

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

INSTITUTO DE CIENCIAS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DEL
OVARIO EN LA REGULACIÓN DEL CICLO OVÁRICO DE LA RATA**

ADULTA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS EN EL ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

PRESENTA

M. en C. BERENICE VENEGAS MENESES

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Roberto Domínguez Casalá
UIBR FES-Zaragoza UNAM

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta
Centro de Química- ICUAP

PUEBLA, PUE.

JUNIO 2015



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dra. Carolina Moran Raya, Dra. Leticia Morales Ledesma, Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández, Dra. María Esther Cruz Beltrán, Dr. José Luis Morán Perales y Dr. José Gustavo López y López, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada "Participación de los receptores dopaminérgicos del ovario en la regulación del ciclo ovárico de la rata adulta", que presenta la M.C. Berenice Venegas Meneses para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintinueve días del mes de mayo del año dos mil quince.

ATENTAMENTE

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dra. Carolina Moran Raya

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dr. José Luis Morán Perales

Dr. Gustavo López y López



Of. No. PCQ/176/15

Mtro. José Juan Morales Rodríguez
Director de Administración Escolar, BUAP
P R E S E N T E

Por este conducto, con atención me dirijo a usted para solicitarle tenga a bien autorizar la elaboración y expedición del Acta de Examen Profesional de Doctorado de la alumna M.C. Berenice Venegas Meneses, quien defenderá la Tesis titulada "Participación de los receptores dopaminérgicos del ovario en la regulación del ciclo ovárico de la rata adulta" el día 16 de junio del presente año a las 12:00 horas en el Auditorio del Centro de Química del ICUAP, estando integrado el jurado del examen por los siguientes sinodales:

| | |
|---|--------------|
| Dra. Lourdes Millán Pérez Peña | (Presidente) |
| Dra. Carolina Morán Raya | (Secretaria) |
| Dra. Leticia Morales Ledesma | (Vocal) |
| Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández | (Vocal) |
| Dra. María Esther Cruz Beltrán | (Vocal) |

Agradeciendo su atención al presente, reitero a usted la seguridad de mi consideración.

ATENTAMENTE

"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 2 de junio de 2015

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta
Secretaria Académica



c.c.p. Archivo
DRA'NHRS/llh*

Posgrado en Ciencias Químicas
Facultad de Ciencias Químicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC7,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 7397
posgrado.quimica@correo.buap.mx

**“PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS
DEL OVARIO EN LA REGULACIÓN DEL CICLO OVÁRICO DE LA
RATA ADULTA”**





**“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota”**

Madre Teresa de Calcuta

“Ten en cuenta que el gran amor y los grandes logros requieren de grandes riesgos”

Dalai Lama

ÍNDICE

| | |
|---|-------------|
| AGRADECIMIENTOS | I |
| ABREVIATURAS | VI |
| RESUMEN..... | VIII |
| ABSTRACT..... | X |
| I. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 Anatomía del ovario..... | 1 |
| 1.2 Estructura, crecimiento y funciones de los folículos ováricos..... | 3 |
| 1.3 Ovulación | 9 |
| 1.4.1 Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)..... | 10 |
| 1.4.2 Gonadotropinas | 12 |
| 1.4.3 Hormonas secretadas por los ovarios | 14 |
| 1.5 Ciclo reproductivo..... | 17 |
| 1.6 La inervación ovárica como parte del sistema regulador de las funciones del órgano ovulación y secreción de hormonas | 20 |
| 1.7 Las catecolaminas en el ovario | 23 |
| II. JUSTIFICACIÓN | 26 |
| III. HIPÓTESIS..... | 28 |
| IV. OBJETIVO GENERAL | 28 |
| V. OBJETIVOS PARTICULARES | 28 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| 6.1 Diagrama de trabajo | 29 |
| 6.2 Sujetos de experimentación..... | 30 |
| 6.3 Registro del Ciclo Estral | 30 |
| 6.4 Procedimiento quirúrgico | 30 |
| 6.5 Preparación de los fármacos..... | 31 |
| 6.6 Preparación de Hormonas | 32 |
| 6.7 Procedimiento de Autopsia..... | 32 |
| 6.8 Reemplazo hormonal en animales tratados con antagonistas dopaminérgicos... 33 | |
| 6.9 Cuantificación de hormonas esteroides en suero estrógenos y progesterona | 33 |
| 6.10 Determinación de la presencia de TH, DBH, y DARPP-32 en los ovarios por inmunohistofluorescencia | 34 |
| 6.11 Determinación de ARNm de P450 aromatasas en ovario | 35 |
| 6.12 Análisis estadístico de los resultados | 36 |
| VII. RESULTADOS | 37 |
| 7.1 Efectos del éter como anestésico en ratas con operación simulada o con inyección de vehículo en la bursas ováricas sobre la ovulación..... | 37 |
| 7.2 Efectos de la administración sistémica de antagonistas dopaminérgicos sobre la ovulación..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 7.3 Efectos de la inyección de antagonistas dopaminérgicos DA-1 y DA-2 dentro de las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral sobre la ovulación..... | 38 |
| 7.4 Efectos en la ovulación espontánea de los animales con inyección de antagonistas dopaminérgicos DA-1 o DA-2 dentro de las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral sobre la ovulación..... | 41 |
| 7.5 Efectos de la administración de GnRH o BE en ratas con bloqueo de la ovulación por la inyección de antagonistas dopaminérgicos | 41 |
| 7.6 Efectos de la administración de GnRH o BE en ratas con bloqueo de los receptores dopaminérgicos DA1 o DA2 sobre la ovulación | 49 |
| 7.7 Variación de las hormonas esteroides estradiol y progesterona, en el estro esperado de los animales no ovulantes con bloqueo de los receptores dopaminérgicos ováricos..... | 53 |
| 7.8 Efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos ováricos DA1 y DA2 en el estro y diestro-1 sobre la presencia de tirosina hidroxilasa, dopamina β hidroxilasa y la proteína fosforilada DARPP-32 en el ovario..... | 56 |
| 7.9 Efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del diestro-1 en el desarrollo folicular | 63 |
| 7.10 Efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos en el ovario a las 13:00 h del diestro-1 sobre el nivel del ARNm del citocromo P450 aromatasa de ovario al día del estro esperado. | 64 |
| VIII. DISCUSIÓN | 66 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 72 |
| X. REFERENCIAS..... | 73 |
| XI. ANEXOS | 88 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura anatómica típica del ovario de los mamíferos. El ovario consta de una médula por la que transcurren vasos sanguíneos y nervios que conectan con los compartimentos funcionales de la corteza ovárica: folículos, cuerpos lúteos y tejido intersticial (Modificado de Yen y cols., 1999)..... | 2 |
| Figura 2. Factores involucrados en la progresión de la foliculogénesis y oogénesis. Varios factores promueven o inhiben el crecimiento folicular. FSH: hormona folículo estimulante; FIG: factor de la línea germinal; GDF: factor de crecimiento y diferenciación; MIS: sustancia de inhibición antimulleriana. Modificado de Yen, 2009. | 3 |
| Figura 3. Estructura del folículo secundario. Tomado de Ross, Michael H 2007. | 4 |
| Figura 4. Reclutamiento y diferenciación de las células tecales. Se sugiere que las células madre tecales residen en el estroma del ovario y son reclutadas por factores liberados por los folículos después que son activados. Algunos factores pueden ser responsables del reclutamiento de estas células y otras promueven la proliferación y diferenciación celular. El origen de estos factores aun no es claro, pero se sugiere que es un conjunto de señales las que controlan estos procesos. AMH: Hormona anti-mulleriana; bFGF: factor de crecimiento básico de fibroblastos; BMP: proteína morfogenética del hueso; GDF9: Factor de crecimiento y diferenciación 9; IGF: factor de crecimiento similar a la insulina; KGF: factor de crecimiento de queratinocitos; LIF: Factor inhibidor de la leucemia, SCF: Factor de células madre. Modificado de Young & McNeilly 2010)..... | 5 |
| Figura 5. Interacción de las células de la granulosa y de la teca en la síntesis de hormonas esteroideas. Modificado de Erikson y cols., 2001. | 8 |
| Figura 6. Regulación neuronal de la GnRH en el área preóptica. ARC: núcleo arcuato; CRH: neuronas corticotrópicas; DA: neuronas dopaminérgicas; ER: receptores a estradiol, GABA: neuronas GABAérgicas; 5-HT: neuronas serotoninérgicas; NA: neuronas noradrenérgicas; NPY: neuronas que sintetizan el neuropéptido Y; β -END: β -endorfinas; POA: área preóptica; PVN: núcleo periventricular; VM: núcleo ventromedial. Tomado de Ciechanowska, 2008. | 11 |
| Figura 7. Ruta biosintética de las hormonas esteroideas sexuales. Modificado de Strauss, 2009. | 15 |
| Figura 8. Perfil de secreción de gonadotropinas y esteroideas sexuales en los diferentes días y horas del ciclo estral de la rata. Tomado de Freeman, 2006..... | 18 |
| Figura 9. Porcentaje de animales ovulantes inyectados con HLP (antagonista de los receptores DA-2>DA-1) [100 μ g/ 20 μ L] en las bursas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6). *p<0.05 respecto al grupo vehículo con un test exacto de Fisher..... | 39 |
| Figura 10. Porcentaje de animales ovulantes inyectados con EEDQ (antagonista irreversible de los receptores dopaminérgicos DA-1 y DA-2) [100 μ g/ 20 μ L] en las bursas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo vehículo con un test exacto de Fisher..... | 40 |

| | |
|--|----|
| Figura 11. Porcentaje de animales ovulantes inyectados con SCH-23390 (antagonista de los receptores DA-1) [100 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo vehículo con un test exacto de Fisher. | 42 |
| Figura 12. Porcentaje de animales ovulantes inyectados con SPD (antagonista dopaminérgico DA-2) [200 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo vehículo con un test exacto de Fisher. | 43 |
| Figura 13. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de HLP [100 µg/20 µL] (antagonista de los receptores DA-2>DA-1) en las bursas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 más la estimulación con GnRH [3.7 µg/kg i.m] a las 14:00 h del proestro esperado. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo HLP con un test exacto de Fisher. | 45 |
| Figura 14. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de EEDQ [100 µg/20 µL] en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 e inyectados con GnRH [3.7 µg/kg i.m] a las 14:00 h del proestro esperado. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al EEDQ con un test exacto de Fisher. | 46 |
| Figura 15. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de HLP (antagonista dopaminérgico DA2>DA-1) [100 µg/20 µL] en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2 esperado. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo HLP con un test exacto de Fisher. | 47 |
| Figura 16. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de EEDQ [100 µg/20 µL] (antagonista irreversible de los receptores DA-1 y DA-2), en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo EEDQ con un test exacto de Fisher. | 48 |
| Figura 17. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de SCH-23390 [100 µg/20 µL] (antagonista de los receptores DA-1), en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 y estimulados con GnRH [3.7 µg/kg i.m] a las 14:00 h del proestro. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo SCH-23390 con un test exacto de Fisher. | 49 |
| Figura 18. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de SPD (antagonista de los receptores DA-2) [200 µg/20 µL] en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 y estimulados con GnRH [3.7 µg/kg i.m] a las 14:00 h del proestro. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo SPD con un test exacto de Fisher. | 50 |
| Figura 19. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de SCH-23390 (antagonista de los receptores DA-1) [100 µg/20 µL] en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del | |

diestro-1 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2 en animales. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6). *p<0.05 respecto al grupo SCH-23390 con un test exacto de Fisher..... 51

Figura 20. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de SPD (antagonista de los receptores DA-2) [200 µg/20 µL] en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6). *p<0.05 respecto al grupo SPD con un test exacto de Fisher. 52

Figura 21. Concentraciones de progesterona (ng/mL) en suero al momento del sacrificio de animales no ovulantes inyectados con antagonistas dopaminérgicos en las bursas ováricas. Las gráficas muestran la media ± EEM de los animales inyectados con A) HLP, B) SCH-23390 y C) SPD a las 8:00 o 13:00 del estro, diestro-1 y diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 del siguiente estro vaginal esperado. * p<0.05 respecto al grupo vehículo (U-Mann Whitney t-test). 54

Figura 22. Concentraciones de estradiol (pg/mL) en suero al momento del sacrificio de animales no ovulantes inyectados con antagonistas dopaminérgicos en las bursas ováricas. Las gráficas muestran la media ± EEM de los animales inyectados con A) HLP, B) SCH-23390 y C) SPD a las 8:00 o 13:00 del estro, diestro-1 y diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 del siguiente estro vaginal esperado. * p<0.05 respecto al grupo vehículo (U-Mann Whitney t-test). 55

Figura 23. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del estro sobre la inmunorreactividad a la tirosina hidroxilasa en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en menor proporción en las células de la granulosa, colocalizadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, Ovocito. 56

Figura 24. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del diestro-1 sobre la inmunorreactividad a la tirosina hidroxilasa en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en las células de la granulosa, colocalizadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, Ovocito..... 56

Figura 25. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del estro sobre la inmunorreactividad a dopamina β-hidroxilasa en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para DBH (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y

en las células de la granulosa, colocalizadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, Ovocito..... 56

Figura 26. Efecto del bloqueo de los receptores DA-1 y DA-2 ováricos a las 13:00 h del diestro-1 sobre la inmunorreactividad a dopamina β-hidroxilasa en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para DBH (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en las células de la granulosa, colocalizadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, Ovocito..... 56

Figura 27. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del estro sobre la inmunorreactividad a DARPP-32 en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para DARPP-32 (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en las células de la granulosa, colocalizadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, Ovocito..... 56

Figura 28. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del diestro-1 sobre la inmunorreactividad a DARPP-32 en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para DARPP-32 (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en las células de la granulosa, colocalizadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, Ovocito..... 56

Figura 29. El panel de microfotografías muestra la morfología ovárica de A) y B) folículos ováricos de ratas con inyección de NaCl 0.9% a las 13:00 del diestro-1 a 10X o 40X respectivamente o C) y D) folículos ováricos de ratas con inyección de 100 µg/20µL de HLP a las 13:00 h diestro-1. Los folículos ováricos con inyección de HLP presentan atresia folicular. Bar 100 o 50 µm..... 56

Figura 30. Efecto de los antagonistas dopaminérgicos en el diestro-1 sobre los niveles de ARNm de P450 aromatas a al estro esperado. La determinación se realizó por qRT-PCR. El nivel de ARNm de ratas intactas en proestro fue fijado arbitrariamente como 1.0 y la relación de los grupos tratados se calcularon respecto al mismo. Se muestra la abundancia relativa del ARNm de P450 de los ovarios tratados con los antagonistas dopaminérgicos selectivos SCH y SPD antagonistas del receptor DA1 y DA2

respectivamente Cada barra representa la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes por triplicado. * $P < 0.001$, frente al grupo intacto en proestro..... 56

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1. NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-2>DA-1..... | 39 |
| TABLA 2. NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 Y DA-2. | 40 |
| TABLA 3. NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 | 42 |
| TABLA 4. NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-2 | 43 |
| TABLA 5. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH EN EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA1 Y DA2..... | 45 |
| TABLA 6. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH SOBRE EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 Y DA-2 | 46 |
| TABLA 7. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BE SOBRE EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 Y DA-2 | 47 |
| TABLA 8. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BE SOBRE EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 Y DA-2 | 48 |
| TABLA 9. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH EN NÚMERO DE OVOCITOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 | 49 |
| TABLA 10. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH SOBREL EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-2 . | 50 |
| TABLA 11. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BE EN LA OVULACIÓN DE RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 | 51 |
| TABLA 12. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BE EN LA OVULACIÓN DE RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-2 | 52 |

AGRADECIMIENTOS

A la comisión revisora:

Por el tiempo dedicado a la lectura y revisión del manuscrito, por sus valiosas aportaciones a la mejora de la escritura y presentación de la tesis.

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dr. Jorge Luis Valente Flores Hernández

Dr. Gustavo López y López

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Carolina Morán Raya

Dr. José Luis Morán Perales

A los directores de tesis:

Por la orientación y apoyo que me brindaron durante la realización de este estudio.

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta

**DURANTE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN LA SUSTENTANTE CONTÓ CON EL APOYO DE
LA BECA NO. 316181 DURANTE EL PERIODO 2011-2014,
OTORGADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA (CONACYT)**



**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE APOYADO
PARCIALMENTE POR EL PROYECTO MOPJ-NAT15-I DE LA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE
POSGRADO DE LA BUAP.**



EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO

EN:

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

**EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
DE INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA BUAP**

**LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD ZARAGOZA DE LA UNAM**



ABREVIATURAS

3 β HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

5-HT: Serotonina

BE: Benzoato de estradiol

CYP11A: Citocromo P450 aromatasa

DA: Dopamina

DARPP-32: Fosfoproteína reguladora por AMPc y DA de 32 kDa

DBH: Dopamina β -Hidroxilasa

E2: Estradiol

EEDQ: N-(2-etoxi-1,2-dihidroquinolina) carboxilato de etilo

ER: Receptores a estrógenos

FSH: Hormona estimulante DEL folículo

FSHR: Receptor a FSH

GABA: Ácido Gamma Aminobutírico

GnRH: Hormona Liberadora de Gonadotropinas

GnRHR: Receptor a GnRH

hCG: Gonadotropina coriónica humana

HLP: Haloperidol

LH: Hormona luteinizante

LHR: Receptor a LH

NA: Noradrenalina

NPO: Nervio del plexo ovárico

NPY: Neuropeptido Y

RIA: Radioinmunoensayo

P4: Progesterona

StAR: Proteína de regulación esteroideogénica aguda

SCH-23390: R(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride

SNC: Sistema Nervioso Central

NOS: Nervio ovárico superior

SPD: Sulpiride

TH: Tirosina Hidroxilasa

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

En el presente estudio analizamos el papel del sistema dopaminérgico del ovario en la regulación de la ovulación, por medio del bloqueo de los receptores dopaminérgicos ováricos sobre los mecanismos de regulación neuroendocrina de la ovulación en cada etapa del ciclo estral.

Grupos de ratas de la cepa CII-ZV con ciclos regulares de cuatro días se inyectaron en las bursas ováricas con diferentes antagonistas dopaminérgicos: haloperidol (antagonista DA₂>DA₁), EEDQ (antagonista irreversible DA₂ y 5HT), sulpiride (antagonista DA₂-4) o SCH-23390 (antagonista DA₁) a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro. Los animales se sacrificaron al siguiente estro esperado.

La inyección de haloperidol a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro y diestro-1 y a las 8:00 o 20:00 h del diestro-2; la de EEDQ a las 13:00 h del estro y a las 8:00 o 13:00 h del diestro-1; la de SCH-23390 a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 y la de sulpiride a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1, en el diestro-2 a las 8:00 h y en el estro a las 20:00 h. bloqueó la ovulación.

El reemplazo hormonal con GnRH a las 14:00 h del proestro esperado, en los animales inyectados con cualquiera de los antagonistas dopaminérgicos, dio como resultado la ovulación al estro esperado.

En los animales tratados con haloperidol en estro o diestro-2, la inyección de benzoato de estradiol a las 14:00 h del diestro-2 normalizó la ovulación en el 50% de los animales, y no tuvo efecto en los animales tratados en el diestro-1 mientras que en los animales inyectados con EEDQ o SCH-23390 en diestro-1 ovularon 48 horas después de haber sido inyectados con benzoato de estradiol en el diestro-2. En los animales tratados con sulpiride a las 8:00 o 13:00 h del diestro 1 o a las 8.00 del diestro-2 el tratamiento con benzoato de estradiol resultó en la recuperación de la ovulación, lo que no ocurrió en los animales tratados a las 20:00 h del día del estro o diestro-1.

En los animales no ovulantes tratados con haloperidol, las concentraciones séricas de progesterona y estradiol fueron mayores que en el grupo control y no fueron modificadas en los grupos tratados con SCH-23390 o sulpiride.

En cortes de ovario las reacciones de inmunofluorescencia para tirosina hidroxilasa, dopamina β -hidroxilasa y DARPP-32 muestran que dichas enzimas se encuentran presentes en las células de la teca y granulosa en los folículos en desarrollo. En los ovarios de los animales inyectados con haloperidol en el diestro-1 se observa un aumento en la inmunorreactividad de dichas enzimas. La atresia folicular en los ovarios de los animales inyectados con haloperidol fue mayor que en los ovarios de los animales controles.

El tratamiento con haloperidol, SCH-23390 o sulpiride no modificó la cantidad de ARNm de la P450aromatasa en los ovarios de los animales no ovulantes.

Los presentes resultados me sugieren que la unión de la dopamina a sus receptores ováricos es necesaria en la regulación de la ovulación a lo largo del ciclo estral, que en el diestro-1 la activación de dichos receptores es crucial para que se produzca la ovulación, y que la estimulación de esos receptores desempeña un papel importante en la regulación de la secreción de GnRH y en los efectos de *feedback* estimulante de los estrógenos sobre la secreción de gonadotropinas.

ABSTRACT

To study the role of the ovarian dopaminergic system in regulating spontaneous ovulation, we analyzed the effects of blocking ovarian dopamine receptors on the neuroendocrine mechanism regulating ovulation on each day of the estrous cycle.

Groups of 4-day cyclic rats of the CII-ZV strain were injected with vehicle, haloperidol (DA₂>DA₁ blocker), EEDQ (DA₂ and 5-HT blocker), sulpiride (DA₂ blocker) or SCH-23390 (DA₁ blocker) into the bursa of both ovaries on the day of estrus, diestrus-1, diestrus-2 or proestrus day at 08:00, 13:00 or 20:00 h. Animals were sacrificed the following predicted estrus day. Ovulation was blocked by injecting haloperidol on estrus or diestrus-1 at 8:00, 13:00 or 20:00 h and on diestrus-2 at 08:00 or 20:00 h; by injecting EEDQ on estrus at 13:00 h or diestrus-1 at 8:00 or 13:00 h; by injecting SCH-23390 on diestrus-1 at 8:00, 13:00 or 20:00 h; and by injecting sulpiride on diestrus-1 at 08:00, 13:00 or 20:00 h, on diestrus-2 at 08:00 and on estrus at 20:00 h.

Rats treated with any of the dopamine antagonists that blocked ovulation, the injection OF GnRH on the predicted proestrus at 14.00 h restored ovulation. In animals treated with haloperidol on estrus or diestrus-2, injecting oestradiol benzoate at 14.00 h on diestrus-2 restored ovulation in 50% of the animals, and had no effect in animals treated on diestrus-1, while it restored ovulation in sulpiride and SCH-23390 treated rats.

Our results suggest that the participation of dopamine ovarian receptors in regulating ovulation varies along the estrus cycle, that highest activity occurs on dioestrus-1, and that they play a role in regulating GnRH secretion and on the positive feedback effects of estrogen on gonadotropin secretion.

I. INTRODUCCIÓN

En las hembras de los mamíferos el ciclo ovárico es el resultado de varios eventos que ocurren en el cerebro, la hipófisis, los ovarios, las adrenales y el aparato reproductor. El ciclo ovárico es regulado por señales neuroendocrinas originadas en el hipotálamo las que estimulan o inhiben la secreción de gonadotropinas por la hipófisis, las que a su vez estimulan una secuencia ordenada de eventos morfológicos en el ovario que culminan en la secreción hormonal y la ovulación (Ferin, 1999; Freeman, 1994; Hotchkiss y Knobil, 1996; Maeda, 2010; Sellix, 2014)

En los folículos ováricos los gametos femeninos (ovocitos) alcanzan su madurez y se transforman en células capaces de ser fecundadas después de la ovulación. En los folículos hay células especializadas que secretan las hormonas esteroideas y polipeptídicas necesarias en la regulación de las funciones reproductivas. La primera descripción del ovario fue reportado por Aristóteles hace más de 2000 años y actualmente la información sobre las características morfológicas microscópicas sigue en expansión (Yao y Barh, 1999; Dissen *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2014). El conocimiento de la función endócrina y nerviosa es esencial para entender los mecanismos que regulan la reproducción y la regeneración de la vida (Ferin, 1999; Freeman, 1994; Maeda, 2010).

1.1 Anatomía del ovario

En los vertebrados los ovarios son órganos pares, a excepción de las aves y reptiles que solo tienen uno. Los ovarios se localizan por fuera del peritoneo, contra la pared de la cavidad pélvica superior, suspendidos por el mesovario del ligamento ancho (Yao y Barh, 1999; Jones, 1991; Yeh y Adashi, 1999).

Los ovarios están envueltos por un repliegue del peritoneo, de 0.5 a 1 mm de espesor, que recibe el nombre de bursa ovárica. Se ha propuesto que en los animales con ovulación múltiple como la rata, la bursa ovárica es responsable de evitar que los ovocitos liberados se dispersen en la cavidad abdominal y se asegure su incorporación en los cuernos uterinos (trompa de Falopio en el humano) (Agduhr, 1927).

Aunque en los mamíferos el tamaño de los ovarios varía según la especie en estudio, su estructura es similar.

Desde el punto de vista estructural, en el ovario se describen tres zonas: la corteza, la médula y el hilio. En la corteza se localizan los folículos en diferentes estadios de desarrollo y los cuerpos lúteos (Fig. 1). En la capa más externa de la corteza se encuentra el epitelio germinal derivado del peritoneo. Bajo el epitelio germinal se encuentra la túnica albugínea, una capa de tejido conectivo que delimita a la corteza. La médula está situada en el centro del ovario y contiene el tejido conjuntivo laxo, vasos sanguíneos y linfáticos así como nervios (Yeh y Adashi, 1999; Humphrey y Bahr, 1999; Strauss y Williams, 2009).

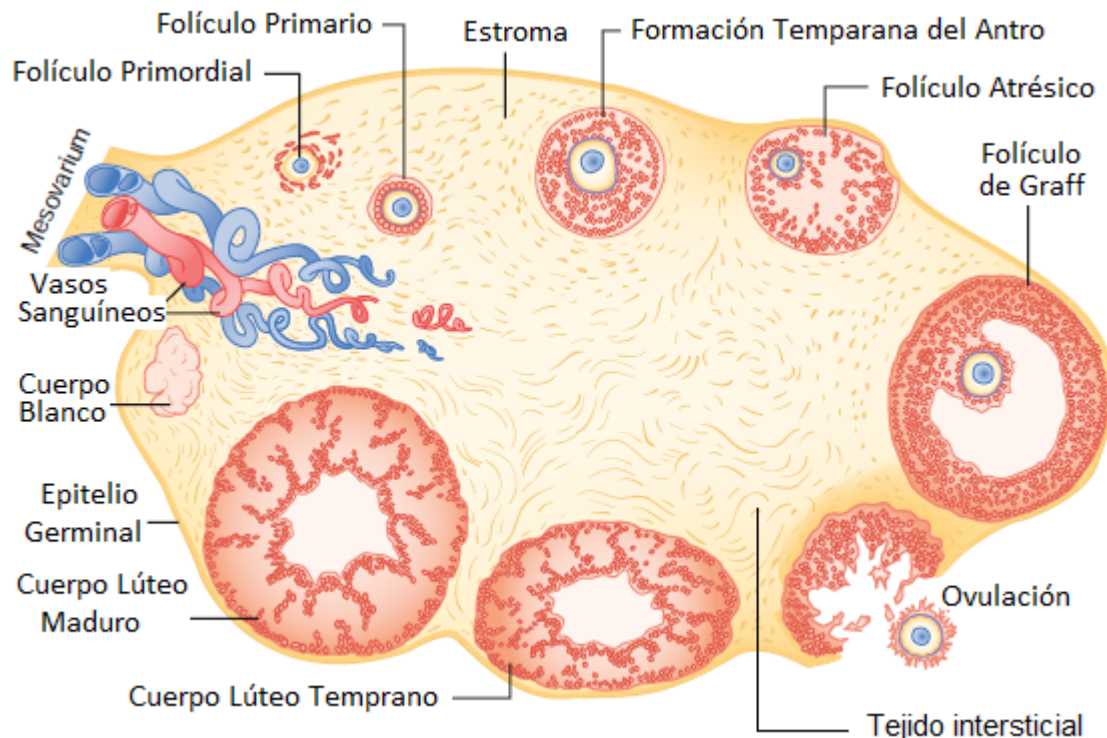


Figura 1. Estructura anatómica típica del ovario de los mamíferos. El ovario consta de una médula por la que transcurren vasos sanguíneos y nervios que conectan con los compartimentos funcionales de la corteza ovárica: folículos, cuerpos lúteos y tejido intersticial (Modificado de Yen y cols., 1999).

En la especie humana los ovarios reciben su riego sanguíneo por la arteria ovárica, rama de la aorta abdominal que ingresa al ovario a través del hilio, por la misma zona emerge la sangre venosa, los vasos linfáticos y las fibras nerviosas (Yeh y Adashi, 1999; Humphrey y Bahr, 1999; Strauss y Williams, 2009). En la rata el ovario recibe riego sanguíneo por dos arterias la ovárica y la que corre por el borde del ligamento suspensorio, junto con al nervio ovárico superior (NOS).

1.2 Estructura, crecimiento y funciones de los folículos ováricos

El folículo ovárico tiene dos funciones: posibilitar el desarrollo de un ovocito capaz de ser fecundado y sintetizar hormonas sexuales (Richards y cols., 2002; Gervasio y cols., 2014).

Los folículos son las estructuras funcionales más sobresalientes de la corteza ovárica y su apariencia microscópica es diferente según su estadio de desarrollo (Fig. 2). Los folículos están formados por un ovocito rodeado de células de la granulosa y una membrana basal (Fig. 3).

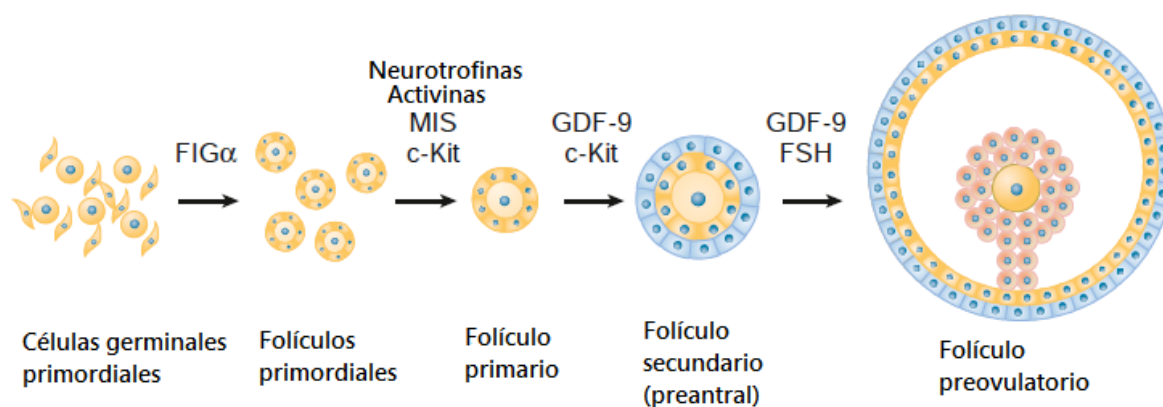


Figura 2. Factores involucrados en la progresión de la foliculogénesis y oogénesis. Varios factores promueven o inhiben el crecimiento folicular. FSH: hormona folículo estimulante; FIG: factor de la línea germinal; GDF: factor de crecimiento y diferenciación; MIS: sustancia de inhibición antimulleriana. Modificado de Yen, 2009.

En los folículos en crecimiento existe una membrana que rodea al ovocito denominada zona pelúcida, en cuya formación participan el ovocito y células de la granulosa especiales que formarán el *cumulus oophorus*. Por fuera de la membrana basal del folículo se encuentran las células teco-intersticiales que forman una estructura denominada teca interna (Fig. 3) (Fair, 2003; Strauss y Williams, 2009; Kurus y cols., 2013). Los folículos ováricos participan en un ciclo de constante activación, crecimiento y atresia, que se debe en gran parte a la influencia de las gonadotropinas sintetizadas en la hipófisis y la concentración de esteroides (Light y Hammes, 2013).

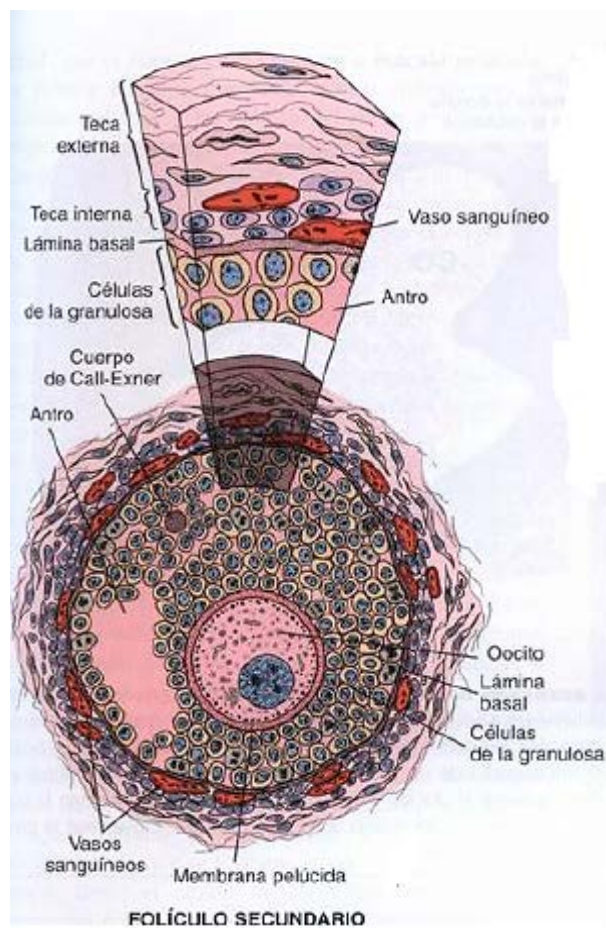


Figura 3. Estructura del folículo secundario. Tomado de Ross, Michael H 2007.

La foliculogénesis es el proceso mediante el cual uno o varios folículos son seleccionados durante cada ciclo estral o menstrual, aceleran su desarrollo y madura el ovocito (Hennet y Combelles, 2012; Light y Hammes, 2013). Durante toda la vida

reproductiva grupos de folículos primordiales comienzan su crecimiento y diferenciación. Los folículos primordiales se caracterizan por estar rodeados por una capa de células que posteriormente dan lugar a las células de la granulosa (Eppig, 2001) (Fig. 4). El primer signo visible del comienzo del crecimiento folicular es el aumento de tamaño del ovocito. Por efecto de factores de crecimiento y neurotransmisores, las células pre-granulosas aplanadas que rodean al ovocito crecen y se transforman en cuboidales, lo que da origen al folículo primario (Eppig, 2001; Fair, 2003) (Fig. 4).

