0,05$ comparado los grupo sin reemplazo hormonal, prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

Discusión de Resultados

Los resultados del presente trabajo muestran que la microinyección bilateral de la neurotoxina dopaminérgica: EEDQ dentro de las bursas ováricas en la rata adulta inhibe la ovulación con efectos que dependen de la hora y del día del ciclo en que se administró el fármaco. Incluso, se observan tendencias muy claras de que el neurotoxina afecta el número de ovocitos liberados por los ovarios de estos animales.

Resulta de particular interés el hecho de que el EEDQ inhiba la respuesta ovulatoria en los animales tratados de manera diferencial cuando se administra durante la primera mitad del ciclo estral y gradualmente desaparezcan a lo largo de la segunda mitad del ciclo estral.

Domínguez y colaboradores (1987) analizaron los efectos de la inyección sistémica con haloperidol, un antagonista de los receptores DA₁ y DA₂ utilizado en la neuropsiquiatría como ansiolítico, en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días y a las 08:00, 13:00 y 21:00h de los diferentes días del ciclo estral. El haloperidol indujo efectos diferentes sobre la respuesta ovulatoria de los animales, en función del día del ciclo estral e incluso de la hora en que se administró. El antagonista invariablemente retrasó la ovulación espontánea cuando se inyectó en los días del estro y diestro-1, manteniendo este efecto inhibitorio hasta las 08:00h del diestro-2, para después no influir significativamente sobre la ovulación de los animales. Estos resultados permitieron sugerir que la dopamina es una señal necesaria para que los mecanismos fisiológicos que conducen a la ovulación se realicen correctamente durante la primera mitad del ciclo estral aunque la influencia del neurotransmisor/neuromodulador tienda a desaparecer durante la segunda mitad del ciclo estral.

Se ha detectado la presencia de dopamina y los receptores DA₁ y DA₂ en diferentes compartimentos ováricos pero en esos estudios no se aclara su posible papel funcional en el tejido ovárico (Mayerhofer et al, 1997; Rey-Ares et al, 2007). Venegas y colaboradores (2015), han recientemente evaluado el papel de los receptores a la dopamina en el tejido ovárico. La microinyección de haloperidol o de antagonistas selectivos del receptor DA₁: SCH23390 o DA₂: Sulpirida dentro de las bursas ováricas, indujo efectos semejantes en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días cuando se antagonizan los receptores dopaminérgicos en los mismos horarios del trabajo previo (Domínguez et al, 1987). En ambos modelos se discute el posible efecto del haloperidol y de la Sulpirida sobre la facilitación de la secreción de prolactina al actuar al nivel del tallo hipofisario, ya que ambos antagonizan potentemente al receptor DA₂ e inhibiendo indirectamente la ovulación al interrumpir la secreción de gonadotropinas. En cambio, la

microinyección con SCH23390 afectó la ovulación únicamente en el día del diestro-1. Este último resultado es relevante ya que pone de manifiesto la plausible interacción entre los diferentes receptores a la dopamina aunque aún falta analizar dicha interacción.

Los resultados del presente trabajo son congruentes con esos datos, ya que el EEDQ como agente alquilante se une al receptor dopaminérgico y afecta su funcionamiento pero no lo “antagoniza” totalmente. Sin embargo, los días críticos para que la señal dopaminérgica se integre a los mecanismos fisiológicos que conducen a la ovulación son los mismos: estro y diestro-1, con efectos que gradualmente desaparecen durante el diestro-2 para ya no afectar la ovulación durante el proestro.

Se han reportado efectos del EEDQ sobre receptores serotoninérgicos (Gozlan et al., 1994) y adrenérgicos (Alder et al, 1985), por lo que es probable que otros receptores ováricos estén participando en las señales que regulan la ovulación, ya que la microinyección de antagonistas no selectivos y selectivos producen efectos diferenciales en la respuesta ovulatoria cuando se administran en diferentes días y en diferentes horas del ciclo estral (Venegas, 2015).

