



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ANTAGONISMO DEL RECEPTOR DA-1 INDUCIDO POR
SCH-23390 EN EL TEJIDO OVÁRICO DE LA RATA ADULTA
HEMICASTRADA: ANÁLISIS DE LA OVULACIÓN
COMPENSADORA**

Tesis para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
NATALY GUZMÁN HERRERA

DIRECTOR DE TESIS
Dr. en Cs. **JOSÉ LUIS MORÁN PERALES**



Enero, 2018

Dedicatorias

A mis padres

Francisco y Margarita, son los dos grandes pilares de mi vida, no tendría como agradecerles todo el apoyo que me dan. Desde pequeña me han enseñado el valor del estudio, por lo tanto, este logro es de ambos. Gracias por creer en mí, por apoyarme en cada una de mis decisiones y por estar ahí en los buenos y malos momentos. Gracias por ser ustedes; los veo y los admiro, los veo y no tengo ninguna duda de que los amo.

A mis hermanos

Ustedes dos han sido y serán mi compañía indispensable, sé que existe una conexión muy fuerte entre nosotros que siempre nos acercará sin importar donde estemos. Gracias por acompañarme a lo largo de mi vida, han sido mi mejor ejemplo en muchas situaciones y es por ustedes que sé que el cariño y el apoyo incondicional existen.

A mis amigas

Ariadne, Ana, Rosalba y Jazmín, este pequeño grupo que hemos creado significa para mí más de lo que creen. Gracias por las risas, las pláticas, las horas de estudio, por compartir su vida universitaria conmigo, hicieron más ligero mi camino; realmente sé que nuestra amistad perdurará.

Agradecimientos

A mi director de tesis, Dr. José Luis Morán Perales, gracias por el apoyo en todos los aspectos para la realización y culminación de esta tesis.

A los revisores y sinodales asignados, gracias por sus consejos y señalamientos, han contribuido a la mejora de esta tesis.

A todos los integrantes del Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del ICUAP, gracias porque de manera directa o indirecta han sido partícipes del camino que he recorrido para poder culminar esta investigación. Gracias por su apoyo intelectual o emocional.

Al personal del Bioterio Claude Bernand de la BUAP, quienes siempre con buena cara me brindaron su apoyo en el cuidado y mantenimiento de los animales utilizados en este estudio.

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y
Tecnología del Estado de Puebla

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Marco Teórico.....	3
I. Eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario.....	3
II. Ovario.....	4
Anatomía.....	4
Desarrollo Folicular.....	5
Ovulación.....	7
Luteinización.....	8
III. Ciclo estral.....	8
IV. Asimetría ovárica.....	11
V. Inervación ovárica.....	13
VI. Sistema dopaminérgico.....	15
VII. Hemiovariectomía.....	18
VIII. Ovulación compensadora.....	19
Antecedentes.....	20
Planteamiento del problema.....	21
Justificación.....	22
Hipótesis.....	22
Objetivo general y particulares.....	22
Materiales y métodos.....	23
Resultados.....	26
Discusión de Resultados.....	34
Conclusiones.....	38
Perspectivas a futuro.....	38
Bibliografía.....	39

RESUMEN

La hemiovariectomía es una técnica que permite analizar asimetrías funcionales y fisiológicas entre los ovarios. Se sabe que la administración local de una dosis de SCH-23390, antagonista dopaminérgico de los receptores DA-1, bloquea la ovulación espontánea cuando se inyecta dentro de las bolsas ováricas derecha e izquierda en ratas adultas con ciclos estrales de cuatro días de duración (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro: ratas cíclicas) con efectos que dependen del día y hora en que los que fueron tratados. Con el fin de aclarar los efectos del bloqueo farmacológico del receptor DA-1 en el ovario, se analizó en el modelo del animal hemiovariectomizado el efecto de la microinyección con SCH-23390 dentro de la bolsa del ovario que permanece *in situ*, sobre el desarrollo de la ovulación compensadora (OC) e hipertrofia compensadora del ovario (HCO) derecho (OD) o izquierdo (OI).

Ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV de ciclo estral regular de cuatro días (cíclicas), fueron hemiovariectomizadas (HX) a las 09:00 h de la mañana del estro. En todos los animales HX se continuó registrando el patrón de ciclicidad vaginal y 64 ratas cíclicas recibieron una microinyección con 20 μ L de solución de SCH-23390 (200 μ g/ μ L; 10 μ L/min) dentro de la bolsa del ovario remanente a las 13:00 h en uno de los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron en la mañana del siguiente estro vaginal observado. Como grupos testigo se utilizaron animales HX a los que se les administró el vehículo (NaCl 0.9%) a las 13:00 h en los diferentes días del ciclo estral. El grupo control consistió en 20 ratas cíclicas HX del OI (N=10) o del OD (N=10), las cuales se sacrificaron en la mañana del estro luego de cuatro ciclos estrales completos.

El número de ovocitos liberados por OD extirpado de todos los grupos experimentales reunidos fue mayor respecto al OI (OD: 6.3 ± 0.1 ovocitos vs OI: 4.9 ± 0.1 ovocitos, $p < 0.0001$; U de Mann-Whitney) pero no se registró diferencia en el peso relativo de los ovarios extirpados (OD: 16.1 ± 0.4 vs OI: 16.9 ± 0.5 , ns). La microinyección del vehículo no afectó la duración del ciclo estral en ninguno de los grupos mientras que en el grupo tratado con SCH-23390 en el diestro-1, la presencia del estro vaginal se retrasó un día. En los grupos de animales HX que recibieron la microinyección con SCH-23390 el ovario que permanece *in situ* ovuló menos respecto al de los grupos testigo (SCH-23390 (N=32): 10.6 ± 0.5 ovocitos vs NaCl 0.9% (N=32): 13.3 ± 0.4 ovocitos; $p < 0.0001$, U de Mann-Whitney).

De manera global, sin tomar en cuenta el día en el que se realizó la microinyección del antagonista, la OC del OD disminuyó respecto a su grupo testigo (SCH-23390 (N=16): $108.8 \pm 12.9\%$ vs NaCl 0.9% (N=16): $194.4 \pm 14.9\%$, $p < 0.001$, U de Mann-Whitney) lo que no ocurrió en el OI (SCH-23390 (N=16): $72.9 \pm 13.6\%$ vs NaCl 0.9% (N=16): $105.9 \pm 10.1\%$, ns). Sin embargo, se observaron diferencias significativas que dependieron del día del ciclo en que se bloqueó el receptor DA-1: la OC en los grupos tratados en el diestro-1, disminuyó para el OI (OI *in situ* + SCH-23390 (N=4): $20.3 \pm 23.9\%$ vs. OI *in situ* + Vehículo: $101.8 \pm 22.2\%$, $p < 0.05$, U de Mann-Whitney) lo que no ocurrió para el OD (OD *in situ* + SCH-23390 (N=4): $65.5 \pm 28.5\%$ vs. OD *in situ* + Vehículo: $171.2 \pm 49.0\%$, ns); en cambio, en los grupos tratados en el diestro-2 ocurre lo inverso (OD *in situ* + SCH-23390 (N=4): $107.0 \pm 9.6\%$ vs. OD *in situ* + Vehículo: $218.7 \pm 14.4\%$, $p < 0.05$, U de Mann-Whitney) (OI *in situ* + SCH-23390 (N=4): $75.7 \pm 34.4\%$ vs. OI *in situ* + Vehículo: $90.8 \pm 24.9\%$, ns).

La HCO en los grupos tratados con el antagonista disminuyó cuando el OI permanece *in situ* (SCH-23390 (N=16): $28.9 \pm 2.8\%$ vs NaCl 0.9% (N=16): $54.5 \pm 8.4\%$; $p < 0.005$, U de Mann-Whitney) sin cambios cuando el OD permaneció *in situ* (SCH-23390 (N=16): $30.5 \pm 5.6\%$ vs NaCl 0.9% (N=16): $32.2 \pm 4.7\%$, ns).

Los resultados del presente estudio indican que la microinyección de una dosis única de SCH-23390 en el ovario remanente de animales HX disminuye el número de ovocitos liberados, la OC y la HCO, con cambios que dependen del día en el que se realiza el bloqueo del receptor DA-1 y ponen de manifiesto que dicho receptor participa activamente en la regulación del eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario.

INTRODUCCIÓN

Las funciones del ovario son controladas por señales hormonales y neuronales que se originan desde el hipotálamo, la adenohipófisis y los propios ovarios por medio de la síntesis y liberación de diferentes hormonas (Domínguez et al, 2012). La liberación de hormonas es regulada de manera recurrente a lo largo del ciclo reproductor, que en los mamíferos pequeños se denomina ciclo estral, un evento que ocurre de modo paralelo al ciclo ovárico. Ambos ciclos tienen como propósito asegurar la emisión constante de gametos viables a lo largo de la etapa fértil de la hembra y su eventual fertilización. Todo se inicia con la secreción hipotalámica de la *hormona liberadora de gonadotropinas* (GnRH; por sus siglas en inglés) que viaja por el sistema porta hipotalámico hipofisiario hasta la adenohipófisis donde estimula al gonadotropo para la secreción de gonadotropinas: *hormona folículo estimulante* (FSH, por sus siglas en inglés) y la *hormona luteinizante* (LH, por sus siglas en inglés) (Halbach y Dermietzel, 2006; Queenan, 2007). La FSH y la LH son vertidas a la circulación periférica y llegan al ovario donde se unen a receptores específicos en los tejidos funcionales de la gónada: las células foliculares (teca y granulosa) y el ovocito. La FSH estimula el crecimiento y maduración de los folículos ováricos, en tanto que LH estimula la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Hazum y Conn, 1988).

La dopamina es considerada un neurotransmisor clásico producido por neuronas específicas en el sistema nervioso central (SNC), típicamente su participación se asocia a diversas funciones cerebrales como es el movimiento voluntario, la memoria, el aprendizaje, entre otros (García et al, 2005). Sin embargo, también ha sido detectada en el ovario y su participación aún no ha sido aclarada, aunque sus receptores han sido localizados en las células de la teca, de la granulosa y en el ovocito (Rey-Ares et al, 2007).

Si bien hemos analizado el papel funcional del receptor dopaminérgico tipo-2 (DA-2) en el modelo de la rata adulta hemicastrada, el propósito del presente trabajo fue analizar la función del receptor dopaminérgico tipo-1 (DA-1) sobre la ovulación compensadora en este modelo experimental cuando es bloqueado por su antagonista específico: SCH23390, en diferentes etapas del ciclo estral de la rata.

MARCO TEÓRICO

I. EJE HIPOTÁLAMO-ADENOHIPÓFISIS-OVARIO

Las funciones del ovario están controladas por señales hormonales y neuronales que se originan desde el hipotálamo, la adenohipófisis y los propios ovarios, por medio de la síntesis y liberación de diferentes hormonas (Domínguez et al, 2012). Conjuntamente estos tres órganos constituyen un eje de regulación de las funciones reproductivas conocido como eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario (Marques et al, 2015; Yen, 2001).

El hipotálamo es el primer elemento de este eje, está ubicado en una zona diencefálica debajo del tálamo alrededor de las paredes y el suelo del tercer ventrículo (Toledano, 2005). Está constituido por distintas agrupaciones que se encuentran organizadas en tres zonas: lateral, medial y periventricular. Las neuronas de la zona lateral se distribuyen de forma difusa, mientras que la zona medial consiste en una serie de núcleos bien organizados y claramente delimitados; por su parte, en la zona periventricular se encuentran gran cantidad de neuronas que proyectan hacia la hipófisis, convirtiéndose en la zona hipotalámica con mayor participación en la regulación de la glándula y de las funciones reproductivas (Simerly, 2002).

El hipotálamo cuenta con células neurosecretoras especializadas en sintetizar y liberar neurohormonas que son transportadas por los axones de las neuronas hasta sus terminales en la eminencia media; de aquí pasan a los vasos portales hasta llegar a la adenohipófisis (Hickman, 2009; Hill et al, 2006). Una de estas neurohormonas es la GnRH, la cual se secreta en forma de pulsos en respuesta a señales hormonales y neurales (Prieto y Panigua, 2002).

La hipófisis, el segundo componente del eje, es una pequeña glándula conectada al hipotálamo por el tallo hipofisario. Fisiológicamente, la hipófisis se divide en dos zonas distintas, un lóbulo anterior o adenohipófisis, y un lóbulo posterior o neurohipófisis (Guyton y Hall, 2006). La adenohipófisis se encarga de liberar hormonas que son clave en la regulación de la función ovárica: la FSH y la LH.

El funcionamiento del eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario inicia con la secreción hipotalámica pulsátil de GnRH que viaja por el sistema porta hipotalámico hipofisario hasta la adenohipófisis donde se une a receptores específicos en sus células blanco: los gonadotropos; en respuesta, se secreta FSH y LH (Halbach y Dermietzel, 2006; Herbison, 2016). Ambas hormonas son vertidas a la circulación periférica y llegan al ovario donde se

unen a sus receptores en los tejidos funcionales de la gónada: las células foliculares (teca y granulosa) y el ovocito. La FSH estimula el crecimiento y maduración de los folículos ováricos, en tanto que LH estimula la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Hazum y Conn, 1988) (Figura 1).

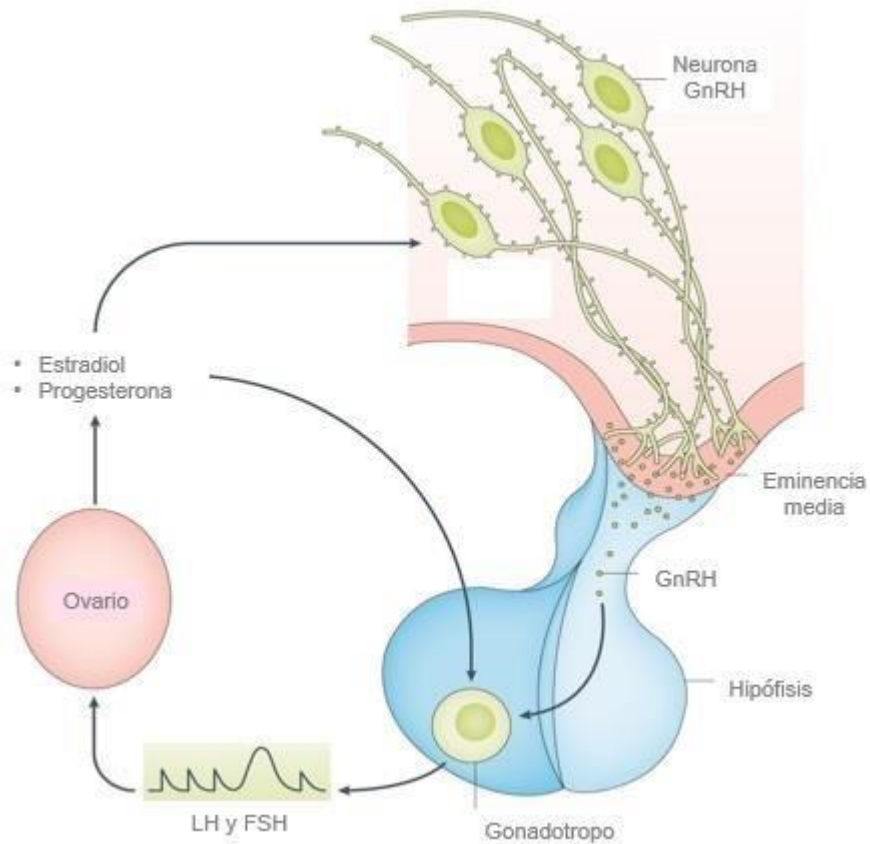


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. De manera general, la GnRH viaja por el sistema porta hipotalámico hipofisiario hasta la adenohipofisis, en respuesta, se secreta FSH y LH, ambas hormonas llegan al ovario donde se unen a sus receptores en los tejidos funcionales de la gónada (Tomado y modificado de Herbison, 2016).