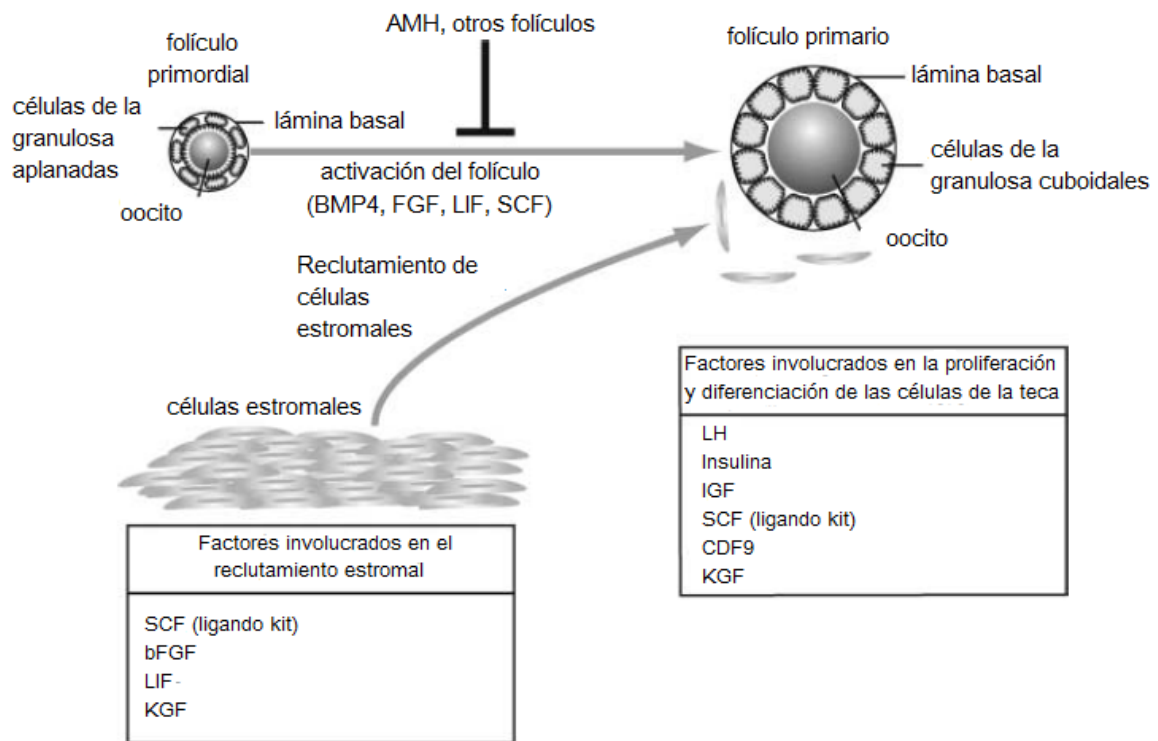


Figura 4. Reclutamiento y diferenciación de las células teca. Se sugiere que las células madre teca residen en el estroma del ovario y son reclutadas por factores liberados por los folículos después que son activados. Algunos factores pueden ser responsables del reclutamiento de estas células y otras promueven la proliferación y diferenciación celular. El origen de estos factores aun no es claro, pero se sugiere que es un conjunto de señales las que controlan estos procesos. AMH: Hormona anti-mulleriana; bFGF: factor de crecimiento básico de fibroblastos; BMP: proteína morfogenética del hueso; GDF9: Factor de crecimiento y diferenciación 9; IGF: factor de crecimiento similar a la insulina; KGF: factor de crecimiento de queratinocitos; LIF: Factor inhibidor de la leucemia, SCF: Factor de células madre. Modificado de Young & McNeilly 2010)

Las células de la granulosa son fundamentales en el crecimiento y desarrollo del folículo (Dzafic y cols., 2013). El conjunto de células de la granulosa que rodean al ovocito tienen un origen mesotelial, por tal razón tres a cinco células progenitoras dan lugar a las células completas en un folículo maduro (Byskov y cols., 1977; Strauss y Williams, 2009; Dzafic y cols., 2013).

Los factores de crecimiento y los neurotransmisores estimulan la síntesis de los receptores a la hormona folículo estimulante (FSH) en las células pre-granulosas y granulosa en el folículo primario y la unión de la FSH estimula el crecimiento folicular y la síntesis de los receptores de la hormona luteinizante (LH) en las células de la granulosa murales (Strauss y Williams, 2009; Hennes y Combelles, 2012; Light y Hammes, 2013). La FSH también estimula la expresión de P450 aromatasa, la enzima que convierte a los andrógenos en estrógenos. La FSH y los estrógenos estimulan la proliferación de células granulosa cuboidales, las que al proliferar forman varias capas alrededor del ovocito.

Las células de la granulosa se comunican con el ovocito por medio de uniones comunicantes (gap junctions) presentes en la membrana celular. Las uniones comunicantes están formadas por proteínas denominadas conexinas. Dichas comunicaciones facilitan el transporte de aminoácidos, metabolitos de glucosa y nucleótidos necesarios para el crecimiento del ovocito (Eppig 2001; Wright y cols., 2001). Las células de la granulosa y el ovocito no reciben riego sanguíneo, ni inervación (Dominguez y cols., 1991; Yeh y Adashi, 1999).

Las células de la granulosa muestran diferentes fenotipos que dependen de su localización en el folículo y se les clasifica en murales, antrales y del *cumulus* (Eppig, 2001; Wigglesworth y cols., 2014). Las células murales presentan mayor actividad esteroideogénica con alta concentración de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y citocromo P450 aromatasa. Las células murales poseen una cantidad de receptores a LH (Yeh y Adashi, 1999; Strauss y Williams, 2009; Conneely, 2010).

A medida que el folículo crece, las células de la granulosa secretan un líquido que se acumula y genera varias lagunas entre las células de la granulosa, las cuales confluyen

y forman el antro del folículo. En el folículo antral, las células de la granulosa que rodean al ovocito constituyen el *cumulus oophorus* (Eppig, 2001; Conneely, 2010).

En la etapa antral, los folículos llegan a ser dependientes a las gonadotropinas y forman grandes folículos antrales, la mayoría de los cuales se someten a la atresia, y pocos serán los elegidos para la ovulación (Scaramuzzi y cols., 1993; Edson cols., 2010).

Las células del *cumulus*, que son liberadas junto con el ovocito en el momento de la ovulación, no expresan la enzima P450 aromatasasa y contienen menos receptores a LH que las células murales. Estas células producen una matriz extracelular que contiene ácido hialurónico, proteoglicanos y proteínas de unión a proteoglicanos, cuya síntesis es estimulada por las prostaglandinas generadas en respuesta a la ovulación que permiten que se forme el complejo cumulus-ovocito (Russell y Salustri, 2006; Strauss y Williams, 2009; Conneely, 2010; Hennet y Combelles, 2012; Wigglesworth, 2014).

Después del pico pre-ovulatorio de LH y la ovulación las células de la granulosa tienen cambios estructurales y genómicos que conducen a la diferenciación en células luteínicas productoras de progesterona (Stocco y cols., 2007).

Es después de la formación del folículo secundario que las células de la teca comienzan a emerger y formar una capa alrededor de la estructura granulosa-ovocito. Las células de la teca se originan de las células mesenquimatosas presentes en el estroma (Strauss y Williams, 2009; Honda y cols., 2007; Young y McNeilly, 2010) (Fig. 4). En la teca se distinguen dos capas multicelulares, la teca interna que está cercana a la membrana basal del folículo que se encuentra formada por células esteroideogénicas, vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas, y la teca externa que carece de células esteroideogénicas (Domínguez y cols., 1991; Young y McNeilly, 2010) (Fig 3).

Es el ovocito quien estimula el desarrollo de la teca interna a través de la síntesis del factor de crecimiento de diferenciación nueve (GDF-9) (Hayashi y cols., 1999; Strauss y Williams, 2009; Young y McNeilly, 2010). Las células de la teca sintetizan el receptor al ligando kit cuya unión estimula la síntesis de moléculas que participan en la organización de la teca alrededor del folículo en desarrollo (Nilsson y cols., 2002; Nilsson y Skinner, 2004; Strauss y Williams, 2009) (Fig. 4).

Las células de la teca se comunican bidireccionalmente con las células de la granulosa, mediante la producción del factor de crecimiento derivado de queratinocitos (KGF) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). El KGF, el HGF y la FSH, estimulan la síntesis del ligando kit por las células de la granulosa, el cuál actúa sobre las células de la teca y promueve la expresión de los factores de crecimiento antes mencionados lo que genera un *feedback* estimulante (Magoffin & Weitman, 1994; Parrot y Skinner; 2000; Strauuss y Williams, 2009; Young y McNeilly, 2010).

Las células de la teca no son capaces de producir estrógenos, pero si producen andrógenos en respuesta a la LH, los cuales serán convertidos a estrógenos por la P450 aromatasa activada por la FSH en las células de la granulosa de los folículos en crecimiento (Fig. 5).

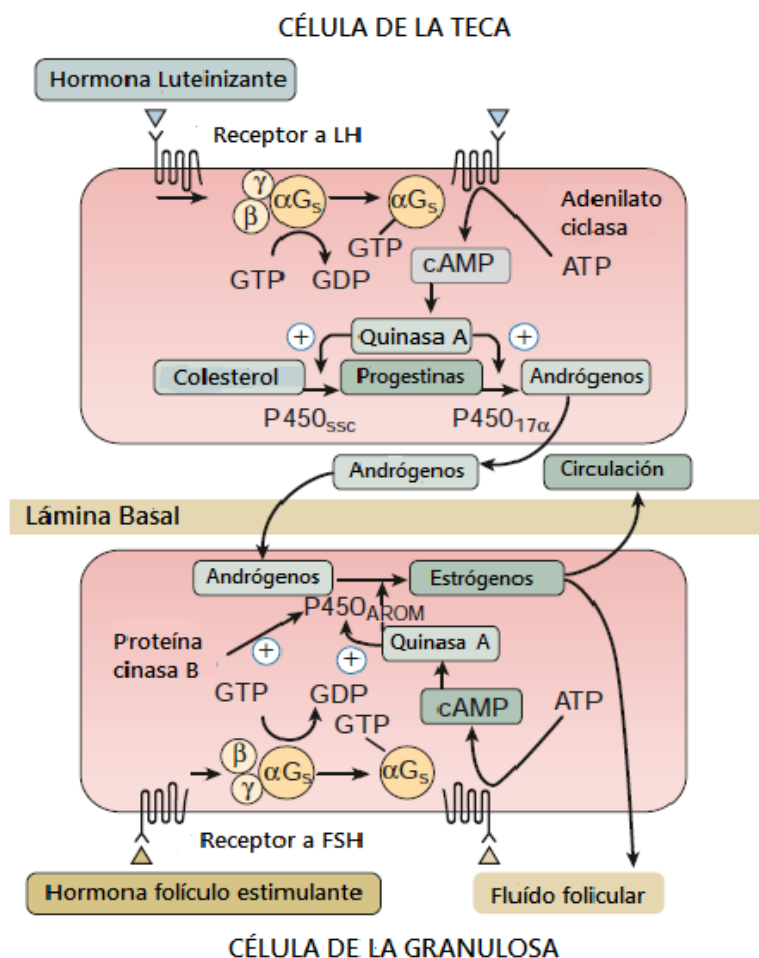


Figura 5. Interacción de las células de la granulosa y de la teca en la síntesis de hormonas esteroides. Modificado de Erikson y cols., 2001.

1.3 Ovulación

En las hembras de los mamíferos la ovulación (ruptura del folículo preovulatorio en la zona más cercana a la túnica albugínea y al epitelio germinal y expulsión del ovocito II, capaz de ser fecundado) es un proceso sincronizado e inducido por un aumento brusco en la secreción de LH por la hipófisis, el cual es estimulado por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Bakos, 1993; Maeda, 2010; Choi y Smitz, 2014).

El ovario secreta hormonas esteroides, las cuales actúan en el hipotálamo y la hipófisis donde regulan la secreción de las hormonas gonadotrópicas, sobre los órganos del sistema reproductor, sobre el sistema inmunológico, el sistema muscular, el hígado, el sistema nervioso, etc. El desarrollo embriológico depende del correcto funcionamiento del hipotálamo, la hipófisis y el tracto reproductivo (Ciechanowska y cols., 2010; Maeda, 2010; Choi y Smitz, 2014).

La ovulación es estimulada por el incremento brusco de la concentración plasmática de LH. Durante el periodo periovulatorio, el ovocito completa la primera división meiótica y su maduración, lo que culmina con la ruptura de la pared del folículo en su borde apical inmediatamente por debajo del epitelio que recubre al ovario, lo que posibilita que el ovocito rodeado por el *cumulus* salga del ovario y llegue a la trompa uterina (Conti y cols., 2012).

Durante el proceso de ruptura de la pared del folículo se rompen capilares sanguíneos, de tal forma que posterior a la salida del ovocito, la cavidad antral se llena de sangre y proliferan las células endoteliales que forman los capilares del cuerpo lúteo. Las células de la granulosa y la teca interna, proliferan dentro de la cavidad folicular y presentan cambios estructurales y funcionales promoviendo la formación del cuerpo lúteo. Si no ocurre la fecundación, el cuerpo lúteo degenera y el tejido conectivo reemplaza a las células luteínicas y en los primates se forma el *corpus albicans*.

1.4 Factores hormonales que regulan la ovulación

1.4.1 Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)

La GnRH y las neuronas que la secretan son componentes críticos del sistema reproductivo. La GnRH es la principal hormona que estimula la liberación de gonadotropinas y su secreción es regulada por neurotransmisores y hormonas (Moenter y cols., 2003; Maeda, 2010; Lomniczi y cols., 2014).

En los mamíferos, las neuronas GnRHérgicas se localizan en el área preóptica y en sitios adyacentes a la región rostral del hipotálamo (Roa, 2013). Estas neuronas forman una red neuronal difusa que funciona como un generador de pulsos de GnRH (Knobil, 1990; Thompson y Kaiser, 2014). La liberación pulsátil de GnRH a la eminencia media es fundamental en la regulación de la función reproductiva (Wray, 2001; Thompson y Kaiser, 2014).

En el humano existen aproximadamente 7000 neuronas GnRHérgicas responsables de la liberación de gonadotropinas y en total se conocen 20 isoformas de GnRH encontradas en diferentes especies (Clifton & Steiner, 2009; Watanabe y cols., 2014). Las isoformas de la GnRH son codificadas por genes diferentes en distintas regiones del cerebro (Ciechanowska y cols., 2010). Todas las variantes del GnRH son deca péptidos que difieren entre sí por su secuencia de aminoácidos. La GnRH tipo I fue la primera isoforma aislada y se encuentra en la mayoría de los mamíferos. Dicho deca péptido es el más estudiado ya que regula la secreción de gonadotropinas (Hall, 2009; Perret y McArdle, 2013).

La acción de la GnRH realiza por su unión a dos tipos de receptores, el GnRH tipo I (GnRHR-I) y el tipo II (GnRHR-II) (Millar, 2005; Perret y McArdle, 2013). Ambos receptores son expresados en diferentes regiones cerebrales y tejidos periféricos. En los mamíferos, el receptor a GnRHR-I es expresado en la hipófisis, la unión de la GnRH al receptor regula la secreción de las gonadotropinas (Millar, 2005; Perret y McArdle, 2013).

La liberación de GnRH es regulada por diferentes neurotransmisores como la noradrenalina (NA), el glutamato y ácido gama aminobutírico (GABA), liberados por neuronas intermedias que hacen sinapsis en las células GnRHérgicas. En las células

GnRHégicas, la expresión de receptores colinérgicos, dopaminérgicos y serotoninérgicos es baja para ser detectados por técnicas inmunocitoquímicas o sus efectos en la secreción de GnRH son mediados por neuronas intermediarias (Ciechanowska y cols., 2010; Hall, 2009; Lomniczi y cols., 2014) (Fig. 6).

Las neuronas GnRHégicas expresan receptores a neuropéptidos que regulan la secreción de GnRH, como el neuropéptido Y (NPY), péptido intestinal vasoactivo (VIP), la galanina, neurotensina, kisspeptina (Ciechanowska y cols., 2010; Roa, 2013; Beltramo y cols., 2014).

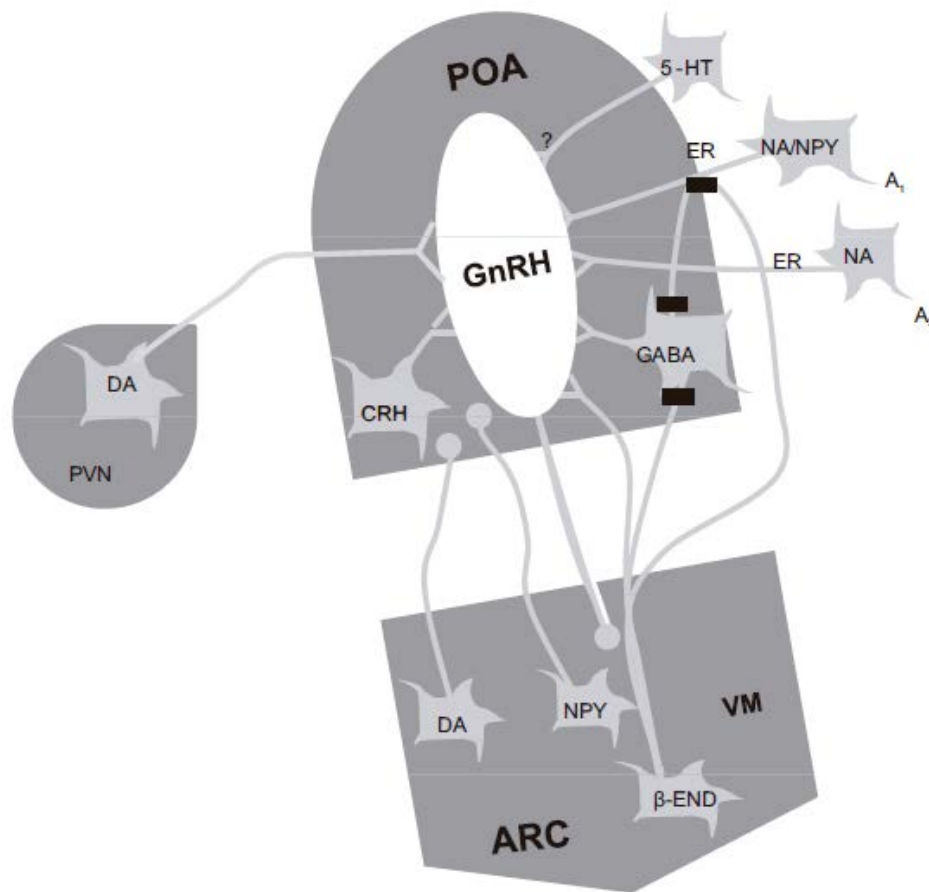


Figura 6. Regulación neuronal de la GnRH en el área preóptica. ARC: núcleo arcuato; CRH: neuronas corticotrópicas; DA: neuronas dopaminérgicas; ER: receptores a estradiol, GABA: neuronas GABAérgicas; 5-HT: neuronas serotoninérgicas; NA: neuronas noradrenérgicas; NPY: neuronas que sintetizan el neuropéptido Y; β-END: β-endorfinas; POA: área preóptica; PVN: núcleo periventricular; VM: núcleo ventromedial. Tomado de Ciechanowska, 2008.

Las hormonas metabólicas y reproductivas también participan en la regulación de la liberación de GnRH ya que las neuronas GnRHérgicas expresan receptores a hormonas como la insulina, leptina, progesterona y testosterona (Hall, 2009; Roa, 2013).

En este contexto, las neuronas GnRHérgicas también expresan receptores a estrógenos (ER α y ER β) cuya estimulación regula la excitabilidad de la membrana, la producción de AMPc y la secreción de GnRH (Hu y cols., 2008; Perret y McArdle, 2013; Lomniczi y cols., 2014).

El GnRHR es un receptor acoplado a proteínas G. La unión de GnRH a GnRHR activa la subunidad Gq/11 que promueve la liberación de Ca²⁺ intracelular y la activación de la proteína cinasa C, vías de transducción que activan a la síntesis y secreción de las gonadotropinas (Ciechanowska, 2008; Perret y McArdle, 2013; Beltramo y cols., 2014). Las concentraciones elevadas de GnRH desensibilizan a los receptores lo que explica que la GnRH se libere en pulsos discretos que resulta en la óptima secreción de gonadotropinas. Los pulsos de bajas frecuencias favorecen la síntesis y secreción de FSH, mientras que los de altas frecuencias estimulan la síntesis y secreción de LH (Krsmanovic y cols., 2009; Thompson y Kaiser, 2014). Los mecanismos moleculares responsables de estos efectos siguen siendo un tema de investigación.

1.4.2 Gonadotropinas

Existen tres gonadotropinas de origen hipofisario: FSH, LH, prolactina (PRL) y una gonadotropina de origen placentario (hCG en el caso del humano. Desde el punto de vista químico la FSH, LH Y hCG son glicoproteínas heterodiméricas compuestas de una subunidad α y una β unidas de forma no covalente (Ascoli y Puett 2009; Thompson y Kaiser, 2014). En el humano, la subunidad α es codificada por el gen CGH, cuya proteína de 92 residuos de aminoácidos es la misma para LH, FSH y hCG. La subunidad β de la LH, FSH y hCG contiene 121, 110 y 145 aminoácidos respectivamente. Esta subunidad es la que le confiere especificidad a la hormona. Ambas subunidades presentan residuos ricos en cisteína (Ascoli & Puett 2009). La glicosilación influye tanto en la velocidad de degradación y las actividades específicas de las hormonas. Las gonadotropinas deglicosiladas se unen a sus receptores con mayor afinidad, pero con menor actividad

específica, en comparación con las formas nativas de las hormonas (Ascoli y Puett 2009; Wide y Eriksson, 2013).

La síntesis y secreción de las gonadotropinas es regulada por diversos factores endócrinos y parácrinos que se generan en el cerebro, la hipófisis y los ovarios (Drummond, 2006; Thompson y Kaiser, 2014). La activina y la inhibina miembros de la familia de los factores de crecimiento TGF- β y la folistatina, son moduladores de los gonadotropos en el eje reproductivo (Bilezikjian y cols., 2012). En las mujeres, la acción local de la activina B en la hipófisis promueve a la secreción de FSH requerida para la foliculogénesis (Woodruff y Mather, 1995; Bilezikjian y cols., 2006). En roedores, se ha demostrado que la activina B junto con la GnRH ayudan a regular el feed back de los esteroides sexuales. La inhibina junto con la folistatina y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), regula la expresión de la subunidad β de la FSH y por lo tanto promueve el aumento de FSH que se produce a finales de proestro y principios de estro (Burger y cols., 2004).

En la hipófisis, la inhibina actúa como una señal reguladora el *feed back* inhibitorio de las gónadas, mientras que la folistatina regula los efectos de la activina en los gonadotropos (Bilezikjian y cols., 2006, 2012; Stenvers y Findlay, 2010).

Los ovarios controlan a la secreción de las gonadotropinas hipofisarias principalmente por los esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progesterona) (Drummond, 2006). Aunque la mayoría de los efectos de los esteroides ováricos sobre las gonadotropinas están mediados por el hipotálamo por medio de la liberación de GnRH, los esteroides también actúan directamente sobre los gonadotropos (Naftolin y cols., 2007; Maeda, 2010). Los efectos de la progesterona y el estradiol pueden ser inhibitorios o estimulantes respectivamente y dependen del sexo, la especie, el medio hormonal, mientras que la testosterona tiene un efecto inhibitorio exclusivamente (Ciechanowska, 2008; Maeda, 2010; Moenter y Chu, 2012).

La estimulación de los receptores a LH (LHR) regula la síntesis de las hormonas esteroides y la ovulación (Ascoli & Puett 2009; Troppmann y cols., 2013). El receptor DE LH tiene afinidad para la LH y hCG, mientras que el receptor a FSH (FHSR) es una proteína

cuya estimulación regula el desarrollo del folículo y la síntesis de estrógenos (Dias y cols., 2002; Simoni y Casarini, 2014). En la rata, el gen que codifica al LHR está formado por 70 Kb de ADN y consiste en 11 exones, mientras que el gen que codifica para el FSHR tiene 190 Kb de ADN y contiene 10 exones (Simoni y Casarini, 2014; Choi y Smitz, 2014). Ambos receptores se encuentran en el ovario y pertenecen a la familia de los receptores a rhodopsina/ β 2-adrenérgicos acoplados a proteínas G (Ulloa-Aguirre y cols., 2007; Ascoli & Puett, 2009; Choi y Smitz, 2014).

1.4.3 Hormonas secretadas por los ovarios

Los ovarios secretan hormonas esteroideas y hormonas polipeptídicas (Drummond, 2006; Sellix, 2014). Las hormonas esteroideas que sintetizan los folículos son tres: progesterona, andrógenos y estrógenos, todas derivadas del colesterol (Fig. 7). Todas las hormonas esteroideas tienen en su estructura al ciclo pentano-perhidrofenantreno. Estas hormonas son liberadas al torrente sanguíneo y actúan sobre el propio ovario y otros órganos incluyendo al SNC.

El colesterol es un compuesto de 27 carbonos, que presenta 3 anillos hexano, un pentano, una cadena alifática de 8 carbonos en el C-17, dos grupos metilo en los carbonos 10 y 18, un OH en el carbono 3 y un doble enlace entre C5-C6 (Fig. 7) (Drummond, 2006; Strauss, 2009; Kazeto y cols., 2011; Miller y Auchus, 2011). Las lipoproteínas son las encargadas de internalizar el colesterol a la célula. Por la acción de varias enzimas, que en conjunto reciben el nombre de P450, la molécula de colesterol presenta cambios estructurales, entre los que se encuentra la pérdida de carbonos lo que da origen a los progestágenos con 21 carbonos, andrógenos con 19 carbonos y estrógenos con 18 carbonos (Drummond, 2006; Strauss, 2009; Kazeto y cols., 2011; Miller y Auchus, 2011).

El primer paso de la vía esteroidogénica es la conversión del colesterol a pregnenolona (Fig. 7). La reacción ocurre en las mitocondrias de las células de la teca interna que contienen a la enzima citocromo P450 (CYP11A) y su función es escindir la

cadena lateral del colesterol. Esta reacción es el paso limitante en la esteroidogénesis (Drummond, 2006; Strauss, 2009; Kazeto y cols., 2011; Miller y Auchus, 2011).

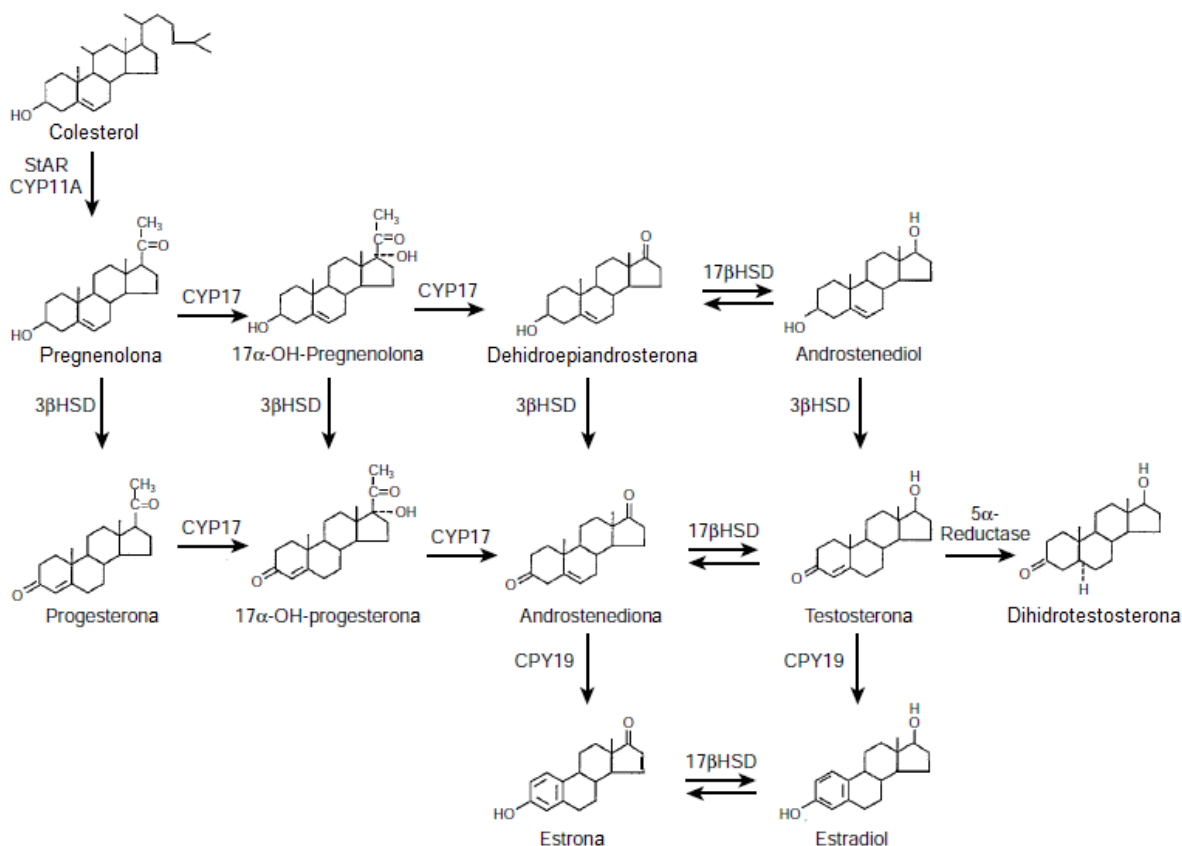


Figura 7. Ruta biosintética de las hormonas esteroides sexuales. Modificado de Strauss, 2009.

Las vesículas lipídicas almacenan a los precursores de la síntesis de hormonas esteroides en forma de ésteres de colesterol. El colesterol es transportado a la mitocondria por la proteína de regulación esteroidogénica aguda (StAR). La proteína StAR parece mediar la regulación trófica aguda de la síntesis de hormonas esteroides (Manna y cols., 2009; Miller y Auchus, 2011)

El retículo endoplásmico liso contiene las enzimas restantes necesarias para producir andrógenos. La pregnenolona se metaboliza por dos diferentes enzimas: la 3β-Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (3βHSD) que provoca la deshidrogenación del grupo hidroxilo del carbono 3 y su conversión en grupo cetónico, y la isomerización del doble enlace C5-C6 a C4-C5, lo que resulta en la formación de progesterona. En la segunda vía,

la enzima P450 17-hidroxilasa, 17,20-hidroxilasa (P450c17) cataliza la conversión de progesterona a dehidroepiandrosterona por una segunda oxidación del C17 que desprende la cadena lateral como acetato y genera una estructura de 19 carbonos precursora de andrógenos. Asimismo, la P450c17 también cataliza la conversión de progesterona a androstenediona (Fig. 7) (Drummond, 2006; Strauss, 2009; Miller y Auchus, 2011).

La androstenediona es convertida en testosterona por efectos de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), por reducción del grupo ceto del C17, el cual es un paso limitante para su síntesis. La androstenediona también es el sustrato para la formación de estrógenos por acción de la aromatasa en las células de la granulosa del folículo. (Miller y Auchus, 2011). La aromatasa (P450arom) es una enzima localizada en el retículo endoplásmico de dichas células y convierte la androstenediona en estrona o la testosterona a 17 β -estradiol. Cataliza tres hidroxilaciones separadas, las dos primeras dan lugar a la formación de las estructuras 19-hidroxi y 19-aldehído, y la tercera cataliza la pérdida del metilo 19, con desprendimiento de ácido fórmico y aromatiza el anillo A (Fig. 7) (Strauss, 2009; Miller y Auchus, 2011).

Las células de la teca interna son las productoras exclusivas de los andrógenos ováricos, que son el sustrato para la producción de estradiol en las células de la granulosa vecinas (Strauss, 2009; Miller y Auchus, 2011).

Las hormonas polipeptídicas que sintetiza el ovario son: la inhibina, activina y folistatina. La inhibina es un dímero que consiste de dos subunidades α y β . La subunidad β tiene dos formas la subunidad β A y la β B (Hall, 2009; Marino y Zanghi, 2013). La inhibina disminuye la expresión de la subunidad β de la FSH y tiene pocos o nulos efectos sobre la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Hall, 2009; Marino y Zanghi, 2013).

La activina es una hormona formada por la dimerización de dos subunidades β idénticas y es sintetizada de manera ubicua. En la hipófisis de la rata, tanto la activina A (que contiene dos subunidades α A) y la activina B (que contiene dos subunidades β B) estimulan la expresión de la cadena β de la FSH en los gonadotropos y de la síntesis del

GnRHR (Hall, 2009; Marino y Zanghi, 2013). Debido a que la activina A se produce en la hipófisis, actúa de forma parácrina en la regulación de la secreción de FSH. La activina B se sintetiza exclusivamente en los gonadotropos, lo que sugiere que tiene un papel autócrino en la síntesis de FSH (Hall, 2009; Marino y Zanghi, 2013). La activina promueve la diferenciación y proliferación de las células de la granulosa y la expresión de los receptores a FSH, por lo tanto juega un papel crucial en la transformación de los folículos preantrales, que no dependen del estímulo de las gonadotropinas, a folículos antrales que son estrictamente dependientes de gonadotropinas (Knight y Glister, 2006; Marino y Zanghi, 2013)

La folistatina es una hormona peptídica que se sintetiza en la hipófisis y que regula la secreción de las gonadotropinas. La folistatina es un potente inhibidor de la expresión y secreción de la cadena β de la FSH y su efecto es aditivo junto con la acción de la inhibina. La expresión de la folistatina en los gonadotropos es estimulada por GnRH y activina, mientras que la inhibina y la testosterona disminuyen su secreción. La expresión de la folistatina tiene una autorregulación y un *feedback* inhibitorio. La regulación de la folistatina por la GnRH es dependiente de la frecuencia de los pulsos de la hormona, a mayor frecuencia mayor la expresión de la folistatina (Hall, 2009; Marino y Zanghi, 2013).

1.5 Ciclo reproductivo

En los roedores de laboratorio como el ratón, el hámster y la rata se presentan ciclos estrales de aproximadamente cuatro días con ovulación espontánea (McMillan, 1998; Freeman, 2006; Goldman, 2007). En la rata las fases del ciclo estral tienen duraciones variables, las cuales se detallan a continuación:

Diestro-1: Durante esta fase las concentraciones plasmáticas de LH, FSH, bajas y presentan pequeñas fluctuaciones cíclicas. La concentración de estrógenos es baja en la mañana de ese día y comienza a incrementar en la tarde, mientras que la de progesterona presenta un aumento entre las 10:00 del diestro 1 y las 01.00 del diestro 2 (Smith y cols. 1975). En el ovario se observan folículos en todas las etapas de crecimiento, excepto

folículos preovulatorios. El epitelio vaginal está formado la membrana basal y 2-3 capas de células epiteliales unidas a la membrana basal; el frotis vaginal revela la presencia de algunas células epiteliales nucleadas, leucocitos polimorfonucleados y moco (Freeman, 2006; Goldman, 2007).