Por último, las fallas ovulatorias observadas en aquellos grupos experimentales tratados con el EEDQ se resolvieron satisfactoriamente con el reemplazo de las señales hipotalámica u ovárica, restableciendo satisfactoriamente la ovulación. Aparentemente, el bloqueo inespecífico de los receptores dopaminérgicos en el ovario afecta los mecanismos neuroendocrinos que determinan la secreción preovulatoria de la GnRH, misma que ocasionaría la ausencia de la secreción de gonadotropinas y con ello, la inhibición de la producción de los estrógenos, imprescindibles para que el efecto feedback estimulante en el hipotálamo anterior se lleve a cabo.

Conclusiones

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que:

- 1) La microinyección bilateral de la neurotoxina dopaminérgica: EEDQ dentro de las bursas ováricas en la rata adulta inhibe la ovulación con efectos que dependen de la hora y del día del ciclo en que se administró el fármaco.
- 2) La microinyección bilateral de la neurotoxina dopaminérgica: EEDQ dentro de las bursas ováricas en la rata adulta disminuyó el número de ovocitos liberados.
- 3) La microinyección bilateral de la neurotoxina dopaminérgica: EEDQ dentro de las bursas ováricas durante la primera mitad del ciclo estral afecta los mecanismos neuroendocrinos que determinan la descarga preovulatoria de la GnRH al nivel del hipotálamo anterior y en consecuencia, una baja producción de estrógenos, lo que conduce a la falla ovulatoria.

Referencias Bibliográficas

- _ AHMED, C.E., W.L. DEES & S.R. OJEDA. (1986). The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118: 1682-1689.
- _ AGUADO, L.I. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech* 59: 462-473.
- _ AGUADO, L.I., S.L. PETROVIC & S.R. OJEDA. (1982). Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 11: 1124-1132.
- _ ALDER, C. H., MELLER, E., AND GOLDSTEIN, M. (1985). Recovery of a 2-adrenoceptor binding and function after irreversible inactivation by EEDQ. *Eur. J. Pharmacol.* 116:175–178.
- _ AMNETA, F., A. RICCI, S.K. TAYEBATI & D ZACCHEO. (2002). The peripheral dopaminergic system: morphological analysis, functional and clinical applications. *Ital J Anat Embryol* 107:145-67.
- _ ANESETTI, G., P. LOMBIDE, H. D'ALBORA & S.R. OJEDA. (2001). Intrinsic neurons in the human ovarii. *Cell Tissue Res* 306: 231-237.
- _ BAHENA-TRUJILLO, R., FLORES, G., ARIAS, J.A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. Revisión. *Rev Biomed* 11:39-60.
- _ BAHR, J.M., L. KAO & A.V. NALBADOV. (1974). The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biol Reprod* 10: 273-282.
- _ BEN-JONATHAN, N., R.H. BRAW, N. LAUFER, R. REICH, J.N. BAHR & A. TSAFRIRI. (1982). Norepinephrine in graafian follicles is depleted by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 110:457-461.
- _ BJÖRKLUND A., LUNDVALL, O. & NOBIN, A. (1975). Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neuron system in the rat. *Brain Res* 89:2942
- _ BÓDIS J., BOGNÀR Z., HARTMANN G., TÖRÖK A., CSABA, I. (1992). Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecol Obstet Invest* 33:165-7.
- _ BÓDIS J., TINNEBERG, H.R., TÖRÖK, A., CLEDON, P., HANF V. & PAPENFUSS, F. (1993). Effect of noradrenaline and dopamine on progesterone and estradiol secretion of human granulosa cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 129:165-168.
- _ BURDEN, H.W. (1978). Ovarian Innervation. En: *The Vertebrate Ovary, Comparative Biology*. Ed. R.E Jones. Plenum Press. New York, pp. 615-338.
- _ BURDEN, H.W. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: *Catecholamines As Hormone Regulators*. Eds. N. Ben Jonathan, J.M. Bahr & R.I. Weiner. Serono Symposia Publications. Raven Press. New York, pp. 262-278.
- _ CARVEY, M. P. (1998). Drug action in the central nervous system. Ed. M.P. Carvey. Oxford. New York. pp 214-225.