II. OVARIO

Anatomía

Los ovarios son órganos pares que se encuentran a cada lado del útero y cerca de la pared pélvica. Cada ovario está fijado a la superficie posterior del ligamento ancho del útero por un pliegue peritoneal llamado mesovario a través del cual transcurren los vasos y nervios ováricos hacia y desde el hilio (Ross y Pawlina, 2007). Dependiendo de la especie éstos pueden presentar una forma ovalada que simula una almendra, o bien, una forma

redonda que aparenta un racimo de uvas; su superficie puede ser lisa o arrugada (Moore y Agur, 2003).

Histológicamente el ovario presenta tres zonas: hilio, corteza y médula. El hilio representa el punto de entrada de vasos sanguíneos y nervios. La corteza está ubicada en la periferia del ovario y rodea a la médula; es aquí donde se encuentran los folículos ováricos y donde se lleva a cabo su maduración, también se pueden observar cuerpos lúteos en desarrollo o maduros. La médula se encuentra situada en el centro del ovario, contiene tejido conjuntivo laxo y un conjunto de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (Carral et al, 2001) (Figura 2).

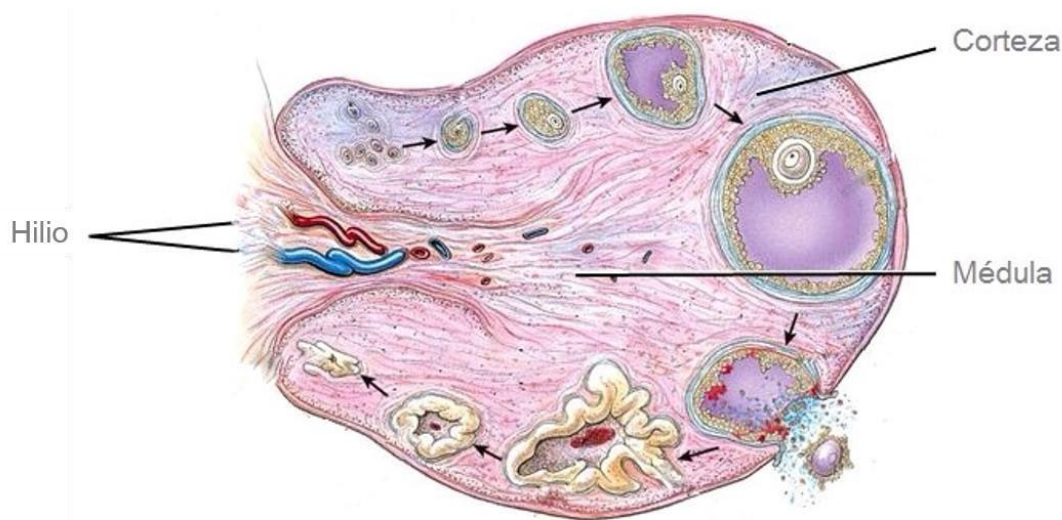


Figura 2. Principales regiones histológicas del ovario. 1) Hilio: sitio de entrada de vasos sanguíneos y nervios. 2) Corteza: contiene folículos en diferentes fases de desarrollo así como cuerpos lúteos. 3) Médula: contiene numerosos vasos arteriales, venosos y linfáticos, también se pueden encontrar fibras nerviosas (Tomado y modificado de Tortora, 2011).

Desarrollo Folicular

Durante la foliculogénesis, las células germinales migrantes del saco vitelino llegan a las crestas gonadales y son rodeadas por una sola capa de células planas formando los folículos primordiales (Erickson, 2012). Durante este estadio, la capa de células que rodean al ovocito se encarga de proveerle nutrientes así como de secretar un factor de inhibición de la maduración que mantiene al ovocito detenido durante la profase de la primera división meiótica (De la Fuente y Epping, 2001).

Al llegar la pubertad o madurez sexual, los folículos primordiales que se vuelven sensibles a la acción de las gonadotropinas salen del estadio y comienzan a desarrollarse.

Las etapas principales del desarrollo folicular son la formación del folículo primario y su posterior conversión a folículo secundario, antral y preovulatorio, también llamado *De Graaf* (Edson et al, 2009) (Figura 3).

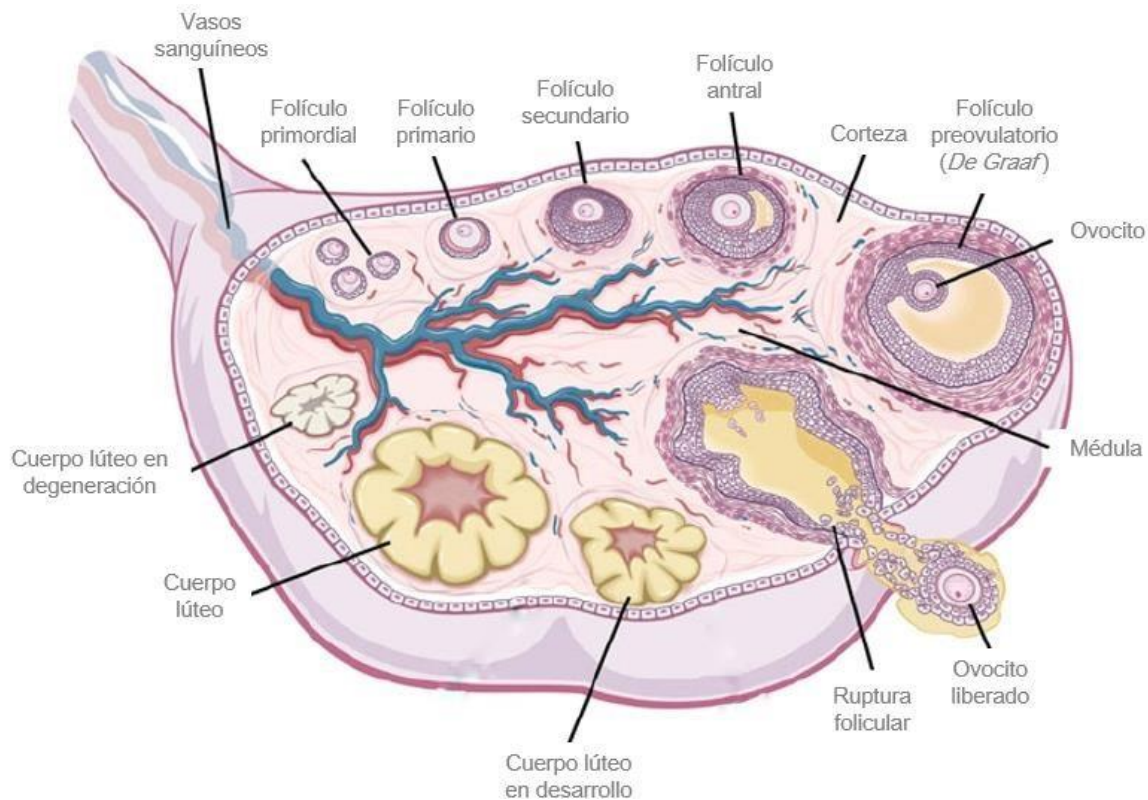


Figura 3. Desarrollo folicular. A partir de un folículo primordial, el folículo pasa por diversas etapas de desarrollo antes de ser expulsado durante la ovulación: primario, secundario, antral y preovulatorio. Posterior a la ovulación, las células de la granulosa y teca interna restantes se convertirán en el cuerpo lúteo (Tomado y modificado de Desai et al, 2004).

Durante los primeros días del ciclo reproductor las concentraciones tanto de FSH como de LH aumentan gradualmente, con el incremento de FSH ligeramente mayor que el de LH. El efecto de este aumento hormonal, especialmente de FSH, dará paso al primer estado de crecimiento folicular en el cual se produce el agrandamiento del ovocito, el cual crece en diámetro dos o tres veces más (Obeagu y Obeagu, 2016).

Los ovocitos continúan creciendo y se ven rodeados por un mayor número de capas de células de la granulosa, dando paso al folículo secundario (Epping, 2001). Posteriormente, las células fusiformes derivadas del intersticio ovárico se acumulan en

varias capas fuera de las células de la granulosa, dando lugar a una segundo tejido ovárico llamado teca, esta se diferencia en teca interna y teca externa, la primera desarrolla la capacidad de secretar hormonas sexuales esteroideas tal como andrógenos y progestinas; por su parte, la teca externa es una capsula de tejido conjuntivo muy vascularizada que reviste al folículo en desarrollo (Edson et al, 2009; Magoffin, 2005).

En la mujer, después de la fase proliferativa temprana, la masa de células de la granulosa segrega un líquido folicular, la acumulación de este líquido provoca la formación de una cavidad o *antrum* dentro de la masa de células de la granulosa. En esta etapa el folículo es conocido como folículo terciario o antral, el crecimiento inicial de folículo primario hasta esta etapa depende fundamentalmente de la FSH; finalmente, un solo folículo antral comienza a superar a los demás en tamaño por lo que los restantes 5 a 11 folículos en desarrollo se vuelven atrésicos e involucionan (Unglaub, 2013). Este único folículo preovulatorio, conocido como folículo de *De Graaf* es el que se expulsará en el momento de la ovulación.

Ovulación

La ovulación es un fenómeno en el cual la pared de un folículo ovárico se rompe liberando un óvulo maduro capaz de ser fecundado; este fenómeno ocurre en respuesta a un aumento en la concentración de LH, por lo que los folículos preovulatorios expresan altas concentraciones de receptores para esta hormona en las células de la granulosa, así, el folículo solo alcanza su maduración final cuando la población de receptores a gonadotropinas es la necesaria para que el pico preovulatorio de LH estimule la liberación del ovocito (Espey, 2005).

La primera señal del proceso ovulatorio es la formación del estigma en el apéndice del folículo preovulatorio, el estigma es una zona delgada de la pared folicular por donde se libera el ovocito en el momento de la ovulación (Russo y Agüero, 2006). La estimulación dada por la LH favorece tanto el crecimiento rápido de nuevos vasos sanguíneos en el interior de la pared del folículo como la secreción de prostaglandinas (hormonas locales que provocan vasodilatación) en los tejidos foliculares, este proceso activa el receptor de progesterona en las células de la granulosa, la expresión de prostaglandina sintasa 2 y los factores similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF): anfiregulina, epiregulina y betacelulina en las células de la granulosa (Richards, 2007). Estos factores conducen a la

reanudación de la meiosis en el ovocito. Por su parte las prostaglandinas F2 alfa (PGF2) y E2 (PGE2) intervienen en la ruptura de la pared folicular a través de la liberación de las enzimas contenidas en los lisosomas de la teca externa causando así una hinchazón adicional de todo el folículo y la degeneración del estigma (Espey, 2002).

Por último, la combinación de la hinchazón del folículo con la degeneración simultánea del estigma hace que el folículo se rompa liberando finalmente al *complejo cúmulo-ovocito* (Guyton y Hall, 2006; Oktem y Oktay, 2008). Dentro de una hora después de la liberación de los ovocitos, estos pueden ser encontrados en el tercio superior del oviducto donde estarán disponibles para su fecundación (Freeman, 2006).

Luteinización

Después de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca experimentan una diferenciación terminal hacia células lúteas. Aumentan de diámetro dos o más veces y se llenan de inclusiones lipídicas que les da un aspecto amarillento. Este proceso es llamado luteinización y la masa de células juntas es llamado cuerpo lúteo (Tomic et al, 2011).

El principal producto de secreción del cuerpo lúteo es la progesterona, hormona esencial para el mantenimiento del embarazo ya que actúa sobre el hipotálamo por retroalimentación negativa para suprimir el desarrollo folicular (Stouffer, 2003). Sin embargo, cuando el ovocito no es fecundado y en ausencia de señales uterinas y embrionarias, el cuerpo lúteo deja de producir progesterona, como resultado se da paso a la luteólisis, fenómeno en el cual ocurre una pérdida de la función y subsecuente involución de la estructura lútea lo que lleva a su desaparición y por consiguiente al inicio de un nuevo ciclo (Brucen et al, 2001; Devoto et al, 2009).

III. CICLO ESTRAL

La rata hembra es una especie poliéstrica, con ovulación espontánea y que muestra ciclos estrales sucesivos con un promedio de 4 a 5 días de duración (Astwood, 1939; Long y Evans, 1922; Ojeda y Urbanski, 1994).

El ciclo estral hace referencia al conjunto de eventos fisiológicos que controlan el ciclo reproductivo en mamíferos pequeños; tiene como propósito asegurar la emisión constante de gametos viables a lo largo de la etapa fértil de la hembra (Lohmiller y Swing, 2006). El ciclo involucra una serie de eventos que ocurren de manera sincronizada y cíclica gracias

al eje Hipotálamo-Neurohipófisis-Ovario, el cual, permite la correcta secreción de hormonas hipofisarias y esteroides que controlan las funciones del ovario (Benítez, 2013; Yoshinaga, 2009).

Para su estudio, el ciclo estral se ha dividido en cuatro etapas que corresponden a cada uno de los días de su duración: estro, diestro-1 (o metaestro), diestro-2 y proestro (Freeman, 2006; Long y Evans, 1922). Cada una de ellas puede ser establecida a través del monitoreo diario de frotis vaginales los cuales corresponden a cambios citológicos muy característicos del epitelio vaginal (Figura 4).

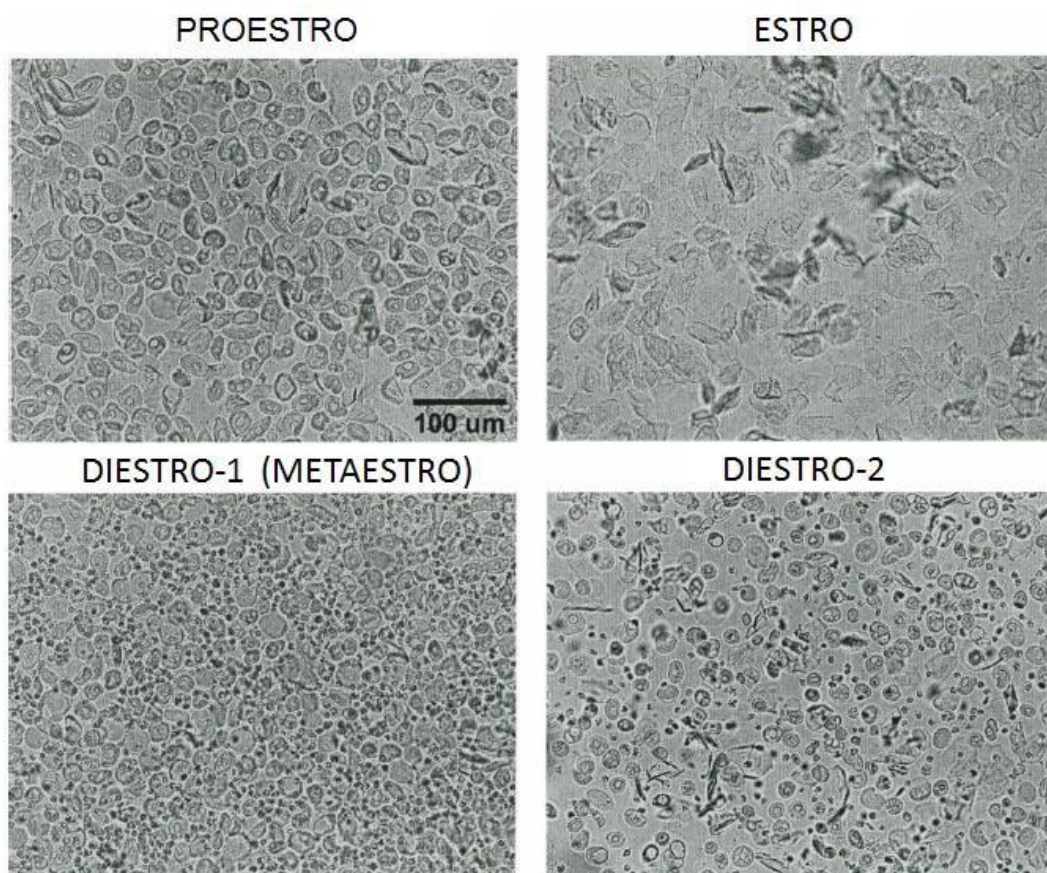


Figura 4. Tipos celulares que aparecen en el frotis vaginal durante cada una de las etapas del ciclo estral de una rata con ciclos regulares de 4 días de duración. El proestro se caracteriza por un predominio de células epiteliales nucleadas que son redondas y tienen un núcleo fácilmente visible; obsérvese la completa ausencia de leucocitos. El estro se caracteriza distintivamente por un gran número de células epiteliales escamosas cornificadas que se agrupan en racimos. El diestro-1 y -2 se caracterizan por un predominio de leucocitos pequeños intercalados por unas pocas células epiteliales escamosas epiteliales o cornificadas nucleadas. Los frotis vaginales durante el diestro-1 y -2 son virtualmente indistinguibles (Tomado y modificado de Hubscher, 2005).