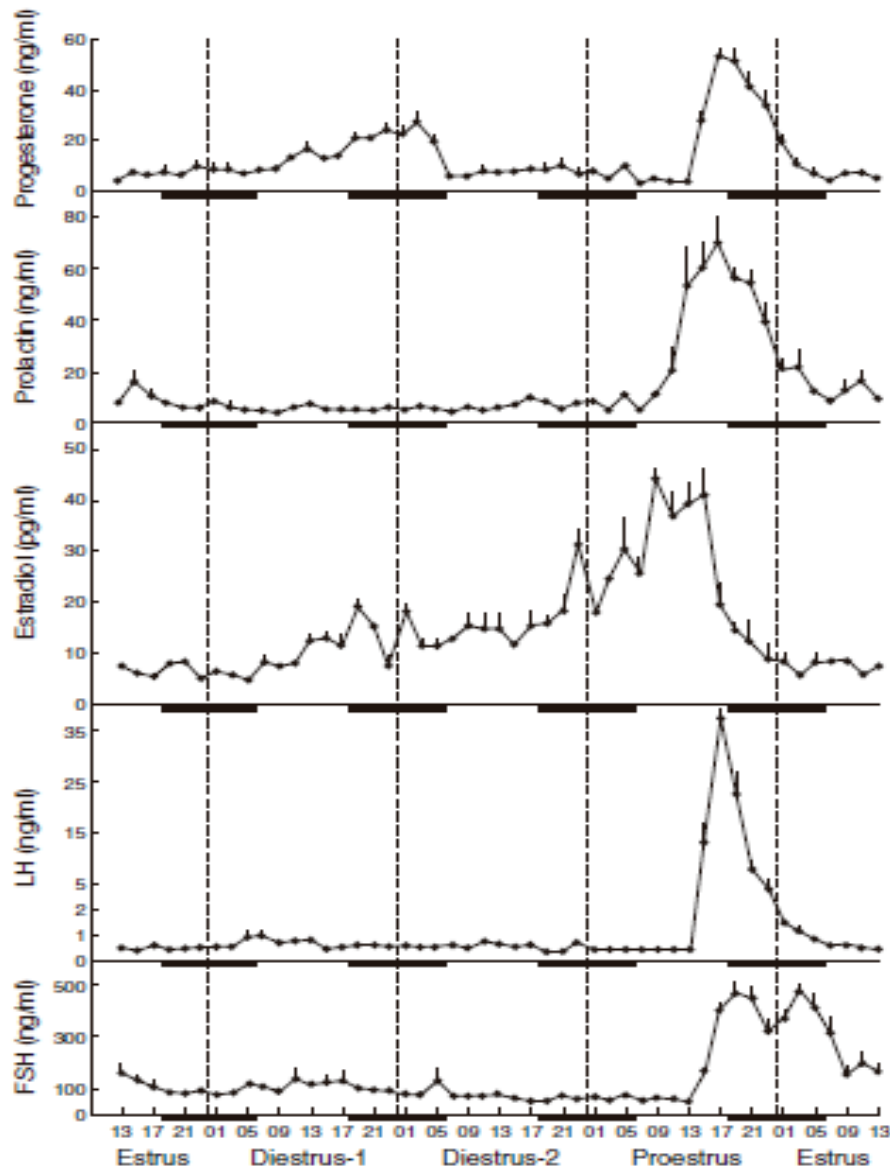


Figura 8. Perfil de secreción de gonadotropinas y esteroides sexuales en los diferentes días y horas del ciclo estral de la rata. Tomado de Freeman, 2006.

Diestro-2: Durante la tarde de este día, las concentraciones plasmáticas de FSH, LH y prolactina se mantienen bajas, la concentración plasmática de progesterona es menor que en el diestro-1 y la de estrógenos sigue aumentando lentamente. Las células del epitelio vaginal aumentan su proliferación; el frotis vaginal presenta gran cantidad de leucocitos polimorfonucleares con escasa cantidad de células epiteliales. La acción creciente de los estrógenos sobre el útero resulta en un aumento en la irrigación sanguínea y proliferan las células que forman las capas del epitelio uterino (Freeman, 2006; Goldman, 2007).

Proestro: El frotis vaginal del proestro, es caracterizado por una completa ausencia de leucocitos y predominancia de células epiteliales nucleadas. Las concentraciones plasmáticas de estrógenos continúan en aumento gradual hasta alcanzar su máxima concentración, seguido de su caída en la tarde (“pico” preovulatorio de estrógenos). Por su parte, durante la mañana del proestro, las concentraciones de FSH, LH y prolactina se mantienen bajas; cuando se produce la caída brusca de estrógenos, las concentraciones plasmáticas de prolactina y progesterona se incrementan rápidamente hasta alcanzar un máximo (picos preovulatorios de prolactina y progesterona) seguidas de una disminución que alcanza un mínimo en las primeras horas del día del estro. En la tarde del proestro la concentración plasmática de LH empiezan a aumentar y alcanzan su nivel máximo entre las 17:00 y 19:00 h de ese día (pico preovulatorio de LH). El rápido surgimiento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación. La secreción de FSH es muy similar a la LH, inicia su incremento desde la tarde del proestro. Aunque los niveles de FSH y LH declinan a sus niveles basales al mismo tiempo, durante la madrugada del estro se produce un aumento secundario de FSH que culmina en la mañana del estro (Freeman, 2006; Goldman, 2007).

Estro: Las concentraciones plasmáticas de estrógenos, progesterona, LH y prolactina disminuyen al mínimo (niveles hormonales basales), pero no la de FSH, que alcanza un segundo “pico” en la mañana de este día. Las capas del epitelio vaginal entran en regresión, produciéndose una descamación generalizada que en el frotis se hace evidente por la presencia de gran cantidad de células cornificadas sin núcleo. Las células

escamosas son el resultado de la maduración de las células nucleadas debido a que las células aumentan la síntesis de queratina, este proceso sucede en todos los epitelios poli estratificados planos. Durante las primeras horas de este día se produce la ovulación; si ocurre la fertilización de los ovocitos, la concentración plasmática de progesterona se mantiene alta asegurando así el implante de los huevos y su desarrollo. De no ocurrir la fertilización, la caída de la concentración plasmática de progesterona en el día del diestro-2, ocasiona una rápida regresión de las capas del endometrio uterino, el líquido de extravasación acumulado en la luz del útero es liberado y la serie de eventos endocrinos se reinician (Freeman, 2006; Goldman, 2007).

1.6 La inervación ovárica como parte del sistema regulador de las funciones del órgano: ovulación y secreción de hormonas

Diversas estructuras cerebrales se conectan por vía multisináptica con los ovarios y participan en la regulación de sus funciones por un mecanismo nervioso que complementa a la vía hormonal (Domínguez y cols., 1998, 2003, 2012; Lara y cols., 2001; Aguado 2002; Dissen y cols., 2003; Gerendai y cols., 2005, 2009). El control nervioso directo de los ovarios es considerado como el ajuste fino de la regulación del sistema. El otro control es llevado a cabo por las acciones de modulación autócrinas y parácrinas del ovario (Lawrence y Burden, 1980; Aguado, 2002; Gerendai y cols., 2005, 2009).

Los ovarios reciben inervación por medio de fibras eferentes simpáticas y parasimpáticas que pertenecen al sistema nervioso autónomo (SNA). Las fibras simpáticas preganglionares se localizan en los segmentos torácico inferior y lumbar superior de la médula espinal. Las fibras parasimpáticas son de origen vagal. Estos nervios poseen fibras nerviosas aferentes que llevan información hacia el SNC se encuentran localizadas en los segmentos torácico inferior y lumbar superior del ganglio de la raíz dorsal y el ganglio nodoso del vago (Lawrence and Burden, 1980; Aguado, 2002, Gerendai, 2009).

Las fibras nerviosas aferentes y eferentes del ovario liberan los neurotransmisores clásicos del SNA (noradrenalina, adrenalina y acetilcolina) (Mayerhofer y cols., 1998;

1999) y contienen otros neurotransmisores y neuropéptidos que incluyen a la serotonina, el GABA (Erdö y cols., 1985; Laszlo y cols., 1989), VIP (Dissen y Ojeda, 1999; Davoren y Hsueh, 1985, Aguado, 2002), sustancia P (Dees y cols., 1985, 1986; Ojeda y cols., 1985), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y galanina (Tsafiriri y cols., 1994).

En animales adultos existen diferencias en el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho, lo que depende de la inervación ovárica (Domínguez, y cols., 1989).

Los ovarios reciben su inervación por el NOS, el nervio del plexo ovárico (NPO) y el nervio vago (Lawrence y Burden, 1980; Aguado, 2002; Gerendai y cols., 2005). El NOS, se localiza en el ligamento suspensorio ovárico, ingresa al órgano a través del hilio y sus fibras se encuentran distribuidas alrededor de las células secretoras de hormonas, en la capa de células de la teca perifolicular en estrecha relación con la capa interna de las células de la teca y con las células intersticiales. La sección uni- o bilateral del NOS modifica la respuesta del ovario a las gonadotropinas (Domínguez y cols., 2003), por lo que se postula que la información nerviosa juega un papel importante en la regulación de la secreción hormonal y la ovulación.

En la rata adulta, la sección unilateral del NOS resulta en la disminución o la falta de ovulación por el ovario desnervado, lo cual varía en función del día del ciclo estral en que se realizó la sección (Chávez & Domínguez, 1994).

Resultados similares se encontraron cuando la sección del NOS se realizó en animales prepuberales (Morales y cols., 1993). Los animales prepuberales con sección del nervio ovárico superior izquierdo no ovularon aún con la administración de gonadotropina coriónica equina (PMSG). En las ratas con sección del NOS bilateral la tasa de animales ovulantes del ovario derecho es 50% más bajo que del izquierdo (Morales y cols., 1998).

Cuando se secciona el NOS en ratas de 4 días de edad, se retrasa la edad de la apertura vaginal, existe un desajuste en el ciclo estral y un número mayor de cuerpos lúteos en los ovarios, probablemente debido a la atenuación del proceso luteolítico. Los niveles plasmáticos de FSH, prolactina y hormona del crecimiento son menores en las

ratas con la sección del NOS que en los controles, mientras que la de estradiol y de NA son mayores (Forneris y Aguado, 2002). El NPO inerva principalmente los vasos sanguíneos (Gerendai, y col, 2005). Por técnicas de marcaje fluorescente se ha mostrado que el NOS y el NPO llegan de las neuronas post-ganglionares localizadas en el complejo del ganglio celiaco mesentérico superior (Aguado, 2002).

La lesión del plexo cervico-vaginal modifica el ciclo estral en cobayas (Buño y cols., 1975) y la ovulación en la rata (Domínguez y col. 1981). El plexo cervico-vaginal morfológicamente está formado por neuronas catecolaminérgicas que contribuyen a la innervación del ovario. La lesión del plexo cervico-vaginal prolonga la presencia de diestro vaginal en el ciclo estral (Aguado, 2002).

De acuerdo con Sawyer & Clifton (1980), la innervación aminérgica del hipotálamo influye en la secreción de la hipófisis de una forma modulada. La NA es estimulante, la 5-HT es inhibitoria y la dopamina (DA) es neutral en la influencia del pico preovulatorio de la LH en el proestro en ratas ovariectomizadas.

Por otra parte, la localización de las fibras colinérgicas en el ovario no es completamente clara, como en el caso de las fibras adrenérgicas; aunque algunas estructuras del SNC participan en la regulación de las funciones ováricas por medio del nervio vago (Gerendai y cols., 2000).

Los efectos de la vagotomía unilateral son diferentes en el ovario derecho e izquierdo, por lo que se sugiere que la información transportada por el nervio vago derecho e izquierdo es diferente (Chávez y cols., 1987). A partir de resultados experimentales y hechos normales y patológicos, se considera que la estructura, la funcionalidad y los mecanismos de regulación de los ovarios son asimétricos y varían durante el ciclo estral (Domínguez y cols., 2003).

Estudios de D'Albora y cols., (2002) y Ojeda y cols., (1985), muestran la presencia de ganglios y neuronas aisladas en los ovarios de algunas cepas de ratas, primates y humanos. Las neuronas aisladas están dispersas a lo largo de venas sanguíneas del ovario, la médula y cerca de los folículos. Algunas neuronas presentan inmunorreactividad a la TH, otras al NPY.

La denervación noradrenérgica periférica inducida por la administración de sulfato de guanetidina disminuye el contenido de NA, el cual es mayor en el ovario izquierdo que el derecho. La concentración de estrógenos y progesterona en el suero, así como el número de folículos y sus diámetros fueron diferentes según el día del ciclo estral en el que fue realizado el tratamiento (Trujillo & Riboni, 2002).

En la rata, la inyección de lidocaína y NA en el ovario afecta la ovulación y depende del ovario tratado. En animales con administración de lidocaína-NA en el ovario izquierdo intacto antes de la extirpación del ovario derecho no ocurre la ovulación. De forma contraria en el ovario derecho intacto sujeto al mismo tratamiento antes mencionado, ocurre ovulación. Al inyectar hCG no se recupera la ovulación (Domínguez y cols., 1998).

1.7 Las catecolaminas en el ovario

La NA modula la respuesta de los folículos y la glándula intersticial a las gonadotropinas, lo que estimula la esteroidogénesis (Bodis y cols., 1992) y el desarrollo folicular (Lara y cols., 1990). En el ovario humano la concentración de NA es mayor que la de DA (Mayerhofer y cols., 1997; Lara y cols., 2001).

Existen pocos estudios sobre el papel funcional de la DA en la regulación de la respuesta del ovario a las gonadotropinas. Estudios in vitro muestran que en el folículo ovárico hay actividad de la dopamina- β -hidroxilasa (DBH) enzima limitante de la síntesis de NA a partir de DA. La NA interactúa con los receptores α y β -adrenérgicos presentes en las células de la granulosa (Forh y cols., 1993; Young y cols., 2005). En la *Macaca mulatta*, los ovocitos capturan DA y la usan como precursor de NA (Mayerhofer y cols., 1998). Así, la DA del ovario actúa en los ovocitos como precursor de NA. También es posible que participe en la regulación de la función de células endócrinas y nerviosas, por ejemplo en la regulación de la secreción de esteroides sexuales o en la estimulación del crecimiento folicular (Wiesak y cols., 1990; Mayerhofer y cols., 1997).

La DA actúa por su unión a cinco tipos de receptores (DA1-DA5), los cuales se clasifican en dos familias que incluyen los DA1 y DA5 y otra los receptores DA2, DA3 y DA4. En el ovario humano y de la yegua las células de la granulosa presentan receptores DA1

(Mayerhofer y cols., 1999; 2000; King y cols., 2005). En células de la granulosa aisladas de folículos preovulatorios de mujeres tratadas con gonadotropinas para la realización de la fertilización *in vitro*, la activación de los receptores de tipo D1 por medio de agonistas selectivos, así como la administración de DA no afectan la síntesis de progesterona (Mayerhofer y cols., 2000).

La activación de los receptores D1 se asocia con la elevación de AMPc y el incremento de la fosforilación de la DARPP-32, un tercer mensajero de la cascada de la DA, así como de otras moléculas de señalización del ovario y otros tejidos. Aunque los receptores a DA están presentes en el ovario y más específicamente en las células de la granulosa, no existe suficiente información sobre el significado funcional de la unión de la DA a sus receptores DA1 y DA2 en la regulación de las funciones del ovario.

A partir de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, se sugiere que las diferencias en el papel que tiene la DA en la regulación de la función reproductiva se deben a los modelos experimentales utilizados, ya que los efectos funcionales de la unión de la DA a sus diversos receptores varían durante el ciclo estral (Domínguez y cols., 1987; Morán y Domínguez, 1995).

La inyección intramuscular de haloperidol (HLP), un antagonista de los receptores DA2>DA1, en los días del estro o diestro-1, bloqueó la ovulación al día del estro esperado, y fue menos efectiva cuando se administró en el diestro-2 o el proestro. Estos resultados son interpretados como una prueba de que el sistema dopaminérgico participa en la regulación de la secreción de gonadotropinas necesarias para la ovulación; que está relacionado con las modificaciones en el crecimiento y la maduración folicular ya que se retrasa el reclutamiento de nuevos folículos normalmente inducidos por FSH y que su participación en la secuencia de los eventos neuroendocrinos que culminan en la ovulación, es fundamental en la primera mitad del ciclo estral (Domínguez y cols., 1987).

También se ha re-evaluado la participación de la DA en la regulación del ciclo estral y la ovulación espontánea de la rata y se han confirmado las observaciones anteriores (Morán y Domínguez, 1995). La administración subcutánea de una dosis única

de HLP en la primera (Ramírez-Ávila 2001) o en la segunda mitad del ciclo estral prolonga 17 días la aparición del siguiente estro vaginal (Pastelín-Rojas, 2003).

En este periodo hay una inhibición del desarrollo folicular y un aumento de los índices de atresia independiente del momento del ciclo estral en que se realiza el bloqueo de los receptores dopaminérgicos. Si bien estos efectos pudieran ser explicados por la interrupción de la secreción de gonadotropinas, el reemplazo hormonal diario con GnRH en dichos animales fue ineficaz para restablecer la función ovárica y el ciclo estral antes de los 17 días de la aparición del estro vaginal (Vargas-Torres, 2002). En conjunto, a partir de los resultados reseñados se propone que el bloqueo farmacológico de los receptores DA1 y DA2 afecta la secreción de las gonadotropinas y sus acciones en los ovarios.

II. JUSTIFICACIÓN

Existe un creciente interés por esclarecer las causas de diferentes síndromes y patologías ováricas que producen infertilidad o cuadros de anovulación crónica causados por desórdenes periféricos o disfunciones del eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario (Gerendai y cols., 2009). Los trastornos reproductivos de la mujer son ocasionados por una deficiencia en los mecanismos de emisión o recepción de señales humorales y por alteraciones en las señales nerviosas que regulan la función fisiológica del ovario (Parra y cols., 2007).

Estudios de las dos décadas pasadas permiten sugerir la existencia de una vía nerviosa directa entre el ovario y el SNC que pudiera ejercer su acción de una forma complementaria a las hormonas secretadas por la hipófisis (Gerendai y cols., 2009).

Los antecedentes muestran el papel crítico que desempeña la DA en la regulación de la función reproductiva de la hembra en relación con las vías de comunicación neuroendocrinas y endocrinas y ponen de manifiesto los efectos del bloqueo sistémico de los receptores dopaminérgicos sobre el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Domínguez y cols., 1987; Moran y cols., 1995). Al presente, no existen evidencias claras de la función fisiológica y reproductiva que tiene la DA y sus receptores en el ovario, sea como un neurotransmisor clásico, como un neuromodulador o como un precursor de NA. Si bien se ha detectado la presencia de DA y de sus receptores en diferentes compartimientos de la gónada femenina y se discute su papel funcional en este órgano (Mayerhofer et al. 1999, Mayerhofer et al. 2000, King et al. 2005, Rey-Ares et al. 2007).

Si la DA ovárica actúa como un modulador estimulante, inhibitorio o ambos de las acciones de otros neurotransmisores (tal es el caso de la NA y el VIP) (Parra y cols., 2007; Greiner y cols., 2008), o de las hormonas clásicas que participan en los mecanismos que regulan las funciones ováricas (Adashi & Hsueh, 1981), se explicarían los cambios sobre la respuesta ovulatoria y sus efectos sobre el desarrollo folicular, observados en los estudios del bloqueo sistémico de sus receptores (Domínguez et al., 1987). Sin embargo, no hay estudios que confirmen la presencia de DA en las terminales sinápticas, tanto

aquellas de origen extrínseco (Lara y cols., 2002) como las provenientes de neuronas ováricas intrínsecas (D'Albora y cols., 2002; Dees y cols., 2006).

Dado que no existen evidencias claras sobre el papel funcional de la DA sobre la regulación fisiológica del ovario, en el presente estudio se analizó el roles de la inervación dopaminérgica de los ovarios en particular con los mecanismos que controlan el desarrollo folicular y la ovulación de la rata adulta. Para ello se analizaron los efectos del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 directamente en los ovarios y algunos de los mecanismos reguladores de la ovulación que fueron alterados por la falta de la unión de la DA a sus receptores.

III. HIPÓTESIS

En la rata adulta, el bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos en el ovario inducirá un retraso en la ovulación espontánea que dependerá de alteraciones en la liberación de la señal endocrina hipotalámica y de la señal estimulante estrogénica, según el día y la hora del ciclo estral en que se realiza el tratamiento.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos fisiológicos y bioquímicos del bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos DA1 y DA2 en los ovarios, a diferentes horas de cada día del ciclo estral sobre la ovulación espontánea, la actividad hormonal esteroideogénica y catecolaminérgica de los ovarios al día del estro esperado.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

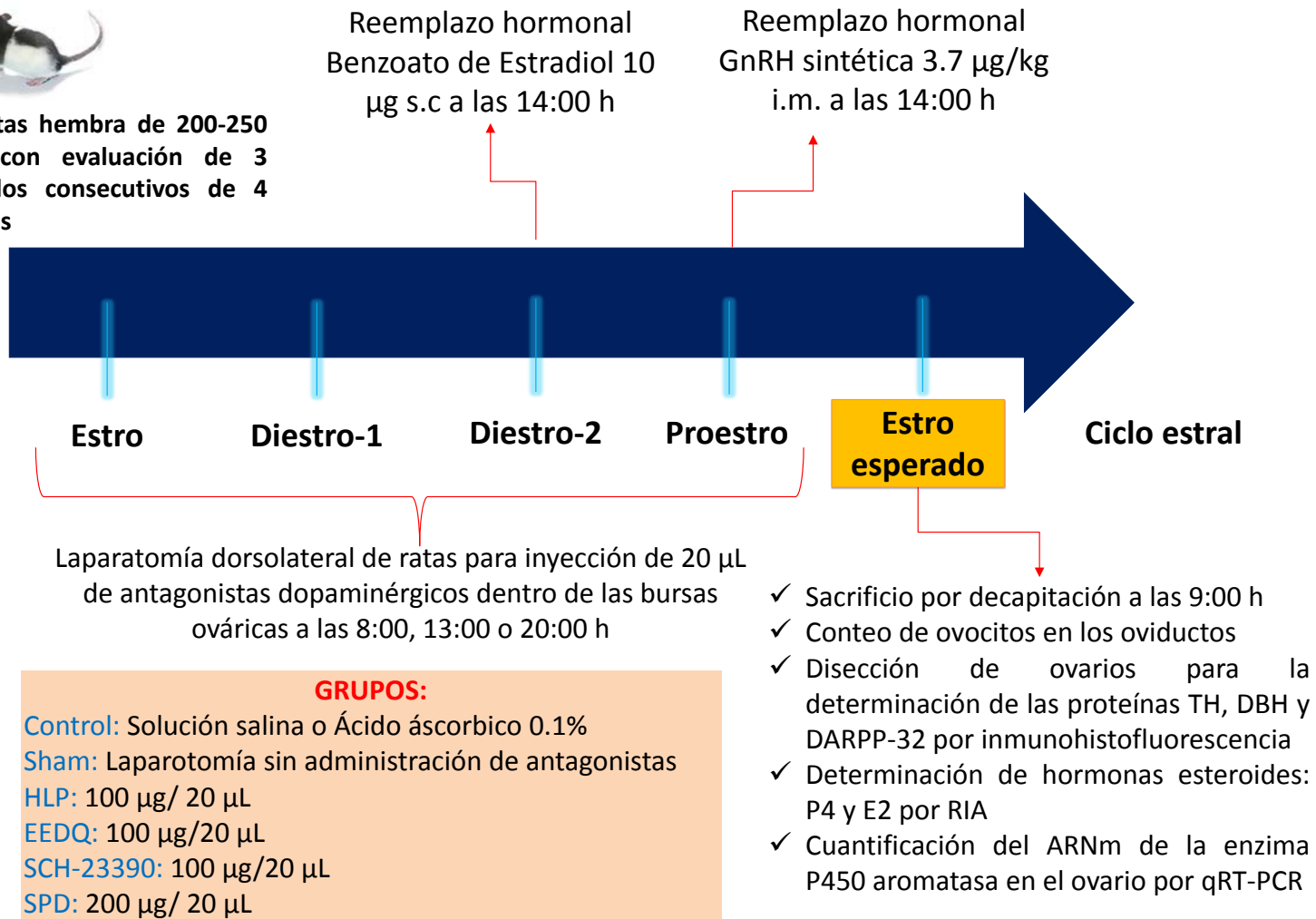
- 1) Analizar el efecto del bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos ováricos a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral sobre la ovulación de la rata adulta cíclica.
- 2) Examinar los efectos del reemplazo de las señales hormonales: hipotalámica y ovárica, en los animales con bloqueo de los receptores dopaminérgicos ováricos.
- 3) Cuantificar las hormonas esteroideas: progesterona y estradiol en los animales no ovulantes que fueron sometidos al bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos ováricos.
- 4) Estudiar la presencia de las enzimas *tirosina hidroxilasa*, *dopamina-β-hidroxilasa* y de la proteína fosforilada *DARPP-32* en los ovarios de ratas sometidos al bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos DA1 y DA2 en el día del estro y diestro-1.
- 5) Cuantificar los cambios en el ARNm de la P450 aromatasa ovárica en los animales con bloqueo farmacológico de los receptores DA1 y DA2 en el diestro-1.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diagrama de trabajo



Ratas hembra de 200-250 g con evaluación de 3 ciclos consecutivos de 4 días



6.2 Sujetos de experimentación

Todos los procedimientos descritos en el presente estudio fueron desarrollados de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana del cuidado y manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y fueron aprobados por el Comité del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV de 200 a 250 g de peso, mantenidas en fotoperiodo controlado de 14 h luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de las 05:00 a 19:00 h) con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Los animales fueron colocados en cajas de acrílico en grupos de cinco.

6.3 Registro del Ciclo Estral

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

6.4 Procedimiento quirúrgico

Las intervenciones quirúrgicas se realizaron bajo anestesia con éter entre las 8:00 y las 9:00 h, las 13:00 y las 14:00 h o las 20:00 y las 21:00 h de cada día del ciclo estral (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro).

Una vez anestesiados los animales, se les practicó una incisión dorsal en el lado izquierdo o derecho que abarcó piel y músculo, y se exteriorizó el ovario respectivo localizando la bolsa que lo recubre (bursa ovárica), en donde se introdujo una jeringa Hamilton de 100 μ L (Hamilton, USA) con una aguja de 29 mm. Con ayuda de una bomba de infusión nanomolar Nano-Injector, Stepper Motorized (Stolting Co., USA), calibrada

para administrar 20 μL en 20 segundos, se inyectaron los antagonistas dopaminérgicos de acuerdo al grupo experimental a trabajar.

Los antagonistas dopaminérgicos utilizados en este estudio fueron:

Haloperidol clínico [5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] (Pulsit, PRECIMEX S. A. de C.V. Edo. de México), un antagonista de los receptores DA-2>DA-1 el cual fue obtenido por autorización del bioterio “Claude Bernard” de la BUAP.

N-(2-etoxi-1,2-dihidroquinolina) carboxilato de etilo (EEDQ, Sigma-Aldrich Co. USA) [5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$], el cual inactiva irreversiblemente varios sitios de los receptores acoplados a proteínas G incluyendo el dopaminérgico (Henry and Roth, 1984).

Hidrocloreto de R(+)-7-cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepina (SCH-23390) [5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$], antagonista selectivo de los receptores DA-1.

Sulpiride [10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] (SPD; Sigma-Aldrich Co. USA), antagonista selectivo de los receptores DA-2 y DA-5.

Como índice de comparación, se incluyeron grupos con operación simulada, en los que únicamente se practicó una incisión en piel y músculo sin tocar ningún órgano o grupos control en los que se administró solución salina o ácido ascórbico 0.1%.

Al término de la cirugía, la herida fue tratada con antiséptico y los animales fueron devueltos a su caja de acrílico correspondiente. Al siguiente día se reanudó la toma de frotis vaginal. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal esperado independientemente si la citología vaginal presentaba células epiteliales cornificadas.

6.5 Preparación de los fármacos

El HLP fue utilizado directamente de la marca comercial clínica Haldol (Janssen-Cilag México) a una concentración de 5mg/mL.

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

El SCH-23390 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) se preparó a una concentración de 5 mg/mL y para su dilución se utilizó solución salina.

El Sulpiride (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) se preparó a una concentración de 10 mg/mL y para su dilución se utilizó una solución de ácido ascórbico al 0.1% y una gota de ácido acético glacial.

6.6 Preparación de Hormonas

Solución Stock de GnRH (40 µg/mL): se pesaron 2 mg de GnRH sintética (LHRH, Cat. L-1898; Sigma Inc.), los que se diluyeron en 10 mL de agua destilada; la solución se aforó a 50 ml.

Solución de GnRH sintética: Se tomó 1 ml de solución stock y se aforó hasta 5 mL de agua destilada, la concentración de la solución resultante fue de 8 µg/mL.

Solución de Benzoato de Estradiol. De acuerdo con Everett y Sawyer (1949) se pesaron en balanza de precisión 20 mg de cristales de Benzoato de Estradiol (BE; Sigma Products Inc., Catálogo: B-8515, β-Estradiol 3-benzoate). Los cristales se disolvieron en 100 µL de acetona seguido de la incorporación de 900 µL de aceite vegetal de canola (Solución Stock a concentración final de: 20 mg/mL). Inmediatamente, se tomaron 10 µL de la solución stock de BE y se aforó a 1 ml (1000 µL) con aceite vegetal de canola puro (Solución Oleosa a concentración final de: 0.2 mg/mL). La solución oleosa de BE se guardó en frasco ámbar con sello de goma.

6.7 Procedimiento de Autopsia

Los animales fueron pesados en una balanza granataria, se les tomó frotis vaginal e inmediatamente fueron sacrificados por decapitación entre las 9:00 y 11:00 h del estro vaginal esperado. La sangre del tronco fue obtenida y centrifugada a 3000 rpm por 15 min. Se disecaron los oviductos y se inspeccionaron para buscar ovocitos bajo el microscopio estereotáxico, los cuales fueron contados siguiendo la metodología del grupo de investigación (Morales y col. 1993). Se disecaron y pesaron los ovarios y el útero.

Los ovarios fueron inmediatamente congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la extracción del ARNm de la P450 aromatasa por qRT-PCR.

En otros grupos experimentales se realizó una perfusión intracardiaca con solución salina para la exanguinación seguida de la perfusión de paraformaldehído al 4% (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) para la fijación del tejido ovárico y la posterior determinación de proteínas por inmunofluorescencia.

6.8 Reemplazo hormonal en animales tratados con antagonistas dopaminérgicos

Únicamente se hicieron reemplazos hormonales de aquellos grupos que presentaron una tasa de ovulación menor al 50%. Estos grupos donde se observaron fallas en la ovulación espontánea fueron sometidos a cirugía dorso bilateral, siguiendo el protocolo explicado anteriormente. Posteriormente fueron tratados con una dosis única de GnRH sintética o Benzoato de Estradiol como se describe a continuación:

Reemplazo de la Señal Hipotalámica:

A las 14 horas del día del proestro esperado posterior a la cirugía, se administraron $3.7\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ peso de GnRH sintética de forma intramuscular.

Reemplazo de la Señal Ovárica:

A las 14 horas del día del diestro-2 esperado posterior a la cirugía, se administraron $10\text{ }\mu\text{g}$ de Benzoato de Estradiol de forma subcutánea.

Los animales se sacrificaron en la mañana del estro esperado independientemente si la citología vaginal presentaba o no células epiteliales cornificadas.

6.9 Cuantificación de hormonas esteroides en suero: estrógenos y progesterona

Las concentraciones de hormonas esteroides: P4 y E2 fueron medidas en suero utilizando Radio Inmuno Ensayo (RIA) de fase sólida. Los kits fueron comprados a Diagnostic Products (Los Ángeles California, EUA). Se adicionaron $100\text{ }\mu\text{L}$ de muestra problema a tubos e polipropileno que contenían el anticuerpo específico anti-

progesterona- I^{125} y anti-estradiol- I^{125} respectivamente, además de 1 mL de hormona radioactiva I^{125} . La mezcla se agitó por un minuto y se incubó durante tres horas a temperatura ambiente. Después se decantó y finalmente se determinó la concentración de hormonas en función de las cuentas por minuto y de una curva de calibración.

6.10 Determinación de la presencia de TH, DBH y DARPP-32 en los ovarios por inmunohistofluorescencia

Los ovarios obtenidos de los animales perfundidos fueron colocados en buffer de fosfatos (PBS) a pH 7.4 durante 24 h y posteriormente se colocaron en soluciones de sacarosa al 10, 20 o 30% cada 24 h para su criopreservación.

El tejido ovárico fue cortado en secciones de 20 μ m de grosor en el criostato (Microm HM 505 N) a -20 °C. La identificación inmunohistoquímica fue realizada como lo reporta Dees y cols., 1995 con algunas modificaciones.

Las secciones fueron descongeladas a temperatura ambiente, se lavaron tres veces por 10 min en buffer de fosfatos en potasio (KPBS) y fueron incubadas por 30 min en tritón-PBS al 0.5%. Posteriormente se trataron con suero normal de cabra al 2% y se incubaron con el anticuerpo primario durante 36 h a 4°C.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron policlonales de conejo: TH (1:200 Santa Cruz Biotechnology Inc.), DBH (1:200 Santa Cruz Biotechnology Inc.) y p-DARPP-32 (Thr 75) (1:500 Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Después de la incubación del anticuerpo primario, los tejidos se lavaron dos veces con tritón-PBS al 0.5% y dos veces con suero normal de cabra al 2% durante 15 min, y acto seguido se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a fluoresceína (1:100 Santa Cruz Biotechnology Inc.) durante una hora.

Al finalizar la incubación del anticuerpo secundario, los tejidos se lavaron tres veces con PBS por 20 min y se incubaron con un anticuerpo primario policlonal de ratón para Actina (1:100 Santa Cruz Biotechnology Inc.) por dos horas. Se realizaron dos lavados con tritón-PBS al 0.5% y dos lavados con suero normal de cabra al 2% y

posteriormente los tejidos se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a rhodamina (1:100) por una hora, seguido de tres lavados con PBS por 20 min. Los cortes fueron teñidos con DAPI-Vecta-Shield (Vector Laboratories) para contra teñir núcleos.

Las observaciones y el análisis de la inmunorreactividad de los anticuerpos en los folículos ováricos se realizó en un microscopio de fluorescencia acoplado a una lámpara de mercurio con filtros: rojo, verde y azul (Olympus BX41). El registro de las imágenes se capturó por medio de una cámara digital acoplada al microscopio por medio del objetivo 10X y 40X. Las fotomicrografías obtenidas en formato JPEG del software Image Pro, se almacenaron y posteriormente se analizaron con ImageJ software. Se utilizaron seis cortes seriados de cada grupo para analizar los folículos ováricos en diferentes etapas de crecimiento.

6.11 Determinación del ARNm de P450 aromatasa en ovario

A los ovarios de los animales inyectados con antagonistas dopaminérgicos DA1 o DA2 en las bursas ováricas se les extrajo el ARN total por la técnica del reactivo de Trizol. Cada ovario fue homogenizado en frío con pistilo estéril frío en tubos eppendorf de 1.5 mL con 350 µL de Tri Reagent (Sigma-Aldrich Co. USA).

La concentración de ARN se determinó por absorbancia a 260/280 nm y su integridad se verificó por electroforesis en 0.7 o 0.8 % de agarosa en una solución amortiguadora Tris Ácido Bórico, EDTA 0.5% (TBE 0.5X).

Los geles fueron visualizados mediante irradiación con luz ultravioleta en un transiluminador. El registro de resultados se realizó mediante fotografía digital.

El ARNm de la proteína P450 aromatasa se analizó a partir del ADN complementario (ADNc) obtenido por la retrotranscripción de 100 ng de ARN total. La amplificación de la RT-PCR se realizó en 2 pasos. La reacción de RT-PCR consistió en un ciclo de desnaturalización a 97 °C por 5 min, seguido por 28 ciclos de amplificación

definidos a 96 °C por 30s, alineamiento a 55 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 1 min. Un ciclo final de extensión de 72 °C por 15 min fue incluido.

Para estimar el nivel de transcritos de P450 aromatasa de ovario con bloqueo de los receptores dopaminérgicos, se realizó un análisis de qRT-PCR (Transcriptasa reversa y PCR en tiempo real), de un solo paso One Step (Applied Biosystem, USA).

La reacción se realizó en un termociclador (Applied Biosystem, USA) y se llevó a cabo en un volumen de 25 µL incluyendo 12.5µL de 2X RT-PCR master mix QuantiTect SYBR Green, 3 µL del ADNc y 0.2 µM de cada uno de los primers diseñados para amplificar una parte de cada gen. Para cuantificar cada blanco transcrito se construyó una curva estándar con diluciones seriales de cDNA. La amplificación se desarrolló de forma siguiente: A 95°C por 10 min, y 40 ciclos de A 95°C por 15 s y diferentes temperaturas de alineamiento (55-60°C) por 15 s y la extensión a 72 °C por 1 min. El amplicón fue confirmado por disociación y electroforesis en gel de agarosa. El cálculo de los niveles de ARNm fue realizado por medio del ciclo umbral (CT). La CT para cada muestra se calculó por el software del sistema de PCR en tiempo real con detección de fluorescencia automatizada.