- _ CAVERO, J. , MASSINGHAM, R. & LEFEVRE-BORG, F. (1982). Peripheral dopamine receptors, potential targets for a new class of antihypertensive agents. Part I: Subclassification and functional description. *Life Sci* 31:939-948.
- _ CONN, P.M. (1994). The molecular mechanism of gonadotrophin-releasing hormone action in the pituitary. En: *Physiology of Reproduction*. 2th Edition. Vol. 1. Chapter 32. Eds. E. Knobil & J. Neill. Raven Press. New York, pp 1815-1832.
- _ COTTON, J., TRAURIG, H. & PAPKA, R. (1983). Substance P and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in the female reproductive system. *Anatomical record*. 205:38-39.
- _ CURRY, T.E., LAWRENCE, I.E. & BURDEN, H.W. (1984a). Effect of ovarian sympathectomy on follicular development during compensatory ovarian hypertrophy in the guinea pig. *J Reprod Fert* 71: 39-44.
- _ CURRY, T.E., LAWRENCE, I.E. & BURDEN, H.W. (1984b). Ovarian sympathectomy in the guinea pig: effects on follicular development during the prepuberal period and following exogenous gonadotrophin stimulation. *Cell Tissue Res* 236: 593-596.
- _ DAVOREN, J.B. & HSUEH, A.J.W. (1985). Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biol.Reprod* 33: 37-52.
- _ D'ALBORA H., LOMBIDE, P. & OJEDA, S.R. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovarii: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 300: 47-56.

- _ D'ALBORA, H., ANESETTI, G., LOMBIDE, P., DEES, W.L. & OJEDA, S.R. (2002). Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech* 59:484-489.
- _ D'ALBORA, H. & BARCIA, JJ. (1996). Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *NeurosciLett* 205:65-67.
- _ DAWSON, T.M., GEHLERT, D.R. & WAMSLEY, J.K. (1986). Quantitative autoradiographic localization of central dopamine D1 and D2 receptors. *Adv Exp Med Biol* 204:93-118.
- _ DES, W.L., KOZLOWSKI, G.P., DEY, R. & OJEDA, S.R. (1985). Evidence for the existence of substance P in the pre-puberal rat ovary. II. Immunocytochemical localization. *Biol Reprod* 33:471-476.
- _ DISSEN, A.G. & OJEDA, S.R. (1999). Ovarian innervation. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. E.Knobil & J. D. Neill. Academia Press. New York, pp.583-589.
- _ DOMÍNGUEZ, C.R., RIBONI, L., ZIPITRIA, D. & REVILLA, R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?. *Endocrinology* 95:175-180.
- _ DOMÍNGUEZ, C.R., ZIPITRIA, D., RIBONI, L. & REVILLA, R. (1985). Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation throughout the oestrous cycle of the rat. *J Interdis Cycle Res* 16: 285-294.
- _ DOMÍNGUEZ, C. R., GAITAN, C. M., MENDEZ, S. A. y 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. *J. of Endocr* 113: 37-44.