Durante el diestro-1 o metaestro, la presencia dominante de leucocitos es la característica más evidente de esta etapa de recuperación post-ovulación. Los leucocitos son pequeños y con un citoplasma granuloso, pueden o no ir acompañados de una pequeña cantidad de células epiteliales nucleadas y algunas células basófilas (Westwood, 2008) (Figura 5).

En la etapa correspondiente al diestro-2 se mantiene la presencia de leucocitos. En el ovario, los cuerpos lúteos recién formados de la ovulación anterior han alcanzado su tamaño máximo, siendo éste el mejor marcador ovárico para establecer esta etapa (Goldman et al, 2007; Klein y Schwartz, 1999; Mandl, 1951).

Posteriormente, durante el proestro, se observa una gran cantidad de células epiteliales visiblemente nucleadas y distintivamente redondas las cuales pueden o no aparecen agrupadas, ocasionalmente también se puede observar una pequeña cantidad de células epiteliales escamosas cornificadas.

El día siguiente al proestro ocurre el estro, 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).

La secuencia de eventos neuroendocrinos que controlan el ciclo estral comienza con el aumento en las concentraciones de estradiol la mañana del proestro, las cuales, al disminuir la tarde del mismo, desencadenan la secreción de GnRH y por consiguiente de LH y FSH, el aumento de estas dos hormonas, especialmente de LH, es un evento preovulatorio característico que tiene lugar durante la tarde del proestro.

El “rápido” surgimiento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación, misma que tiene lugar durante el estro y que ocurre entre 10 a 12 horas después del aumento en las concentraciones de LH; es en esta etapa que la hembra permite la cópula. Mientras transcurre el estro, las altas concentraciones de estas hormonas disminuyen, manteniéndose en niveles basales durante el resto del ciclo, sin embargo, la FSH tiene un segundo pico de actividad durante la mañana del estro el cual estimula el reclutamiento y crecimiento de folículos para el siguiente ciclo (Klein y Schwartz, 1999).

Conforme se da paso al diestro-1 la secreción de progesterona aumenta, baja durante el diestro-2, tiene un segundo pico durante la tarde del proestro y disminuye la mañana del estro. Tanto la progesterona como el estradiol actúan por retroalimentación negativa sobre

la secreción de LH, por tanto, ambas hormonas son capaces de restringir al eje Hipotálamo-Neurohipofisario y conducir a la secreción basal de LH desde el diestro-1 hacia el diestro-2, suprimiendo su pulso y amplitud (Goodman, 1985; Leipheimer et al, 1986). Sin embargo, el estradiol ovárico secretado durante el diestro-2 también es capaz de actuar por retroalimentación positiva induciendo el surgimiento de LH el cual a su vez estimula la ovulación (Hoffman, 1970). Por otra parte, el surgimiento de progesterona durante el proestro puede ser el responsable de inhibir la actividad de la aromatasa, por lo que también estaría interfiriendo con la síntesis de estrógenos (Katt et al, 1985; Wang et al, 1981).

Otra hormona importante dentro del control neuroendocrino del ciclo estral es la prolactina, sus concentraciones aumentan durante el proestro y se mantienen basales el resto del ciclo, esta hormona se encarga de estimular la expresión de receptores para estrógenos a través de la expresión de la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD), enzima encargada de catalizar la conversión de estrona a estradiol. Además, inhibe a la enzima 20-hidroxiesteroide deshidrogenasa (20α -HSD) y en consecuencia previene el catabolismo de la progesterona durante la gestación (López et al, 2011) (Figura 5).

IV. ASIMETRÍA OVÁRICA

Existe evidencia de que la gran mayoría de los órganos pareados presentan algún nivel de asimetría, este es el caso de los ovarios. La asimetría ovárica alcanza su máxima expresión en las aves, donde solo el ovario y oviducto izquierdo se desarrollan mientras que el derecho permanece rudimentario (Benítez, 2013; Rodler et al, 2015). En el caso de las ratas, ambos ovarios presentan diferencias que van desde el número de ovocitos liberados hasta el tipo de innervación que reciben.

Con respecto al número de ovocitos liberados, se sabe que en ratas cíclicas el ovario izquierdo libera un promedio de 6 ovocitos mientras que el ovario derecho libera solo cuatro (Domínguez, 2003). Aunado a lo anterior, existe evidencia de que tras realizar una hemiovariectomía se genera un cambio en el contenido de GnRH del hipotálamo medio basal, siendo mayor en el lado derecho que en el lado izquierdo, esto permite deducir que existe un nivel de asimetría presente tanto en los órganos del sistema reproductivo como a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), por tanto, ambos ovarios son capaces de responder de manera diferencial ante diversos estímulos (Gerendai et al, 1978).

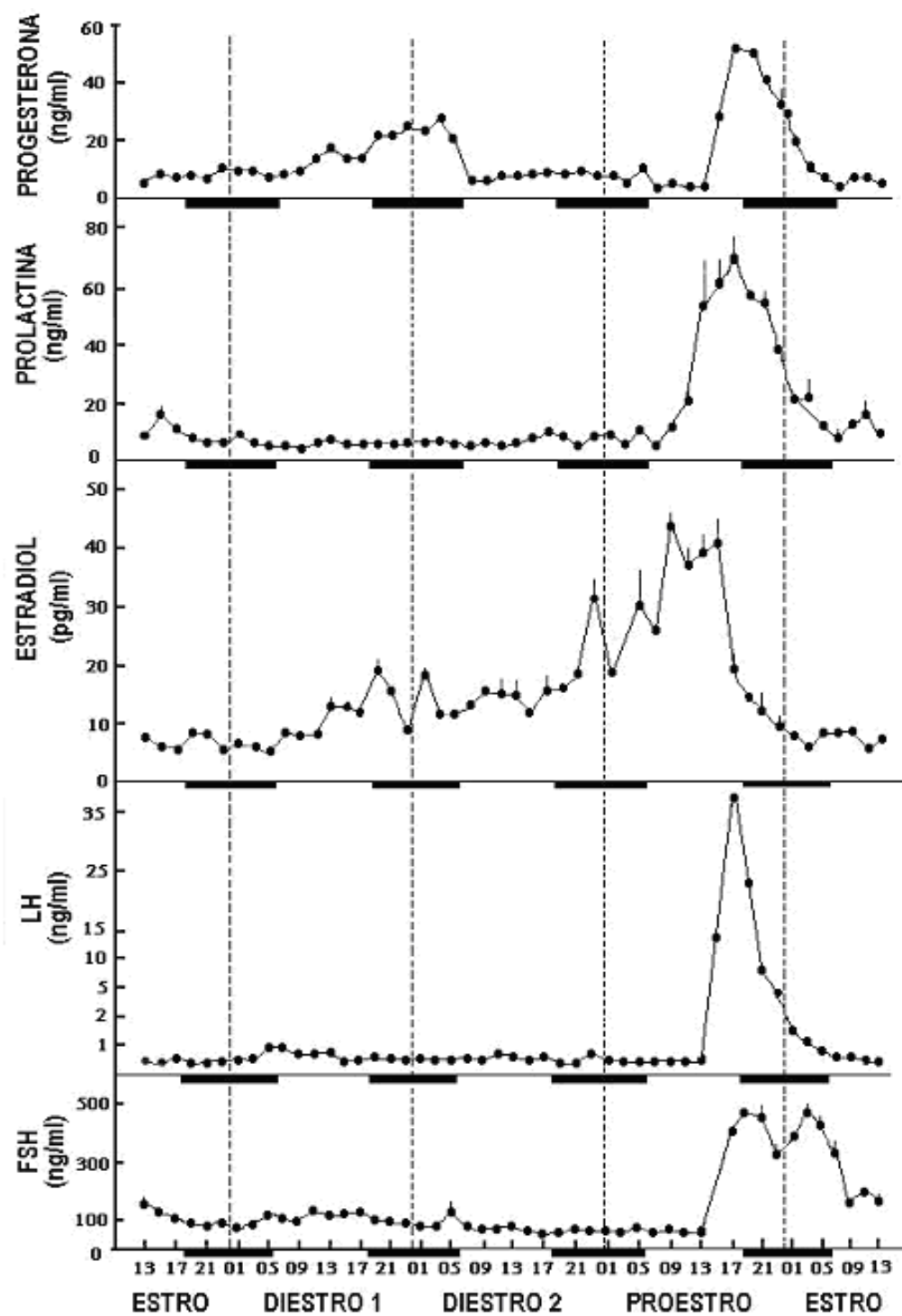


Figura 5. Concentraciones de progesterona, prolactina, estradiol, LH y FSH en plasma periférico correspondientes a cada día del ciclo estral de la rata. Cada punto representa el promedio de concentración hormonal. Las barras negras representan intervalos de oscuridad; los números en la parte inferior representan la hora del día (Smith et al, 1975 citado por Freeman, 2006).

Por ejemplo, Chávez y colaboradores (1986) al mostrar la existencia de diferencias en la tasa de ovulación tras realizar una hemiovariectomia, concluyeron que el ovario derecho tiene mayor capacidad de reaccionar a los sistemas de regulación compensadora que el ovario izquierdo.

Así también Letras-Luna (2015) muestra que el bloqueo del receptor dopaminérgico con una dosis única de sulpiride en los diferentes días del ciclo modifica la ovulación compensadora cuando es el ovario derecho el que permanece *in situ* pero no lo hace cuando el que permanece es el ovario contralateral. Tales resultados muestran la sensibilidad diferencial que presenta el órgano derecho del izquierdo ante el mismo estímulo (Domínguez et al, 2003; Gerendai y Halász, 2001).

V. INERVACIÓN OVÁRICA

Las funciones del ovario no solo son controladas por señales hormonales, sino que también responden a una serie de señales neuronales que llegan a él a través de fibras simpáticas y parasimpáticas (Klein y Burden, 1988; Nance et al, 1988).

La inervación que llega al ovario es través del nervio ovárico superior (NOS), el nervio del plexo ovárico y el nervio vago (Pérez, 2012) (Figura 6). Las neuronas que dan lugar a las fibras que inervan el ovario a través del NOS tienen dos orígenes: la mayoría provienen del ganglio celiaco y en menor medida del ganglio paravertebral. Estas fibras corren a través del musculo liso del ligamento suspensorio ovárico inervando al oviducto, útero y ovario, aquí, la mayoría de las fibras se distribuyen en la zona perifolicular de la teca en estrecha relación con las células de la teca interna (Aguado, 2002; Gerendai, 2004).

Por su parte las neuronas del plexo ovárico que acompaña a la arteria ovárica se originan desde la región torácica inferior de la médula espinal inervando al ovario y al oviducto (Gerendai, 2004). Con respecto a las fibras parasimpáticas, las cuales tienen un origen vagal, estas convergen en su mayor parte en la vasculatura ovárica, especialmente alrededor de los vasos existentes en la médula y el hilio. Una parte de los nervios pasan a la corteza del ovario, inervan el tejido intersticial ovárico y forman un plexo alrededor de los folículos ováricos (Burden y Lawrence, 1978; Gerendai y Halász, 1997) (Figura 6).

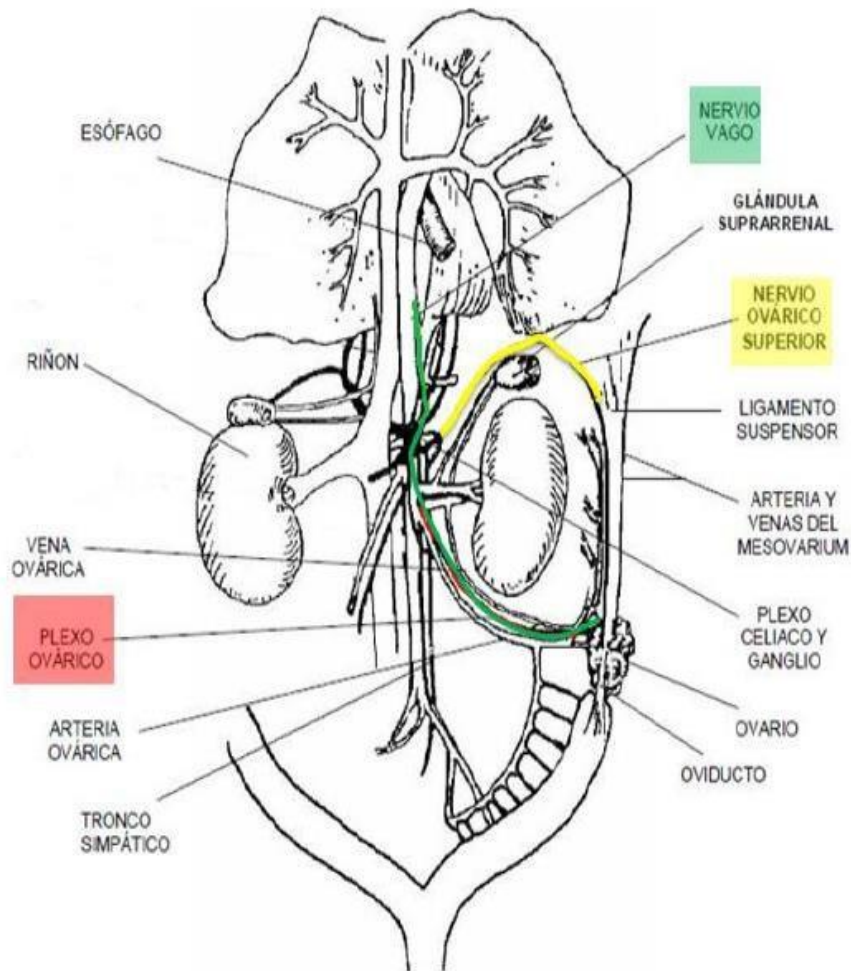


Figura 6. Inervación ovárica. Se observan las tres principales fibras nerviosas que inervan el ovario: nervio ovárico superior, nervio del plexo ovárico y nervio vago. (Tomado y modificado de Lawrence y Burden, 1980).

Es generalmente aceptado que las distintas vías que inervan al ovario juegan un rol central en la modulación de las respuestas que tendrá este órgano hacia las gonadotropinas, también se sabe que en la rata adulta la disección de uno de estos nervios resulta en una disminución o total falta de ovulación por parte del ovario desnervado (Domínguez, 2003).

Los datos disponibles sugieren que la inervación simpática también desempeña un rol modulante tanto en el desarrollo folicular como en las funciones que lleva a cabo el cuerpo lúteo (Burden, 1978; Tsafiriri y Adashi, 1994).