6.12 Análisis estadístico de los resultados

La tasa de animales ovulantes fue analizado con la prueba de probabilidad exacta de Fisher. El número de ovocitos se analizó por medio de la prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba U Mann-Whitney.

Las concentraciones de hormonas en suero y el ARNm de la P450 aromatasa fueron analizados por medio del software Graph Pad InStat3, Inc., (San Diego, CA, USA). Con una prueba U Mann-Whitney y una ANOVA de una vía con una prueba Dunnet post hoc. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

7.1 Efectos del éter como anestésico en ratas con operación simulada o con inyección de vehículo en la bursa ovárica sobre la ovulación

Grupo de animales intactos que presentaron tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración fueron sacrificados a las 9:00 h del día del estro esperado y se cuantificaron los ovocitos. La tasa de ovulación en dichos animales fue de 27/27 y el número de ovocitos fue de 11.1 ± 0.6 .

Todas las cirugías se realizaron en animales anestesiados con éter debido a que los anestésicos convencionales son antagonistas adrenérgicos, los cuáles afectan los resultados experimentales.

Las cirugías simuladas se realizaron en animales a diferentes días del ciclo estral y se sacrificaron al siguiente estro vaginal esperado. La tasa de ovulación de dichos animales fue de 32/37 y el número de ovocitos fue 11.3 ± 0.9 lo cual indica que ni las cirugías ni el éter afectan la ovulación en los animales.

Al comparar la tasa ovulatoria de los animales intactos o con operación simulada, la inyección de los vehículos: solución salina o ácido ascórbico 0.1%, dentro de las bursas ováricas en cada día del ciclo estral no modificó la tasa de ovulación (27/27 vs 32/37, 57/73), ni el número de ovocitos de los animales ovulantes (11.1 ± 0.6 vs 11.3 ± 0.9 , 11.6 ± 0.5).

La tasa promedio de ovulación y el número de ovocitos antes mencionados fueron utilizados como grupo control para comparar los diferentes parámetros de los efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos.

7.2 Efectos de la administración sistémica de antagonistas dopaminérgicos sobre la ovulación

A grupos de animales (N=6) se les inyectaron los antagonistas dopaminérgicos fuera de las bursas ováricas a las mismas dosis que el experimento anterior, con la finalidad de analizar los efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos sistémicos y compararlos con el efecto local.

Ninguna de las ratas tratadas con HLP en estro o diestro-1 fuera de la bursa ovárica a las 8:00 o 13:00 ovularon (0/8). Las ratas administradas en diestro-2 o proestro con el tratamiento antes mencionado ovularon normalmente (8/8).

La administración de SCH-23390 fuera de la bursa ovárica en ratas en estro, diestro-1 o diestro-2 a las 8:00 o 13:00 h no afectaron la ovulación (12/12).

Ninguno de los animales inyectados con SPD fuera de la bursa ovárica en diestro-1 a las 8:00 o 13:00 h ovularon (0/8).

7.3 Efectos de la inyección de antagonistas dopaminérgicos DA-1 y DA-2 dentro de las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral sobre la ovulación

Como se muestra en la figura 9, el tratamiento con HLP (antagonista de los receptores DA-2>DA-1) en ratas en estro a las 13:00 o 20:00 h, en diestro-1 a las 8:00, 13:00 o 20:00 h o en diestro-2 a las 8:00 o 20:00 h, bloqueó la ovulación en el 100% de los animales. Solamente el 20% de las ratas inyectadas en estro a las 8:00 h ovularon. El número de ovocitos liberados por animal ovulante tratados en estro fue menor que el grupo vehículo (HLP: 6 vs control: 10.8 ± 1.7) (Tabla 1).

En las ratas en proestro, la inyección de HLP en las bursas ováricas a las 13:00 h bloqueó la ovulación en 4/6 animales (Fig. 9), y no se afectó en las ratas inyectadas a las 8:00 o 20:00 h. El número de ovocitos fue similar al vehículo (Tabla 1).

La inyección del agente alquilante EEDQ (antagonista de los receptores DA-1 y DA-2) en las bursas ováricas, a las 08:00 o 20:00 h del estro o a las 08:00, 13:00 o 20:00 h del

diestro-2, bloqueó la ovulación en el 50% de los animales tratados. El mismo tratamiento a las 13:00 h del día del estro, a las 08:00 o 13:00 h del diestro-1 bloqueó la ovulación en el 100% de los animales tratados (Fig. 10). El número de ovocitos liberados por animal ovulante fue similar al grupo vehículo (Tabla 2).

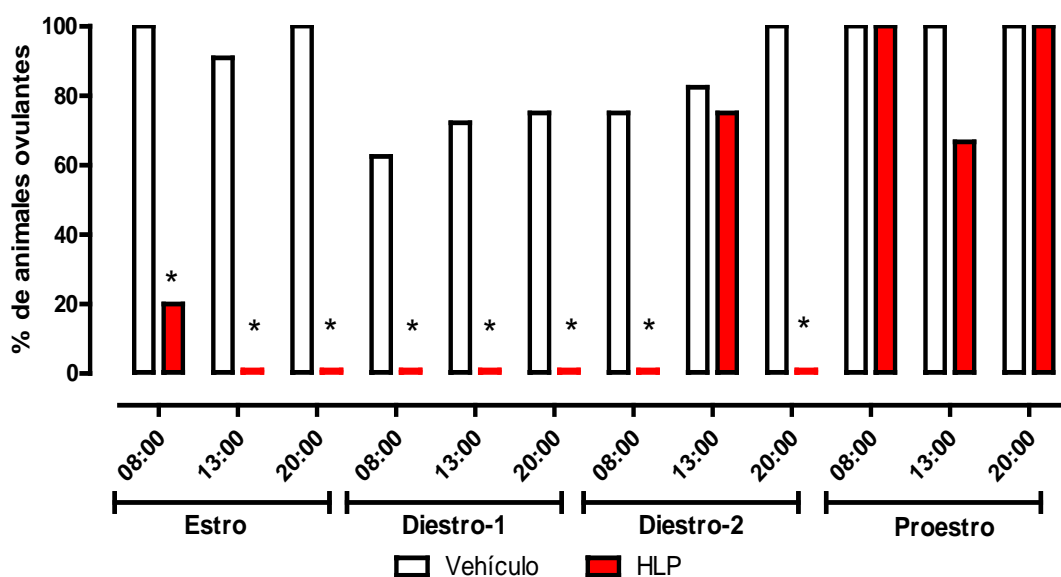


Figura 9. Porcentaje de animales ovulantes inyectados con HLP (antagonista de los receptores DA-2>DA-1) [100 µg/ 20 µL] en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6). *p<0.05 respecto al grupo vehículo con un test exacto de Fisher.

TABLA 1. NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-2>DA-1

| Grupos | 8:00 h | | 13:00 h | | 20:00 h | |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Vehículo | HLP | Vehículo | HLP | Vehículo | HLP |
| Estro | 10.8 ± 1.7 | 6 | 12.2 ± 0.7 | 0 | 9.0 ± 4.0 | 0 |
| Diestro-1 | 10.8 ± 1.7 | 0 | 12.8 ± 0.8 | 0 | 14.0 ± 1.0 | 0 |
| Diestro-2 | 11.3 ± 1.1 | 0 | 12.0 ± 0.9 | 12.0 | 7.3 ± 2.4 | 0 |
| Proestro | 12.6 ± 1.5 | 13.2 ± 1.0 | 11.3 ± 0.8 | 11.0 ± 0.6 | 14.3 ± 1.4 | 11.0 ± 2.0 |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con HLP (antagonista dopaminérgico DA-2>DA-1) [100 µg/ 20 µL] en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al grupo vehículo.

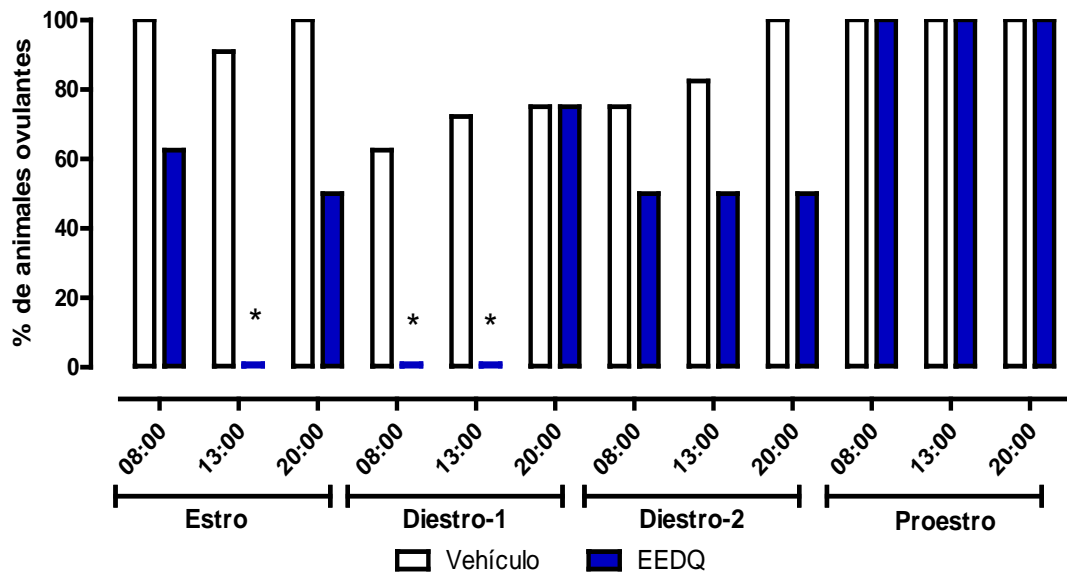


Figura 10. Porcentaje de animales ovulantes inyectados con EEDQ (antagonista irreversible de los receptores dopaminérgicos DA-1 y DA-2) [100 µg/ 20 µL] en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo vehículo con un test exacto de Fisher.

TABLA 2. NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 Y DA-2.

| Grupos | 8:00 h | | 13:00 h | | 20:00 h | |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Vehículo | EEDQ | Vehículo | EEDQ | Vehículo | EEDQ |
| Estro | 10.8 ± 1.7 | 6.8 ± 1.3 | 12.2 ± 0.7 | 0 | 9.0 ± 4.0 | 11.5 ± 1.5 |
| Diestro-1 | 10.8 ± 1.7 | 0 | 12.8 ± 0.8 | 0 | 14.0 ± 1.0 | 8.3 ± 1.2 |
| Diestro-2 | 11.3 ± 1.1 | 8.0 ± 2.0 | 12.0 ± 0.9 | 10.6 ± 2.4 | 7.3 ± 2.4 | 8.5 ± 3.5 |
| Proestro | 12.6 ± 1.5 | 6.25 ± 1.1 | 11.3 ± 0.8 | 12.0 ± 0.7 | 14.3 ± 1.4 | 9.0 ± 1.8 |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con EEDQ (antagonista dopaminérgico DA-1 y DA-2) [100 µg/10 µL] a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al grupo vehículo.

7.4 Efectos de la inyección de antagonistas dopaminérgicos DA-1 o DA-2 dentro de las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral sobre la ovulación

La inyección de SCH-23390 (antagonista dopaminérgico DA-1) dentro de las bursas ováricas de las ratas a las 8:00 h del diestro-2, proestro o estro no afectó la ovulación espontánea. El mismo tratamiento en ratas en diestro-1 a las 8:00 o 20:00 h, bloqueó la ovulación en el 100% de los animales al estro esperado, y el efecto fue menor (33% de animales ovulantes) cuando el tratamiento se realizó a las 13:00 h (Fig. 11). El número de ovocitos liberados por animal ovulante fue similar al del grupo control (Tabla 3).

La inyección de SPD (antagonista de los receptores DA-2) dentro de las bursas ováricas a las 20:00 h del estro, o a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1, y a las 8:00 h del diestro-2, bloqueó la ovulación en el 100% de los animales en el día del estro esperado (Fig. 12). El mismo tratamiento no tuvo efectos en las ratas tratadas a las 13:00 h o 20:00 h del diestro-2 o a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del P ni a las 8:00 o 13:00 h del estro (Fig. 12). El número de ovocitos en los animales ovulantes fue similar al del grupo control (Tabla 4).

7.5 Efectos de la administración de GnRH o BE en ratas con bloqueo de la ovulación por la inyección de antagonistas dopaminérgicos

La inyección de GnRH i.m. a las 14:00 h del proestro esperado indujo la ovulación en el 100% de los animales tratados con HLP a las 8:00 o 20:00 h del estro, 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 y 20:00 h del diestro-2 y el mismo tratamiento produjo el 80% de animales ovulantes a las 13:00 h del estro o 8:00 h del diestro-2 (Fig. 13). El número de ovocitos liberados fue similar al grupo control (Tabla 5).

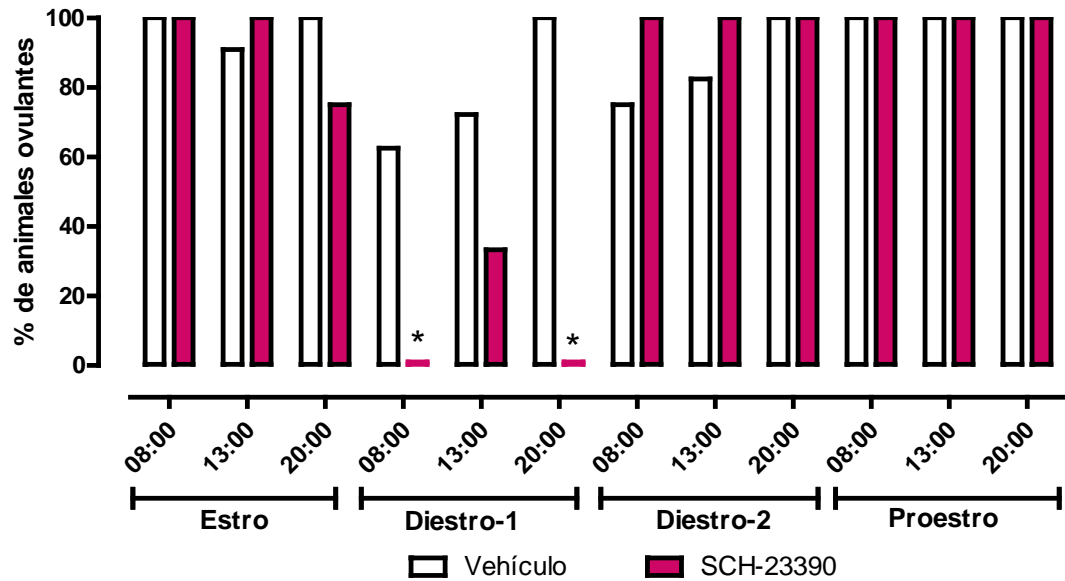


Figura 11. Porcentaje de animales ovulantes inyectados con SCH-23390 (antagonista de los receptores DA-1) [100 µg/ 20 µL] en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo vehículo con un test exacto de Fisher.

TABLA 3. NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1

| | 8:00 h | | 13:00 h | | 20:00 h | |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Grupos | Vehículo | SCH-23390 | Vehículo | SCH-23390 | Vehículo | SCH-23390 |
| Estro | 10.8 ± 1.7 | 10.1 ± 0.9 | 12.2 ± 0.7 | 14.2 ± 1.1 | 9.0 ± 4.0 | 5.3 ± 2.9 |
| Diestro-1 | 10.8 ± 1.7 | 0 | 12.8 ± 0.8 | 11.0 ± 1.0 | 14.0 ± 1.0 | 0 |
| Diestro-2 | 11.3 ± 1.1 | 10.5 ± 1.8 | 12.0 ± 0.9 | 13.0 ± 1.8 | 7.3 ± 2.4 | 12.3 ± 0.9 |
| Proestro | 12.6 ± 1.5 | 12.0 ± 0.4 | 11.3 ± 0.8 | 10.0 ± 1.0 | 14.3 ± 1.4 | 10.5 ± 1.4 |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con SCH-23390 (antagonista dopaminérgico DA-1) [100 µg/20 µL] a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05.

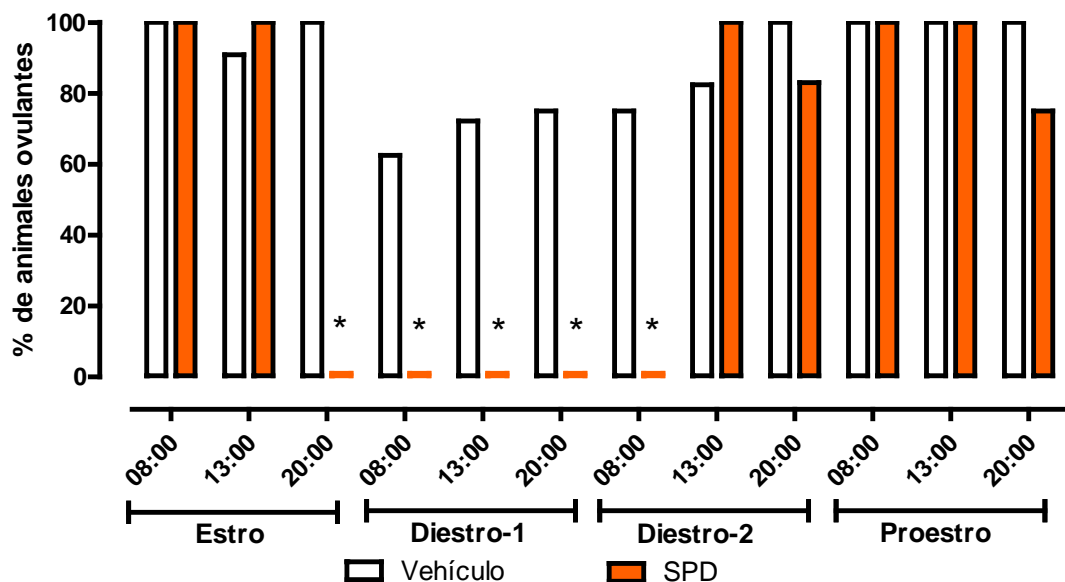


Figura 12. Porcentaje de animales ovulantes inyectados con SPD (antagonista dopaminérgico DA-2) [200 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo vehículo con un test exacto de Fisher.

TABLA 4. NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-2

| Grupos | 8:00 h | | 13:00 h | | 20:00 h | |
|------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | Vehículo | SPD | Vehículo | SPD | Vehículo | SPD |
| Estro | 10.8 ± 1.7 | 12.8 ± 0.9 | 12.2 ± 0.7 | 12.7 ± 0.8 | 9.0 ± 4.0 | 0 |
| Diestro-1 | 10.8 ± 1.7 | 0 | 12.8 ± 0.8 | 0 | 14.0 ± 1.0 | 0 |
| Diestro-2 | 11.3 ± 1.1 | 0 | 12.0 ± 0.9 | 7.0 ± 1.7 | 7.3 ± 2.4 | 2.0 |
| Proestro | 12.6 ± 1.5 | 13.8 ± 0.9 | 11.3 ± 0.8 | 10.2 ± 0.8 | 14.3 ± 1.4 | 4.0 ± 1.0* |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con SPD (antagonista dopaminérgico DA-2) [200 µg/ 20µL] a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al grupo vehículo.

La administración de GnRH a las 14:00 h del proestro esperado indujo ovulación en el 100% de los animales inyectados con EEDQ a las 13:00 o 20:00 h del estro, 8:00 o 13:00 h del diestro-1 y 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-2 (Fig. 14). El mismo tratamiento indujo la ovulación en el 75% de los animales inyectados a las 8:00 h del estro. El número de ovocitos liberados fue semejante al grupo control (Tabla 6).

La administración de BE a las 14:00 h del diestro-2 esperado no indujo la ovulación en ninguno de los animales inyectados con HLP en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1. El mismo tratamiento realizado en ratas inyectadas con HLP a las 8:00 h del diestro-2 o a las 13:00 del día del estro, indujo la ovulación en el 50% y el 40% de animales tratados y solo en el 20% de animales tratados a las 20:00 h del estro y diestro-2 (Fig. 15). El número de ovocitos liberados por los animales inyectados con BE fue similar al grupo control (Tabla 7).

En el caso del grupo inyectado con EEDQ en las bursas ováricas, la administración de BE a las 14:00 h del diestro-2 indujo la ovulación en el 100% de los animales tratados a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro y diestro-2 y solo en el 80% en los animales tratados a las 8:00 h del diestro-1 (Fig. 16). El número de ovocitos liberados por los animales inyectados BE fue similar al grupo control (Tabla 8).

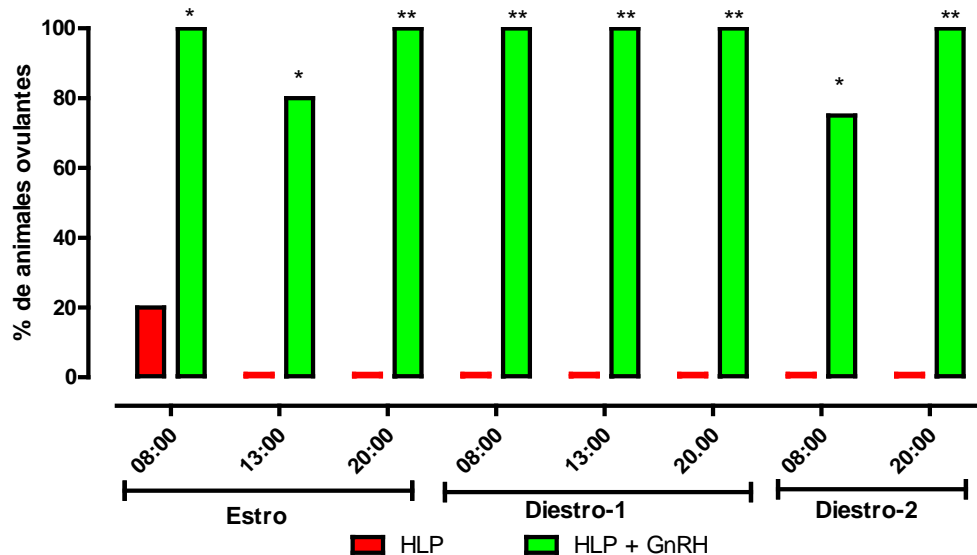


Figura 13. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de HLP [100 µg/20 µL] (antagonista de los receptores DA-2>DA-1) en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 más la estimulación con GnRH [3.7 µg/kg i.m.] a las 14:00 h del proestro esperado. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo HLP con un test exacto de Fisher.

TABLA 5. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH EN EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA1 Y DA2

| Grupos | 8:00 h | 13:00 h | 20:00 h |
|------------------|------------|------------|-----------|
| Estro | 11.8 ± 1.0 | 11.8 ± 0.9 | 8.8 ± 2.3 |
| Diestro-1 | 10.3 ± 1.4 | 7.3 ± 1.6 | 7.5 ± 2.3 |
| Diestro-2 | 8.7 ± 1.5 | NA | 9.2 ± 0.9 |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con HLP [100 µg/20 µL] (antagonista dopaminérgico DA-2>DA-1) en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral y la estimulación con GnRH [3.7 µg/kg] a las 14:00 h del proestro. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado. NA: No aplica. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al grupo vehículo de la tabla 1.

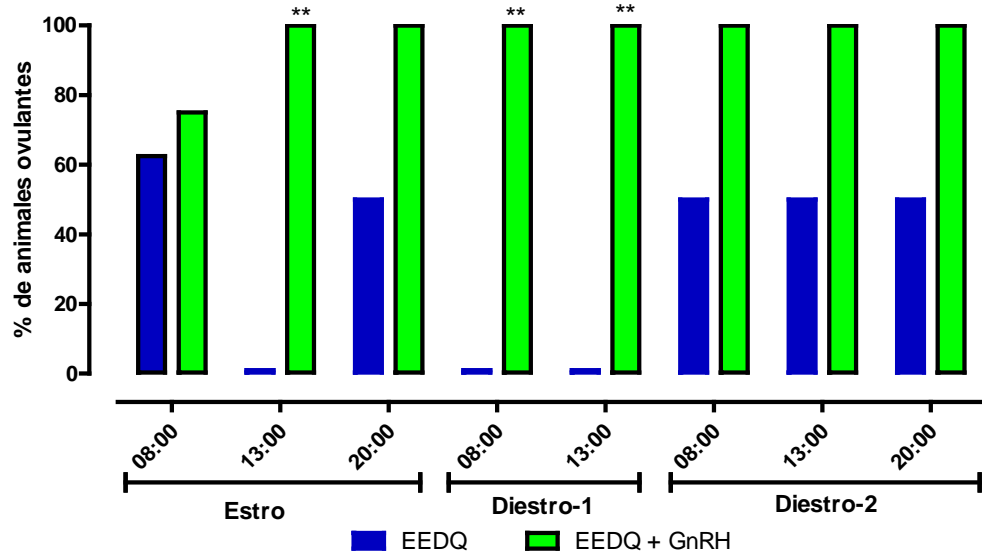


Figura 14. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de EEDQ [100 µg/20 µL] en las bolsas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 e inyectados con GnRH [3.7 µg/kg i.m] a las 14:00 h del proestro esperado. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al EEDQ con un test exacto de Fisher.

TABLA 6. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH SOBRE EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 Y DA-2

| Grupos | 8:00 h | 13:00 h | 20:00 h |
|------------------|------------|------------|------------|
| Estro | 5.7 ± 2.5 | 11.0 ± 2.5 | 9.5 ± 5.5 |
| Diestro-1 | 12.0 ± 1.4 | 5.8 ± 1.5 | NA |
| Diestro-2 | 9.3 ± 1.8 | 9.0 ± 2.4 | 10.0 ± 3.0 |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con EEDQ (antagonista irreversible dopaminérgico DA1 y DA2) [100 µg/20µL] en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h de cada día del ciclo estral y la estimulación con GnRH a las 14:00 h del proestro. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado. NA: No aplica. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al grupo vehículo de la tabla 2.

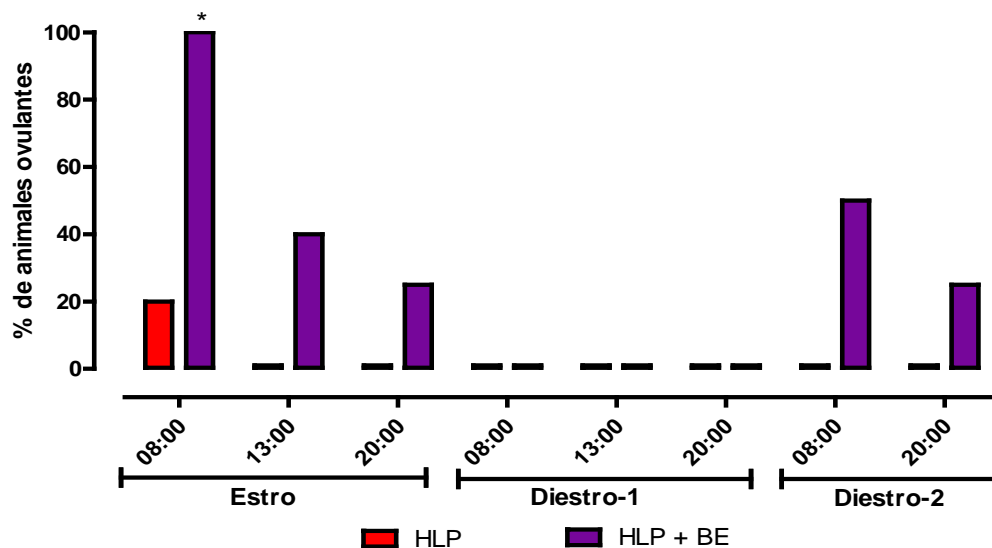


Figura 15. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de HLP (antagonista dopaminérgico DA2>DA-1) [100 µg/20 µL] en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2 esperado. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo HLP con un test exacto de Fisher.

TABLA 7. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BE SOBRE EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 Y DA-2

| Grupos | 8:00 h | 13:00 h | 20:00 h |
|------------------|------------|------------|---------|
| Estro | 11.3 ± 2.5 | 11.5 ± 1.5 | 11.0 |
| Diestro-1 | 0 | 0 | 0 |
| Diestro-2 | 4.0 ± 1.0 | NA | 11.0 |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con HLP (antagonista dopaminérgico DA-1 y DA-2) [100 µg/µL] en las bursas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2. E inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado. NA: no aplica. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al grupo vehículo de la tabla 1.

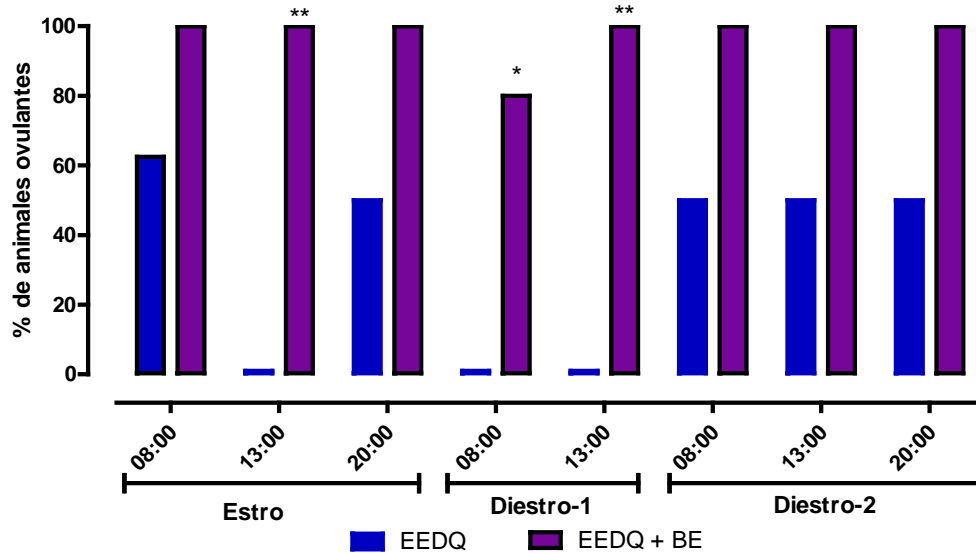


Figura 16. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de EEDQ [100 µg/20 µL] (antagonista irreversible de los receptores DA-1 y DA-2), en las bursas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo EEDQ con un test exacto de Fisher.

TABLA 8. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BE SOBRE EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO IRREVERSIBLE DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1 Y DA-2

| Grupo | 8:00 h | 13:00 h | 20:00 h |
|------------------|------------|------------|------------|
| Estro | 13.0 ± 1.3 | 12.3 ± 0.9 | 11.8 ± 0.4 |
| Diestro-1 | 5.3 ± 0.5 | 10.0 ± 1.3 | 8.3 ± 1.6 |
| Diestro-2 | 10.0 ± 2.0 | 12.0 ± 3.0 | 9.3 ± 1.8 |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con EEDQ [100 µg/ 20µL] (antagonista irreversible dopaminérgico DA-1 y DA-2) en las bursas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 o diestro-2 e inyectados con BE [10µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al vehículo de la tabla 2.

7.6 Efectos de la administración de GnRH o BE en ratas con bloqueo de los receptores DA1 o DA2 sobre la ovulación

La administración de GnRH a las 14:00 h del proestro indujo la ovulación en el 100% de los animales con inyección de SCH-23390 a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 (Fig. 17). No hubo cambios en el número de ovocitos respecto al grupo control (Tabla 9).

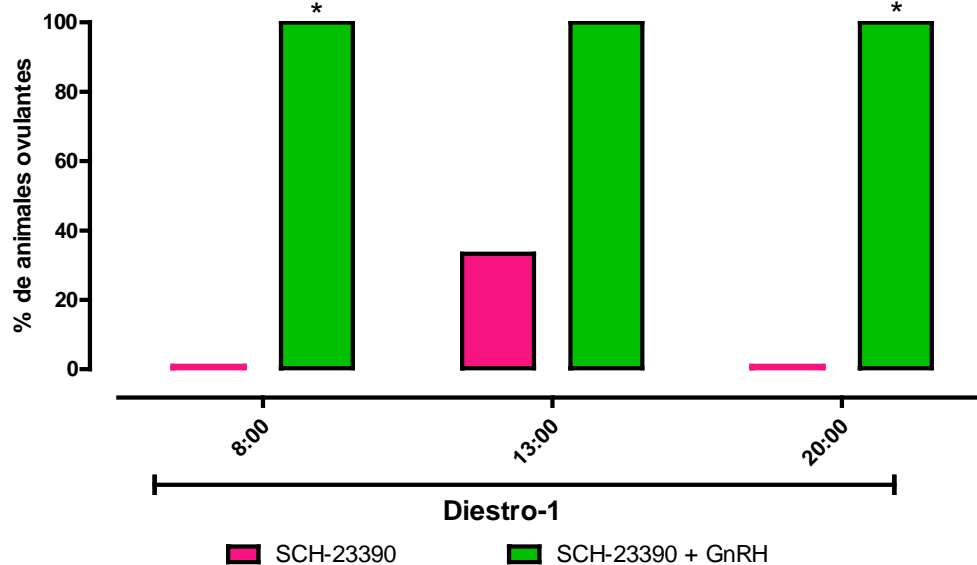


Figura 17. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de SCH-23390 [100 µg/20 µl] (antagonista de los receptores DA-1), en las bolsas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 y estimulados con GnRH [3.7 µg/kg i.m.] a las 14:00 h del proestro. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo SCH-23390 con un test exacto de Fisher.

TABLA 9. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH EN NÚMERO DE OVOCITOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1

| Grupos | Diestro-1 |
|---------|------------|
| 8:00 h | 13.0 ± 0.9 |
| 13:00 h | 6.4 ± 0.5 |
| 20:00 h | 9.75 ± 0.6 |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con SCH-23390 [100 µg/20 µL] (antagonista dopaminérgico DA-1) en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 y estimulados con GnRH [3.7 µg/kg i.m.] a las 14:00 h del proestro. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al vehículo de la tabla 3.

Asimismo, la administración de GnRH a las 14:00 h del proestro indujo la ovulación en el 100% de los animales inyectados con SPD a las 20:00 h del estro, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 y 8:00 h diestro-2. El mismo tratamiento indujo el 50% de animales ovulantes en el grupo tratado con SPD a las 8:00 h del diestro-1 (Fig. 18). No hubo cambios en el número de ovocitos respecto al grupo control (Tabla 10).

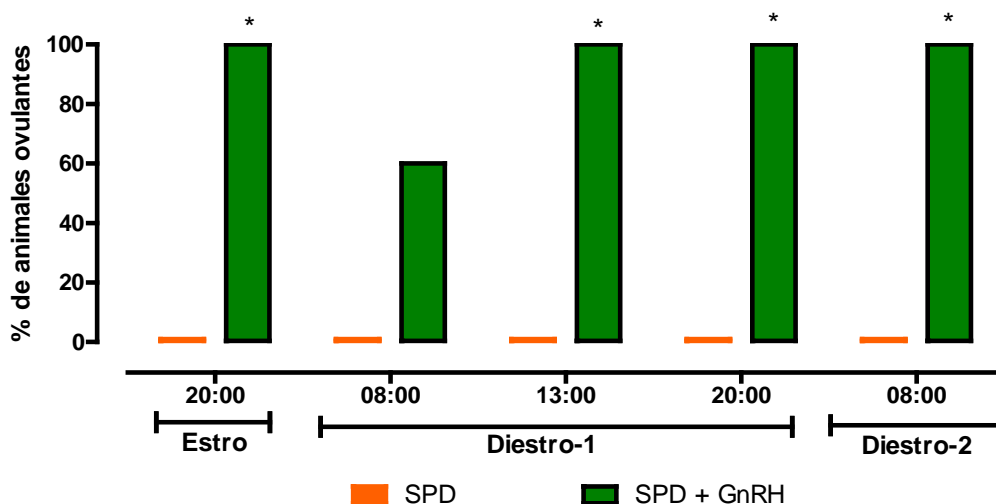


Figura 18. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de SPD (antagonista de los receptores DA-2) [200 µg/20 µL] en las bolsas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 y estimulados con GnRH [3.7 µg/kg i.m.] a las 14:00 h del proestro. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del estro vaginal esperado (n=6 por grupo). *p<0.05 respecto al grupo SPD con un test exacto de Fisher.