- DOMINGUEZ, R., CRUZ, M.E. & CHAVEZ, R. (1989). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: "Growth Factors and the Ovary". Edt. A.N. Hirshfield. Plenum Press. New York. pp.321-325
- ERICKSON, G.F., MAGOFFIN, D.A., DYER, C.A & HOFEDITZ, C. (1985). The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 6: 371-399.
- ERICKSON, G.F. (1995). The Ovary: Basic Principles and Concepts. En: *Endocrinology & Metabolism*. Capitulo 17. Eds. P. Felig, J.D Boxter & L.A Frohman. 3th Edition. McGraw-Hill. New York. pp 973-1013.
- FAWCETT, W.D. (1995). *Tratado de histología*. Mc Graw-Hill. Interamericana. Madrid, España. pp. 858-893.
- FEDER, H.H. (1981). Estrous cyclicity in mammals. En: "Neuroendocrinology of Reproduction: Physiology and Behavior". Sección III. Capítulo 10. Eds. N.T. Adler. Plenum Press. New York & London. pp 279-308.
- FINK, G. (1988). Gonadotropic secretion and its control. En: "Physiology of Reproduction". 1th Edition. Vol.I. Capítulo 32. Eds. E. Knobil & J. Neill. Raven Press, New York, pp 1349-1377.
- FREEMAN, M.E. (1988). The ovarian cycle of the rat. En: "Physiology of Reproduction". 1th Edition. Vol. II. Capítulo 45. Eds. E. Knobil & J. Neill. Raven Press, New York, pp. 1893-1928.
- FREEMAN, M.E. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: "Physiology of Reproduction". Vol. II. Capítulo 46. Eds. E. Knobil & J.D. Neill. Raven Press. New York. pp. 613-658.
- GERENDAI, I. & HALÁSZ, B. (1997). Neuroendocrine Asymmetry. *Front in neuroendocrinology*. 18:354-381.
- GOLDBERG, L.I. (1978). The dopamine vascular receptor. En: "The Neurobiology of Dopamine". Eds. A.S. Horn, J. Korf & B.H.C. Westerink. Academic Press. New York. pp. 541-551.
- GOZLAN, H. LAPONTE, A.M., THIBAUT, S., SCHECHTER, L.E., BOLAÑOS, F. & HAMON, M. (1994). Differential effects of N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) on various 5-HT receptor binding sites in the rat brain. *Neuropharmacology* 33:423-431
- HESS, E., NORMAN, A. & CREESE, I. (1988). Chronic Treatment with Dopamine Receptor Antagonists: Behavioral and Pharmacologic Effects on D1 and D2 Dopamine Receptor. *The J. of Neuroscience*. 8(7):2362.
- KEBABIAN, J.W. & CALNE D.B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96
- KING, S.S., CAMPBELL, A.G., DILLE, E.A., ROSER, J.F., MURPHY, L.L., JONES, K.L. (2005). Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Dom. Anim. Endocr.* 28,405-415.
- KLEIN, C.M. & BURDEN, H.W. (1988a). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating rat ovary. *Neuroscience letters*. 85:217-222.
- KORDON, C., DROUVA, S.V., MARTÍNEZ DE LA ESCALERA G. & WEINER, R.I. (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine

- regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *The Physiology of Reproduction*. 2th. Edition. Vol. I. Capítulo 27. Eds. E. Knobil & J. Neill. Raven Press. New York, pp.1621-1681.
- LARA, H.E., McDONALD, J.K. C.E. AHMED & S.R. OJEDA (1990). Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and functioning rats. *Endocrinology* 127:2199-2209.
 - LARA, H.E., A. PORCILE, J. ESPINOZA, C. ROMERO, S.M. LUZA, J. FUHRER, C. MIRANDA & BL. ROBLERO (2001). Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine* 15: 187-192.
 - LAWRENCE, I.E. & BURDEN, H.W. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the ovary. *Anat Rec* 196:51-59.
 - LEVANT, B., VANSELL, N. (1997). In Vivo Occupancy of D2 Dopamine Receptors by Nafadotride. *Neuropsychopharmacology*. 17(2):68.
 - LEVESQUE, D. & Di PAOLO, T. (1988). Dopamine receptor reappearance after irreversible receptor blockade: effect of chronic estradiol treatment of ovariectomized rats. *Adv Exp Med Biol* 235:121-136.
 - LITTER, M. (1988). *Farmacología Especial*. En: *Farmacología Experimental y Clínica*. 7ª Edición. 2ª Parte. Sección I: *Farmacología del Sistema Nervioso*. El Ateneo, Buenos Aires. pp 179-429.
 - MARTEL, R. R., BERMAN, R. & BELLEAU, B. (1969). Pharmacology of EEDQ (N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1-2-dilhydroquinoline). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 47, 909-912.
 - MATSUDA, F., INOVE, N., MANABE, N. & OHKURA, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Reprod and Development*. 58:44-50.
 - MAYERHOFER, A., DISSEN, G.A., COSTA, M.E. & OJEDA, S.R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 178: 3320-3329.
 - MCMILLAN, H.J. & WYNNE-EDWARDS, K.E. (1998). Evolutionary change in the endocrinology of behavioral receptivity: Divergent roles for progesterone and prolactin within the genus *phodopus*. *Biology of Reproduction*. 59:30-38.
 - McNEILL, D.L. & BURDEN, H.W. (1987). Neuropeptides in sensory perykarya projecting to the ovary. *Am J Anat* 179: 269-276.
 - MELENDEZ, E., MORAN, C. & MORAN, J.L. (2002). Efectos de la microinyección de EEDQ en el hipotálamo anterior sobre el ciclo estral de la rata. Resúmen. Congreso Ciencias Fisiológicas.
 - MORÁN, J.L. & DOMÍNGUEZ, A. (1995). Effects of the unilateral implant of haloperidol at the preoptic-anterior hypothalamic area, ovulation. *Endocrine* 3:399-401
 - MORÁN, J.L. & DOMÍNGUEZ, A. (1997). Differences in the sensitivity of the right and left side of the preoptic anterior hypothalamic area to the effect of a unilateral implantation of haloperidol, performed on the day of oestrous, on spontaneous ovulation. *Med Sci Res* 25: 465-466.