Gran parte de evidencia experimental señala que los neurotransmisores liberados desde las terminales nerviosas hacia el ovario tienen la capacidad de actuar sobre receptores localizados en células secretoras de hormonas. Dada esta información, parece ser muy probable que las entradas neurales que llegan al ovario a través de los nervios

autónomos son señales integradas que incluyen impulsos neuronales de diferentes áreas del SNC (Gerendai, 2004).

La demostración de la existencia de estas conexiones neurales se ha logrado gracias a la inyección de trazadores virales trans-neuronales en el ovario, mismos que permiten establecer las estructuras del SNC que participan en esta integración (Benítez, 2013). Entre las áreas más importantes se encuentra la columna intermediolateral de la médula espinal (origen de las fibras simpáticas preganglionares), la médula oblonga (núcleo del tracto solitario y núcleo motor dorsal del nervio vago), la región caudal del núcleo del rafe, el *locus coeruleus*, el núcleo paraventricular hipotalámico, área preóptica medial, hipotálamo dorsal, núcleo *arcuato*, entre otras (Card et al, 1993; Gerendai, 2004; Gerendai, 1998).

Con respecto al tipo de neurotransmisor o neuropéptido que contienen las fibras nerviosas que inervan el ovario se sabe que estos pueden incluir al *péptido intestinal vasoactivo* (VIP, por sus siglas en inglés), sustancia P, neuropéptido Y, *péptido relacionado con el gen de la calcitonina* (CGRP, por sus siglas en inglés), somatostatina y, teniendo mayor preponderancia, fibras que contienen acetilcolina y catecolaminas (Calka et al, 1990; Setchell, 2002; Sporrang et al, 1991).

VI. SISTEMA DOPAMINÉRGICO

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico sintetizado a partir del aminoácido tirosina, su síntesis tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas, sitio donde se encuentra en altas concentraciones la tirosina hidroxilasa, enzima limitante de su síntesis. Los principales sitios de producción de la dopamina son el cerebro, la médula adrenal y las neuronas simpáticas (Bahena et al, 2000; Peaston y Weinkove, 2004).

Existen cuatro vías dopaminérgicas principales: la vía tuberoinfundibular, la vía *nigroestriatal*, la vía mesocortical y la vía mesolímbica. El sistema tuberoinfundibular se proyecta desde el hipotálamo hacia la hipófisis, la vía *nigroestriatal* se origina en la sustancia negra y se proyecta hacia el cuerpo estriado dorsal, las proyecciones mesolímbica y mesocortical se originan en el área tegmental ventral y se proyectan hacia el estriado ventral y las áreas en la corteza prefrontal, respectivamente (Speed, 2010).

La dopamina induce sus efectos celulares y bioquímicos a través de interactuar con sus receptores de superficie celular. Los receptores son moléculas o arreglos moleculares

capaces de reconocer selectivamente un ligando (agonista o antagonista) (Castro y Strange, 1993; Zeng et al, 2011).

Análisis estructurales revelan que los receptores dopaminérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G, la cual, es capaz de inducir mecanismos de señalización intracelular (Akimoto et al, 2013). Este tipo de receptores poseen 7 dominios transmembranales de entre 20 a 25 residuos hidrofóbicos cada uno, están conectados de forma alterna por asas citoplasmáticas (il, i2, i3) y extracelulares (el, e2, e3), y la región amino terminal corresponde a un dominio extracelular glicosilado que permite el reconocimiento entre el neurotransmisor y la molécula efectora a través de su capacidad para unir nucleótidos de guanina (Kandel et al, 1991; Missale et al, 1998; Souza, 2010; Trujillo et al, 2000).

Los receptores dopaminérgicos se han clasificado internamente en dos familias denominadas DA-1 y DA-2, esta clasificación se basa en estudios farmacológicos y moleculares que muestran que la dopamina es capaz de modular la actividad de la adenilato ciclasa (AC) (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Trantham et al, 2004). Así, los receptores de la familia DA-1 (subtipos D₁ y D₅) están acoplados positivamente a la AC, lo que induce la acumulación intracelular de *adenosín monofosfato cíclico* (AMPc, por sus siglas en inglés) y la posterior activación de la *proteína quinasa dependiente de AMPc* (PKA, por sus siglas en inglés) como principal mecanismo de transducción de señales.

Por su parte, la familia de receptores DA-2 (subtipos D₂, D₃ y D₄) están acoplados negativamente a la AC lo que disminuye la acumulación de AMPc (Kebabian y Calne, 1979; Rangel et al, 2015; Spano et al, 1978; Trujillo et al, 2000).

El mecanismo de acción de los receptores DA-1 es a través de la activación directa de la subunidad G $\alpha_{s/olf}$ de la proteína G, esta se une a la subunidad catalítica C2 de la AC permitiendo la interacción entre las subunidades C1-C2 de la enzima, lo que provoca la conversión de ATP hacia AMPc (Barajas et al, 2015; Demchyshyn et al, 2003; Kim et al, 2006). El AMPc interactúa con las subunidades reguladores de la PKA induciendo la liberación de subunidades catalíticas que fosforilan diferentes sustratos involucrados en la regulación de la expresión génica y la traducción de señales (Fig. 7) (Sunahara y Taussig, 2002; Neve et al, 2004). Por su parte, los receptores DA-2 están acoplados a la proteína G $\alpha_{i/o}$, inducen la inhibición de AC y por lo tanto disminuye la acumulación de AMPc (Rankin et al, 2010; Rondou et al, 2010).

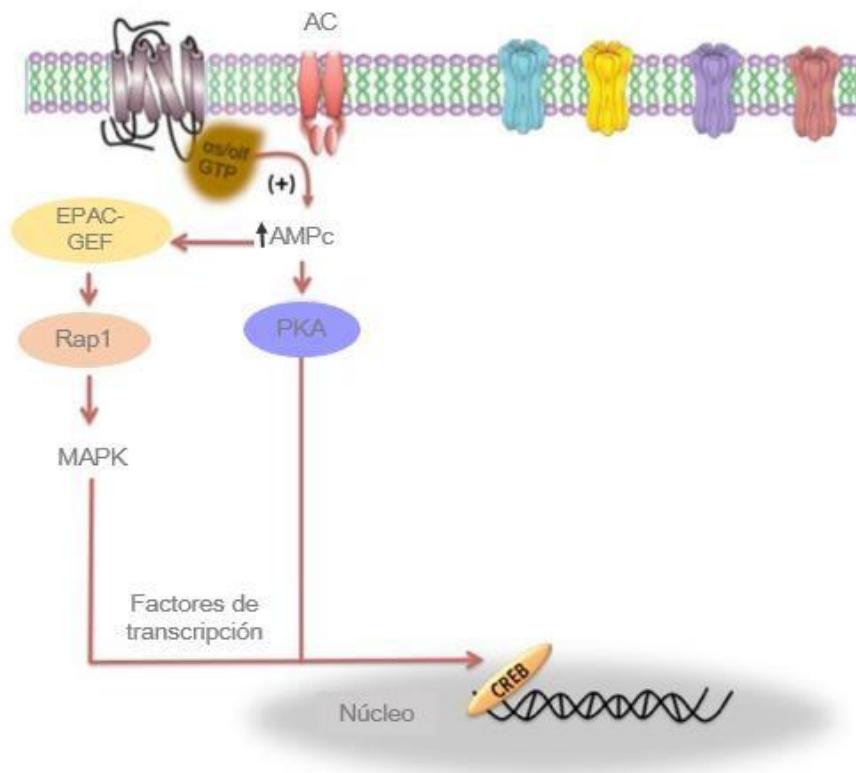


Figura 7. Mecanismo de acción de los receptores DA-1. Se observan algunas de las vías de señalización intracelular que son activadas por la acción de los receptores DA-1 (Tomado y modificado de Barajas et al, 2015).

De manera general, el papel de la dopamina se ha relacionado con la regulación de una serie de procesos fisiológicos y de comportamiento que incluyen la locomoción, cognición, afectividad, estado de ánimo, la motivación y recompensa, entre otros (Speed, 2010). En el Sistema Nervioso Periférico, la dopamina desempeña un papel en la modulación de la función cardíaca y renal, del tono vascular y de la motilidad gastrointestinal (Carvey, 1998).

Sin embargo, datos recientes señalan que también tiene un rol importante en la regulación de las funciones del ovario tales como la ovulación y el desarrollo folicular (King et al, 2005; Letras, 2016; Matsumara et al, 2003; Venegas, 2015). Así mismo, en el ovario humano se ha detectado la presencia de dopamina en el cuerpo lúteo. El repertorio de receptores de dopamina presentes específicamente en las células de la granulosa ha sido descrito, todos los receptores de dopamina están presentes a excepción el D3, siendo el D2 el de mayor expresión (Rey-Ares et al, 2007).

VII. HEMIOVARIETOMÍA

La hemiovariectomía es una de las herramientas experimentales utilizadas con frecuencia para analizar la existencia de asimetrías funcionales y/o fisiológicas entre los ovarios. Los efectos de la hemiovariectomía pueden ser analizados en términos de los cambios que ocurren en el ovario que permanece *in situ*, tales cambios pueden incluir: incremento en su peso total, el cual puede ser atribuido al desarrollo de la *hipertrofia compensadora del ovario remanente* (HCO) ; el incremento en el número de ovocitos liberados, lo que se conoce como *ovulación compensadora* (OC); el aumento de la actividad folicular, o un incremento en el número de cuerpos lúteos, etc., (Domínguez, 2003; Matsumara y Domínguez, 2003).

También es posible estudiar qué tipo de cambios hormonales tienen lugar tras realizarse esta técnica, por ejemplo, los datos disponibles señalan que tras una hemiovariectomía izquierda (ratas con el ovario derecho *in situ*) llevada a cabo a las 13:00 h el día del estro no muestran cambios aparentes en las concentraciones de progesterona; en cambio, las concentraciones séricas de testosterona incrementan, mientras que las de estradiol disminuyen significativamente. Por otro lado, la hemiovariectomía derecha (ratas con el ovario izquierdo *in situ*) no provoca cambios aparentes en las concentraciones séricas de progesterona, testosterona y estradiol (Domínguez, 2003).

Siguiendo esta línea, se ha establecido que la inyección de sulfato de atropina a ratas hemiovariectomizadas del lado izquierdo resulta en mayores concentraciones de progesterona y en una reducción significativa en las concentraciones de testosterona. Sin embargo, aquellas ratas a las que se les extirpo el ovario derecho, o fue bloqueado colinérgicamente, no mostraron cambios en las concentraciones séricas de progesterona, pero si un incremento significativo en las concentraciones de testosterona y estradiol (Domínguez, 2003).

Por otro lado, tras realizarles una hemiovariectomía a ratas adultas con el fin de estudiar el número de animales ovulantes, Chávez y colaboradores (1987) obtuvieron que cuando el ovario derecho permanece *in situ* 27/32 animales ovulan el día del estro esperado, mientras que en el ovario izquierdo *in situ* sólo 16/38 lo hacen.

VIII. OVULACIÓN COMPENSADORA DEL OVARIO (OC)

Uno de los efectos de la hemiovariectomía es el incremento, generalmente del doble, en el número de ovocitos liberados por parte del ovario que permanece *in situ*, este fenómeno es conocido como OC. En el caso de la rata, se ha demostrado que se produce incluso desde el primer estro después de la cirugía (Bhattacharya, 2013).

La duplicación en la tasa de ovulación no es un fenómeno transitorio, se sabe que puede continuar durante al menos 75 semanas en el ratón y 8 semanas en el hámster, en la rata, se ha informado que la OC cesa hasta 6 meses después de la cirugía (Peppler, 1971; Sengupta, 2013).

Los mecanismos que regulan la OC han sido explicados a través de los cambios que ocurren en la secreción de gonadotropinas, la liberación de hormonas esteroideas ováricas y la información neural que llega a los ovarios (Burden, 1985; Flores et al, 2011; Greenwald y Roy, 1994; Ojeda y Aguado, 1984). Tras la hemiovariectomía se produce una disminución en la acción de retroalimentación negativa llevada a cabo por la inhibina, en respuesta, la adenohipófisis aumenta la liberación de FSH y por consiguiente se reclutan una gran cantidad de folículos ováricos pequeños, lo que explicaría el aumento en el número de ovocitos liberados por el ovario *in situ* (King et al, 1995).

Estudiando estos fenómenos, Arévalo y colaboradores (2011) reportan que en el animal con hemiovariectomía, los mecanismos neuroendocrinos que modulan la respuesta del ovario están en función de la gónada remanente, de la etapa del ciclo estral y de la hora en la que se realice la cirugía. Tal es así que en animales a los que se les extirpo una gónada durante el diestro-2 a las 07:00 h o 19:00 h, solo la extirpación del ovario izquierdo resultó en un incremento en el número de ovocitos liberados por el ovario *in situ*. Aunado a esto, en animales hemiovariectomizados en el día del proestro a las 13:00 h se observa un incremento en el número de ovocitos liberados por parte del ovario izquierdo *in situ*, mientras que en los tratados a las 19:00 h este incremento es observado para el ovario derecho *in situ*.

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 hembra con ciclos estrales regulares de cuatro días que fueron tratadas periféricamente con una dosis única de haloperidol (2.5 mg/kg de peso; i.m.), antagonista de los receptores dopaminérgicos, en diferentes horas de cada uno de los días del ciclo estral: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro. Los animales se sacrificaron en la mañana del estro esperado. El haloperidol impidió la ovulación espontánea en estos animales cuando se administró en el estro y diestro-1 pero fue menos efectivo cuando se inyectó en el diestro-2 y en el proestro. La población folicular de los ovarios mostró alteraciones en el crecimiento de los folículos que dependieron del momento en el que se realizó el bloqueo sistémico de los receptores a dopamina. La interpretación de estos resultados permitió sugerir que la información dopaminérgica que se genera durante la primera mitad del ciclo estral es fundamental para que la secuencia de eventos neuroendocrinos y endocrinos que culminan con la ovulación ocurra de manera normal.

Recientemente, hemos 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). La administración subcutánea de una dosis única de haloperidol en la primera (Ramírez-Ávila, 2001) o en la segunda mitad del ciclo estral (Pastelín-Rojas, 2003) interrumpe el ciclo estral e inhibe de modo claro la secreción de gonadotropinas y de estrógenos. En estos experimentos, se confirmó que el desarrollo folicular se ve interrumpido y mostró que los índices de atresia se incrementaron casi de manera absoluta en los animales tratados con el antagonista. Si bien estos efectos pudieran ser explicados por la interrupción de la secreción de gonadotropinas, el reemplazo hormonal fue ineficaz para restablecer de la función ovárica (Vargas-Torres, 2002) lo que nos permite suponer que el bloqueo farmacológico de la información dopaminérgica en la gónada pudiera involucrar de manera directa mecanismos que controlan las funciones ováricas.

Venegas y colaboradores (2015), mostraron la existencia virtual de un sistema dopaminérgico local en el ovario de la rata adulta que participa de modo crítico en la regulación del ciclo estral y la ovulación espontánea, con papeles variables a lo largo del

ciclo estral e incluso de acuerdo a la hora del día en que se analiza su función. Sus resultados son altamente concordantes con lo reportado por Domínguez y colaboradores (1987) y muestran claros efectos que los antagonismos locales de los receptores dopaminérgicos ováricos tienen sobre el ciclo estral, es decir, 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.

El antecedente más directo al presente trabajo consistió en el estudio del bloqueo del receptor DA-2 inducido por la microinyección local de una dosis única de sulpiride en los diferentes días del ciclo en el modelo de la rata hemicastrada. En este estudio se reportó que el sulpiride disminuyó la OC cuando es el ovario derecho el que permanece *in situ*, pero no lo hace cuando el que persiste es el ovario contralateral; además, el grado de HCO que desarrolló el ovario derecho fue significativamente mayor que la que alcanzó el izquierdo. Estos resultados permitieron sugerir que el sistema dopaminérgico del ovario presenta un funcionamiento lateralizado (Letras-Luna, 2015).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La dopamina juega un papel crítico en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad, entre otras (Mackenzie et al, 1984; Trujillo et al, 2000). Sin embargo, no hay suficiente evidencia que trate el papel funcional de la dopamina presente en los tejidos ováricos.