TABLA 10. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE GnRH SOBREL EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS POR RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-2

| Grupos | 8:00 h | 13:00 h | 20:00 h |
|------------------|------------|-----------|-----------|
| Estro | NA | NA | 7.5 ± 1.6 |
| Diestro-1 | 3.2 ± 1.8 | 9.3 ± 0.9 | 7.0 ± 1.6 |
| Diestro-2 | 10.3 ± 1.4 | NA | NA |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con SPD (antagonista de los receptores DA-2) [200 µg/20 µL] en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 y estimulados con GnRH [3.7 µg/kg i.m.] a las 14:00 h del proestro. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al vehículo de la tabla 4.

La administración de BE a las 14:00 h del diestro-2 esperada indujo el 100% de animales ovulantes a pesar del bloqueo de los receptores dopaminérgicos DA1 con SCH-23390 a las 8:00 o 20:00 h del diestro-1. El mismo tratamiento indujo el 50% de animales ovulantes cuando el bloqueo de los receptores se realizó a las 13:00 h del diestro-1 (Fig. 19). No hubo cambios en el número de ovocitos respecto al grupo control (Tabla 11).

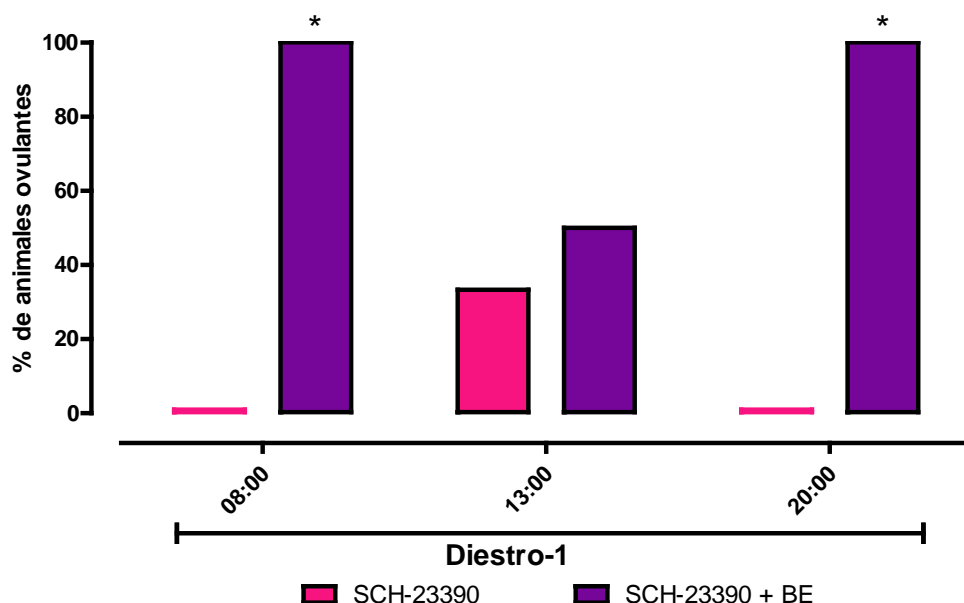


Figura 19. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de SCH-23390 (antagonista de los receptores DA-1) [100 µg/20 µl] en las bolsas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2 en animales. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6). *p<0.05 respecto al grupo SCH-23390 con un test exacto de Fisher.

TABLA 11. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BE EN LA OVULACIÓN DE RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-1

| Grupos | Diestro-1 |
|---------|------------|
| 8:00 h | 13.5 ± 1.0 |
| 13:00 h | 6.0 ± 1.5 |
| 20:00 h | 11.8 ± 1.2 |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con SCH-23390 (antagonista de los receptores DA-1) [100 µg/20 µL] en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al grupo vehículo de la tabla 3.

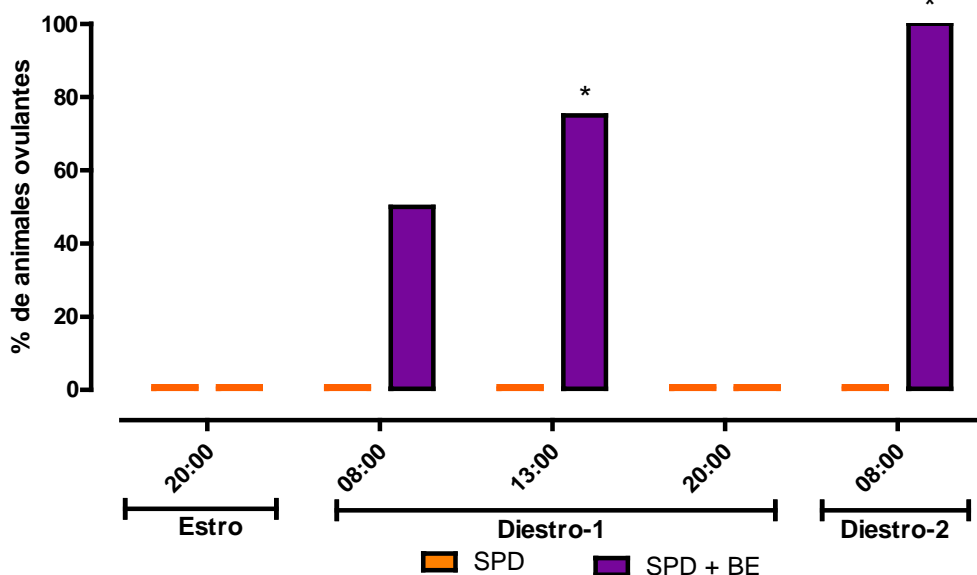


Figura 20. Porcentaje de animales ovulantes con inyección de SPD (antagonista de los receptores DA-2) [200 µg/20 µL] en las bolsas ováricas a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del diestro-1 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado (n=6). *p<0.05 respecto al grupo SPD con un test exacto de Fisher.

TABLA 12. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE BE EN LA OVULACIÓN DE RATAS CON BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DA-2

| Grupos | 8:00 h | 13:00 h | 20:00 h |
|------------------|------------|-----------|-----------|
| Estro | NA | NA | 9.8 ± 3.3 |
| Diestro-1 | 4.7 ± 1.5 | 4.7 ± 2.2 | 0 |
| Diestro-2 | 11.3 ± 1.4 | NA | NA |

Media ± EEM del número de ovocitos de los animales inyectados con SPD (antagonista dopaminérgico DA2) [200 µg/µL] en las bolsas ováricas, a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 e inyectados con BE [10 µg s.c.] a las 14:00 h del diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 h del siguiente estro vaginal esperado. ANOVA de una vía y una post-prueba de Kruskal Wallis *p<0.05 respecto al grupo vehículo de la tabla 4.

El reemplazo hormonal con BE no indujo ovulación en los grupos con inyección de SPD a las 20:00 h del estro o diestro-2. El mismo tratamiento indujo ovulación en el 50% y 75% de los animales con bloqueo de los receptores DA1 a las 8:00 o 13:00 h del diestro-1 respectivamente. Todos los animales ovularon con BE cuando el bloqueo de los receptores DA1 se realizó a las 8:00 h del diestro-2 (Fig. 20). No hubo cambios en el número de ovocitos liberados respecto al grupo control (Tabla 12).

7.7 Variación de las hormonas esteroides: estradiol y progesterona, en el estro esperado de los animales no ovulantes con bloqueo de los receptores dopaminérgicos ováricos

Las concentraciones de progesterona (ng/mL) en el estro esperado fueron más elevadas en los animales inyectados con HLP a las 8:00 o 13:00 h en el día del diestro-1 y a las 08:00 h del diestro-2 respecto al grupo control (Fig. 21A).

Las concentraciones de progesterona (ng/mL) no se modificaron en los animales no ovulantes tratados con SCH-23390 en diestro-1 a las 8:00 h o 13:00 h con respecto al grupo vehículo al momento del sacrificio (Fig. 21B).

Asimismo, las concentraciones de progesterona en los animales no ovulantes tratados con SPD en diestro-1 a las 8:00 o 13:00 h; o en diestro-2 a las 8:00 h fueron similares al grupo vehículo al momento del sacrificio (Fig. 21C).

Las concentraciones de estradiol en los animales no ovulantes tratados con HLP en las bursas ováricas a las 8:00 h del estro, diestro-1 y diestro-2 fueron mayores respecto al grupo vehículo (Fig. 22A).

No se observaron cambios en las concentraciones de estradiol en las ratas tratadas con HLP a las 13:00 h del estro y diestro-1 respecto al grupo vehículo (Fig. 22A).

En los animales tratados con SCH-23390 a las 8:00 o 13:00 h del diestro-1 no ovulantes las concentraciones de estradiol fueron similares al grupo vehículo (Fig. 22B).

Del mismo modo, los animales no ovulantes tratados con SPD a las 8:00 o 13:00 h del diestro-1 y a las 8:00 h del diestro-2 no presentaron modificaciones en las concentraciones de estradiol respecto al grupo vehículo (Fig. 22C).

Las concentraciones de estradiol en los animales no ovulantes tratados con HLP fueron mayores respecto a los animales tratados con SPD a las 8:00 h del diestro-2 (Fig. 22 A y C).

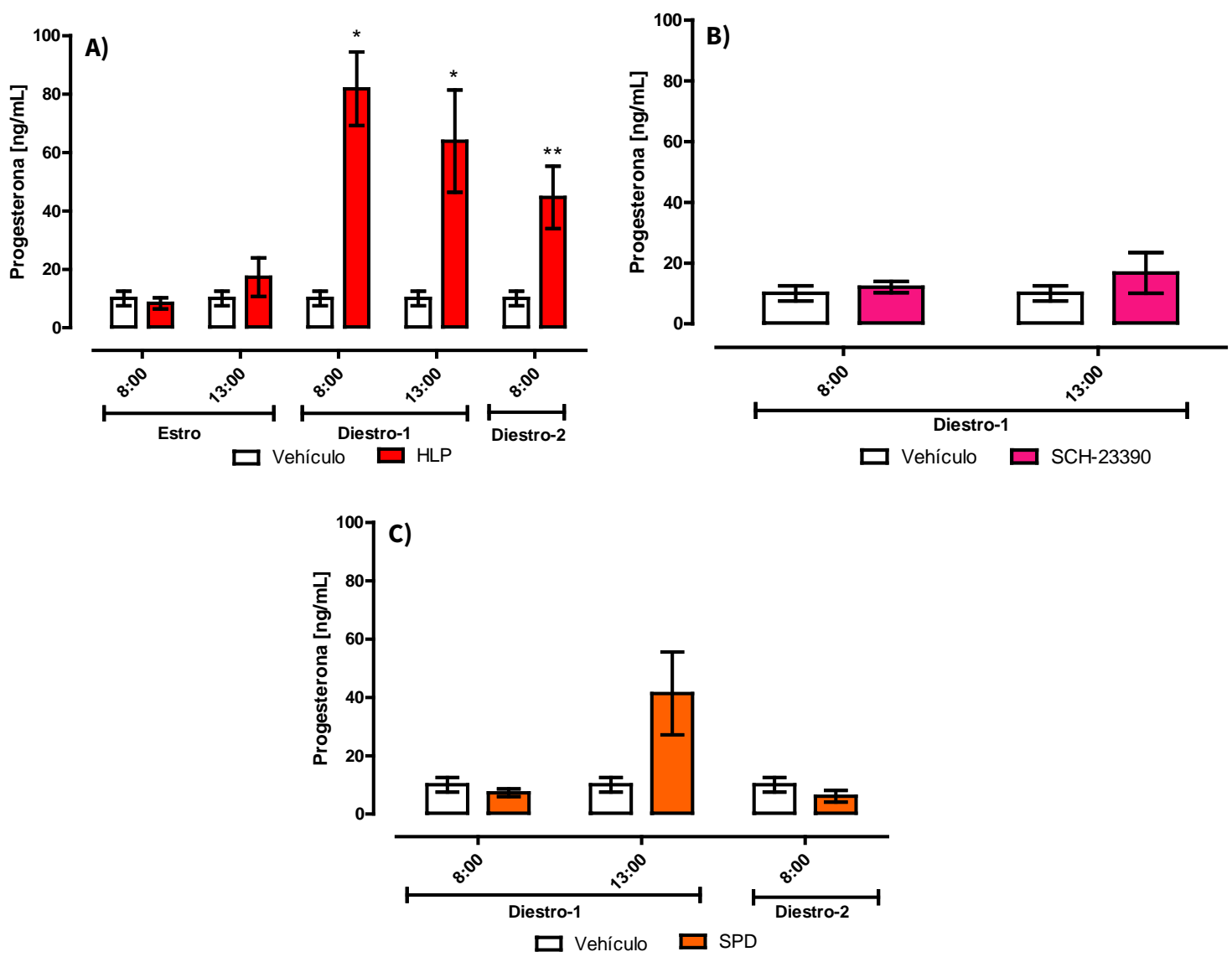


Figura 21. Concentraciones de progesterona (ng/mL) en suero al momento del sacrificio de animales no ovulantes inyectados con antagonistas dopaminérgicos en las bolsas ováricas. Las gráficas muestran la media \pm EEM de los animales inyectados con A) HLP, B) SCH-23390 y C) SPD a las 8:00 o 13:00 del estro, diestro-1 y diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 del siguiente estro vaginal esperado. * $p < 0.05$ respecto al grupo vehículo (U-Mann Whitney t-test).

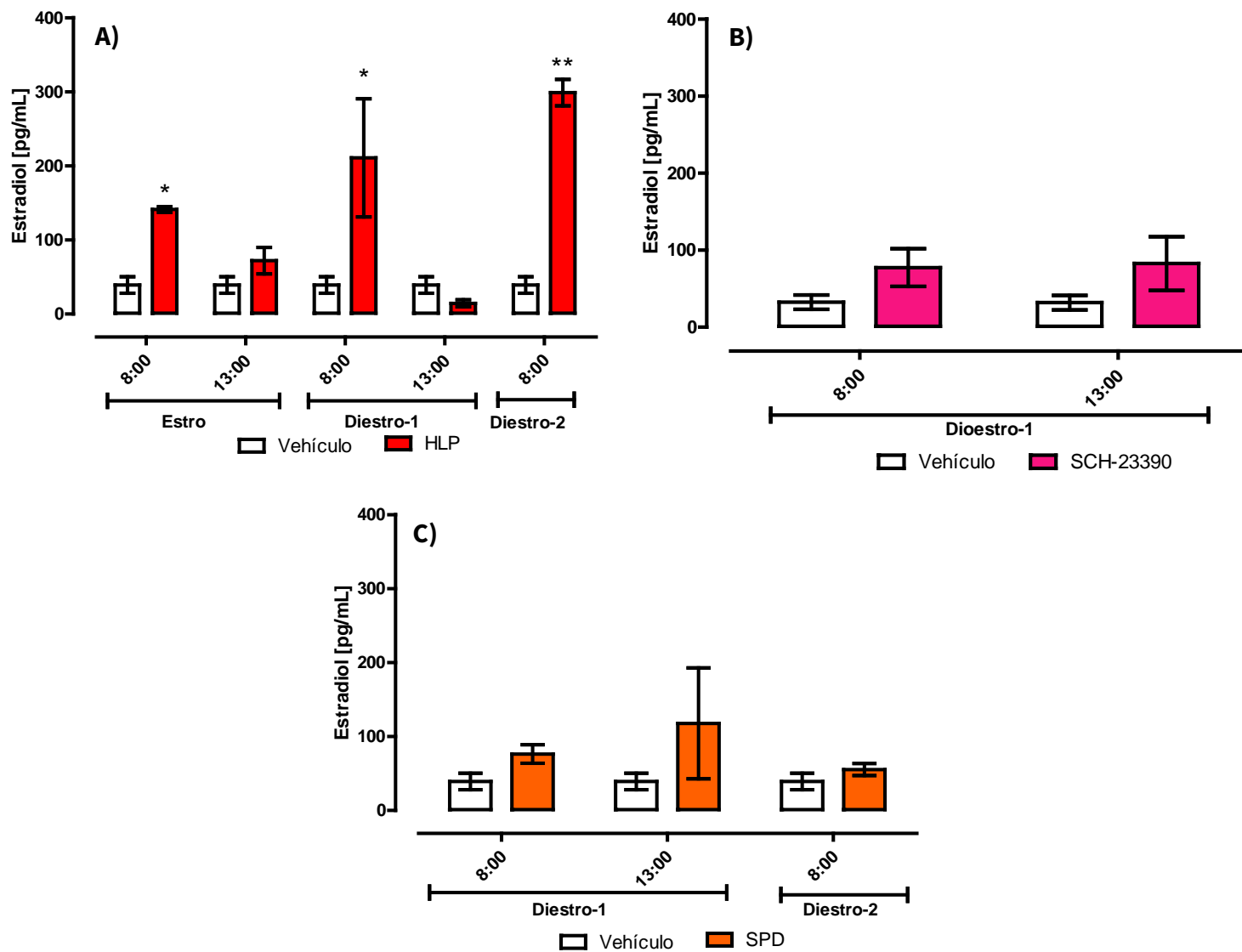


Figura 22. Concentraciones de estradiol (pg/mL) en suero al momento del sacrificio de animales no ovulantes inyectados con antagonistas dopaminérgicos en las bursas ováricas. Las gráficas muestran la media \pm EEM de los animales inyectados con A) HLP, B) SCH-23390 y C) SPD a las 8:00 o 13:00 del estro, diestro-1 y diestro-2. Los animales se sacrificaron a las 9:00 del siguiente estro vaginal esperado. * $p < 0.05$ respecto al grupo vehículo (U-Mann Whitney t-test).

7.8 Efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos ováricos DA1 y DA2 en el estro y diestro-1 sobre la presencia de tirosina hidroxilasa, dopamina β hidroxilasa y la proteína fosforilada DARPP-32 en el ovario

En los cortes ováricos del grupo control inyectado con solución salina a las 13:00 h del estro o diestro-1 se observó la presencia de marca para TH principalmente en células de la teca y en menor proporción en células de la granulosa. No se encontraron folículos preovulatorios. En los cortes ováricos del grupo inyectado con HLP a las 13:00 h del diestro-1, la inmunoreactividad en las células de la teca y granulosa fue mayor que la del grupo control (HLP: 422 ± 76.9 vs. control: 197 ± 9.5 megapíxeles por campo). En los ovarios de los animales tratados con HLP se encontraron folículos preovulatorios (Fig. 24 y 25).

Con el mismo procedimiento mencionado anteriormente, se analizó la presencia de DBH, la enzima limitante para la síntesis de noradrenalina. En el caso de los cortes ováricos del grupo vehículo inyectado con solución salina se encontró marca en las células de la granulosa y células de la teca. Al comparar la inmunoreactividad del grupo vehículo respecto al grupo inyectado con HLP en diestro-1, no se encontraron cambios significativos en la enzima (Control: 361.3 ± 71.2 ; HLP: 586.2 ± 90.7) (Fig. 26 y 27).

Finalmente para el caso de la inmunoreactividad de la proteína DARPP-32 fosforilada en Thr 34, se encontró marca localizada en las células de la granulosa y de la teca de los folículos ováricos de animales inyectados con solución salina y de ratas tratadas con HLP a las 13:00 h del estro y sacrificados al siguiente estro esperado. En los folículos ováricos de animales inyectados en el diestro-1 con solución salina la inmunoreactividad a DARPP-32 fue mayor que en los folículos ováricos de ratas inyectadas en estro (Fig. 28 y 29). En el grupo tratado con HLP en diestro-1 hay una mayor presencia de la proteína con respecto al grupo vehículo.

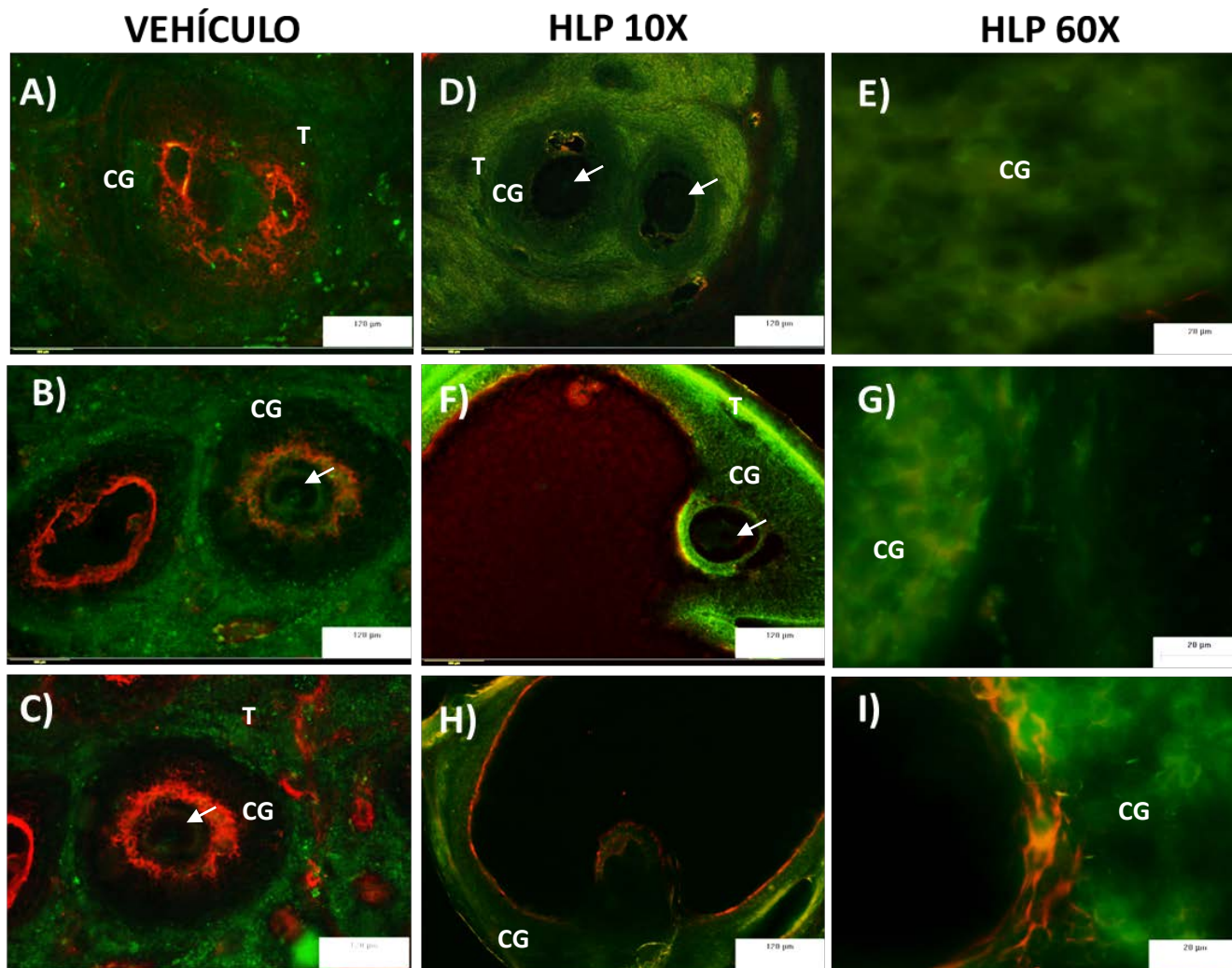


Figura 23. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del estro sobre la inmunorreactividad a la tirosina hidroxilasa en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en menor proporción en las células de la granulosa, colocalizadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, \longrightarrow Ovocito.

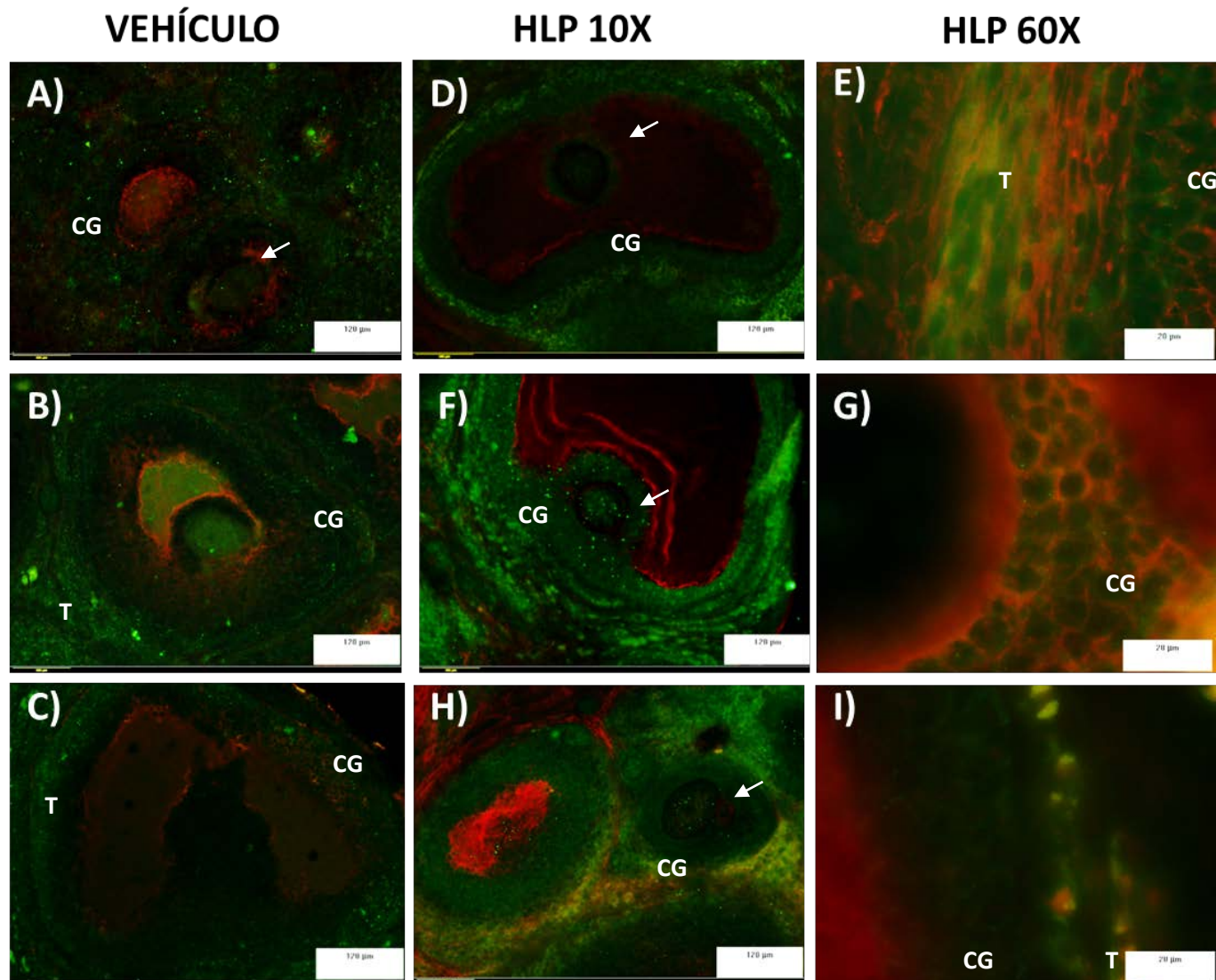


Figura 24. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del diestro-1 sobre la inmunorreactividad a la tirosina hidroxilasa en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para tirosina hidroxilasa (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en las células de la granulosa, colocalizadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 µg/ 20 µL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, \longrightarrow ovocito.

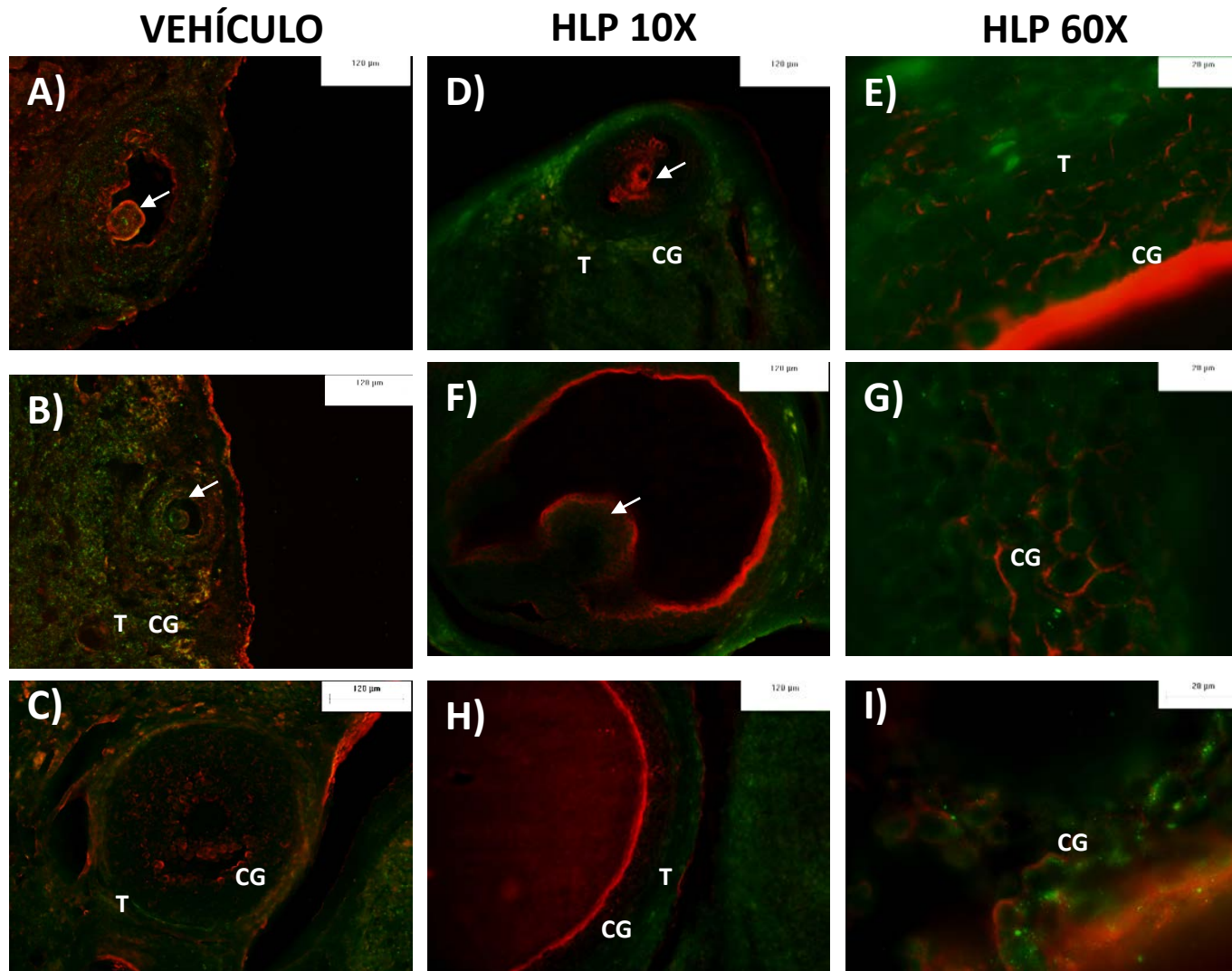


Figura 25. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del estro sobre la inmunorreactividad a dopamina β -hidroxilasa en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para DBH (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en las células de la granulosa, colocalizadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 μ g/ 20 μ L] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, \longrightarrow Ovocito.

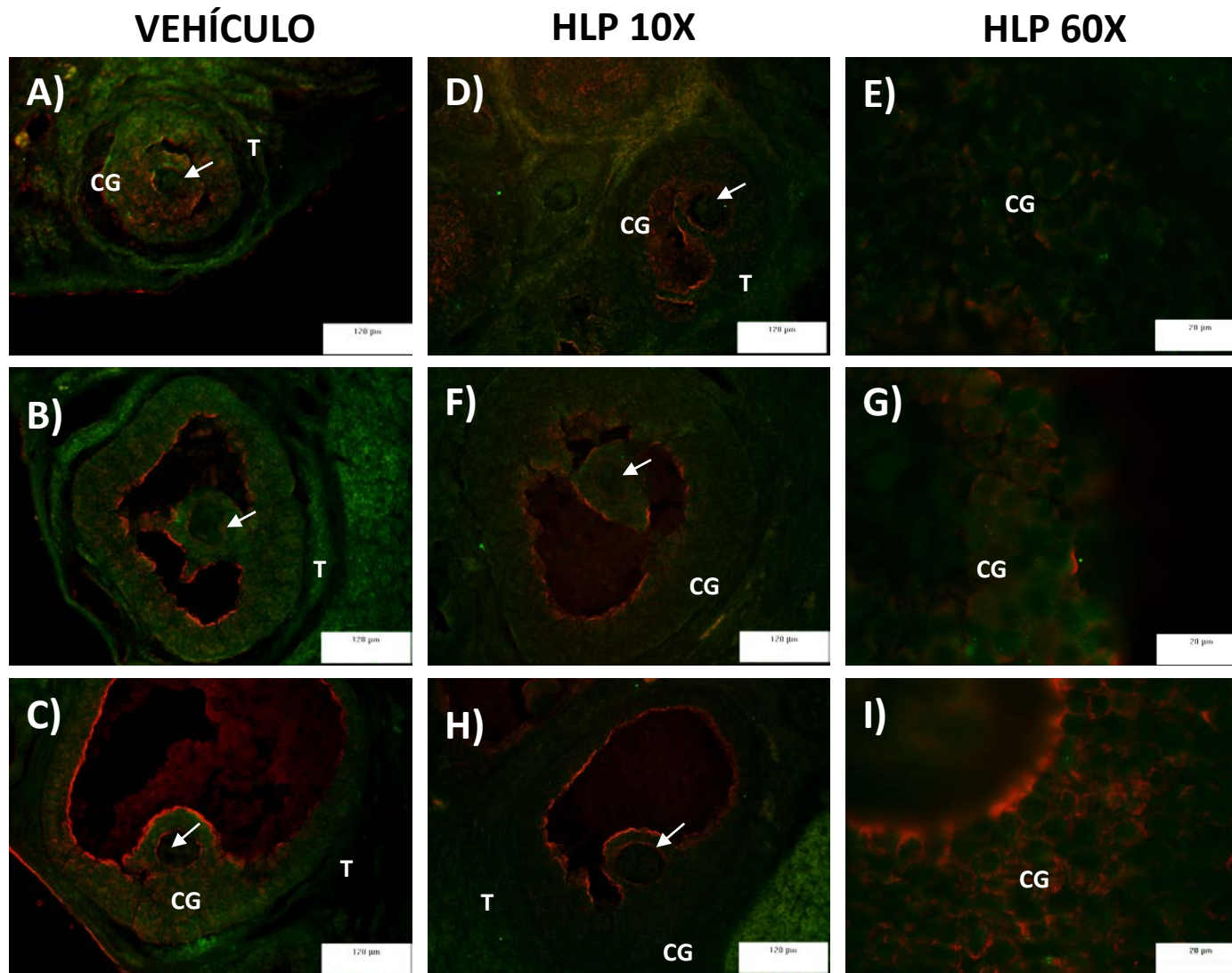


Figura 26. Efecto del bloqueo de los receptores DA-1 y DA-2 ováricos a las 13:00 h del diestro-1 sobre la inmunorreactividad a dopamina β -hidroxilasa en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para DBH (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en las células de la granulosa, colocadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 μ g/ 20 μ L] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, \longrightarrow Ovocito.