- _ 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.
- _ RAMÍREZ-ÁVILA, B. (2001). Efectos de la administración secuencial de GnRH sobre la ovulación en ratas adultas con bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico. Tesis Profesional. Biología, BUAP.
- _ RANDALL, D., BURGGRON, W., & FRENCH, K. (2002). Animal physiology. Mechanism and adaptations. Freeman 5th. Edition. pp.316.
- _ REY-ARES, V., LAZAROV, N., BERG, D., BERG, U., KUNZ, L. & MAYERHOFER, A. (2007). A dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 5:40-49.
- _ RICHARDS, J.S. & PANGAS, S.A. (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *J. Clinical Invest.* 4: 963.
- _ SANCHEZ-CRIADO, J.E. (1999). Fisiología del ovario. En: Fisiología Humana. capítulo 75. eds. J.A.F. Tres guerras. Interamericana/McGraw-Hill. Madrid. pp.1020-1031.
- _ SANCHEZ, M.A. & DOMINGUEZ, R. (1995). Differential effects of unilateral lesions in the medial amygdala on spontaneous and induced ovulation. *Brain Res Bull* 38:313-317.
- _ SMITH, M.S., FREEMAN, M.F. & NEILL, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with resorption of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226.
- _ SUTTON, M. L., GILCHRIST, R. B. & THOMPSON, J. G. (2003). Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, 9, 35-48
- _ TOHYAMA, M. & TAKATSUJI, K. (1998). The catecholaminergic system. En: "Atlas of Neuroactive Substances and their Receptors in the Rat". Ed. M. Tohyama & K. Takatsuji. Oxford University Press, pp 20-33.
- _ VARGAS-TORRES, L.A. (2002). Efectos del bloqueo farmacológico de la información dopaminérgica sobre el ciclo estral de la rata: análisis de los mecanismos que inhiben la función de los ovarios. Tesis Profesional. Biología, BUAP.
- _ VENEGAS, B., PADILLA, J.F., JUAREZ C.E., MORAN, J.L., MORAN, C., ROSAS MURRIETA, N.H., HANDAL, A. DOMINGUEZ, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptor on ovulation. *Endocrine*. DOI 10.1007/s12020-015-0636-4
- _ YEN, S. & JAFFE, R. B. (1999). Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. 6th. edition. Capítulo 1. Editorial Strauss & Barbieri. Philadelphia. pp 9-40.
- _ WEINER, N. & MOLINOFF, P. B. (1994). Catecholamines. En: Basic Neurochemistry. Capítulo 12. Eds. G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers & P. B. Molinoff. Raven Press, New York. pp. 211-281.
- _ WEISSMAN, A. & MUREN, J.F. (1971). Depressant 1, 2 -dihydroquinolines and related derivatives. *J. Med. Chem.* January; 14(1):49-53.