A su vez, los diferentes estudios que abordan el análisis del papel de la innervación ovárica sobre las funciones de la gónada se han enfocado en el estudio del papel de los sistemas noradrenérgicos y peptidérgicos (Aguado, 2002; Ahmed et al, 1986; Ben et al, 1982; Dees et al, 1985; Davoren y Hsueh, 1985; Dissen y Ojeda, 1999; Mayerhofer et al, 1997; McNeill y Burden, 1987). Por otra parte, existen pocos estudios que abordan el papel del sistema dopaminérgico sobre las funciones ováricas, enfocándose principalmente en el análisis del papel de la dopamina sobre la liberación hormonal de la GnRH o de las gonadotropinas (Ramírez et al, 1984; Vijayan y McCann, 1978). Otros autores han analizado su papel en el hipotálamo y la regulación de la ovulación espontánea (Morán y Domínguez, 1995, Morán y Domínguez, 1997) sin profundizar en el análisis de la función dopaminérgica en el propio ovario.

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Los diversos estudios que abordan el papel de la innervación ovárica sobre las funciones de la gónada se han dirigido a los sistemas noradrenérgicos y peptidérgicos, sin embargo, no hay suficiente evidencia que trate el papel funcional de la dopamina presente en los tejidos ováricos. El presente trabajo pretende ampliar el conocimiento del papel funcional de la dopamina en el tejido ovárico a través del bloqueo farmacológico del receptor DA-1 y analizar la función ovárica en el modelo experimental de la rata adulta hemicastrada.

El estudio del antagonismo del receptor DA-1 inducido por SCH-23390 en el tejido ovárico de la rata adulta permitirá, a través del análisis de la ovulación compensadora, dilucidar el papel de la dopamina en el sistema reproductivo de la rata adulta.

HIPÓTESIS

El bloqueo farmacológico del receptor DA-1 dentro de la bursa del ovario remanente en ratas adultas hemicastradas provocará cambios en la ovulación compensadora, mismos que dependerán del día del ciclo estral en que se realiza el bloqueo.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el bloqueo farmacológico del receptor DA-1 inducido por la microinyección del antagonista SCH-23390 dentro de la bursa del ovario remanente en ratas adultas hemicastradas sobre la ovulación e hipertrofia compensadora.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar el efecto de la microinyección de SCH-23390 dentro de la bursa del ovario derecho *in situ* en la rata hemicastrada que muestre ciclos estrales regulares de cuatro días de duración (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) sobre la ovulación compensadora.
- 2) Analizar el efecto de la microinyección de SCH-23390 dentro de la bursa del ovario izquierdo *in situ* en la rata hemicastrada que muestre ciclos estrales regulares de cuatro días de duración (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) sobre la ovulación compensadora.
- 3) Comparar los grados de ovulación compensadora respecto al ovario que permanece *in situ*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 84 ratas hembras adultas de la cepa *CII-ZV*, proporcionadas por el Bioterio *Claude Bernard* de la BUAP, con edades entre 90-120 días y con pesos corporales de 200-250 g. Los animales fueron alojados en un cubículo con fotoperiodo controlado (14:00 h luz/ 10 h oscuridad; luces de las 06:00-20:00 h), con libre acceso al agua y al alimento balanceado en *pellets* comerciales. Todos los experimentos del presente estudio se ajustaron a la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio) y estuvieron bajo el cuidado del MVZ Francisco Ramos Collazo, director del Bioterio *Claude Bernard* de la BUAP.

Procedimientos Generales

Entre las 09:00-10:00h, a todos los animales se les registró el aspecto de la citología vaginal por medio de frotis de las células epiteliales de la vagina con la finalidad de seleccionar únicamente animales que presentaran un mínimo de tres ciclos estrales regulares de cuatro días de duración: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro. Una vez cumplido el criterio de la ciclicidad regular, las ratas fueron asignadas a los diferentes grupos experimentales de acuerdo con el siguiente diseño: 1) Grupos control: ratas cíclicas hemicastradas la mañana del estro y que tras presentar cuatro ciclos estrales regulares fueron sacrificadas la mañana del estro vaginal. 2) Grupos testigo: ratas cíclicas hemicastradas la mañana del estro y que tras presentar mínimo dos ciclos estrales regulares se les aplicó una microinyección de vehículo a las 13:00 horas del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro. 3) Grupos con SCH-23390: ratas cíclicas hemicastradas la mañana del estro y que tras presentar mínimo dos ciclos estrales regulares se les aplicó una microinyección de SCH-23390 a las 13:00 horas del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cálculo del número de ratas adultas hemicastradas (HX) con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración que se utilizaron en el proyecto (tamaño mínimo de muestra (n) por grupo: 4). Con excepción de los grupos control HX, los demás grupos experimentales estuvieron conformados con animales a los que se les realizó una laparotomía para realizar la técnica de microinyección dentro de la bursa ovárica del ovario remanente (in situ).

Grupos	Tratamiento	n=10
Control HX OD <i>in situ</i>	(Sin microinyección y autopsia en la mañana del estro esperado precedido de proestro)	10
Control HX OI <i>in situ</i>	(Sin microinyección y autopsia en la mañana del estro esperado precedido de proestro)	10
	Subgrupos con microinyección a las 13:00 h de uno de los días del CE	n = 4 / Subgrupo
NaCl 0.9% OD <i>in situ</i>	estro, diestro-1, diestro-2 o proestro	16
NaCl 0.9% OI <i>in situ</i>	estro, diestro-1, diestro-2 o proestro	16
SCH-23390 OD <i>in situ</i>	estro, diestro-1, diestro-2 o proestro	16
SCH-23390 OI <i>in situ</i>	estro, diestro-1, diestro-2 o proestro	16

Técnica de Hemicastración (Laparotomía)

Tras haber presentado tres ciclos normales consecutivos de cuatro días de duración los animales fueron hemicastrados entre las 09:00h y 10:00h del día del estro. La cirugía se realizó siguiendo este procedimiento:

Se formaron dos grupos generales de animales, uno de ellos destinado a la hemicastración derecha (ovario izquierdo *in situ*) y el otro para hemicastración izquierda (ovario derecho *in situ*). Antes de la hemicastración, cada animal fue sedado con vapores de isoflurano (*Sofloran Vet; PiSA*) y luego afeitado de la zona intercostal derecha o izquierda, según el caso. Para realizar la laparotomía, el animal sedado fue colocado sobre una tabla de disección, se limpió la piel afeitada con una solución antiséptica de clorhexidina 2% y se realizó una incisión vertical de aproximadamente 0.5 cm sobre la piel y se removió la grasa subcutánea; cuando se observó el músculo abdominal, se realizó otra incisión sobre el mismo hasta la cavidad peritoneal. Posteriormente, se exteriorizó y removió según el caso, el ovario izquierdo (OI) o el derecho (OD). Las incisiones fueron suturadas con seda quirúrgica #00 y aseptizadas con clorhexidina 2%.

El ovario extirpado fue mantenido en hielo y se pesó en balanza de precisión de 0.1 mg y se le disecó el oviducto. Con ayuda de un estereomicroscopio de disección, se identificó la zona de distención en cada oviducto y se contó el número de ovocitos liberados.

A partir de la mañana siguiente, en todos los animales hemicastrados se continuó registrando el aspecto del frotis vaginal hasta que se cumplieron al menos dos ciclos regulares consecutivos de cuatro días. Todos los animales que cumplieron este requisito fueron asignados a los diferentes subgrupos para realizarles la técnica de microinyección descrita a continuación.

Técnica de Microinyección (Laparotomía)

Se formaron seis grupos experimentales de ratas cíclicas hemicastradas del OI o del OD distribuidas en diferentes subgrupos (Cuadro 1).

A las 13:00 horas del día del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro, cada animal fue sedado con vapores de isoflourano (*Sofloran Vet; PiSA*). Siguiendo la técnica antes mencionada para realizar la hemicastración, el ovario remanente fue exteriorizado y sometido a una microinyección dentro de la bursa ovárica con una solución de SCH-23390 (10 mg/ml; *Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA* + Vehículo: NaCl 0.9%). La microinyección se realizó con una bomba de perfusión nanomolar, infiltrando 20 µL de la solución, seguida de 60 segundos de reposo antes de retirar la aguja del microinyector de la bursa. Cada uno de los grupos testigo fue sometido al mismo procedimiento y recibió 20 µL del Vehículo: NaCl 0.9%.

Luego de la perfusión, el ovario se devolvió a la cavidad peritoneal. Las incisiones sobre musculo y piel fueron suturadas con seda quirúrgica #00 y aseptizadas con clorhexidina 2%.

Eutanasia y Autopsia General

Todos los animales fueron sacrificados entre las 09:00 y 10:00 horas de la mañana del estro observado, fueron previamente sedados en una cámara de vapores de isoflurano (*Sofloran Vet; PiSA*) y decapitados para extraer la sangre del tronco y recuperar el ovario remanente (ovario *in situ*) y su oviducto. Este último fue inspeccionado en un estéreomicroscopio de disección para buscar el signo de distensión y realizar el conteo directo de los ovocitos liberados.

Análisis de Datos

Para calcular el porcentaje de la *ovulación compensadora* (OC) en los distintos grupos, el número de ovocitos liberados (NOL) por el ovario remanente y el NOL por el ovario extirpado el día de la hemicastración, fueron analizados con la siguiente formula:

$$OC = \frac{NOL \text{ por el Ovario Remanente (in situ)} - NOL \text{ por el Ovario Extirpado}}{NOL \text{ por el Ovario Extirpado}} \times 100$$

Para calcular el porcentaje de la *hipertrofia compensadora del ovario* (HCO) en los distintos grupos, el peso relativo (mg/100g) del ovario remanente y el peso relativo del ovario extirpado el día de la hemicastración, fueron analizados con la siguiente formula:

$$HCO = \frac{\text{Peso Relativo del Ovario Remanente (in situ)} - \text{Peso Relativo del Ovario Extirpado}}{\text{Peso Relativo del Ovario Extirpado}} \times 100$$

Análisis Estadístico

A los datos del número de ovocitos liberados y de los porcentajes de OC y HCO, se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; el peso corporal y el peso relativo de los ovarios, se analizaron con Análisis de Varianza Simple de una vía. En los casos de la comparación entre medias y medianas de dos grupos, se utilizó la prueba de t de *Student* o la U de Mann-Whitney, según el caso. Se consideraron estadísticamente significativas todas aquellas diferencias iguales o menores a la $p < 0.05$.

RESULTADOS

El número total de días transcurridos desde el día en que se llevó a cabo la hemicastración hasta el día de autopsia fue similar entre los grupos con hemiovariectomía derecha (HX-D) o hemiovariectomía izquierda (HX-I) (HX-D: 12.5 ± 1.2 días vs HX-I: 12.3 ± 1.0 días), siendo 12.4 ± 1.1 el promedio de días transcurridos para los animales utilizados en el presente estudio.

No se encontraron diferencias significativas en el peso corporal promedio de los animales al momento de la HX-D o HX-I y al momento de la autopsia por lo que, al no modificarse el peso corporal de los animales, los pesos de los ovarios se expresarán en términos de peso relativo en los análisis pertinentes (Tabla 1).

Tabla 1. Media±e.e.m del peso corporal (g) de los animales sometidos a hemicastración (HX) del ovario izquierdo (<i>OD in situ</i>) o del derecho (<i>OI in situ</i>), que después de presentar al menos tres ciclos estrales regulares de cuatro días, fueron sometidos a una microinyección con 20 µL de una solución de SCH 23390 (5 µg/µL) o su vehículo (NaCl 0.9%). Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del siguiente estro observado.		
HX	Peso Corporal el Día de la HX (g)	Peso Corporal el Día de la Autopsia (g)
Ovario Izquierdo (N=32): <i>OD in situ</i>	212.43±1.7	216.50±6.0
Ovario Derecho (N=32): <i>OI in situ</i>	210.68±1.8	214.62±6.2

Ovulación Espontánea del Ovario Extirpado

En el presente estudio se observó una diferencia significativa en el número de ovocitos liberados entre ambos ovarios; el OD ovuló más ovocitos que el OI, pero no se observaron diferencias significativas en el peso relativo entre los ovarios extirpados en la mañana del estro vaginal en todos los animales hemicastrados (Tabla 2).

Tabla 2. Mediana±e.e.m. del número de ovocitos liberados y media±e.e.m. del peso relativo del ovario extirpado (mg/100 g de peso corporal) en los animales que fueron hemiovariectomizados en la mañana del estro, luego de presentar al menos tres ciclos estrales regulares de cuatro días de duración, que posteriormente fueron destinados a recibir una microinyección 20 µL de una solución de SCH 23390 (5 µg/µL) o su vehículo (NaCl 0.9%).		
Hemiovariectomía	Número de Ovocitos Liberados	Peso del Ovario Extirpado
Ovario Izquierdo (N=32)	4.9±0.1	16.9±0.5 mg/100g
Ovario Derecho (N=32)	6.3±0.1*	16.1±0.4 mg/100g
*p< 0.0001 comparado con el ovario izquierdo (U de Mann-Whitney)		

Ovulación del Ovario *in situ* Luego de la Microinyección de SCH-23390

Comparado con su respectivo grupo testigo, se observó una tendencia general a la disminución en el número de ovocitos liberados por el ovario *in situ* en los grupos tratados con el antagonista dopaminérgico (SCH-23390 (N=32): 10.6±0.5 ovocitos vs NaCl 0.9%: 13.3±0.4 ovocitos; p<0.0001, U de Mann-Whitney), que se mantiene cuando se compara respecto al ovario que permanece *in situ* (OD *in situ* + SCH-23390 (N=16): 10.6±0.6 ovocitos

vs OD *in situ* + NaCl 0.9% (N=16): 13.7 ± 0.5 ovocitos; OI *in situ* + SCH-23390 (N=16): 10.6 ± 0.8 ovocitos vs OI *in situ* + NaCl 0.9% (N=16): 12.9 ± 0.6 ovocitos; $p < 0.001$ OD *in situ* y $p < 0.03$ OI *in situ*, respectivamente; U Mann-Whitney).

El análisis de la ovulación espontánea respecto al día del ciclo estral en que se realizó la microinyección del antagonista dopaminérgico, mostró algunos cambios que dependieron del día del tratamiento. Aparentemente, en el diestro-1 se presentó una disminución neta en el número de ovocitos liberados por el ovario respecto a otros días del ciclo (diestro-1 (N=8): 7.9 ± 1.0 ovocitos vs estro (N=8): 11.8 ± 0.5 ovocitos y proestro (N=8): 12.1 ± 0.6 ovocitos; $p < 0.05$ prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn). No se observaron cambios entre los grupos tratados con el vehículo en ninguno de los días del ciclo estral pero la ovulación neta en el grupo con microinyección del antagonista en el diestro-1 es baja respecto a todos los grupos con vehículo (diestro-1 (N=8): 7.9 ± 1.0 ovocitos vs NaCl 0.9% en estro (N=8): 13.5 ± 0.5 , diestro-1 (N=8): 13.0 ± 0.9 , diestro-2 (N=8): 13.3 ± 0.7 , proestro (N=8): 13.4 ± 0.9 ovocitos; $p < 0.05$ prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

El análisis de los efectos de la microinyección del antagonista respecto al día ciclo estral y al ovario que permanece *in situ*, no mostró diferencias significativas en la ovulación espontánea entre los grupos, pero si una clara tendencia a la disminución de la cuota ovulatoria en el grupo con microinyección del antagonista en el diestro-1 cuando se compara contra todos los grupos con vehículo (OI *in situ* + SCH-23390 (N=4): 7.5 ± 1.4 ovocitos vs OI *in situ* + NaCl (N=16): 12.9 ± 0.6 ; OD *in situ* + SCH-23390 (N=4): 8.3 ± 1.5 ovocitos vs OD *in situ* + NaCl (N=16): 13.6 ± 0.5 ; $p < 0.05$ prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn). Asimismo, solo cuando el ovario derecho permanece *in situ* en el grupo tratado con el antagonista en el diestro-2, mostró una caída en la cuota ovulatoria respecto a los grupos con vehículo (OD *in situ* + SCH-23390 (N=4): 10.3 ± 0.5 ovocitos vs OD *in situ* + NaCl (N=4): 14.0 ± 0.5 ; $p < 0.05$ prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn) (Tabla 3).