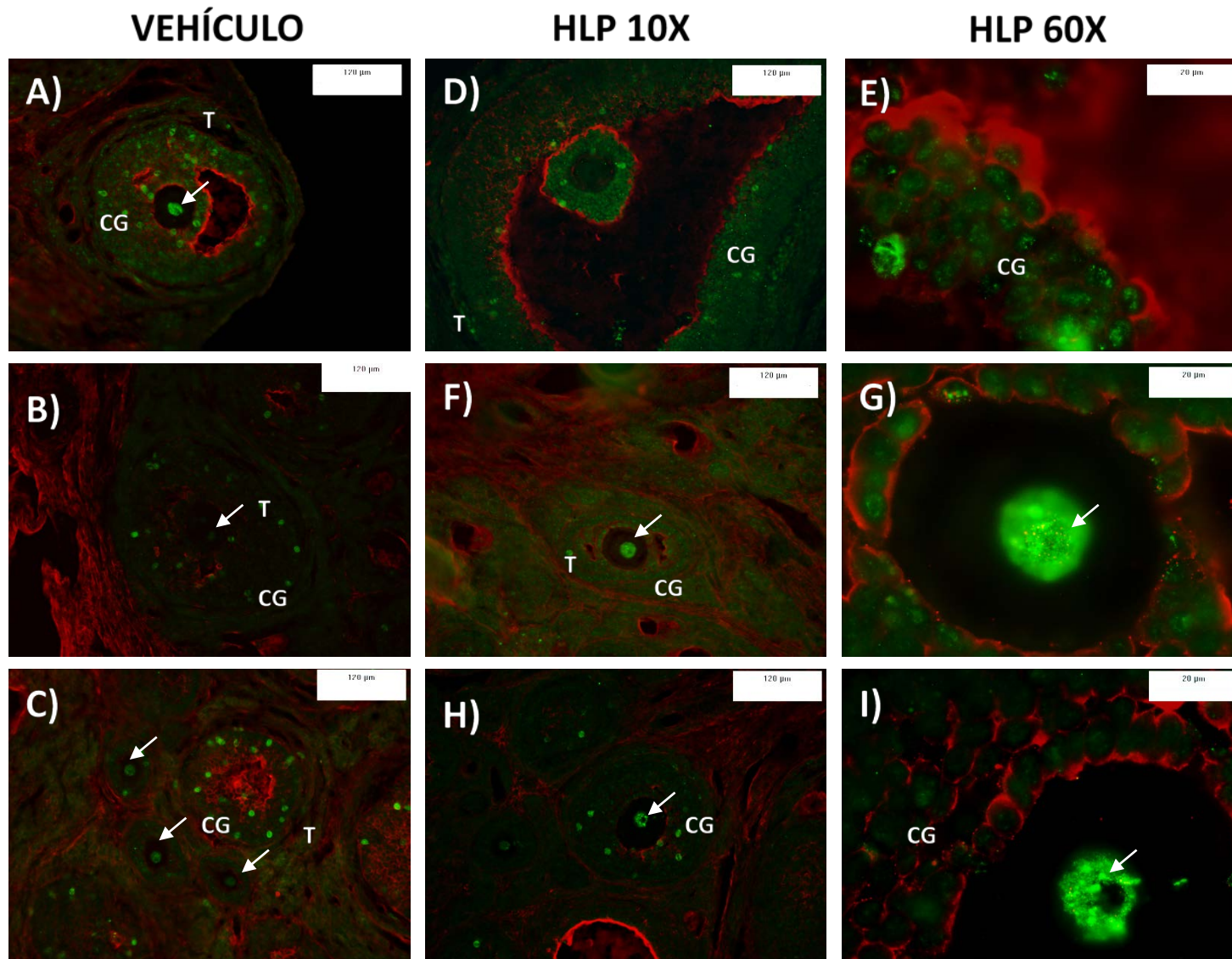


Figura 27. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del estro sobre la inmunorreactividad a DARPP-32 en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para DARPP-32 (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en las células de la granulosa, colocadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 μg/ 20 μL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, —→ Ovocito.

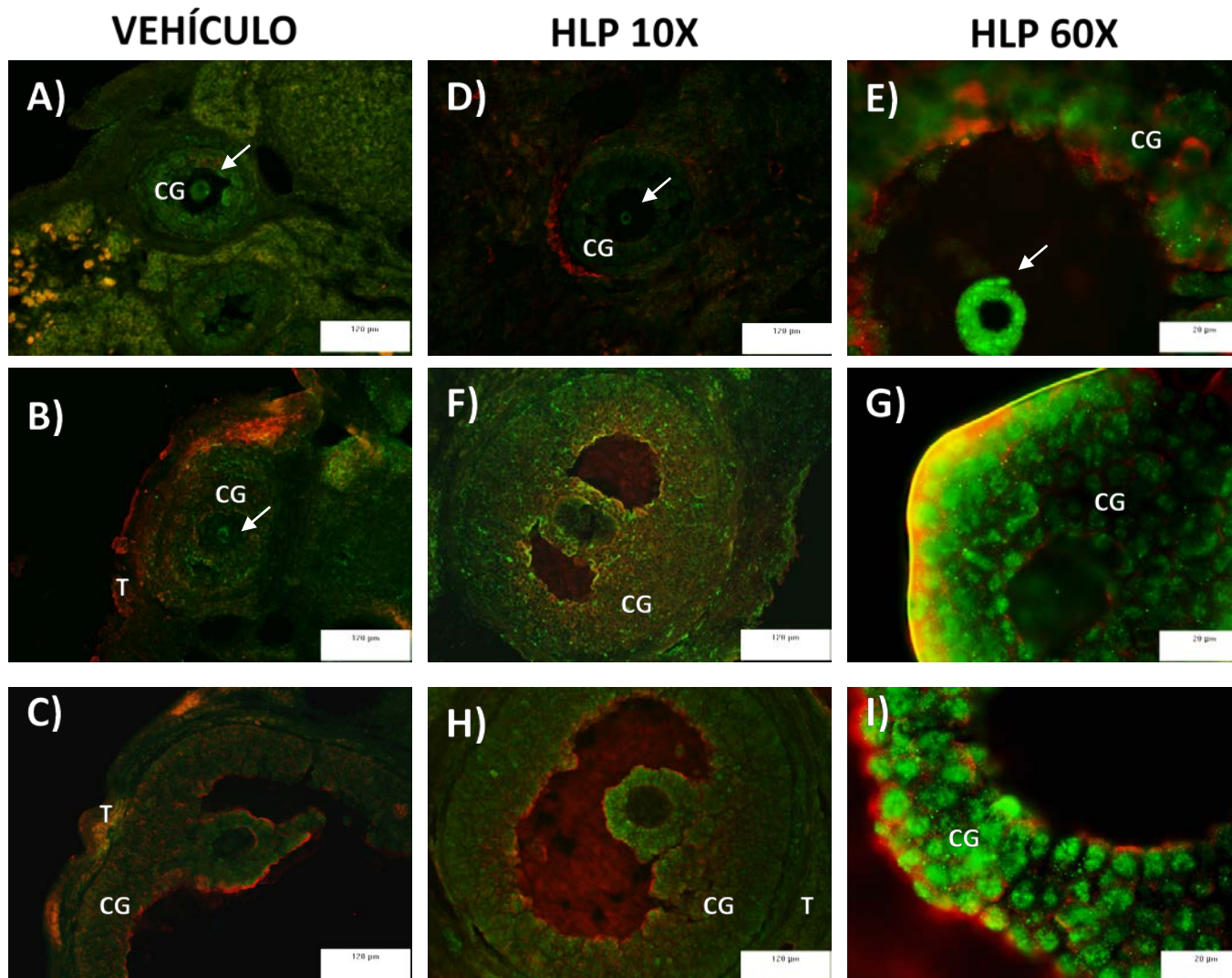


Figura 28. Efecto del bloqueo de los receptores DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del diestro-1 sobre la inmunorreactividad a DARPP-32 en los folículos ováricos al siguiente estro esperado. El panel de microfotografías muestra la inmunorreactividad para DARPP-32 (verde, Santa Cruz, inc. 1:500) en las células de la teca y en las células de la granulosa, colocadas con actina (Rojo Santa Cruz Inc. 1:200). A), B) y C) folículos ováricos de ratas inyectadas con NaCl 0.9% en las bursas ováricas, D), F) y H) folículos ováricos de ratas inyectadas con HLP [100 μg/ 20 μL] en las bursas ováricas, Magnificación 10X. E), G) e I) Amplificación a 60X de los folículos de ovarios tratados con HLP CG: Células de la granulosa, T: Células de la teca, —→ Ovocito.

7.9 Efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos DA1 y DA2 ováricos a las 13:00 h del diestro-1 en el desarrollo folicular

La inyección de salina dentro de las bursas ováricas no induce cambios en la morfología de los folículos ováricos (Fig. 30B). Cuando los ovarios fueron tratados con salina, se observaron folículos medianos (Fig. 30A), mientras que en el grupo inyectado con HLP en las bursas ováricas a las 13:00 h del D1, se observaron folículos preovulatorios (Fig. 30C). En estos folículos, la incidencia de atresia fue elevada (Fig. 30D).

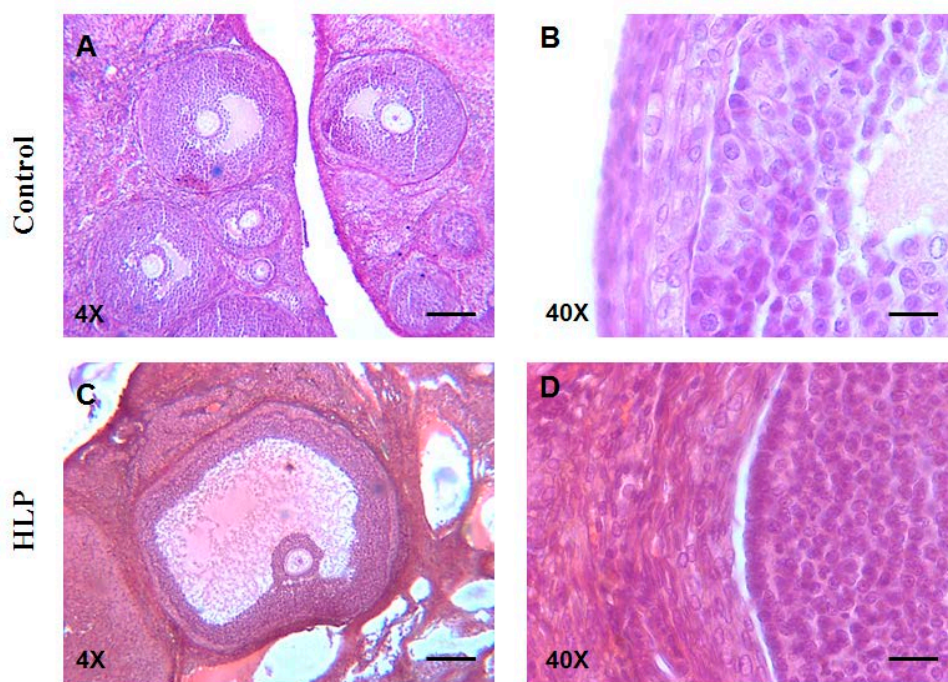


Figura 29. El panel de microfotografías muestra la morfología ovárica de A) y B) folículos ováricos de ratas con inyección de NaCl 0.9% a las 13:00 del diestro-1 a 10X o 40X respectivamente o C) y D) folículos ováricos de ratas con inyección de 100 μ g/20 μ L de HLP a las 13:00 h diestro-1. Los folículos ováricos con inyección de HLP presentan atresia folicular. Bar 100 o 50 μ m.

7.10 Efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos en el ovario a las 13:00 h del diestro-1 sobre el nivel del ARNm del citocromo P450 aromatasa de ovario al día del estro esperado.

Al estro esperado, no hubo cambios en el ARNm de la P450 aromatasa ovárica en ratas sometidas a laparotomía (Grupo Sham) a las 13:00 h del diestro-1, respecto al grupo vehículo (NaCl 0.9%) (Fig. 31A y B). Este resultado muestra que ni la propia cirugía, ni la inyección en las bursas ováricas modifican la transcripción del gen de la P450 aromatasa en el diestro-1.

Al comparar el grupo intacto en proestro (INT P), respecto a los grupos de animales ovulantes sham y vehículo realizados en diestro-1 (sacrificados al estro esperado y confirmado el día del ciclo por citología vaginal), se observó que la cantidad de ARNm de la P450 aromatasa ovárica aumentó un 80%, por consiguiente se deduce que existe una mayor cantidad de transcrito en el día del estro que en el proestro (Fig. 31A).

Los grupos sham y vehículo respecto a los grupos inyectados con los antagonistas dopaminérgicos no presentan diferencias significativas (Fig. 31A y B); sin embargo, no se puede asumir una comparación entre los mismos debido a que se encuentran en momentos hormonales diferentes según lo observado en la citología vaginal.

Los grupos sham y vehículo tratados a las 13:00h del diestro-1 mostraron un estro vaginal al momento del sacrificio y presentaron ovulación espontánea, lo que indica que se llevó a cabo la correcta regulación hormonal para la síntesis de estrógenos.

Los grupos inyectados con los antagonistas dopaminérgicos en el ovario, mostraron citología vaginal típica de diestro y proestro al momento del sacrificio y no presentaron ovulación. Por esta razón, la concentración de ARNm de los grupos inyectados con los antagonistas dopaminérgicos tiene mayor correlación con el ARNm del grupo de ratas intactas en proestro ya que se encuentran en momentos hormonales similares según lo observado en la citología vaginal al momento del sacrificio.

Los datos muestran que el antagonismo de los receptores DA1 o DA2 en los ovarios de rata a las 13:00 h del diestro-1 incrementa un 60 y 70% respectivamente la transcripción de la aromatasa respecto al grupo intacto en proestro (Fig. 31A).

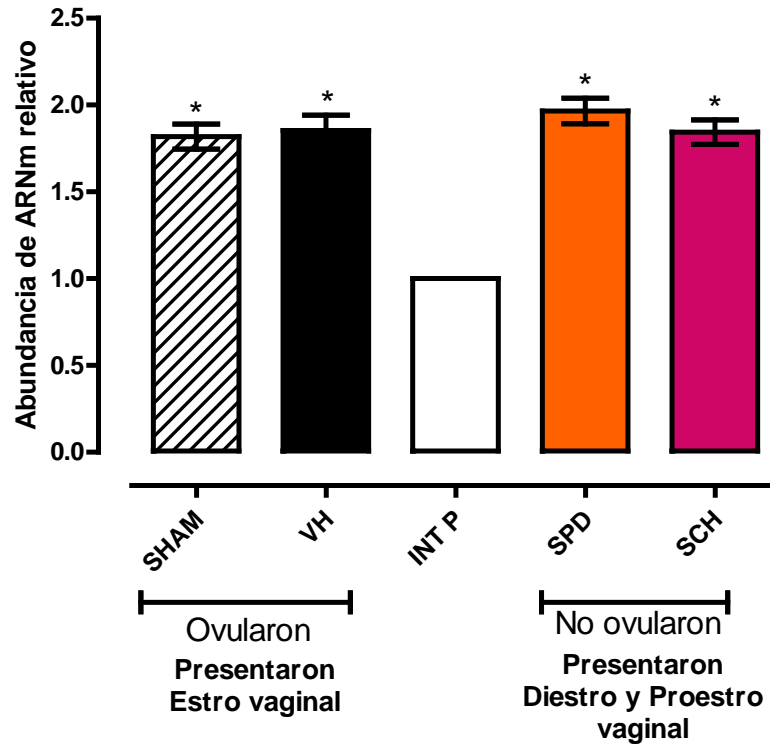


Figura 30. Efecto de los antagonistas dopaminérgicos en el diestro-1 sobre los niveles de ARNm de P450 aromatasa al estro esperado. La determinación se realizó por qRT-PCR. El nivel de ARNm de ratas intactas en proestro fue fijado arbitrariamente como 1.0 y la relación de los grupos tratados se calcularon respecto al mismo. Se muestra la abundancia relativa del ARNm de P450 de los ovarios tratados con los antagonistas dopaminérgicos selectivos SCH y SPD antagonistas del receptor DA1 y DA2 respectivamente. Cada barra representa la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes por triplicado. * $P < 0.001$, frente al grupo intacto en proestro.

VIII. DISCUSIÓN

El presente estudio se muestra por primera vez los efectos endócrinos y neuroendócrinos que regula la unión de la DA a sus receptores dopaminérgicos DA1 y DA2 presentes en los ovarios durante el día del diestro-1.

Estudios realizados en yeguas y perras muestran la relación que tiene la estimulación de los receptores dopaminérgicos a nivel sistémico con la ovulación, y la secreción de hormonas esteroides (Mari et al., 2009; Donadeu et al., 2002; Zoldag et al., 2001; Besognet et al., 1997). En yeguas en anestro, el bloqueo de los receptores DA2 por el tratamiento con SPD adelantó la primera ovulación (Mari et al., 2009).

En ratas hembra, la inyección sub-crónica de antipsicóticos (antagonistas de los receptores dopaminérgicos) redujo el número de animales con ciclos estrales regulares los cuales presentaron diestro en estado permanente (Fell et al., 2004).

En el presente estudio, la inyección del antagonista selectivo de los receptores DA1 a las 8:00, 13:00 o 20:00 h dentro de las bursas ováricas en ratas en diestro-1, retrasaron la ovulación la cual se presentó 24 h después del estro vaginal esperado. Estos resultados nos sugiere que en el diestro-1 la unión de la DA a los receptores DA1 participa en la regulación del desarrollo folicular y como resultado retrasa los mecanismos endócrinos y neuroendócrinos para que se produzca la ovulación.

Al analizar el papel de los receptores dopaminérgicos DA2 se sugiere que la unión de la DA a dichos receptores es necesaria desde la noche del estro a la mañana del diestro-2 y probablemente tenga efectos en el hipotálamo (bloqueo de la liberación de GnRH) o hipófisis (retraso en el *feedback* estimulante de los estrógenos para la secreción de LH).

Para que se produzca la ovulación se requiere el aumento en la frecuencia y amplitud de la liberación pulsátil de GnRH por el hipotálamo a fin de que se produzca la secreción preovulatoria de LH (Maeda et al., 2010). En los mamíferos la regulación de la secreción de GnRH participan informaciones neuroendocrinas intrínsecas que culminan con el aumento de la frecuencia y amplitud de los pulsos de la hormona. Este mecanismo

es propio de los llamados ovulantes espontáneos (mujer, rata, ratón, vaca). En el otro modelo el aumento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH es desencadenados por el coito y a esas especies se les denomina ovulantes reflejos, como son la gata, coneja, hurón (Maeda et al., 2010).

En el ciclo de los animales de ovulación espontánea, la actividad del generador de pulsos de GnRH es modulada por los esteroides gonadales, estrógenos y progesterona (Haughian y Wiltbank, 2002). En la mujer, durante la fase luteal que sigue a la ovulación las altas concentraciones de progesterona se acompañan de la presencia de pulsos de LH de baja frecuencia y alta amplitud. Cuando las concentraciones de estradiol de la fase folicular se mantienen incrementadas, los pulsos de LH ocurren a una mayor frecuencia y menor amplitud (Goodman y Karsch, 1980). Estos efectos de la progesterona y el estradiol sobre la pulsabilidad de la GnRH y LH son críticos en la regulación del desarrollo folicular. Cuando la concentración plasmática de progesterona disminuye debido a la lisis del cuerpo lúteo, el generador de pulsos de GnRH se reactiva lo cual resulta en el aumento de la frecuencia de los pulsos de LH, los que a su vez estimulan la secreción de estradiol que culmina con el “pico preovulatorio de estradiol” el cual es necesario para que se produzca el “picopreovulatorio de LH” y la ovulación del (los) folículo(s) dominante(s) (Wiltbank et al., 2002).

En el día del diestro-2 el aumento en la concentración de estradiol ejerce un *feedback* estimulante sobre la secreción de GnRH que culmina en el día del proestro con un aumento brusco de la concentración plasmática de la hormona lo cual estimula el aumento de la frecuencia y amplitud de la secreción de preovulatoria de GnRH Y LH que induce la ovulación (Evans et al., 1995, 1997; Freeman 2006).

En el presente estudio, el reemplazo de la señal hormonal de GnRH en el día del proestro esperado en los animales con bloqueo de los receptores dopaminérgicos DA1 y DA2 o ambos, provocó ovulación en todos los animales al estro esperado. Esto nos sugiere que la unión de la DA a sus receptores participa en la regulación de la liberación preovulatoria de GnRH y LH.

Dado que el bloqueo conjunto de los receptores DA₂>DA₁ por la inyección de HLP previene el feedback estimulante de los estrógenos, retrasa el desarrollo folicular y la ovulación, sugiero que la información dopaminérgica del ovario participa de manera estimulante en la regulación de la síntesis de estrógenos y el desarrollo folicular.

En el presente estudio, el bloqueo de los receptores dopaminérgicos DA₂>DA₁ por la micro inyección de HLP en las bursas ováricas resultó en la disminución de la concentración de progesterona sérica, mientras que el bloqueo de uno u otro receptor no afectó dichos resultados, probablemente por un aumento en la secreción de prolactina (Batipsta y cols., 2002; Kinon y cols., 2003).

Según Abogast y Ben-Jonathan (1990) la progesterona pero no el estradiol mantiene los niveles basales de prolactina debido a una reducción en la actividad de las neuronas hipotalámicas lo que conduce a una ausencia en la entrada de DA a los lactotopos de la hipófisis anterior. Como resultado, la concentración de prolactina permanece elevada por un periodo prolongado, lo que produce cambios en la oleada de LH.

Taketa y cols., (2011), mostraron que la inyección de SPD durante cuatro días a ratas adultas, éstas presentaron altos niveles de prolactina, progesterona en suero, y la expresión de StAR y 3 β -HSD en el cuerpo lúteo recién formado, por lo que sugieren que el aumento en la concentración de progesterona se debe a la secreción de prolactina por la hipófisis.

Durante la formación del cuerpo lúteo se presenta un aumento en la angiogénesis la cual es regulada por una variedad de factores estimulantes e inhibitorios (Macchiarelli y cols., 2010). Según Delgado-Rosas y cols., (2011 y Gómez y cols., (2006, 2011) en el cuerpo lúteo de la rata la unión de la DA a sus receptores DA₂ inhibe al factor de crecimiento endotelial vascular un mediador de la angiogénesis ovárica. La inyección de agonistas del receptor DA₂ disminuye permeabilidad vascular observada en ratas pre-púberes inyectadas con PMSG sin afectar la angiogénesis ovárica. En el presente estudio el bloqueo de los receptores DA₂ por la micro inyección de SPD dentro de las bursas ováricas bloqueó la ovulación y se podría sugerir que la vida del cuerpo lúteo se pudo

haber prolongado, lo que resultaría en una alteración en los mecanismos luteolíticos modificando el crecimiento y la maduración del folículo. En nuestro estudio, la inyección de GnRH a ratas con bloqueo de los receptores DA2 con SPD se produjo la ovulación por lo que sugiere que la maduración de los folículos y la presencia de receptores a LH no fue afectada.

Mostafapour y cols., 2014 mostraron que ratas inyectadas con SPD durante 28 días disminuyen las concentraciones séricas de FSH, LH y estradiol, mientras que las de progesterona y prolactina permanecen aumentadas. En el presente estudio la inyección de SPD en el diestro-1 no modificó la concentración de progesterona y los animales ovularon 24 a 48 h posteriores al estro esperado, lo cual nos sugiere que la concentración de prolactina no se habría incrementado por la inyección de SPD.

Aunque el HLP y el SPD son antagonistas de los receptores DA2 que inducen hiperprolactinemia, se requiere inyectar altas dosis de SPD para incrementar los niveles de progesterona (Mostafapour y cols., 2014). Estudios en cultivos celulares de ovario de rata, tratadas con PMSG e incubadas con agonistas del receptor DA1, incrementaron los niveles de progesterona (Mori y cols., 1994). En el presente estudio las ratas con bloqueo del receptor dopaminérgico DA1 no mostraron cambios en la concentración de progesterona, lo que nos sugiere que otros factores además de la dopamina participan en la regulación de la secreción de progesterona.

Rey-Ares y cols., (2007), muestran que la cantidad de ARNm de los receptores DA1 o DA2 es mayor en las células de la teca y el cuerpo lúteo que en las células de la granulosa. El estímulo con LH de las células teco-intersticiales de los folículos ováricos aumenta la síntesis de andrógenos y su conversión a estrógenos, por lo que se sugiere que la unión de la DA a sus receptores regula la síntesis de hormonas esteroideas (Gervásio et al., 2014). Dado que mostramos que entre las células de la teca algunas son TH positivas, proponemos que el ovario tiene la maquinaria enzimática para sintetizar *per se* DA y que ésta participa en la regulación de la conversión de andrógenos a estrógenos. Es posible que estas células sean neuronas, que podrían participar en la regulación de las funciones ováricas, tal y como ha sido propuesto (Lara y cols., 2002; Greiner y cols., 2008,

Domínguez y cols. 2012, Gerendai y cols. 2009). Dado que las células de la granulosa no pueden sintetizar DA debido a que no expresan TH, si poseen transportador a DA y NA lo que les permite incorporar DA y NA a las células las cuales participan en la regulación de la síntesis hormonal por estas células (Greiner y cols. 2008).

Mayerhofer y cols., 1998 proponen que en el ovario la DA solo actúa como precursor para la síntesis de NA. En nuestro estudio, el bloqueo de los receptores DA1 y DA2 por la inyección de HLP en las bursas ováricas resultó en la disminución de la expresión de DBH, enzima limitante para la síntesis de NA, en las células de la teca folicular, lo que nos sugiere que la dopamina regula la síntesis de NA por dichas células y que la DA per se modula la regulación del ciclo ovárico de la rata adulta.

En las células de la granulosa de folículos humanos se localizan los cinco receptores dopaminérgicos descritos en el SNC, mientras que en las células de la granulosa del ovario de la ratas se describen solo dos receptores dopaminérgicos (Rey-Ares y cols., 2007). La activación de estos receptores por la DA genera una vía de transducción de señales intracelular que permite la activación de DARPP-32 (Rey-Ares y cols., 2007; Mayerhofer y cols., 1999; 2000), el cual representa un integrador funcional de algunos mensajeros. La DARPP-32 es una fosfodiesterasa que participa en la cascada de señalización del receptor DA1 y este receptor participa en la regulación de la síntesis de hormonas esteroides. En nuestro estudio, se mostró *in vivo* que la DA interactúa con el receptor DA1 lo que resulta en la activación (fosforilación en Thr 34) de la DARPP-32 en las células de la granulosa. La unión de la DA a los receptores DA1, pero no a los DA2, aumenta la fosforilación de dicha proteína (Ouimet y cols., 1984), lo que nos sugieren que la dopamina participa en la regulación de la síntesis de hormonas esteroides por su unión a los receptores DA1, tal y como ha sido postulado (Mayerhofer y cols., 1999; Rey-Ares y cols., 2007). Dado que no todas las células de la granulosa se encuentran activas simultáneamente, propongo que la actividad de los receptores a DA presentes en el ovario depende de la hora del día del ciclo estral.

Los resultados del bloqueo de los receptores dopaminérgicos DA1 y DA2 en las bursas ováricas de ratas en diferentes días y horas del ciclo estral, nos sugieren que en la primera

mitad del ciclo estral, la unión de la DA a sus receptores dopaminérgicos ováricos, generan señales neuroendocrinas que se requieren en la regulación de la liberación espontánea de GnRH y de la síntesis de estradiol, lo cual depende del tipo de receptor dopaminérgico activado.

IX. CONCLUSIONES

- ✓ En los ovarios de los animales cíclicos en los días del estro, diestro-1 y la mañana del diestro-2, se origina una señal nerviosa de naturaleza dopaminérgica imprescindible para la secreción pre-ovulatoria de GnRH.
- ✓ El sistema de feed-back estimulante de los estrógenos también requiere de una señal dopaminérgica originada en los ovarios.
- ✓ La síntesis de las enzimas tirosina hidroxilasa, dopamina β -hidroxilasa y la proteína DARPP-32 en los folículos en diferentes estadios de crecimiento, dependen de la actividad de los receptores DA 1 y DA 2.
- ✓ La actividad de los receptores dopaminérgicos DA1 y DA2 en el diestro-1 y diestro-2 modula la transcripción del gen de la enzima P450 aromatasa encargada de sintetizar estrógenos.

X. REFERENCIAS

- Adashi, E. Y. (1996). The ovarian follicular apparatus. In E. Y. Adashi, J. A. Rock & Z. Rosenwaks (Eds.), *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology* (pp. 17-40). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Agduhr, E. (1927). Studies on the structure and development of the bursa ovarica and the tuba uterina in the mouse. *Acta Zoologica*, 8(1), 1-133. doi: 10.1111/j.1463-6395.1927.tb00649.x
- Aguado, L. I. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech*, 59(6), 462-473. doi: 10.1002/jemt.10232
- Arbogast, L. A., & Ben-Jonathan, N. (1990). The preovulatory prolactin surge is prolonged by a progesterone-dependent dopaminergic mechanism. *Endocrinology*, 126(1), 246-252. doi: 10.1210/endo-126-1-246
- Ayala, M. E., & Dominguez, R. (1988). Ovulatory response to the sequential administration of follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotropin by autografted ovary in unilaterally ovariectomized adult rat with peripheral denervation induced by guanethidine treatment. *Rev Invest Clin*, 40(2), 149-155.
- Bahr, J. M., & Ben-Jonathan, N. (1981). Preovulatory depletion of ovarian catecholamines in the rat. *Endocrinology*, 108(5), 1815-1820. doi: 10.1210/endo-108-5-1815
- Barria, A., Leyton, V., Ojeda, S. R., & Lara, H. E. (1993). Ovarian steroidal response to gonadotropins and beta-adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, 133(6), 2696-2703. doi: 10.1210/endo.133.6.8243293
- Beltramo, M., Dardente, H., Cayla, X., & Caraty, A. (2014). Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by kisspeptin. *Mol Cell Endocrinol*, 382(1), 387-399. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.10.015>
- Ben-Jonathan, N., Arbogast, L. A., Rhoades, T. A., & Bahr, J. M. (1984). Norepinephrine in the rat ovary: ontogeny and de novo synthesis. *Endocrinology*, 115(4), 1426-1431. doi: 10.1210/endo-115-4-1426
- Besonet, B., Hansen, B. S., & Daels, P. F. (1996). Dopaminergic regulation of gonadotrophin secretion in seasonally anoestrous mares. *J Reprod Fertil*, 108(1), 55-61.

- Besognet, B., Hansen, B. S., & Daels, P. F. (1997). Induction of reproductive function in anestrous mares using a dopamine antagonist. *Theriogenology*, 47(2), 467-480.
- Bodis, J., Koppan, M., Kornya, L., Tinneberg, H. R., & Torok, A. (2002). The effect of catecholamines, acetylcholine and histamine on progesterone release by human granulosa cells in a granulosa cell superfusion system. *Gynecol Endocrinol*, 16(4), 259-264.
- Byskov, A. G., Skakkebaek, N. E., Stafanger, G., & Peters, H. (1977). Influence of ovarian surface epithelium and rete ovarii on follicle formation. *Journal of Anatomy*, 123(1), 77-86.
- C., P.-R. (2003). *Efectos del bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico durante la segunda mitad del ciclo estral sobre la función ovárica de la rata adulta*. (Licenciatura), BUAP, Puebla.
- C., Y. H. H., & M., B. J. (1999). Ovary, Overview. In E. Knobil & J. D. Neill (Eds.), *Encyclopedia of Reproduction* (Vol. 3, pp. 590-596). New York: Academic Press.
- Ciechanowska, M., Lapot, M., Malewski, T., Mateusiak, K., Misztal, T., & Przekop, F. (2008). Implication of dopaminergic systems on GnRH and GnRHR genes expression in the hypothalamus and GnRH-R gene expression in the anterior pituitary gland of anestrous ewes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 116(6), 357-362. doi: 10.1055/s-2008-1042406
- Cruz, M., Alvarado, B. E., Hernández, G. C., Santiago, M. L., Zarate, A., Chavira, R., . . . Domínguez, R. (2012, October 13-17). [Spontaneous ovulation in both ovaries depends on the stimulation of m1 muscarinic receptors of the left ovary]. Proceeding of the Meeting of Society for Neuroscience, 2012 90.01 RR8.
- Cruz, M. E., Chavez, R., & Dominguez, R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Rev Invest Clin*, 38(2), 167-171.
- Cruz, M. E., Flores, A., Palafox, M. T., Melendez, G., Rodriguez, J. O., Chavira, R., & Dominguez, R. (2006). The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 43. doi: 10.1186/1477-7827-4-43
- Cruz, M. E., Hernández, S., Toledo, S., Alvarado, B., Hernández, C., Flores, A., & Domínguez, R. (2013, November, 9-12). [At diestrus-2 muscarinic receptors M1 and M2 of the left and right ovary participates in the spontaneous ovulation regulation]. Proceeding of the Meeting of Society for Neuroscience 2013-S-5050-SfN.

- Cruz, M. E., Villegas, G., Dominguez-Gonzalez, A., Chavira, R., & Dominguez, R. (2001). Ovulation delay induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior-hypothalamic area of the rat. *Brain Res Bull*, 54(4), 339-344.
- Chaffin, C. L., Lee, Y. S., VandeVoort, C. A., Patel, B. G., & Latham, K. E. (2012). Rhesus Monkey Cumulus Cells Revert to a Mural Granulosa Cell State After an Ovulatory Stimulus. *Endocrinology*, 153(11), 5535-5545. doi: 10.1210/en.2012-1733
- Chaffin, C. L., & Vandevoort, C. A. (2013). Follicle growth, ovulation, and luteal formation in primates and rodents: a comparative perspective. *Experimental Biology And Medicine (Maywood, N.J.)*, 238(5), 539-548. doi: 10.1177/1535370213489437
- Chavez, R., Carrizosa, L., & Dominguez, R. (1991). Effects of superior ovarian nerve on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Medical Science Research*, 19, 41-42.
- Chavez, R., Cruz, M., & Domínguez, R. (1987). Ovulation and compensatory ovarian hypertrophy response to gonadotrophins depends on the vagus nerve and catecholaminergic ovarian innervation. *Medical Science Research*, 15, 1529-1530.
- Chavez, R., Cruz, M. E., & Dominguez, R. (1987a). Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: effect of ipsi- and contralateral vagus nerves on the remaining ovary. *J Endocrinol*, 113(3), 397-401.
- Chavez, R., Cruz, M. E., & Dominguez, R. (1987b). Modifications on the ovarian response to gonadotropins induced by catecholamine depletion in vagotomized adult rats. *Rev Invest Clin*, 39(2), 149-153.
- Chavez, R., & Dominguez, R. (1994). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle. *J Endocrinol*, 140(2), 197-201.
- Chávez, R., Morales, L., González, M. E., & Dominguez, R. (1994). Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies. *Medical Science Research*, 22, 789-790.
- Chavez, R., Sanchez, S., Ulloa-Aguirre, A., & Dominguez, R. (1989). Effects on oestrous cyclicity and ovulation of unilateral section of the vagus nerve performed on different days of the oestrous cycle in the rat. *J Endocrinol*, 123(3), 441-444.

- Choi, J., & Smitz, J. (2014). Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference. *Mol Cell Endocrinol*, 383(1-2), 203-213. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.12.009>
- D'Albora, H., & Barcia, J. J. (1996). Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci Lett*, 205(1), 65-67.
- D'Albora, H., Lombide, P., & Ojeda, S. R. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 300(1), 47-56.
- Davoren, J. B., & Hsueh, A. J. (1985). Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod*, 33(1), 37-52.
- Dees, W. L., Ahmed, C. E., & Ojeda, S. R. (1986). Substance P- and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology*, 119(2), 638-641. doi: 10.1210/endo-119-2-638
- Dees, W. L., Hiney, J. K., Schultea, T. D., Mayerhofer, A., Danilchik, M., Dissen, G. A., & Ojeda, S. R. (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology*, 136(12), 5760-5768. doi: 10.1210/endo.136.12.7588334
- Dees, W. L., Kozlowski, G. P., Dey, R., & Ojeda, S. R. (1985). Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. II. Immunocytochemical localization. *Biol Reprod*, 33(2), 471-476.
- Denning-Kendall, P. A., Wild, M. L., & Wathes, D. C. (1991). Regional differences in catecholamine concentrations in bovine ovaries analysed by high-performance liquid chromatography. *J Endocrinol*, 129(2), 221-226.
- Dissen, G. A., Paredes, A., Romero, C., Les Dees, W., & Ojeda, S. R. (2003). Chapter 1 - Neural and Neurotrophic Control of Ovarian Development. In P. C. K. Leung & E. Y. Adashi (Eds.), *The Ovary (Second Edition)* (pp. 3-II). San Diego: Academic Press.
- Dominguez, R. (1990). Differential ovulatory responses of the right and left ovaries of the adult rat to unilateral lesion and anaesthesia of the cervico-vaginal plexus. *J Endocrinol*, 124(1), 43-45.
- Domínguez, R., Cruz, E., & Chavez, R. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. In C. d. l. i. científica (Ed.), *Tópicos selectos en Biología de la Reproducción*. México D.F.: UNAM.

- Dominguez, R., Cruz, M. E., & Moran, C. (1998). Differential effects of ovarian local anaesthesia during pro-oestrus on ovulation by the right or left ovary in normal and hemiovariectomized adult rats. *J Reprod Fertil*, *113*(2), 185-190.
- Domínguez, R., Flores, A., & Cruz Morales, S. E. (2012). Hormonal and neural mechanism regulating hormone steroids secretion. In P. H. Abduljabbar (Ed.), *Steroids-Basic Science*.
- Dominguez, R., Gaitan, C. M., Mendez, S. A., & Ulloa-Aguirre, A. (1987). Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *J Endocrinol*, *113*(1), 37-44.
- Domínguez R, M. L., Cruz ME. (2003). Ovarian Asymmetry. *Annual Review of Biomedical Sciences*, *5*, 95-104.
- Dominguez, R., Riboni, L., Zipitria, D., & Revilla, R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *J Endocrinol*, *95*(2), 175-180.
- Dominguez, R., Zipitria, D., Riboni, L., & Revilla, R. (1985). Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation throughout the estrous cycle of the rat. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, *16*(1), 63-72. doi: 10.1080/09291018509359872
- Donadeu, F. X., & Ginther, O. J. (2002). Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. *Reproduction*, *124*(6), 875-885.
- Drummond, A. E. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*, *4*, 16. doi: 10.1186/1477-7827-4-16
- Dyer, C. A., & Erickson, G. F. (1985). Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology*, *116*(4), 1645-1652. doi: 10.1210/endo-116-4-1645
- Dzafic, E., Stimpfel, M., & Virant-Klun, I. (2013). Plasticity of granulosa cells: on the crossroad of stemness and transdifferentiation potential. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *30*(10), 1255-1261. doi: 10.1007/s10815-013-0068-0
- Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, *122*(6), 829-838.

- Erdo, S., Varga, B., & Horvath, E. (1985). Effect of local GABA administration on rat ovarian blood flow, and on progesterone and estradiol secretion. *Eur J Pharmacol*, *111*(3), 397-400.
- Evans, N. P., Dahl, G. E., Mauger, D. T., Padmanabhan, V., Thrun, L. A., & Karsch, F. J. (1995). Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system. *Endocrinology*, *136*(12), 5511-5519. doi: 10.1210/endo.136.12.7588302
- Evans, N. P., Dahl, G. E., Padmanabhan, V., Thrun, L. A., & Karsch, F. J. (1997). Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology*, *138*(12), 5408-5414. doi: 10.1210/endo.138.12.5558
- Everett, J. W. (1964). Central Neural Control of Reproductive Functions of the Adenohypophysis. *Physiological Reviews*, *44*(3), 373-431.
- Fair, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, *78*(3-4), 203-216. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00091-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00091-5)
- Fasano, C., Bourque, M. J., Lapointe, G., Leo, D., Thibault, D., Haber, M., . . . Trudeau, L. E. (2013). Dopamine facilitates dendritic spine formation by cultured striatal medium spiny neurons through both D1 and D2 dopamine receptors. *Neuropharmacology*, *67*, 432-443. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.11.030
- Fell, M. J., Neill, J. C., & Marshall, K. M. (2004). Effects of the classical antipsychotic haloperidol and atypical antipsychotic risperidone on weight gain, the oestrous cycle and uterine weight in female rats. *Eur Neuropsychopharmacol*, *14*(5), 385-392. doi: 10.1016/j.euroneuro.2003.12.001
- Ferin, M. (1999). Ovarian cycle, Mammals *Encyclopedia of Reproduction* (Vol. 3, pp. 547-552). San Diego California USA: Academic Press.
- Flores, A., Melendez, G., Palafox, M. T., Rodriguez, J. O., Barco, A. I., Chavira, R., . . . Cruz, M. E. (2005). The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine*, *28*(2), 145-151.

- Flores, A., Rodriguez, J. O., Palafox, M. T., Melendez, G., Barco, A. I., Chavira, R., . . . Dominguez, R. (2006). The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system. *Reprod Biol Endocrinol*, 4, 11. doi: 10.1186/1477-7827-4-11
- Flores, A., Velasco, J., Gallegos, A. I., Mendoza, F. D., Everardo, P. M., Cruz, M. E., & Dominguez, 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. doi: 10.1186/1477-7827-9-34
- Fohr, K. J., Mayerhofer, A., Sterzik, K., Rudolf, M., Rosenbusch, B., & Gratzl, M. (1993). Concerted action of human chorionic gonadotropin and norepinephrine on intracellular-free calcium in human granulosa-lutein cells: evidence for the presence of a functional alpha-adrenergic receptor. *J Clin Endocrinol Metab*, 76(2), 367-373. doi: 10.1210/jcem.76.2.8381798
- Freeman, M. E. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In E. Knobil & J. D. Neill (Eds.), *The physiology of reproduction* (pp. 613-658). New York: Raven Press.
- Freeman, M. E. (2006). Chapter 43 - Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In J. D. Neill, T. M. Plant, D. W. Pfaff, J. R. G. Challis, D. M. d. Kretser, J. S. Richards & P. M. Wassarman (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 2327-2388). St Louis: Academic Press.
- Gerendai, I., Banczerowski, P., & Halasz, B. (2005). Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine*, 28(3), 309-318. doi: 10.1385/ENDO:28:3:309
- Gerendai, I., Toth, I. E., Boldogkoi, Z., & Halasz, B. (2009). Recent findings on the organization of central nervous system structures involved in the innervation of endocrine glands and other organs; observations obtained by the transneuronal viral double-labeling technique. *Endocrine*, 36(2), 179-188. doi: 10.1007/s12020-009-9189-8
- Goiny, M., Cekan, S., & Uvnas-Moberg, K. (1986). Effects of dopaminergic drugs on plasma levels of steroid hormones in conscious dogs. *Life Sci*, 38(25), 2293-2300.

- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research. Part B, Developmental And Reproductive Toxicology*, 80(2), 84-97.
- Hayashi, M., McGee, E. A., Min, G., Klein, C., Rose, U. M., van Duin, M., & Hsueh, A. J. (1999). Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, 140(3), 1236-1244. doi: 10.1210/endo.140.3.6548
- Hennet, M. L., & Combelles, C. M. (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol*, 56(10-12), 819-831. doi: 10.1387/ijdb.120133cc
- Henry, J. M., & Roth, G. S. (1984). Effect of aging on recovery of striatal dopamine receptors following N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1, 2-dihydroquinoline (EEDQ) blockade. *Life Sci*, 35(8), 899-904.
- Hofmann, P. G., Baez Saldana, A., Fortoul Van Der Goes, T., Gonzalez del Pliego, M., & Gutierrez Ospina, G. (2013). Neuroendocrine cells are present in the domestic fowl ovary. *J Anat*, 222(2), 170-177. doi: 10.1111/joa.12002
- Honda, A., Hirose, M., Hara, K., Matoba, S., Inoue, K., Miki, H., . . . Ogura, A. (2007). Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(30), 12389-12394. doi: 10.1073/pnas.0703787104
- Hotchkiss, J., & Knobil, E. (1996). The hypothalamic pulse generator: The reproductive core. In E. Y. Adashi, J. A. Rock & Z. Rosenwaks (Eds.), *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology* (pp. 123-162). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Isobe, S. (1994). [The role of the dopaminergic system in the rat ovary]. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi*, 70(4), 457-464.
- Jones, R. E. (1991). The ovaries *Human Reproductive Biology* (pp. 39-53). San Diego: Academic Press.
- Kapur, S., Langlois, X., Vinken, P., Megens, A. A. H. P., De Coster, R., & Andrews, J. S. (2002). The Differential Effects of Atypical Antipsychotics on Prolactin Elevation Are Explained by Their Differential Blood-Brain Disposition: A Pharmacological Analysis in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3), 1129-1134. doi: 10.1124/jpet.102.035303

- Kazeto, Y., Tosaka, R., Matsubara, H., Ijiri, S., & Adachi, S. (2011). Ovarian steroidogenesis and the role of sex steroid hormones on ovarian growth and maturation of the Japanese eel. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3-5), 149-154. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.03.013>
- King, S. S., Campbell, A. G., Dille, E. A., Roser, J. F., Murphy, L. L., & Jones, K. L. (2005). Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domest Anim Endocrinol*, 28(4), 405-415. doi: 10.1016/j.domaniend.2005.02.001
- King, S. S., Jones, K. L., Mullenix, B. A., & Heath, D. T. (2008). Seasonal relationships between dopamine D1 and D2 receptor and equine FSH receptor mRNA in equine ovarian epithelium. *Anim Reprod Sci*, 108(1-2), 259-266. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.08.007
- Krautscheid, Y., Senning, C. J., Sartori, S. B., Singewald, N., Schuster, D., & Stuppner, H. (2014). Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, and in Vitro Testing Reveal Haloperidol, Eprazinone, and Fenbutrazate as Neurokinin Receptors Ligands. *J Chem Inf Model*. doi: 10.1021/ci500106z
- Kurus, M., Karakaya, C., Karalok, M., To, G., & Johnson, J. (2013). The Control of Oocyte Survival by Intrinsic and Extrinsic Factors. In S. S. Kim (Ed.), *Oocyte Biology in Fertility Preservation* (Vol. 761, pp. 7-18): Springer New York.
- Lara, H. E., Dees, W. L., Hiney, J. K., Dissen, G. A., Rivier, C., & Ojeda, S. R. (1991). Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervation. *Endocrinology*, 129(4), 1849-1860. doi: 10.1210/endo-129-4-1849
- Lara, H. E., Dorfman, M., Venegas, M., Luza, S. M., Luna, S. L., Mayerhofer, A., . . . Ramirez, V. D. (2002). Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech*, 59(6), 495-502. doi: 10.1002/jemt.10229
- Lara, H. E., Porcile, A., Espinoza, J., Romero, C., Luza, S. M., Fuhrer, J., . . . Roblero, L. (2001). Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine*, 15(2), 187-192. doi: 10.1385/ENDO:15:2:187
- Lasaga, M., & Debeljuk, L. (2011). Tachykinins and the hypothalamo-pituitary-gonadal axis: An update. *Peptides*, 32(9), 1972-1978. doi: 10.1016/j.peptides.2011.07.009

- Laszlo, A., Villanyi, P., Zsolnai, B., & Erdo, S. L. (1989). Gamma-aminobutyric acid, its related enzymes and receptor-binding sites in the human ovary and fallopian tube. *Gynecol Obstet Invest*, 28(2), 94-97.
- Lawrence, I. E., Jr., & Burden, H. W. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec*, 196(1), 51-59. doi: 10.1002/ar.1091960106
- Lehman, M. N., & Karsch, F. J. (1993). Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology*, 133(2), 887-895. doi: 10.1210/endo.133.2.8102098
- Light, A., & Hammes, S. R. (2013). Membrane receptor cross talk in steroidogenesis: Recent insights and clinical implications. *Steroids*, 78(6), 633-638. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.12.016>
- Lomniczi, A., Wright, H., & Ojeda, S. R. Epigenetic regulation of female puberty. *Frontiers in Neuroendocrinology*(0). doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.08.003>
- Lotharius, J., & Brundin, P. (2002). Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 11(20), 2395-2407.
- Maeda, K., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., Oka, Y., Tsukamura, H., & Okamura, H. (2010). Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res*, 1364, 103-115. doi: 10.1016/j.brainres.2010.10.026
- Magoffin, D. A., & Weitsman, S. R. (1994). Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod*, 51(4), 766-775.
- Mari, G., Morganti, M., Merlo, B., Castagnetti, C., Parmeggiani, F., Govoni, N., . . . Tamanini, C. (2009). Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrous mares. *Theriogenology*, 71(6), 959-965. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.11.001
- Marino, G., & Zanghì, A. (2013). Activins and Inhibins: Expression and Role in Normal and Pathological Canine Reproductive Organs: A review. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, 42(1), 1-8. doi: 10.1111/j.1439-0264.2012.01161.x

- Mayerhofer, A., Fritz, S., Grunert, R., Sanders, S. L., Duffy, D. M., Ojeda, S. R., & Stouffer, R. L. (2000). D1-Receptor, DARPP-32, and PP-1 in the primate corpus luteum and luteinized granulosa cells: evidence for phosphorylation of DARPP-32 by dopamine and human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(12), 4750-4757. doi: 10.1210/jcem.85.12.7084
- Mayerhofer, A., Hemmings, H. C., Jr., Snyder, G. L., Greengard, P., Boddien, S., Berg, U., & Brucker, C. (1999). Functional dopamine-1 receptors and DARPP-32 are expressed in human ovary and granulosa luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(1), 257-264. doi: 10.1210/jcem.84.1.5378
- Mayerhofer, A., Smith, G. D., Danilchik, M., Levine, J. E., Wolf, D. P., Dissen, G. A., & Ojeda, S. R. (1998). Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18), 10990-10995.
- Millar, R. P. (2005). GnRHs and GnRH receptors. *Animal Reproduction Science*, 88(1-2), 5-28. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.05.032>
- Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*, 32(1), 81-151. doi: 10.1210/er.2010-0013
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 78(1), 189-225.
- Morales-Ledesma, L., Betanzos-Garcia, R., & Dominguez-Casala, R. (2004). Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepubertal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Arch Med Res*, 35(4), 279-283. doi: 10.1016/j.arcmed.2004.03.007
- Morales, L., Chávez, R., & Dominguez, R. (1993). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unileteral and bilateral section of the nerve. *Medical Science Research*, 21, 15-17.
- Moran, C., Franco, A., Moran, J. L., Handal, A., Morales, L., & Dominguez, R. (2005). Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac-superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*, 26(2), 147-152. doi: 10.1385/endo:26:2:147
- Moran, M. J., Ayala, M. E., Gallegos, E., Romero, J., Chavira, R., Damian-Matsumura, P., & Dominguez, R. (2013). Effects of systemic administration or intrabursal injection of

serotonin on puberty, first ovulation and follicular development in rats. *Reprod Fertil Dev*, 25(8), 1105-1114. doi: 10.1071/rd12253

- Mori, H., Arakawa, S., Ohkawa, T., Ohkawa, R., Takada, S., Morita, T., & Okinaga, S. (1994). The involvement of dopamine in the regulation of steroidogenesis in rat ovarian cells. *Horm Res*, 41 Suppl 1, 36-40.
- Naftolin, F., Garcia-Segura, L. M., Horvath, T. L., Zsarnovszky, A., Demir, N., Fadiel, A., . . . Parducz, A. (2007). Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reprod Sci*, 14(2), 101-116. doi: 10.1177/1933719107301059
- Neve, K. A., Seamans, J. K., & Trantham-Davidson, H. (2004). Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res*, 24(3), 165-205.
- Nilsson, E. E., & Skinner, M. K. (2002). Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod*, 67(3), 1018-1024.
- Nilsson, E. E., & Skinner, M. K. (2004). Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*, 214(1-2), 19-25. doi: 10.1016/j.mce.2003.12.001
- Ojeda, S. R., Costa, M. E., Katz, K. H., & Hersh, L. B. (1985). Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. I. Biochemical and physiologic studies. *Biol Reprod*, 33(2), 286-295.
- Papenfuss, F., Bodis, J., Tinneberg, H. R., & Schwarz, H. (1993). The modulatory effect of catecholamines on gonadotropin-stimulated granulosa cell steroid secretion. *Arch Gynecol Obstet*, 253(2), 97-102.
- Parra, C., Fiedler, J. L., Luna, S. L., Greiner, M., Padmanabhan, V., & Lara, H. E. (2007). Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrous cycle and in the development of estradiol valerate-induced polycystic ovary. *Reproduction*, 133(1), 147-154. doi: 10.1530/rep.1.01214
- Perrett, R. M., & McArdle, C. A. (2013). Molecular mechanisms of gonadotropin-releasing hormone signaling: integrating cyclic nucleotides into the network. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 180. doi: 10.3389/fendo.2013.00180

- Quiroz, U., Morales-Ledesma, L., Moran, C., Trujillo, A., & Dominguez, R. (2013). Lack of sensorial innervation in the newborn female rats affects the activity of hypothalamic monoaminergic system and steroid hormone secretion during puberty. *Endocrine*. doi: 10.1007/s12020-013-0055-3
- Ramírez-Ávila. (2001). *Efectos de la administración secuencial de GnRH sobre la ovulación en ratas adultas con bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico*. (Licenciatura), BUAP, Puebla.
- Rey-Ares, V., Lazarov, N., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., & Mayerhofer, A. (2007). Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 5, 40. doi: 10.1186/1477-7827-5-40
- Ricu, M., Paredes, A., Greiner, M., Ojeda, S. R., & Lara, H. E. (2008). Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology*, 149(1), 50-56. doi: 10.1210/en.2007-1204
- Ricu, M. A., Ramirez, V. D., Paredes, A. H., & Lara, H. E. (2012). Evidence for a celiac ganglion-ovarian kisspeptin neural network in the rat: intraovarian anti-kisspeptin delays vaginal opening and alters estrous cyclicity. *Endocrinology*, 153(10), 4966-4977. doi: 10.1210/en.2012-1279
- Roa, J. (2013). Role of GnRH Neurons and Their Neuronal Afferents as Key Integrators between Food Intake Regulatory Signals and the Control of Reproduction. *Int J Endocrinol*, 2013, 518046. doi: 10.1155/2013/518046
- Russell, D. L., & Salustri, A. (2006). Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. *Semin Reprod Med*, 24(4), 217-227. doi: 10.1055/s-2006-948551
- Saller, S., Kunz, L., Berg, D., Berg, U., Lara, H., Urra, J., . . . Mayerhofer, A. (2014). Dopamine in human follicular fluid is associated with cellular uptake and metabolism-dependent generation of reactive oxygen species in granulosa cells: implications for physiology and pathology. *Hum Reprod*, 29(3), 555-567. doi: 10.1093/humrep/det422
- Sellix, M. T. (2014). Circadian Clock Function in the Mammalian Ovary. *J Biol Rhythms*. doi: 10.1177/0748730414554222
- Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., & Dekel, N. (2011). Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(4), 1462-1467. doi: 10.1073/pnas.1017213108

- Simoni, M., & Casarini, L. (2014). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Genetics of FSH action: a 2014-and-beyond view. *European Journal of Endocrinology*, 170(3), R91-R107. doi: 10.1530/eje-13-0624
- Strauss III, J. F., & Williams, C. J. (2009). The Ovarian Life Cycle. In J. F. Strauss III & B. R. L. (Eds.), *Yen and jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management* (6TH EDITION ed., pp. 155-190). Philadelphia: Elsevier.
- Taketa, Y., Yoshida, M., Inoue, K., Takahashi, M., Sakamoto, Y., Watanabe, G., . . . Nishikawa, A. (2011). Differential Stimulation Pathways of Progesterone Secretion from Newly Formed Corpora Lutea in Rats Treated with Ethylene Glycol Monomethyl Ether, Sulpiride, or Atrazine. *Toxicological Sciences*, 121(2), 267-278. doi: 10.1093/toxsci/kfr062
- Thompson, I. R., & Kaiser, U. B. (2014). GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, 385(1-2), 28-35. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.012>
- Toth, I. E., Banczerowski, P., Boldogkoi, Z., Toth, J. S., Szabo, A., Halasz, B., & Gerendai, I. (2008). Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary: a double viral tracing study. *Brain Res Bull*, 77(5), 306-311. doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.08.022
- Toth, I. E., Wiesel, O., Boldogkoi, Z., Balint, K., Tapaszti, Z., & Gerendai, I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microsc Res Tech*, 70(8), 710-718. doi: 10.1002/jemt.20456
- Troppmann, B., Kleinau, G., Krause, G., & Gromoll, J. (2013). Structural and functional plasticity of the luteinizing hormone/choriogonadotrophin receptor. *Hum Reprod Update*, 19(5), 583-602. doi: 10.1093/humupd/dmt023
- Trujillo, A., & Riboni, L. (2002). Effects of functional peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine on follicular development and ovulation of the adult female guinea pig. *Gen Comp Endocrinol*, 127(3), 273-278.
- Ulloa-Aguirre, A., Zarinan, T., Pasapera, A. M., Casas-Gonzalez, P., & Dias, J. A. (2007). Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine*, 32(3), 251-263. doi: 10.1007/s12020-008-9041-6

- Vargas-Torres. (2002). *Efectos del bloqueo farmacológico de la información dopaminérgica sobre el ciclo estral de la rata: análisis de los mecanismos que inhiben la función de los ovarios*. (Licenciatura), BUAP, Puebl.
- Weick, R. F., Smith, E. R., Dominguez, R., Dhariwal, A. P., & Davidson, J. M. (1971). Mechanism of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. *Endocrinology*, 88(2), 293-301. doi: 10.1210/endo-88-2-293
- Wide, L., & Bakos, O. (1993). More basic forms of both human follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in serum at midcycle compared with the follicular or luteal phase. *J Clin Endocrinol Metab*, 76(4), 885-889. doi: 10.1210/jcem.76.4.8473400
- Wide, L., & Eriksson, K. (2013). Dynamic changes in glycosylation and glycan composition of serum FSH and LH during natural ovarian stimulation. *Ups J Med Sci*, 118(3), 153-164. doi: 10.3109/03009734.2013.782081
- Wiesak, T., Przala, J., Muszynska, A., & Hunter, M. G. (1990). Effect of catecholamines and FSH on progesterone secretion by pig granulosa cells. *Endocrinol Exp*, 24(4), 449-456.
- Wigglesworth, K., Lee, K. B., Emori, C., Sugiura, K., & Eppig, J. J. (2014). Transcriptomic Diversification of Developing Cumulus and Mural Granulosa Cells in Mouse Ovarian Follicles. *Biol Reprod*. doi: 10.1095/biolreprod.114.121756
- Wright, C. S., Becker, D. L., Lin, J. S., Warner, A. E., & Hardy, K. (2001). Stage-specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction*, 121(1), 77-88.
- Xu, J., Xu, M., Bernuci, M., Fisher, T., Shea, L., Woodruff, T., . . . Stouffer, R. (2013). Primate Follicular Development and Oocyte Maturation In Vitro. In S. S. Kim (Ed.), *Oocyte Biology in Fertility Preservation* (Vol. 761, pp. 43-67): Springer New York.
- Yeh, J., & Adashi, E. Y. (1999). The ovarian life cycle. In S. S. C. Yen, R. B. Jaffe & R. L. Barbieri (Eds.), *Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management* (pp. 153-190). Philadelphia: Saunders Company.
- Young, F. M., Menadue, M. F., & Lavranos, T. C. (2005). Effects of the insecticide amitraz, an alpha2-adrenergic receptor agonist, on human luteinized granulosa cells. *Hum Reprod*, 20(11), 3018-3025. doi: 10.1093/humrep/dei194
- Zoldag, L., Fekete, S., Csaky, I., & Bersenyi, A. (2001). Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology*, 55(8), 1657-1666.

XI. ANEXOS

Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation

Berenice Venegas-Meneses¹ · José Francisco Padilla¹ · Claudia Elvira Juárez¹ · José Luis Morán¹ · Carolina Morán¹ · Nora Hilda Rosas-Murrieta² · Anabella Handal¹ · Roberto Domínguez³

Received: 10 March 2015 / Accepted: 20 May 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Hormonal and neural signals regulate the ovarian follicular development. The present study's hypothesis is that the blockade of ovarian dopamine receptors locally will affect follicle development and ovulation. Groups of adult 4-day cyclic rats of the CII-ZV strain on estrus, diestrus-1, diestrus-2, or proestrus day were injected with vehicle, haloperidol (DA2 > DA1 blocker), sulpiride (DA2 blocker), or SCH-23390 (DA1 blocker) into the bursa of both ovaries at 08:00, 13:00, or 20:00 h. Animals were sacrificed the following predicted estrus day. The following treatments blocked ovulation: injecting haloperidol to rats on estrus or diestrus-1 at 8:00, 13:00, or 20:00 h and to rats on diestrus-2 at 08:00, or 20:00 h; injecting SCH-23390 to rats on diestrus-1 at 8:00, 13:00, or 20:00 h; injecting sulpiride to rats on estrus at 20:00 h, diestrus-1 at 08:00, 13:00, or 20:00 h and to rats on diestrus-2 at 08:00 h. In rats treated with any of the dopamine antagonists that blocked ovulation, injecting GnRH at 14.00 h on the next predicted proestrus day restored ovulation. Injecting estradiol benzoate at 14.00 h of the next predicted diestrus-2 restored ovulation in some animals treated with haloperidol on estrus or diestrus-2 and was ineffective in rats treated on diestrus-1. In rats treated with

sulpiride or SCH-23390 ovulation occurred in most animals (SCH-23390: 6/8; SPD: 9/12). Present results suggest that dopamine ovarian receptors' participation in regulating follicular development and ovulation varies along the estrus cycle, with their most prominent activity occurring on diestrus-1.

Keywords Ovulation · Estrus cycle · Dopamine receptors · Hormone replacement

Introduction

The ovarian catecholaminergic innervation arrives via the ovarian plexus nerve and the superior ovarian nerve [1, 2]. These nerves' fibers carry norepinephrine (NE) and dopamine (DA) [3, 4], as well as other neurotransmitters.

The ovaries of some animal species, including primates, rats, and fowl, have neuronal cell bodies that presumably synthesize catecholamines [5, 6]. Since tyrosine hydroxylase (TH) is the limiting enzyme for DA and NE synthesis, its presence in the ovary has been used to describe the ovary's basic capacity to produce its own neurotransmitters [4–8].

The presence of DA in the ovaries of different animal species has been described by Barh and Ben-Jonathan [9], Denning-Kendall et al. [10], and Mayerhofer et al. [3, 11]. Studies have shown the presence of mRNA for DA1 and DA2 receptors in the ovarian cortex of mares, humans, monkeys, and rats [3, 12–14]. The presence of DA1 and DA2 receptors in the ovaries of rats suggest that follicular development and/or the function of the corpus luteum may be regulated by DA [3, 11, 12, 14].

Blocking DA receptors by subcutaneous injection of either haloperidol (HLP) or chlorpromazine prolonged the

✉ Berenice Venegas-Meneses
bvnic@gmail.com

¹ Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, CP.72570 Puebla, Mexico

² Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

³ Biology of Reproduction Research Unit, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Mexico, D.F., Mexico

estrus cycle and blocked ovulation [15, 16], while the pharmacological stimulation of DA receptors with apomorphine also blocked ovulation. In vitro studies show that the ovarian DA system plays a role in the regulation of steroidogenesis by its ligand to the DA1 receptor [17, 18]. Adding DA to human granulosa cell cultures decreased the effects of follicular stimulant hormone on estradiol secretion, without affecting the effects of luteinizing hormone (LH) on progesterone secretion [19, 20].

To our knowledge, no studies on the effects of directly blocking DA receptors in the ovary have been published. Based on available results, we hypothesize that during the estrus cycle the DA ligand to ovarian dopaminergic receptors plays a role in regulating ovarian functions. The present study aims were to evaluate the physiological role played by ovarian DA receptors in regulating follicular development and ovulation. This study is focused on analyzing the effects of blocking DA1, DA1-2, or DA2 ovarian receptors on ovulation, and estradiol and progesterone serum levels in adult cyclic rats. For this purpose, we used HLP a DA2 > DA1 blocker, SCH-23390 a DA1 blocker and sulpiride (SPD) DA-2 blocker [21, 22]. The ovarian receptors' participation on GnRH's effects on ovulation and positive estrogen feedback on gonadotropin secretion was also assessed. To assess the source of DA in ovaries of rats on diestrus-1 and the activation of DA1 receptor, the TH and DARPP-32 protein immunoreactivity content was analyzed in the ovarian follicles.

Materials and methods

Animals

All procedures described in this study were performed in accordance to the Mexican Law of Animal Treatment and Protection Guidelines (NOM-062-ZOO-1999). The Committee of the Bioterio Claude Bernard of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla approved the experimental protocols.

Adult virgin female rats (200–250 g) of the CII-ZV strain were maintained under controlled light conditions (lights on from 05:00 to 19:00 h), with free access to food and water ad libitum. Daily vaginal smears were taken between 9:00 and 11:00 h. This study only used rats showing three consecutive 4-day estrus cycles. Groups of six animals were randomly allocated to the following experimental groups.

Control group

Control non-treated cyclic rats were sacrificed at 9:00–10:00 h of the predicted estrus day.

Sham group

Groups of rats on estrus, diestrus-1, diestrus-2, or proestrus were ether anesthetized at 8:00, 13:00, or 20:00 h, dorsally laparotomized, and the right and left ovaries exposed for 5 min. Subsequently, the ovaries were carefully returned to the abdominal cavity, and the skin and muscle sutured. The rats were sacrificed the following predicted estrus day at 9:00–10:00 h.

Intra-ovarian bursa injection of vehicle, HLP, SCH23390 or SPD

Groups of rats on estrus, diestrus-1, diestrus-2, or proestrus were laparotomized at 8:00, 13:00, or 20:00 h, and the right and left ovaries exposed. The DA antagonists concentration used was selected based on the results of a dose-response curve. With the aid of a Nano-Injector, Stepper Motorized (Stoelting Co, USA) and a 100- μ L micro syringe (Hamilton, USA), equipped with a 29-gage needle, 20 μ L of saline, ascorbic acid 0.1 %, HLP (Janssen-Cilag México) (100 μ g in saline), SCH-23390 (Sigma Chemical Co., USA) (100 μ g in saline), or SPD (Sigma Chemical Co., USA), (200 μ g dissolved in ascorbic acid and one drop of glacial acetic acid) was injected into both ovarian bursa at a rate of 4 μ L/min, following the methodologies described by Morán et al. [23, 24] and Rosas et al. [25]. The injected fluid distended the ovarian bursa. To prevent fluid leakage, the needle was kept in the ovarian bursa for 5 min. Subsequently, the ovaries were carefully cleaned, dried, and returned to the abdominal cavity, and the skin and muscle were sutured. The rats were sacrificed the following predicted estrus day at 9:00–10:00 h.

Dousing DA blocking drugs over the ovaries

To assess if the DA blocking drugs were acting only on the ovaries, groups of rats ($n = 4$) on estrus, diestrus-1, diestrus-2, or proestrus were laparotomized at 8:00 or 13:00 h, and the right and left ovaries exposed. Subsequently, the same concentrations and volumes of drug injected into the ovarian bursa or saline was doused over the exposed ovaries at a rate of 4 μ L/min. After treatment, the ovaries were carefully cleaned, dried, and returned to the abdominal cavity, and the skin and muscle were sutured. The rats were sacrificed the following predicted estrus day at 9:00–10:00 h.

Hormone replacement in rats treated with DA antagonist

Since blocking DA receptors in the ovaries blocked ovulation, we assessed the potential relation between the

anovulation resulting from blocking DA receptors and the blockage of gonadotropin-releasing hormone. Based on published results on hormone replacement studies [26, 27], rats treated on estrus, diestrus-1, or diestrus-2 with DA receptors antagonists that blocked ovulation, and were injected i.m. with 3.7 µg/kg b.w. of GnRH (Sigma Chemical Co., USA) at 14:00 h of the following predicted proestrus day. The animals were sacrificed the following morning.

Other groups of rats treated on estrus, diestrus-1, or diestrus-2 with DA receptors antagonists that blocked ovulation, and were injected with 10 µg of estradiol benzoate (EB) s.c (Sigma Chemical Co., USA) at 14:00 h on the predicted diestrus-2 day, following Weick et al. [28] study. These rats were sacrificed between 09.00 and 10.30 h on the next predicted estrus day.

Autopsy procedures

Rats were sacrificed by decapitation the morning of the next predicted estrus day after treatment. The blood of the trunk was collected, centrifuged for 15 min at 3000 rpm, and stored at -20°C until hormones in serum were measured. At autopsy, the ovaries were removed and weighed using a precision balance. The oviducts were dissected, and the number of ova present was counted with the aid of a dissecting microscope.

Hormone assay

Progesterone and estradiol serum concentrations in vehicle treated and non-ovulating rats were measured using Radio-Immuno-Assay; with kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA). Progesterone results are expressed in ng/mL and estradiol in pg/mL. The intra- and inter-assay percent variation coefficients for progesterone were 5.3 and 9.87 and for estradiol 6.9 and 10.8, respectively. The detection limits for progesterone analysis were between 0.03 and 50 ng/mL, with a correlation coefficient of 0.9887. For estradiol, the detection limits were between 3.99 pg/mL and 1.9 ng/mL, with a correlation coefficient of 0.9960.

Immunofluorescence

Cryosections of 20-µm thick of the ovaries were mounted on coated glass slides. The frozen sections were rinsed with PBS, pH 7.4, and twice in PBS-B (PBS with 0.5 % Triton X-100). The sections were blocked by incubating in IgG-free 2 % bovine serum albumin (BSA sigma) for 30 min to reduce background staining [29]. Then slides were incubated overnight at 4°C with a polyclonal rabbit anti-TH antibody or polyclonal rabbit anti-DARPP-32 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) diluted in PBS-B to 1:500 and

subsequently incubated with a secondary antibody goat anti-rabbit FITC-labeled (Jackson Immuno Research Laboratories Inc.) diluted at 1:100 with PBS-B for its visualized in the green channel. Then the slides were incubated with polyclonal mouse anti-actin antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc. USA) diluted in PBS-B to 1:200. The samples were incubated with the secondary antibody anti-mouse rhodamine-labeled secondary antibodies (Jackson Immuno research Laboratories Inc. USA) for its visualized in the red channel. Slides were counterstained with Vectashield with DAPI (Vector Labs., CA, USA) for nuclei staining and visualized in the blue channel. Photomicrographs of the ovarian follicles showing the oocyte with its nucleus were obtained with a Digital Camera coupled with a fluorescence microscope (Olympus Corporation). Ten randomly selected follicles from each group ($n = 3$) were used for counting the immunoreactivity of the TH-positive cells using National Institutes of Health's ImageJ software [30].