De manera global e independientemente del ovario que permaneció *in situ*, se registró un retraso en la aparición del estro vaginal únicamente en los grupos tratados con SCH-23390 en el diestro-1, es decir el signo histológico del estro, se retrasó un día (Tabla 3).

Tabla 3. Mediana $\pm$ e.e.m. del número de ovocitos liberados y media $\pm$ e.e.m. de la duración del ciclo estral (días) de las ratas hemiovariectomizadas que presentaron un patrón regular de ciclicidad vaginal y que recibieron una microinyección 20 μ L de una solución de SCH 23390 (5 μ g/ μ L) o su vehículo (NaCl 0.9%) a las 13:00 h del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro.

Ovario <i>In Situ</i>	Grupo Experimental	Número de Ovocitos Liberados		Duración del Ciclo Estral (días)	
		Vehículo	SCH-23390	Vehículo	SCH-23390
Izquierdo	MIB en estro	13.5 $\pm$ 0.6	11.8 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
	MIB en diestro-1	13.0 $\pm$ 1.2	7.5 $\pm$ 1.4*	4.0 $\pm$ 0.0	5.0 $\pm$ 0.0**
	MIB en diestro-2	12.5 $\pm$ 1.2	10.8 $\pm$ 1.9	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
	MIB en proestro	12.7 $\pm$ 1.7	12.3 $\pm$ 1.0	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
Derecho	MIB en estro	13.5 $\pm$ 1.0	11.8 $\pm$ 0.9	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
	MIB en diestro-1	13.0 $\pm$ 1.6	8.3 $\pm$ 1.5	4.0 $\pm$ 0.0	5.0 $\pm$ 0.0**
	MIB en diestro-2	14.0 $\pm$ 0.5	10.3 $\pm$ 0.5*	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
	MIB en proestro	14.0 $\pm$ 1.1	12.0 $\pm$ 0.7	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0

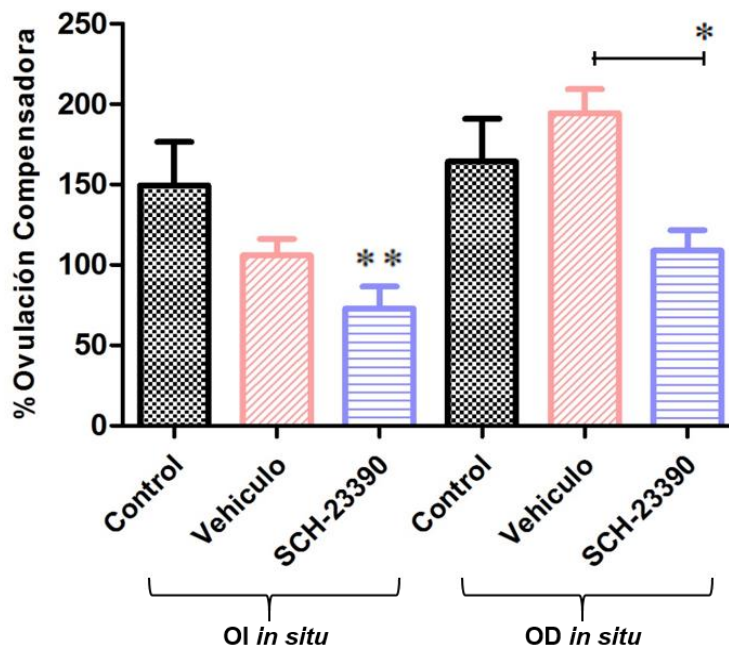
*p<0.03 comparado con su vehículo, U de Mann-Whitney; **p<0.001 vs todos; Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Ovulación Compensadora (OC) del Ovario *in situ*

El porcentaje de OC entre los ovarios que permanecen *in situ* fue semejante entre los dos grupos de animales cíclicos intactos hemicastrados del OI o del OD (grupo control HX) (OI *in situ* (N=10): 149.5 $\pm$ 27.2% vs OD *in situ* (N=10): 164.4 $\pm$ 26.6% ns).

Al comparar la OC entre los ovarios *in situ* de los grupos con el vehículo, el OD *in situ* desarrolló un mayor porcentaje de OC respecto al OI (OD *in situ* (N=16): 194.4 $\pm$ 14.9% vs OI *in situ* (N=16): 105.9 $\pm$ 10.1; p<0.001, U de Mann-Whitney). Sin embargo, el incremento de la OC del OD parece depender de la fase del ciclo ovárico, ya que solo en la fase folicular el incremento es notoriamente significativo respecto a los grupos tratados con el antagonista (SCH-23390 (N=8): 113.9 $\pm$ 11.1% vs. NaCl 0.9%: 215.6 $\pm$ 12.7%; p<0.01, U de Mann-Whitney).

Por tanto, de manera general y sin tomar en cuenta el día del ciclo en que se realizó la microinyección del antagonista dopaminérgico, solo cuando el OD permanece *in situ* se observa una disminución en el grado de OC comparado con su grupo testigo (OD *in situ* + SCH-23390 (N=16): $108.8 \pm 12.9\%$ vs NaCl 0.9% (N=16): $194.4 \pm 14.9\%$, $p < 0.001$, U de Mann-Whitney). No se encontraron diferencias en el grado de OC del OI (OI *in situ* + SCH-23390 (N=16): $72.9 \pm 13.6\%$ vs NaCl 0.9% (N=16): 105.9 ± 10.1 , ns) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Media $\pm$ e.e.m del porcentaje de ovulación compensadora del ovario *in situ* de las ratas hemiovariectomizadas que al presentar un patrón regular de ciclicidad vaginal, fueron sometidas a una microinyección dentro de la bursa ovárica (MIB) con 20 μ L de una solución de SCH 23390 (5 μ g/ μ L) disuelto en NaCl 0.9% (Vehículo) (* $p < 0.001$ comparado con su vehículo; ** $p < 0.05$ comparado con los grupos control; prueba de U de Mann-Whitney).

En concordancia con los datos de la ovulación espontánea del ovario que permanece *in situ*, la OC se encuentra disminuida solo en el grupo de los animales que recibieron la microinyección del antagonista en el diestro-1 (SCH-23390 (N=8): $42.9 \pm 19.2\%$ vs NaCl 0.9% (N=8): $136.5 \pm 28.2\%$; $p < 0.01$, U de Mann-Whitney), respecto a los animales tratados en los otros días del ciclo.

Al analizar la OC del ovario que permanece *in situ* respecto al día del ciclo estral en que se realizó la microinyección de SCH-23390, en el grupo tratado en el diestro-1 se observó una caída significativa en la OC del OI *in situ* (OI *in situ* + SCH-23390 (N=4): $20.3 \pm 23.9\%$ vs OI *in situ* + NaCl 0.9% (N=4): $101.8 \pm 22.2\%$; $p < 0.05$, U de Mann-Whitney).

Por otra parte, en el día del diestro-2 se observó una disminución en el grado de OC cuando el OD permanece *in situ* (OD *in situ* + SCH-23390 (N=4): 107.0±9.6% vs OD *in situ* + NaCl 0.9% (N=4): 218.8±14.5%, $p<0.05$, U Mann-Whitney) (Tabla 4).

Tabla 4. Media±e.e.m del porcentaje de ovulación compensadora mostrada por las ratas hemiovariectomizadas que luego de presentar un patrón regular de ciclicidad vaginal fueron sometidas a una microinyección dentro de la bursa ovárica (MIB) con SCH-23390 disuelto en NaCl 0.9% (Vehículo) a las 13:00 h del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro.			
Ovario <i>In Situ</i>	Grupo Experimental	Ovulación Compensadora (porcentaje)	
		Vehículo	SCH-23390
Izquierdo	MIB en estro	118.5±14.2	98.0±14.0
	MIB en diestro-1	101.8±22.2	20.3±23.9*
	MIB en diestro-2	90.8±24.9	75.7±34.4
	MIB en proestro	112.7±24.0	97.5±20.6
	Control	149.5±27.1	
Derecho	MIB en estro	175.0±26.3	141.7±30.2
	MIB en diestro-1	171.2±49.0	65.5±28.5
	MIB en diestro-2	218.7±14.4	107.0±9.6*
	MIB en proestro	212.5±23.1	120.7±21.1
	Control	164.3±26.6	
*p<0.05, comparado con su vehículo, U de Mann-Whitney.			

Peso Relativo del Ovario *in situ*

El peso relativo del ovario que permaneció *in situ* en los grupos tratados con SCH-23390 fue relativamente bajo respecto al peso del ovario *in situ* de los grupos testigo (SCH-23390 (N=32): 21.3±0.4 mg/100 g vs. NaCl 0.9% (N=32): 23.1±0.6; $p<0.05$, prueba de t de Student). Aparentemente, este descenso del peso promedio de la gónada remanente es resultado del incremento del peso del OI *in situ* en el grupo testigo respecto al peso de la gónada remanente en los grupos tratados con el antagonista (OI *in situ* + NaCl 0.9% (N=16): 24.2±0.7 vs OI *in situ* +SCH 23-390 (N=16): 20.8±0.5 o OD *in situ* + SCH 23390 (N=16): 21.9±0.7; $p<0.05$, ANOVA seguido de la prueba de Tukey). Sin embargo, el análisis puntual del peso relativo del ovario que permaneció *in situ* respecto al día del ciclo estral en que se administró el antagonista, no reveló diferencias (Tabla 5).

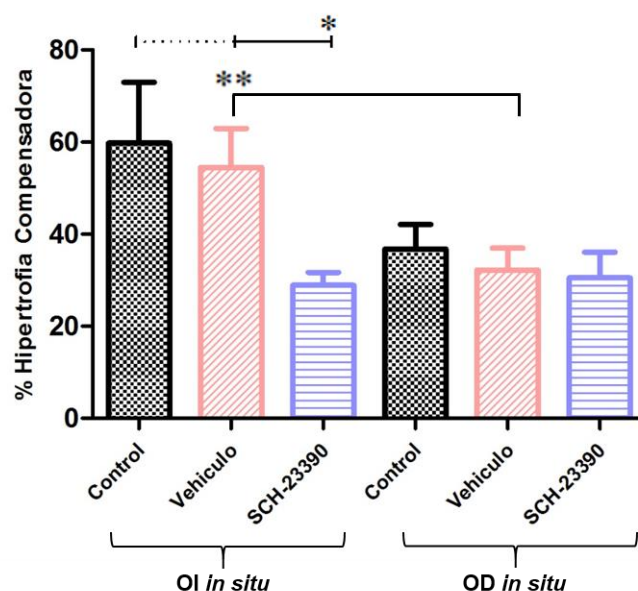
Tabla 5. Media $\pm$ e.e.m. del peso relativo del ovario *in situ* de las ratas hemiovariectomizadas que presentaron un patrón regular de ciclicidad vaginal luego de ser sometidas a una microinyección dentro de la bursa ovárica (MIB) con 20 μ L de una solución de SCH 23390 (5 μ g/ μ L) disuelto en NaCl 0.9% (Vehículo) a las 13:00 h del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro.

Ovario <i>In Situ</i>	Grupo Experimental	Peso relativo (mg/100g)	
		Vehículo	SCH 23390
Izquierdo	MIB en estro	24.3 $\pm$ 0.8	20.9 $\pm$ 1.4
	MIB en diestro-1	24.3 $\pm$ 0.9	20.7 $\pm$ 0.8
	MIB en diestro-2	24.1 $\pm$ 0.9	20.6 $\pm$ 0.4
	MIB en proestro	23.9 $\pm$ 2.2	20.0 $\pm$ 1.2
Derecho	MIB en estro	24.7 $\pm$ 1.5	22.6 $\pm$ 0.6
	MIB en diestro-1	21.0 $\pm$ 0.8	20.7 $\pm$ 0.2
	MIB en diestro-2	22.4 $\pm$ 2.1	23.5 $\pm$ 2.7
	MIB en proestro	19.8 $\pm$ 2.0	20.1 $\pm$ 0.9

Hipertrofia Compensadora del Ovario (HCO) *in situ*

En un animal hemicastrado sin tratamiento (Grupo Control) el grado de HCO que desarrolla el OI es aparentemente mayor a la que desarrolla el OD (OI *in situ* (N=10): 59.8 $\pm$ 13.2% vs OD *in situ* (N=10): 36.8 $\pm$ 5.3%, ns). Sin embargo, el grado de HCO en el grupo testigo con OI *in situ* fue significativamente mayor comparado con el testigo con OD *in situ* (OI *in situ* + NaCl 0.9% (N=16): 54.5 $\pm$ 8.4% vs OD *in situ* + NaCl 0.9% (N=16): 32.2 $\pm$ 4.7%; $p < 0.05$, U de Mann-Whitney), lo que revela un comportamiento asimétrico en el grado de HCO que depende del ovario que permanece *in situ* (HCO OI *in situ* (N=26): 56.5 $\pm$ 7.1% vs OD *in situ* (N=26): 34.0 $\pm$ 3.5%; $p < 0.01$, U de Mann-Whitney) (Gráfica 2).

Por otra parte, de manera general, el grado de HCO que desarrolla la gónada izquierda es significativamente menor en los grupos tratados con el antagonista respecto a control y al testigo. (SCH-23390 (N=16): 28.9 $\pm$ 2.8% vs NaCl 0.9% (N=16): 54.5 $\pm$ 8.4%; $p < 0.005$, U de Mann-Whitney). Estos cambios no se observaron cuando el OD permaneció *in situ* (SCH-23390 (N=16): 30.5 $\pm$ 5.6% vs NaCl 0.9% (N=16): 32.2 $\pm$ 4.7%, ns) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Media $\pm$ e.e.m. del porcentaje de hipertrofia compensadora del ovario *in situ* de las ratas hemiovariectomizadas que al presentar un patrón regular de ciclicidad vaginal fueron sometidas a una microinyección dentro de la bursa ovárica (MIB) con 20 μ L de una solución de SCH 23390 (5 μ g/ μ L) (disuelto en NaCl 0.9%: vehículo) (* p <0.05 comparado con su grupo vehículo y control; Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; ** p <0.05 comparado con el grupo testigo con OD *in situ*; Prueba U de Mann-Whitney).

Sin embargo, al tomar en cuenta el día del ciclo estral en que se realizó la microinyección del antagonista y el ovario que permanece *in situ*, no se encontraron diferencias significativas en el grado de HCO entre los diferentes grupos (Tabla 6).

Tabla 6. Media $\pm$ e.e.m. del porcentaje de hipertrofia compensadora del ovario <i>in situ</i> de las ratas hemiovariectomizadas con un patrón regular de ciclicidad vagina tras el cual fueron sometidas a una microinyección dentro de la bursa ovárica (MIB) con 20 μ L de una solución de SCH 23390 (5 μ g/ μ L) (disuelto en NaCl 0.9%: vehículo) a las 13:00 h del Estro, Diestro-1, Diestro-2 o Proestro.			
Ovario In Situ	Grupo Experimental	Hipertrofia Compensadora (porcentaje)	
		Vehículo	SCH-23390
Izquierdo	MIB en estro	51.7 $\pm$ 13.3	28.62 $\pm$ 8.7
	MIB en diestro-1	45.3 $\pm$ 6.9	28.9 $\pm$ 5.6
	MIB en diestro-2	46.7 $\pm$ 8.6	28.6 $\pm$ 5.2
	MIB en proestro	74.3 $\pm$ 30.6	29.6 $\pm$ 4.1
	Control	59.8 $\pm$ 13.1	
Derecho	MIB en estro	16.6 $\pm$ 4.4	29.3 $\pm$ 7.0
	MIB en diestro-1	26.0 $\pm$ 8.5	13.1 $\pm$ 4.5
	MIB en diestro-2	54.7 $\pm$ 8.8	57.4 $\pm$ 11.1
	MIB en proestro	31.4 $\pm$ 4.0	22.10 $\pm$ 8.4
	Control	36.8 $\pm$ 5.3	

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se utilizaron 64 ratas hembras adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días, que al momento de la hemicastración mostraron diferencias significativas en el número de ovocitos entre los ovarios extirpados; el ovario derecho ovuló 1.32 ovocitos más que el ovario izquierdo. Consistentemente, nuestra cepa de rata muestra este rasgo característico, ya que este resultado es semejante al reportado por Letras y colaboradores (2016), quienes mostraron que el ovario derecho de un animal cíclico intacto ovula prácticamente un ovocito más que el ovario contralateral. Según Domínguez y colaboradores (2003), estas diferencias pueden ser atribuidas a un control de la ovulación asimétrico intrínseco en la rata, ya que existen diferencias en la calidad y/o cantidad de fibras nerviosas que inervan a cada ovario (Klein y Burden, 1988; Toth et al, 2007).

Los resultados del presente trabajo muestran una tendencia general a la disminución en el número de ovocitos liberados en los animales tratados con el antagonista dopaminérgico del receptor DA-1, independientemente del ovario que permanece *in situ*. Nuestros datos son parcialmente semejantes a los reportados por Letras y colaboradores (2016), quienes mostraron que si bien existe una disminución en número de ovocitos liberados tras la administración de sulpiride (antagonista dopaminérgico del receptor DA-2) en animales cíclicos hemicastrados, esta es significativa únicamente cuando es el OD el que permanece *in situ*, pero no cuando el que permanece *in situ* es el ovario contralateral. Aparentemente, el funcionamiento del receptor DA-2 acoplado a los mecanismos que conducen a la ovulación en el animal hemicastrado está lateralizado (Letras et al, 2016).

Por lo anterior y en relación con los resultados del antagonismo específico hacia el receptor DA-1, es probable que la diferencia entre la capacidad de respuesta ovulatoria del ovario remanente esté relacionada con alteraciones en las señales mediadas por el tipo de receptor dopaminérgico y que conducen a la modificación de los mecanismos que controlan la selección folicular y la ovulación. Sin embargo, para resolver este planteamiento aún es necesario realizar más estudios y profundizar sobre aspectos de las cascadas de señalización que se inducen cuando el receptor DA-1 o el receptor DA-2 son activados o bloqueados.

Por otro lado, independientemente del ovario extirpado, el presente estudio mostró que en los grupos tratados con SCH-23390 en el diestro-1, la presencia del estro vaginal se retrasó un día (aunque todos los animales ovularon en la mañana del siguiente estro vaginal)

lo mismo ocurre cuando el receptor DA-2 es antagonizado por sulpiride (Letras et al, 2016), y concuerda con lo mostrado en otros trabajos de nuestro grupo (Venegas et al, 2015). Queda por dilucidar que ocurre en esa fase del ciclo estral, donde aparentemente se están desarrollando eventos endocrinos, neuroendocrinos y/o nerviosos cruciales que participan en el control del ciclo estral, la secreción de gonadotropinas y la ovulación espontánea; en esta fase del ciclo estral u ovárico, los receptores dopaminérgicos del ovario parecen jugar un papel crítico en la regulación funcional del eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario.

De acuerdo con lo anterior, independientemente del ovario que permanece *in situ*, los datos muestran una disminución significativa en el número de ovocitos liberados en los grupos a los que se les administró el SCH-23390 en el día del diestro-1. Se ha sugerido que la unión de la dopamina al receptor DA-1 durante todo el diestro-1 es crucial para que el eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovario funcione correctamente y se induzca la ovulación espontánea en la madrugada del día de estro (Venegas et al, 2015).

Los hallazgos de nuestro grupo de investigación, señalan que el bloqueo de los receptores a la dopamina inducido por la microinyección local de diferentes antagonistas dopaminérgicos durante el diestro-1, afecta significativamente la ovulación espontánea al desfasar el ciclo estral, lo cual significa que las señales feedback de los esteroides sexuales no estarían ocurriendo al nivel central y con ello la secreción preovulatoria de las gonadotropinas estaría reprimida hasta que los estrógenos alcanzaran sus células blanco en el hipotálamo. El reemplazo hormonal de la señal hipotalámica con GnRH restableció la ovulación satisfactoriamente, pero los estrógenos solo lo hicieron de modo parcial; esto último abre todo un debate sobre las señales ováricas mediadas por la dopamina, aparentemente cruciales para que los receptores centrales a los estrógenos ejerzan sus efectos feedback positivos e induzcan la descarga preovulatoria de la GnRH (Venegas et al, 2015).

En otros trabajos, se ha descrito que la sección del nervio vago derecho realizada a las 13:00 h del diestro-1, resultó en un menor número de ovocitos liberados por el ovario denervado, lo que no se observó en los otros días del ciclo estral y pone de manifiesto la importancia de los mecanismos fisiológicos que se desarrollan en la etapa del diestro-1 y que conducen a una ovulación exitosa y normal (Bonilla-Ramírez, 2015).

De manera interesante, en este estudio se observó una clara asimetría en el grado de OC en los grupos testigo, tales asimetrías pudieran revelar sensibilidades diferentes entre

el OD y el OI en respuesta a estímulos químicos o mecánicos. En el caso del OD, la maniobra quirúrgica o el efecto del NaCl 0.9% condujo a un incremento de la OC, en tanto que el mismo procedimiento en el OI fue el opuesto.

Una de las posibles explicaciones que apoyan nuestras observaciones es la evidencia de que los ovarios son inervados de manera asimétrica (Gerendai y Halász, 2001; Gerendai et al, 1995; Klein y Burden, 1988). Un ejemplo de este hecho quedó de manifiesto cuando se analizó la incorporación del trazador retrógrado *True Blue* dentro de la bursa ovárica y su incorporación en las neuronas del ganglio celiaco en la rata adulta (Morán et al, 2005). En este trabajo se observó que la marca del trazador fue significativamente mayor cuando se inyectó en la bursa del OI comparado con la inyección en la del OD; además, la inyección de *True Blue* en el OD produjo un marcaje neuronal positivo en ambos lados del ganglio celiaco, mientras que inyectando en el OI las marcas en el ganglio fueron exclusivamente ipsilaterales.

Así mismo, Toth y colaboradores (2007) empleando trazadores virales mostraron que el OI envía más información nerviosa al SNC que el OD, pese a que años atrás Klein y Burden (1988) señalaban que el número de fibras nerviosas que recibe el OD es mayor que las del OI.

Al analizarse el grado de la OC respecto al día del ciclo estral en que se administró el antagonista dopaminérgico dentro de la bursa ovárica, tomando en cuenta el ovario que permanece *in situ*, se encontró una disminución significativa de la OC solo en el grupo de los animales que recibieron la microinyección del antagonista en el OI durante el diestro-1 y no así en el grupo tratado en el OD, de modo semejante a lo reportado por Letras y colaboradores (2016). En este trabajo, en el diestro-2 la caída en la OC ocurrió cuando se bloquearon los receptores DA-1 en el OD, lo cual permite sugerir la posibilidad de que los diferentes subtipos de receptor a la dopamina desempeñen papeles diferentes en determinadas etapas del ciclo estral, lo que ya ha sido mostrado en el animal entero por nuestro grupo de trabajo (Venegas et al, 2015).

Se sabe que durante el diestro-2, los estrógenos son capaces de ejercer el feedback positivo sobre la adenohipófisis, en el hipotálamo y otros centros cerebrales estimulando la liberación de LH (Karsch et al, 1997; Hoffman, 1973). Este aumento gradual en la secreción de LH se manifiesta en la noche como el evento preovulatorio, el cual ocurrió en todos los animales hemicastrados. Queda pendiente por analizar los cambios puntuales que afectan

la cuota ovulatoria o la OC en etapas determinadas del ciclo estral, como lo observado en los días del diestro.

Lo anterior nos lleva a plantear que el sistema dopaminérgico tiene una participación en la regulación de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la ovulación compensadora, dentro de estos mecanismos pueden estar involucrados la secreción de gonadotropinas, liberación de hormonas esteroideas ováricas, o bien el tipo de información neural que llega a los ovarios (Burden, 1985; Flores et al, 2011; Greenwald y Roy, 1994; Ojeda y Aguado, 1984).

Por otra parte, con respecto a las diferencias en el porcentaje de la HCO entre el OI y el OD de los grupos tratados con el vehículo, una vez más se pone de manifiesto la existencia de una asimetría en la capacidad de respuesta de los ovarios a las gonadotropinas propuesta por algunos investigadores y que pudiera estar relacionada con diferencias en la cantidad y/o calidad de la información nerviosa hacia cada gónada (Domínguez et al, 2003; Gerendai y Halász, 2001; Gerendai et al, 1995; Klein y Burden, 1988).

Se sabe que, tras la hemiovariectomía, se desarrolla una respuesta inmediata de la adenohipófisis hacia el déficit en la producción de inhibina ocasionada por la extirpación de gónada. Esto se ha interpretado como una disminución en la retroalimentación negativa llevada a cabo por parte de la inhibina y la adenohipófisis responde aumentando la liberación de FSH, lo que involucra el reclutamiento de una mayor cantidad de folículos ováricos y con ello el incremento del peso de la gónada (King et al, 1995).

Con base en esto último, los resultados del presente trabajo permiten sugerir que la integridad funcional del sistema dopaminérgico mediada por el receptor DA-1 estaría participando activamente en el control de la HCO ya que, en los grupos tratados con el antagonista específico, ocurrió una caída significativa en el peso de la gónada remanente.

Los resultados del presente estudio muestran que los mecanismos que regulan la respuesta del ovario tras el bloqueo del receptor DA-1 dependen del día del ciclo estral en que se realice la administración del antagonista, así como también de la gónada que permanece *in situ*.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que:

1. En la rata, existe una asimetría en la capacidad ovulatoria entre los ovarios: el ovario derecho ovula más que el izquierdo.
2. En diestro-1, la participación del receptor dopaminérgico tipo 1 en ambos ovarios es crucial para que se presente el estro vaginal y la ovulación espontánea en la mañana del estro esperado.
3. En los días del diestro-1 y diestro-2 el receptor dopaminérgico tipo 1 está directamente involucrado en el desarrollo de la ovulación compensadora del ovario *in situ* y su papel es asimétrico.
4. Existe una asimetría en la sensibilidad de los ovarios para el control de la hipertrofia compensadora del ovario que depende de la fase del ciclo ovárico en que el ovario es manipulado.

PERSPECTIVAS A FUTURO

Los resultados del presente trabajo contribuyen y fortalecen el conocimiento sobre el papel de la dopamina en la regulación de las funciones ováricas, especialmente en las relacionadas con la ovulación espontánea y en aquellos mecanismos que permiten el desarrollo de la ovulación compensadora. Sin embargo, aún falta por aclarar cuál es su papel en la regulación de otros procesos como el desarrollo, crecimiento y atresia folicular, o bien, abordar su análisis funcional en los procesos que controlan la secreción de hormonas sexuales y su influencia sobre la secreción de la GnRH y de gonadotropinas.

Además de este contexto neuroendocrino y endocrino, quedan pendientes muchas preguntas sobre los efectos del antagonismo específico de los receptores dopaminérgicos del ovario sobre los cambios bioquímicos y moleculares que serían modificados cuando se inhiben las funciones mediadas por la dopamina.

Por otra parte, los resultados de este trabajo también nos sugieren que algunas funciones del sistema dopaminérgico ovárico aparentemente se encuentran lateralizadas, por lo que sería interesante continuar analizando estos cambios en el modelo de animal hemicastrado y compararlo con lo que ocurre en el animal entero.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado, L. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech*, 59: 462-473.
- Akimoto, M., Selvaratnam, R., McNicholl, E., Verma, G., Taylor, S. y Melacini, G. (2013). Signaling through dynamic linkers as revealed by PKA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110:14231-14236.
- Arévalo, E., Flores, A., Cruz, M. y Domínguez, R. (2011). Efectos de la ovariectomía unilateral realizada en la mañana, tarde y noche del diestro-2 y proestro sobre la ovulación compensadora. La rata adulta como modelo de estudio. Tesis de licenciatura UNAM.
- Astwood, E. (1939). Changes in the weight and water content of the uterus of the normal adult rat. *Am J Physiol*, 126: 162-170.
- Bahena, T., Flores, J. y Arias, A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed* 11:39-60.
- Barajas, C., Coronel, I y Florán, B. (2015). Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging and Disease* 6 (5): 349-368.
- Beaulieu, J. y Gainetdinov, R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol Rev*, 63:182–217.
- Benítez, D. (2013). Respuesta ovulatoria a la denervación vagal y ovariectomía unilateral a las 17:00 h en cada etapa del ciclo estral de la rata adulta. Tesis de licenciatura UNAM.
- Bhattacharya, K. (2013). Ovulation and rate of implantation following unilateral ovariectomy in mice. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6(1):45-48.
- Bonilla-Ramírez, E., Ramírez-Téllez, J., Guzmán-Bárcenas, N., Pimentel-Martínez, K., Flores-Ramírez, A., Cruz-Beltrán, M.E. y Domínguez-Casalá, R. (2015). Efectos de la sección del nervio vago en los días del diestro a las 09:00 h o a las 13:00 h sobre la ovulación de la rata adulta con o sin hemiovariectomía unilateral. Memorias del LVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. San Miguel de Allende, Gto. Septiembre 6-10.
- Brucen, W., Husheh, S. y Dharmarajana, M. (2001). Patterns of apoptosis in the corpora lutea of the rat during the oestrous cycle, pregnancy and in vitro culture. *Reprod Fertil Dev* 13(2–3): 105–109.

- Burden, H. y Lawrence, I. (1978). Experimental studies on the acetylcholinesterase positive nerves in the ovary of the rat. *Anat Rec* 190: 233–242.
- Burden, H. (1978). Neural modulation of ovarian function. *TINS* 1: 85–86.
- Burden, H. (1985) The adrenergic innervation of mammalian ovaries. In: Ben, N., Bahr, J. y Weiner, R. (eds) Catecholamines as hormone regulators. Raven Press, New York, pp 261-278.
- Burden, H., Leonard, M., Smith, C. & Lawrence I. (1983). The sensory innervation of the ovary: A horseradish peroxidase study in the rat. *Anat Rec* 1983; 207: 623–627.
- Calka, J., McDonald, J. y Ojeda, S (1990). The innervation of the immature rat ovary. *J Reprod Fertil* 88: 475–479.
- Card, J., Rinaman, L. y Lynn, R (1993). Pseudorabies virus infection of the rat central nervous system: ultrastructural characterization of viral replication, transport, and pathogenesis. *J Neurosci* 13:2515-2539.
- Carral, F., Sillero, A. y Oliveira, G. (2001). Fisiología del sistema endocrina. En Torres, L. Tratado de Anestesia y Reanimación. Madrid: ARAN pag 634.
- Carvey, M. (1998). Drug action in the central nervous system. Ed. M.P. Carvey. New York: Oxford. Pp 214-225.
- Castro, S. y Strange, P. (1993). Coupling of D2 and D, dopamine receptors to Gproteins. *Febs letters*, 315 (3):223-226.
- Chávez, R., Cruz, M. y Dominguez, R. (1987). Differences in the ovulation rate of right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: effect of ipsi-and contralateral vagus nerves on the remaining ovary. *J Endocrinol* 113: 397-401.
- Clarke, I. y Pompolo, S. (2005). Synthesis and secretion of GnRH. *Animal Reproduction Science* 88 (2): 29-55.
- De la Fuente, R. y Epping, J. (2001). Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Developmental Biology* 229: 224–236.
- Demchyshyn, L., O'Dowd, B. y George, S. (2003). Structure of mammalian D1 and D5 dopamine receptors and their function and regulation in cells. En: Sidhu A, Laruelle M, Vernier P, eds. In: Dopamine Receptors and Transporters: Function, Imaging, and Clinical Implication. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Desai, N., Ludgin, J., Sharma, R., Anirudh, R. y Agarwal, A. (2014). Female and Male Gametogenesis. *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*, 43-62.
- Devoto, L., Fuentes, A., Kohen, P., Cespedes, P., Palomino, A., Pommer, R. y Munoz, S. (2009). The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertil Steril* 92(3): 1067–79.
- Dominguez, R., Morales, L. y Cruz, M. (2003). Ovarian Asymmetry. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 5: 95-104.
- Edson, M., Najaraja, A. y Matzuk, M. (2009). The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocrine Reviews* 30:624–712.
- Epping, J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122: 829–838.
- Erickson, G. (2012). Morphology and Physiology of the ovary. Endotext.
- Espey, L. (2005). Ovulation. p. 605-614. In: Knobil E. and Neill JD. (eds.). Encyclopedia of reproduction Vol. 3. Academic Press, USA.
- Flores, A., Velasco, J., Gallegos, A., Mendoza, F., Everardo, P., Cruz, M. y Domínguez, R. (2011). Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 34.
- Freeman, M. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Knobil E & Neill JD (Editors), *The Physiology of Reproduction*. 2nd edn. Raven Press Ltd., New York, 613-652.
- Freeman, M. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle in the rat. In: Physiology of reproduction. Knobil E y J Neil. 3 Ed. United States of America: Academic Press.
- García, F., Pedraza, C. y Navarro, J. (2005). Implicación de la dopamina en los procesos cognitivos del aprendizaje y la memoria. *Psic Biol*, 12(6): 232-236.
- Gerendai, I. y Halász, B. (2001). Asymmetry of the Neuroendocrine System. *News Physiol Sci* 2 (16): 92-95.
- Gerendai, I. (2004). New data on the neural control of gonadal functions. Supraspinal innervation of the gonads. *TMJ* 54 (3): 218-224.

- Gerendai, I., Csaba, Z., Voko, Z. y Csernus, V (1995). Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53 299–305.
- Gerendai, I., Rotsztejn, W., Marchetti, B., Kordon, C. y Scapagnini, U. (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neurosci Lett* 9: 333–336.
- Gerendai, I., Tóth, I. y Boldogkői, Z. (1998). Neuronal labelling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology* 68:244-56.
- Goldman, J., Murr, A. y Cooper, R. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth defects research* 80: 84-97.
- Goodman, R. y Keri, D. (1985). Modulation of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion by Ovarian Steroids in the Rat. *Biology of reproduction* 32: 217-225.
- Greenwald, G. y Roy, S. (1994). Follicular development and its control. In: Knobil, E.; Neill, JD., editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press; New York. p. 629-724.
- Guyton, A. y Hall, J. (2006). *Textbook of medical physiology*. 11th edition, Philadelphia: Elsevier Inc.
- Halbach, O. y Dermietzel, R. (2006). (2006) Neurotransmitters, in *Neurotransmitters and Neuromodulators: Handbook of Receptors and Biological Effects*, Second Edition, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Hazum, E. y Conn, M. (1988). Molecular Mechanism of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Action. I. The GnRH Receptor. *Endocr Rev* 9 (4): 379-386.
- Henao, G. y Trujillo, L. (2000). Establecimiento y desarrollo de la dominancia folicular bovina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 13 (2):108-120.
- Henao, G., Trujillo, L. y Maldonado, A. (2000). Liberación de hormonas hipofisarias y factores que la afectan durante el postparto bovino. *Revision. Rev Col Ciene Pee* 13: 46-56.
- Herbison, A. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature reviews endocrinology* 12: 452-466.

- Hickman, C. (2009). Principios Integrales de Zoología. McGrawHill: Madrid.
- Hill, R., Wyse, G y Anderson, M. (2006). Fisiología animal. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana: Madrid.
- Hoffman, J. (1973). Light and reproduction in the rat: Effects of photoperiod length on albino rats from two different breeders. *Biol Reprod* 2 (2): 255-261.
- Hubscher, C., Brooks, D. y Johnson, D. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry* 80(2): 79-87.
- Kandel, E., Schwartz, I. y Jessel, T. (1991). Principles of neural science. 3M. Ed., New York: Apleton and Lange p. 120-269.
- Karsch, F.J., Bowen, J.M., Caraty A., Evans, N.P. y Moenter, S.M. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod* 56(2):303-309
- Katt, J., Duncan, J., Herbon, L., Barkan, A. y Marshall, J. (1985). The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation determines the number of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrinology* 116 (5): 2113-2115.
- Keibarian, J. y Calne, D. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- Kim, C., Vigil, D., Anand, G y Taylor, S. (2006). Structure and dynamics of PKA signaling proteins. *Eur J Cell Biol*, 85:651-654.
- King, F., Britt, J., Esbenshade, K., Flowers, W. y Ireland, J. (1995). Evidence for a local role of inhibin or inhibin α subunits in compensatory ovarian hypertrophy. *Journal of reproduction and fertility*. 104:291-295.
- King, S., Campbell, A., Dille, E., Roser, J., Murphy, L. y Jones, K. (2005). Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domes Anim Endocrinol* 28(4): 405–415.
- Klein, S. y Burden, H. (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett* 85: 217–222.
- 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.
- Lee, S., So, C., Rashid, A., Varguese, G., Cheng, R., Lanca, A., Dowd, B. y George, S. (2004). Dopamine D1 and D2 Receptor Co-activation Generates a Novel Phospholipase C-mediated Calcium Signal. *The journal of biological chemistry*, 279 (34): 35671–35678.

- Leipheimer, R., Bona, A. y Gallo, R. (1986). Ovarian Steroid Regulation of Basal Pulsatile Luteinizing Hormone Release between the Mornings of Proestrus and Estrus in the Rat. *Endocrinology* 118 (5): 2083-2090.
- Letras, D., Handal, A., Diaz, A. y Moran, J. (2016). La *Sulpirida* reduce la ovulación compensadora pero incrementa la hipertrofia compensadora del ovario derecho en la rata hemi-ovariectomizada. *Revista de Sistemas Experimentales* 3 (7): 46-59.
- Letras-Luna, D. (2015). Estudio del bloqueo de farmacológico de los receptores dopaminérgicos sobre el ciclo estral y la ovulación en el modelo de la rata adulta hemicastrada. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Químicas, BUAP.
- Lohmiller, J. y Swing, S. (2006). Reproduction and breeding. *En*: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL (Ed.). *The Laboratory Rat*. 2nd. ed. New York, NY: Academic Press. pp. 147-162.
- Long, A. y Evans, M. (1922). The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif*, 6:1-148.
- López, C., Maselli, M., Di Nasso, F., Telleria, C. y Carón, R. (2011). Regulation of prolactin secretion during the estrus in rats: possible role of glucocorticoids. *Reproduction* 142(3):477-485.
- Magoffin, D. (2005). Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1344–1349.
- Malishevskaja, V. y Brindak, O. (1980). Formation of extraorganic ovarian nerves during the intrauterine period of human ontogeny. *Arkh Anat Gistol Embriol* 79 (12):95-9.
- Mandl, A. (1951). The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology*, 28: 576-584.
- Marques, P., Skorupskaite, K., Rozario, K., Anderson, R. y George, J. (2015). Physiology of GnRh and Gonadotropin Secretion. South Dartmouth: Endotex.
- Missale, C., Russel, S., Robinson, S, Jaber, M y Caron, M. (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological reviews*, 78 (1): 189-225.
- Mittwoch, V. (1975). Lateral asymmetry and gonadal differentiation. *Lancet* 1: 401–
- Moenter, S., Chu, Z. y Christian, C. (2009). Neurobiological mechanisms underlying oestradiol negative and positive feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone (gnrh) neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 21 (4): 327–333.

- Moore, K. y Agur, A. (2003). Fundamentos de anatomía. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Morán, C., Franco, A., Morán, J., Handal, A., Morales, L. y Domínguez, R. (2005). Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac-superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat. *Endocrine* 26: 147-152
- Morán, J.L. y Domínguez R. (1995). Effects of the unilateral implant of haloperidol at the preoptic-anterior hypothalamic area, ovulation. *Endocrine* 3:399-401.
- Morán, J.L. y Domínguez R. (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.
- Nance, D., Burns, J., Klein, C. y Burden, H. (1988). Afferent fibers in the reproductive system and pelvic viscera of female rats: Anterograde tracing and immunocytochemical studies. *Brain Res Bull* 21: 701–709.
- Neve, K., Jeremy, K. y Heather, T. (2004). Dopamine Receptor Signaling. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 24(3): 165-205.
- Obeagu, E. y Obeagu, G. (2016). A review on haematological profile in menstruating, pre-menopausal and menopausal women. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 3 (11): 92-108.
- Ojeda, S. y Aguado, L. (1984). Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology* 114: 1944–1946.
- Ojeda, S. y Urbanski, H. (1994). Puberty in the rat. In *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. (E. Knobil and J. D. Neill, eds.), pp. 363–409, Raven Press, New York.
- Oktem, O y Oktay, K. (2008). The Ovary: Anatomy and Function throughout Human Life, *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1127: 1–9.
- Peaston, R. y Weinkove, C. (2004). Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem* 41: 17-38.
- Peppler, R. (1971). Effects of unilateral ovariectomy on follicular development and ovulation in cycling aged rats. *Am J Anat*, 132:423-7.

- Pérez, A. (2012). Concentración sérica de progesterona y 17 B-estradiol como resultado de la sección del nervio vago a las 09:00 H en cada etapa del ciclo estral de la rata adulta con o sin ovariectomía unilateral. Tesis de licenciatura: UNAM.
- Prieto, B., Panigua, M. y Velázquez, M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev Fac Med UNAM* 45 (6): 252-257.
- Queenan, J. (2007). The Menstrual Cycle. In: Lewis V. Reproductive Endocrinology and Infertility. Texas: Landes Bioscience, 3-9.
- Rangel, C., Coronel, I. y Floran, B. (2015). Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging and disease* 6(5):349-368.
- Rey-Ares, V., Lazarov, N., Berg, D., Berg, U., Kunz, L. y Mayerhofer, A. (2007). Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 5:40.
- Richards, J. (2007). Genetics of ovulation. *Semin Reprod Med*, 25(4):235-42.
- Rodler, D., Stein, K y Korbel, R. (2015). Observations on the right ovary of birds of prey: a histological and immunohistochemical study. *Anat. Histol. Embryol* 44:168–177.
- Ross, M. y Pawlina, W. (2007). Histología. Texto y Atlas color con Biología celular y molecular. 5ta edición. Estados Unidos: Editorial Medica Panamericana.
- Russo, G. y Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. *InVet*, 8(1): 183-204.
- Sengupta, P., Chaudhuri, P. y Bhattacharya, K. (2013). Screening Obesity by Direct and Derived Anthropometric Indices with Evaluation of Physical Efficiency Among Female College Students of Kolkata. *Annals of Medical and Health Sciences Research*, 3(4): 517–522.
- Setchell, B. (2002). Innervation and vasculature of the excurrent duct system. In: Robaire B, Hinton B, editors. The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice, London: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, p. 35-48.
- Simerly, R. (2002). Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain *Annu Rev Neurosci* 25: 507-536.
- Souza, U. (2010). Gene and Promoter Structures of the Dopamine Receptors. En: Neve, K. *The Dopamine Receptors, 2nd Edition*, New York: Humana Press.

- Spano, P., Govoni, S y Trabucchi, M. (1978). Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19:155-165.
- Speed, N. (2010). The role of insulin signaling on dopamine transporter trafficking. Tesis de Doctorado. Universidad de Vanderbilt.
- Sporrang, B., Meshari, A. y Ouman, C.(1991). Innervation of the ovary. In: Familiari G., Makabe, S. y Motta, P. Ultrastructure of the Ovary. Dordrecht/Norwell: Kluwer Academic Publishers 255–271.
- Stouffer, R. (2003). Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. *Human Reproduction Update*, 9 (2): 99-117.
- Stouffer, R. (2006). Structure, function, and regulation of the corpus luteum. Pp 475-496. In: Knobil E y J Neil. Physiology of Reproduction. (ed.)3 ed., United States of America: Academic Press.
- Sunahara, R. y Taussig, R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv*, 2:168-184.
- Tesmer, J., Sunahara, R., Gimian, A. y Sprang, S. (1997). Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science*, 278:1907-1916.
- Toledano, G. (2005). El hipotálamo: su complejidad morfológica y su capacidad para dirigir los sistemas reguladores del organismo. Monografía XVIII. Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: Patologías. Madrid, España.
- Tomac, J., Cekinov, J. y Arapovi, J. (2011). Biology of the corpus luteum. *Periodicum biologorum* 113 (1): 43–49.
- Toth, I., Wiesel, O., Boldogkoi, Z., Balint, K., Tapasztai, Z. y Gerendai, I. (2007). Predominance of supraespal innervation of the left ovary. *Microsc ResTech* 70:710-718.
- Trantham, H., Neely, L., Lavin, A. y Seamans, J. (2004). Mechanisms Underlying Differential D1 versus D2 Dopamine Receptor Regulation of Inhibition in Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 24:10652–10659.
- Tresguerres, J. y Castillo, C. (2012). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En: Fisiología Humana. Eds. Tresguerres, J. España: McGraw-Hill / Interamericana.

- Trujillo, R., Flores, G. y Montañol, J. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed*, 11:39-60.
- Tsafiriri, A. y Adashi, E (1994). Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: Knobil E and Neill JD, Eds. *The Physiology of Reproduction*, second ed. New York: Raven Press, 817–860.
- Unglaub, S. (2013). *Human Physiology. An integrated Approach 6th Edition*. Glenview, IL: Pearson Education, Inc. Pp. 850-890.
- Venegas, B., Padilla, F., Juárez, C., Morán, J., Morán, C., Rosas, N., Handal, A & Domínguez, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*, 50 (3):783–796.
- Wang, C., Hsueh, A. y Erickson, G. (1981). Direct inhibition of estrogen production in rat granulosa cells by prolactin. En Schwartz, N y Hunzicker, M. *Dynamics of ovarian function*. Raven Press: New York.
- Westwood, F. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic pathology* 36: 375-384.
- Yen, S. (2001). Neuroendocrinología de la reproducción. p. 31-85. En: Yen, S.S.C., Jaffe, R.B. y Barbier, R.L. (eds.). *Endocrinología de la Reproducción -Fisiología, fisiopatología y manejo clínico-* Editorial Panamericana. 4ª Ed. Argentina.
- Yoshinaga T, Sellix M, Pzuk P y Menaker M. 2009. Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropinas. *Endocrinology*, 150(9): 4338-4347.
- Zeng, C y Jose, A. (2011). Dopamine Receptors: Important Antihypertensive Counterbalance Against Hypertensive Factors. *Hypertension* 57(1): 11–17.