Ovarian morphology

The ovaries were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin wax, and serially sectioned at 10 µm. The sections were stained with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope. Follicles were classified as healthy or atretic. Degenerative changes observed by light microscopy, including the presence of more than eight pyknotic nuclei in granulosa cells per follicle, hypertrophy in the theca-interna cells, and degeneration signs in the oocyte, were used as criteria for atresia.

Statistics

The number of ova shed by ovulating rats was analyzed using Kruskal–Wallis, followed by a Mann–Whitney *U* test. Ovulation rate, expressed as the number of ovulating animals per number of treated animals, was analyzed using Fisher's exact probability test. Hormonal serum levels and immunoreactivity of TH or DARPP-32 were analyzed using the Graph Pad InStat3 Software, Inc., U-Mann–Whitney *t* test (San Diego, CA, USA). A probability $\leq 5\%$ was considered significant.

Results

Effects of ether anesthesia and sham operation

Compared to the control and sham treatment groups, injecting the saline or ascorbic acid into the ovarian bursa of rats on each day of estrus cycle did not modify ovulation rates (untouched control 18/18; sham operated animals

32/37 vs. animals injected with saline 40/57; animals injected with ascorbic acid 23/25) nor the number of ova shed by ovulating animals (11.1 ± 0.6 ; 11.3 ± 0.9 vs 11.6 ± 0.5 ; 11.8 ± 0.5). The ovulation rates is the number of ovulating animals/number of treated animals. Given that no significant effects were observed; the average ovulation rate and number of ova shed by control, sham treatment, and saline or ascorbic rats injected are hereafter referred to as the control group values. Control group values were used to assess the effects of blocking DA receptors on ovulation rate and number of ova shed.

Effects of dousing DA1/DA2 receptor blocking drugs over the ovaries

HLP doused over the exposed ovaries of rats on estrus or diestrus-1 at 8:00 or 13:00 h blocked ovulation (0/4; 0/4 vs. 4/4, $P < 0.005$, Fisher's exact probability test). HLP had no apparent effect on ovulation when doused over the exposed ovaries of rats on diestrus-2 or proestrus (4/4; 4/4 vs. 4/4). SCH-23390 doused over the exposed ovaries of rats on estrus, diestrus-1, diestrus-2, or proestrus at 08:00, 13:00, or 20:00 h had no effect on ovulation. SPD doused over the exposed ovaries of rats on diestrus-1 at 8:00, 13:00, or 20:00 h blocked ovulation (0/4; 0/4; 0/4 vs. 4/4, $P < 0.005$, Fisher's exact probability test). No effects were observed in rats doused with SPD on estrus, diestrus-2, or proestrus.

Effects on ovulation resulting from blocking ovarian DA2 > DA1, DA1, or DA2 receptors on each day of the estrus cycle

Compared to control rats, HLP treatment to rats on estrus or diestrus-1 at 08:00, 13:00, or 20:00 h, and to rats in diestrus-2 at 08:00 or 20:00 h, blocked ovulation. HLP treatment to rats on proestrus at 13:00 h blocked ovulation in four out of six rats; no effect on ovulation was observed in rats treated at 08:00 or 20:00 h (Fig. 1a). HLP injected rats at 08:00 of diestrus-1 ovulated 10–12 days after of the predicted estrus day.

Compared to control rats, injecting SCH-23390 to rats on diestrus-1 at 8:00, 13:00, or 20:00 h blocked ovulation on the predicted estrus day (Fig. 1b). The animals injected with SCH-23390 on diestrus-1 ovulated 24 h after to the predicted vaginal estrus day. Rats injected with SCH-23390 on diestrus-2, proestrus, or estrus ovulated.

Compared to control rats, injecting SPD to rats on estrus at 20:00 h, diestrus-1 at 8:00, 13:00, or 20:00 h, or to on diestrus-2 at 8:00 h blocked ovulation (Fig. 1c). The rats injected with SPD on diestrus-1 ovulated 24 (1/6) or 48 (5/6) h after the predicted vaginal estrus day. SPD treatment

to rats on diestrus-2, at 13:00 or 20:00 h, or on proestrus or estrus, ovulated.

Effects of injecting GnRH or EB to rats treated with DA blocking receptors that blocked ovulation

Injecting GnRH (i.m.) at 14:00 h of the predicted proestrus day of rats previously treated with DA blocking receptors (HLP, SCH-23390, or SPD) on the days and times that blocked ovulation, resulted in 96 % ovulation induction (Fig. 2). The number of ova shed by ovulating animals treated with this hormonal replacement was similar to the control group.

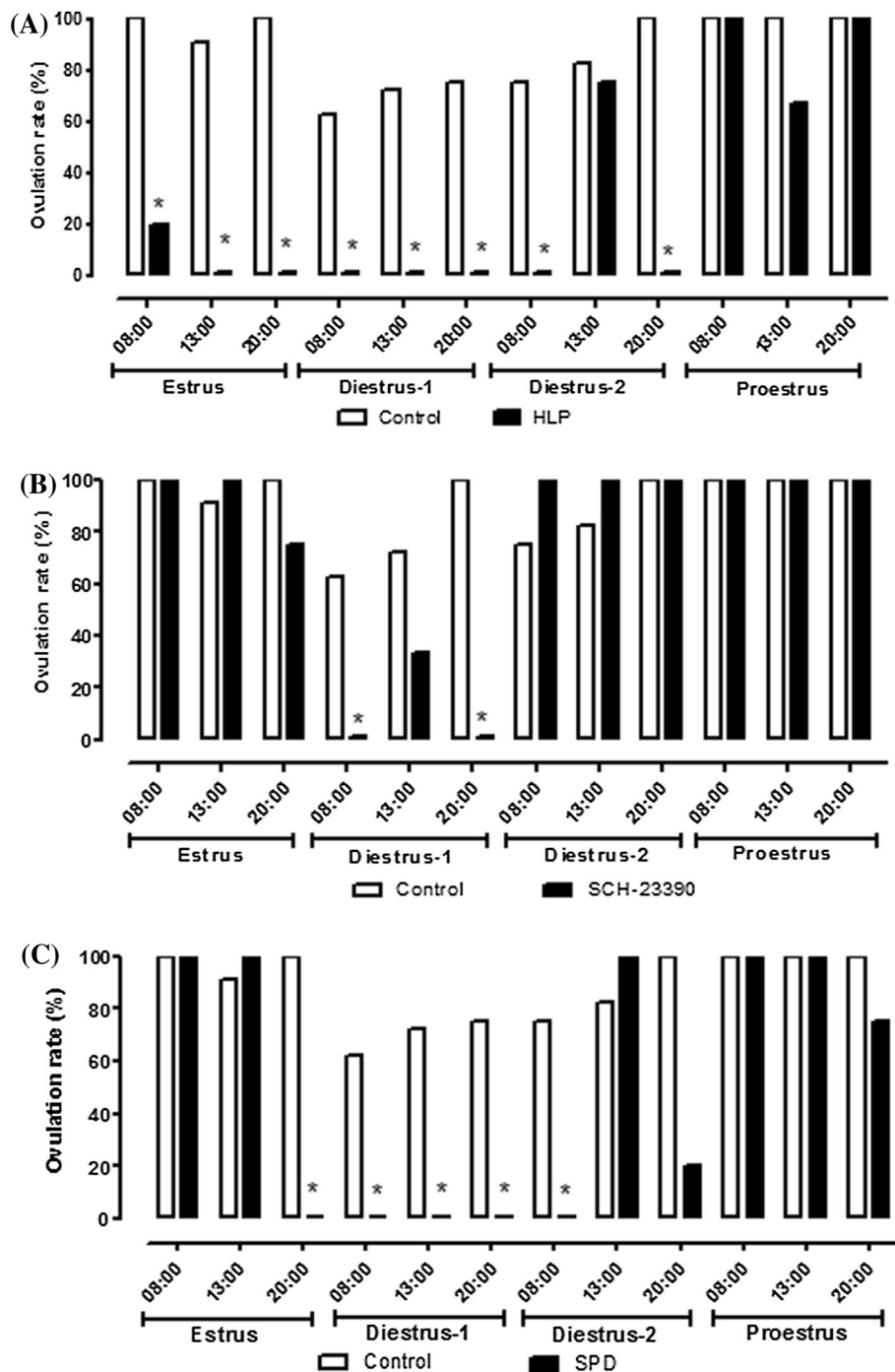
The effects of injecting EB at 14:00 h of the predicted diestrus-2 day of rats previously treated with DA blocking receptors were not as conclusive. EB treatment did not induce ovulation in any of the animals treated with HLP at 8:00, 13:00, or 20:00 h on diestrus-1. EB treatment to rats treated with HLP at 8:00 on estrus induced ovulation the predicted estrus day and did not induce ovulation in most animals treated with HLP at 13:00 or 20:00 h on estrus (2/5 vs. 1/4) (Fig. 3a). Animals with EB hormonal replacement had a similar number of ova shed as the control group. EB treatment on diestrus-2 induced ovulation in 100 % of the animals treated on diestrus-1 with SCH-23390 at 08:00 or 20:00 h, and only in 50 % of the animals treated with SCH-23390 at 13:00 h (Fig. 3b). The number of ova shed by ovulating animals was similar to the control group. EB treatment on diestrus-2 to animals treated with SPD on the previous estrous cycle at 20 h of estrus or diestrus-1 did not induce ovulation. EB treatment on diestrus-2 to animals treated on the previous estrous cycle with SPD at 8:00 or 13:00 h of diestrus-1 induced ovulation of 50 and 75 % of the animals, respectively. EB treatment at 14:00 h on diestrus-2 to animals treated with SPD at 8:00 h on diestrus-2 induced ovulation in all animals (Fig. 3c). The number of ova shed by ovulating animals was similar to the control group.

Hormone concentrations in non-ovulating rats with blocked DA receptors at 13:00 h

Compared to control animals, non-ovulating rats treated with HLP on diestrus-1 at 08:00 or 13:00 h, or on diestrus-2 at 13:00 h showed higher progesterone levels (Fig. 4a). Such differences were not observed in rats treated with SCH-23390 (Fig. 4b) or SPD (Fig. 4c).

Estradiol levels in non-ovulating rats on estrus, diestrus-1, or diestrus-2 treated with HLP at 8:00 h were higher than in the control group (Fig. 4d). Such differences were not observed in rats treated with SCH-23390 or SPD (Fig. 4e, f).

Fig. 1 Ovulation rates in rats with bilateral injection of dopaminergic blockers. The injection into the ovarian bursa with **a** HLP, **b** SCH-23390 or **c** SPD on each day of the estrus cycle at 8:00, 13:00, or 20:00 h was performed. The animals were sacrificed at 9:00 h on the predicted estrus day. * $P < 0.05$ Fisher's exact probability test



Effects on follicular development resulting from injecting ovarian DA1/DA2 blocking receptors into the ovarian bursas of rats on diestrus-1 at 13:00 h

Saline treatment into the ovarian bursas did not induce observable morphological changes in ovarian follicles (Fig. 5a, b). The presence of several pre-ovulatory follicles

was observed in the ovaries of rats on diestrus-1 treated with HLP at 13:00 h (Fig. 5c). In these follicles, the incidence of atresia was higher than in the control group (Fig. 5d). Fresh corpus luteum, characterized by healthy cells with large nuclei, were observed in the ovaries of all ovulating animals from the different experimental groups. In turn, fresh corpus luteum were consistently absent in the ovaries of non-ovulating rats.

Fig. 2 Effects of injecting GnRH to rats treated with DA blocking receptors that blocked ovulation. Ovulation rates in rats with bilateral injection treatment into the ovarian bursa with **a** HLP, **b** SCH-23390 or **c** SPD on each day of the estrus cycle at 8:00, 13:00, or 20:00 h and GnRH hormone replacement (3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.) at 13:00 h on the predicted proestrus day. Animals were sacrificed at 09:00 h on the predicted estrus day (19 h after de GnRH treatment). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Fisher's exact probability test

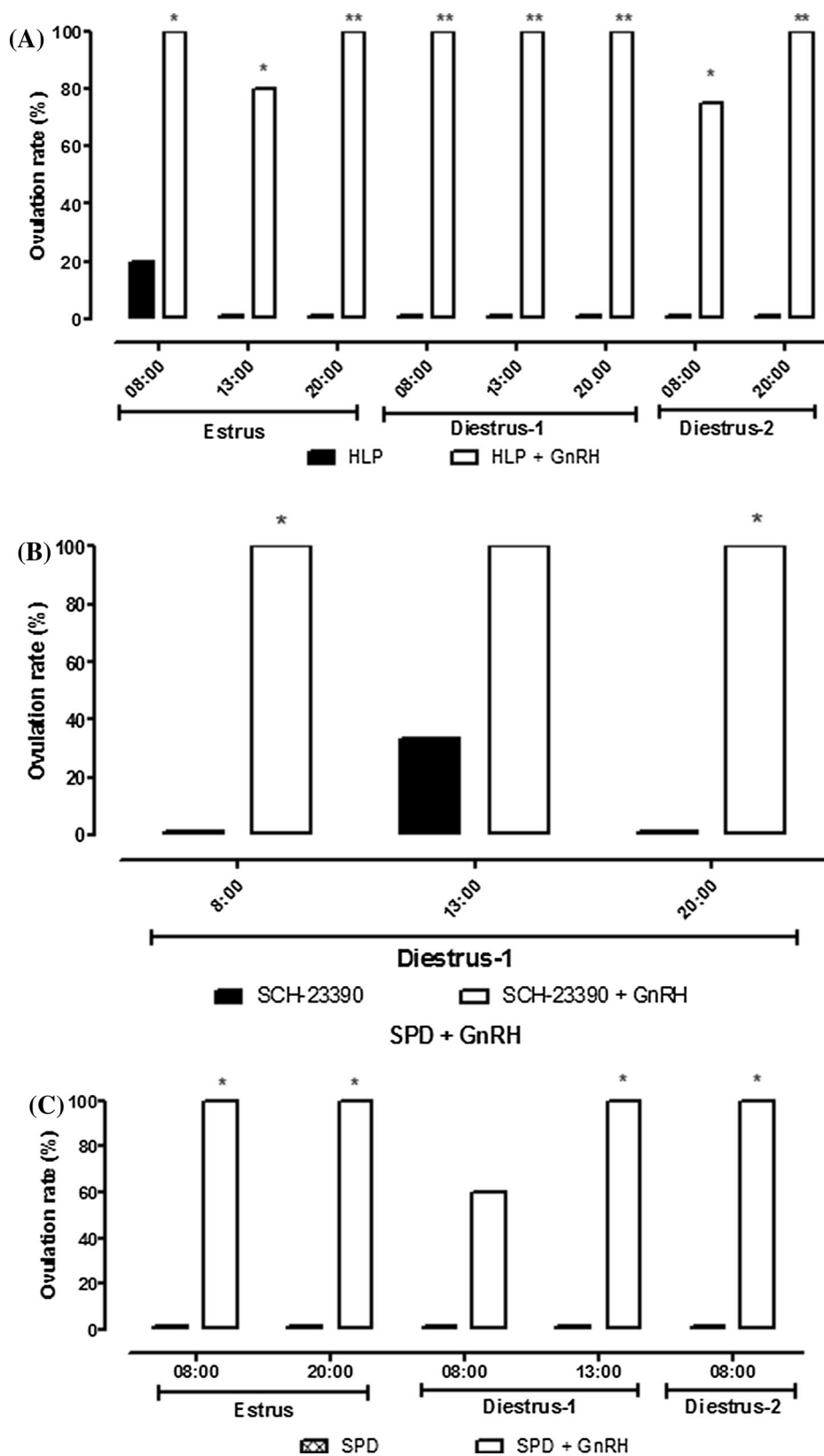
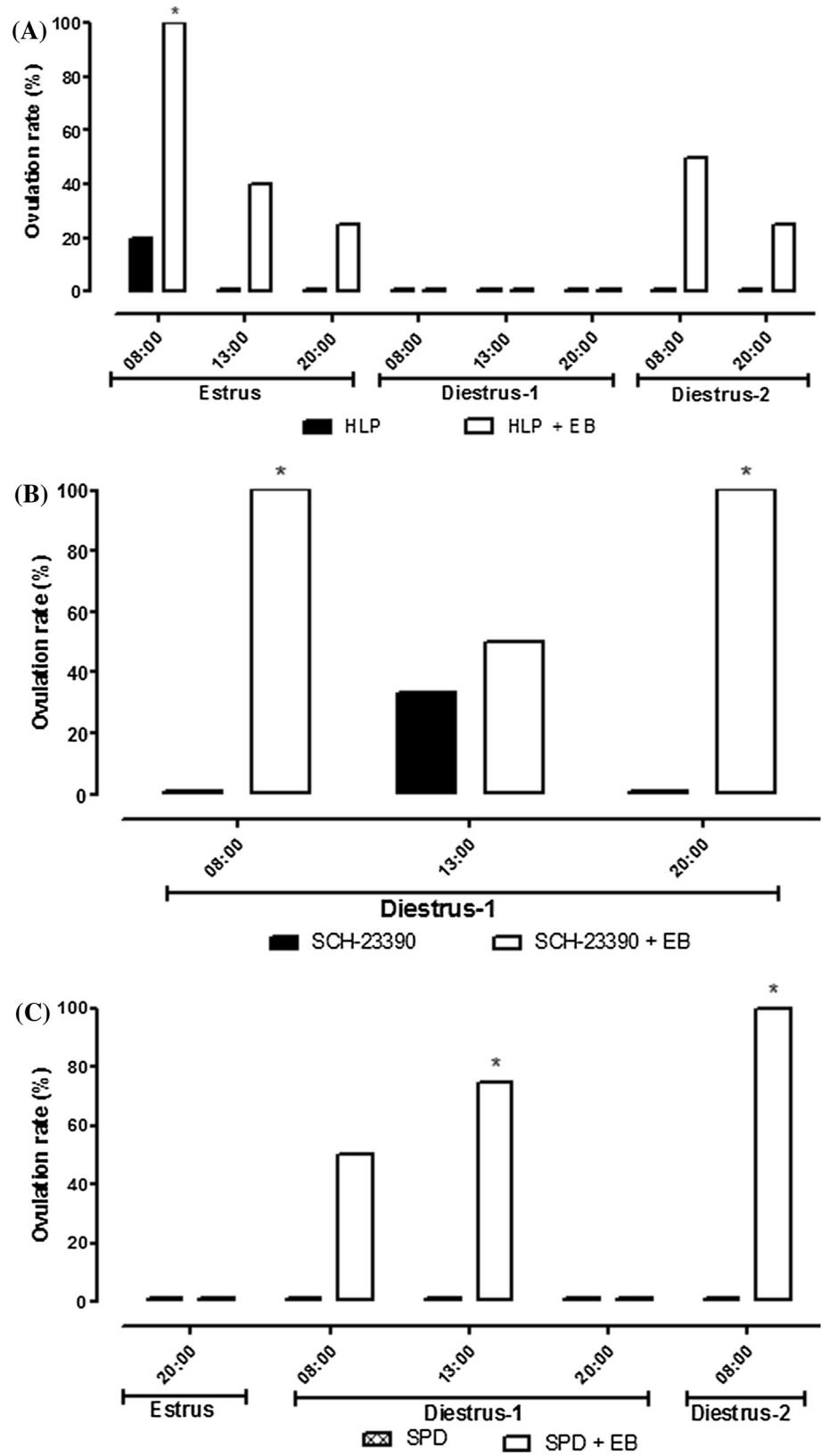


Fig. 3 Effects of injecting EB to rats treated with DA blocking receptors that blocked ovulation. Ovulation rates in rats with bilateral injection treatment into the ovarian bursa with **a** HLP, **b** SCH-23390 or **c** SPD on each day of the estrus cycle at 8:00, 13:00, or 20:00 h and EB hormone replacement (10 µg) at 13:00 h on the expected day diestrus-2 day. Animals were sacrificed at 9:00 h of the predicted estrus day. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 Fisher's exact probability test



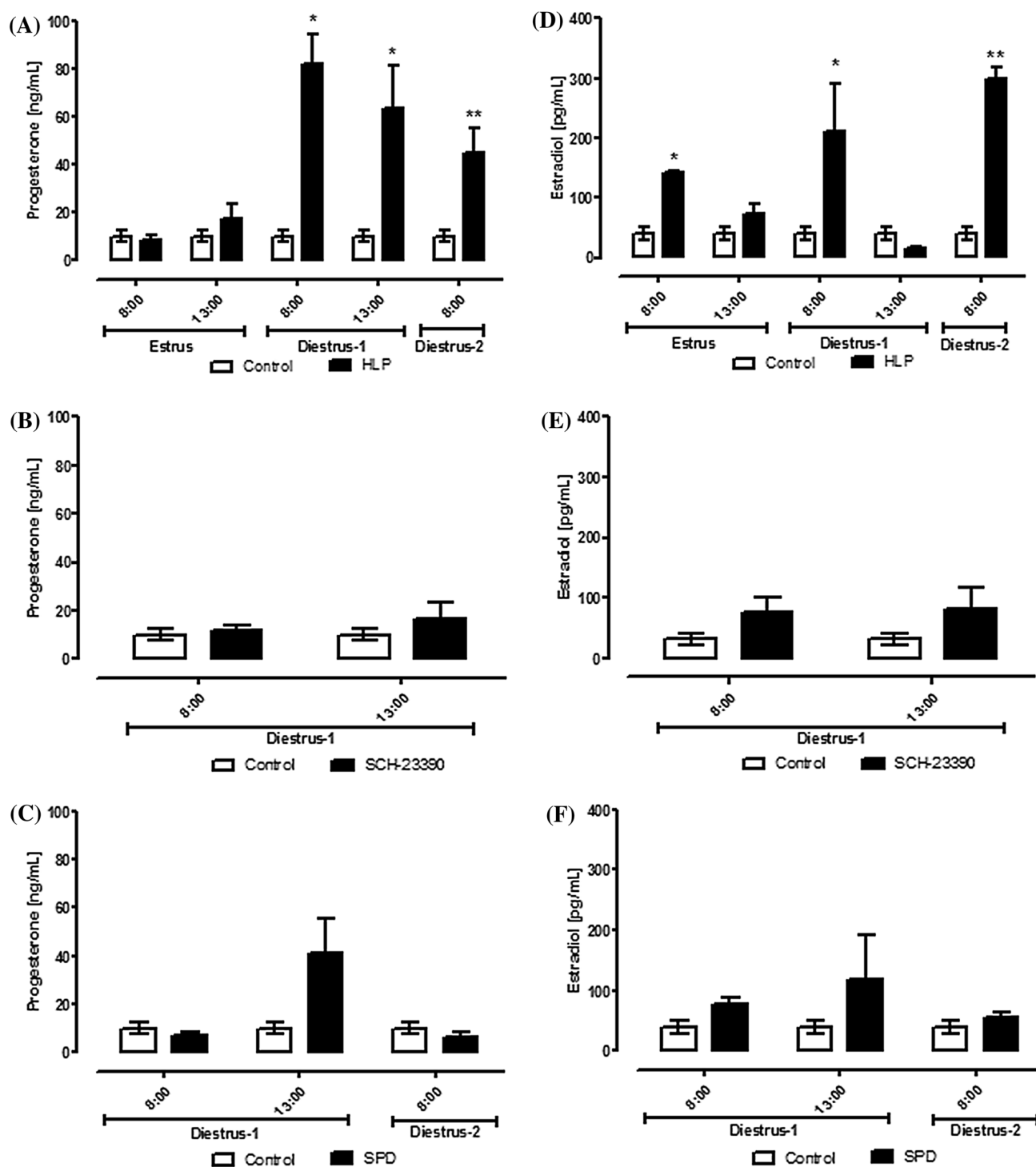


Fig. 4 Hormone concentrations in non-ovulating rats with blocked DA receptors. Steroid hormones serum levels in non-ovulating rats treated with **a** and **d** HLP, **b** and **e** SCH-23390, **c** and **f** SPD into the ovarian bursa on estrus, diestrus-1 or 2 at 8:00 or 13:00 h. Mean

\pm S.E.M. of steroid hormones levels in serum. Animals were sacrificed at 9:00 h on the next predicted estrus day by decapitation. The blood of the trunk was collected * $P < 0.05$ versus control group (U-Mann-Whitney t test)

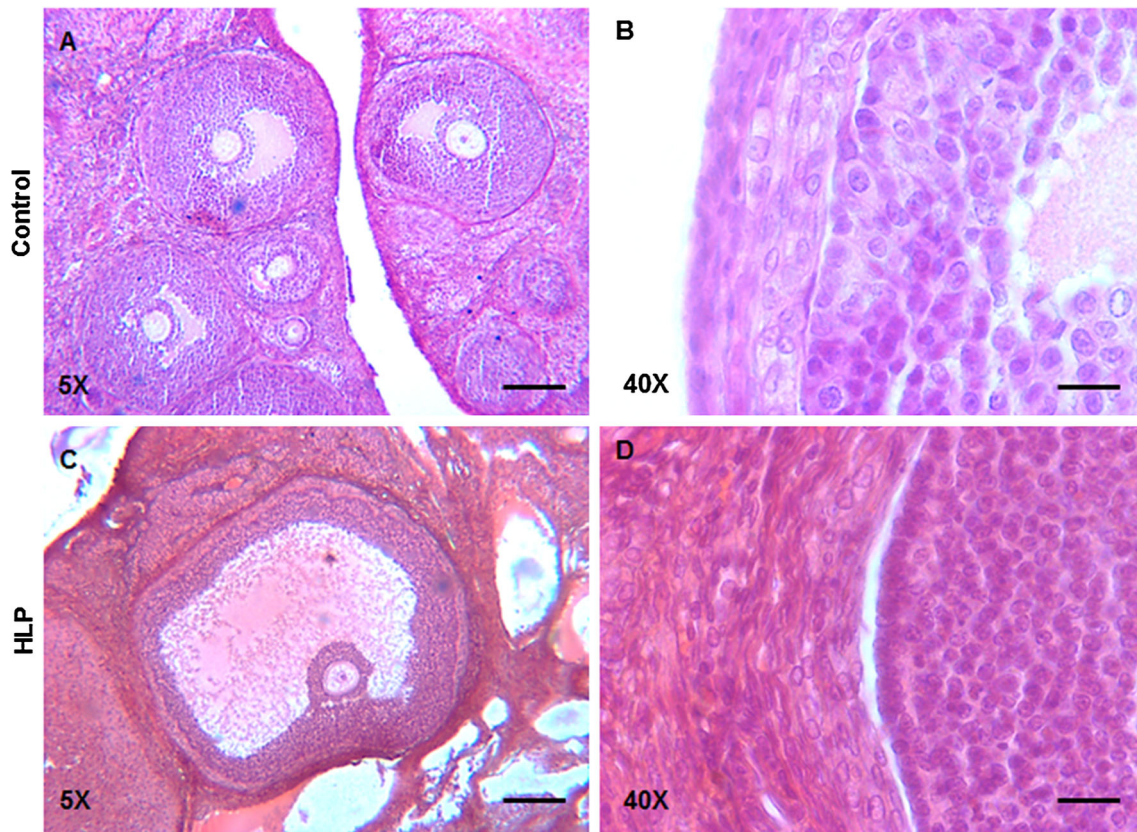


Fig. 5 Effects on follicular development resulting from injecting ovarian DA1/DA2 blocking on diestrus-1. Representative hematoxylin-eosin-stained sections showing ovarian morphology of the saline solution treated group (**a** and **b**) or rats injected with HLP into the ovarian bursas (100- μ g/20- μ L) at 13:00 h on diestrus-1 (**c** and **d**). The animals were sacrificed at 9:00 h on the predicted estrus day and the ovaries fixed. **a** Pre-antral and antral follicles at different stages of

growth. **b** Magnification of healthy secondary follicle, showing the theca and granulosa cells. **c** An ovarian section from a Pre-ovulatory follicle, the oocyte is observed in the central follicle. **d** An ovarian section showing the magnification of atretic pre-ovulatory follicles. The hypertrophy in the theca cells can be observed. Bar 100 in **a** and **c** or 50- μ m in **b** and **d**

TH and DARPP-32 protein immunoreactivity in ovarian follicles of rats on diestrus-1 injected with ovarian DA2-4 blocking receptors at 13:00 h

Figure 6a shows the TH immunoreactivity (green color) found in the interstitial tissue and theca cells of antral follicles of various sizes in the control group. Compared to the saline group, the follicles of animals injected with HLP on diestrus-1 showed higher TH-positive cells (HLP: 422 ± 76.9 vs. control group: 197 ± 9.5 positive cells per follicle) (Fig. 6b). DAPI staining indicated the cytoplasmic location of TH in the theca cells (Fig. 6c). The highest intensity in the immunoreactivity of actin was observed in the granulosa or theca cells of the ovarian follicles, which were simultaneously co-localized with the TH protein. The number of DARPP32-positive nuclei was lower in saline group than in HLP injection group on diestrus-1 (HLP: 37.5 ± 8.0 vs. control group: 14.3 ± 3.9 positive cells per follicle) (Fig. 7).

Discussion

Present results suggest that at the beginning of the estrus cycle the presence of DA ligand to its ovarian level receptors is crucial for follicular development and ovulation.

To our knowledge, this is the first study showing that the binding of DA to its DA1 receptor during the day of diestrus-1 (08.00–20.00 h) is crucial to close the neuroendocrine axis resulting in ovulation in the early morning of the day of estrus. Current evidence on the relation between blocking DA receptors in the ovaries, ovulation, and hormone secretion has been obtained mostly from studies in mares and bitches injected systemically [31–33]. Blocking DA2 receptors by injecting SPD to anestrus mares significantly advanced the beginning of the transitional phase and first ovulation [32]. In rats, the sub-chronic injection of antipsychotics reduced the number of animals displaying a normal estrus cycle, and animals with a disrupted estrus cycle appeared to remain in a permanent state of diestrus [34].

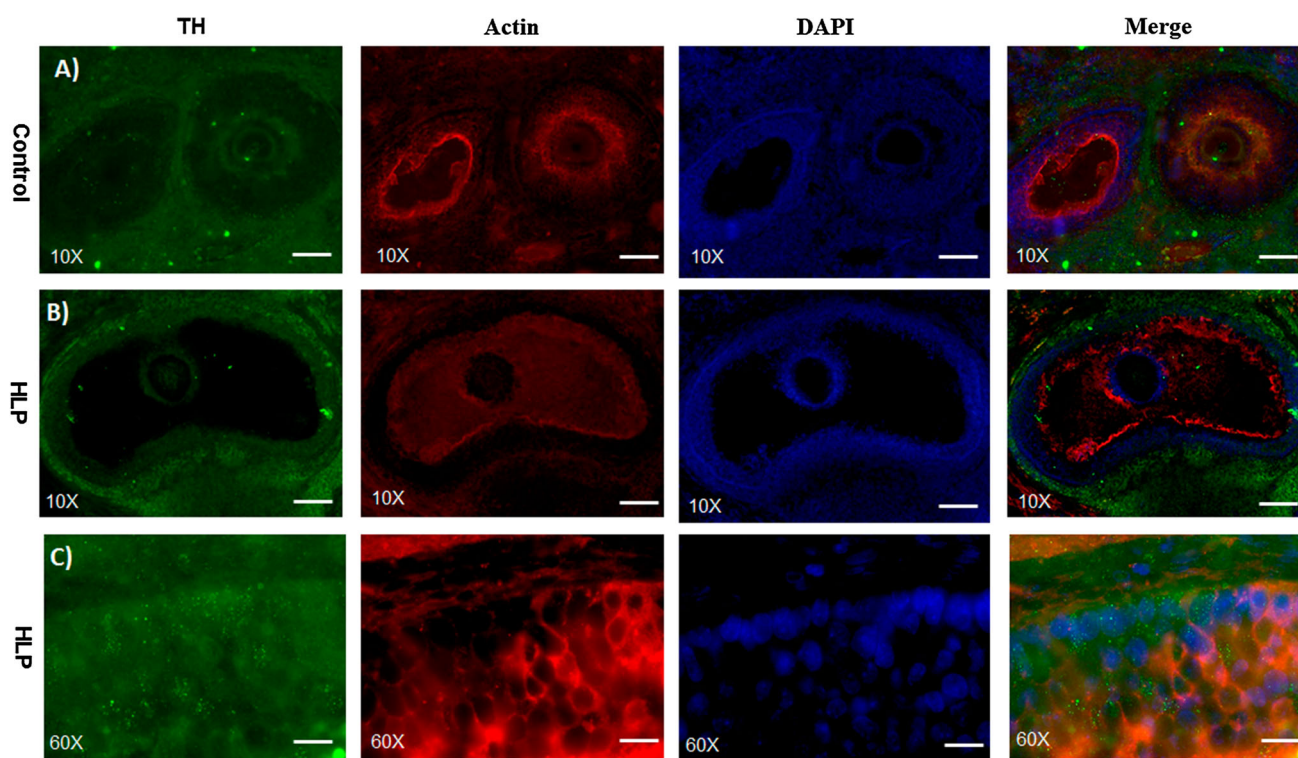


Fig. 6 Effects of the DA1/DA2 blocking receptors at 13:00 h on diestrus-1 in the TH-protein immunoreactivity in ovarian follicles on the predicted estrus day. The ovarian sections were stained with anti-TH antibody (*left column*), anti-actin antibody (*middle column*), and nuclear staining with DAPI (*right column*). *Merged images* are shown in the last column (*green TH; red actin; blue nuclear staining*). **a** The

TH was expressed in theca cells of the ovarian follicles of rats injected into the ovarian bursas with saline. **b** and **c** The ovarian follicles of rats injected with HLP showing the TH-protein immunoreactivity in the theca and granulosa cells on different size follicles. The actin showed the cytoarchitecture of the granulosa or theca cells of the ovarian follicles, *Bar* 100 or 50 μ m

In the present study, injecting DA1 receptor blocking agent into the ovarian bursas of rats on diestrus-1 at 8:00, 13:00, or 20:00 delayed ovulation, and ovulation occurred 24 h after the predicted estrus day. These results suggest that on diestrus-1 the DA ligand to the DA1 receptor participates in regulating follicular development. Blocking the ovaries' DA2 receptors probably has effects on the hypothalamus (lack of GnRH release) or pituitary (lack of positive estradiol feedback on LH secretion). Present results suggest that for normal follicular development and ovulation to occur the DA ligand to DA2 receptors is necessary from the night of estrus through the morning of diestrus-2. However, to clarify this hypothesis, it is necessary to measure the magnitude of this surge.

In ovulating animals, the GnRH pulsatile release is required to generate the pre-ovulatory LH surge [35]. In females, two types of GnRH and gonadotropin secretion are known to occur: (1) a pulsatile secretory pattern that is inhibited by estradiol and (2) a large surge triggered by high levels of estradiol that induces ovulation [36, 37]. In the present study, replacing the GnRH signal to animals with blocked DA receptors (DA1, DA2 or both) on the predicted day of proestrus restored ovulation, suggesting

that the DA ligand to DA1 and DA2 receptors is necessary for the normal pre-ovulatory GnRH release.

On diestrus-2, estradiol stimulates LH release by acting on the pituitary [28] and the hypothalamus [38]. During proestrus, a pre-ovulatory increase of LH levels occurs in response to sustained high levels of estradiol, generating the positive feedback that induces the pre-ovulatory GnRH surge [38, 39].

Present results show that blocking DA2 > DA1 receptors with HLP treatment delays the positive estrogen feedback on gonadotropin secretion, and this delayed follicular development and ovulation. According to Rey-Ares et al. [14] in the rat's ovary, there is the presence of mRNA for DA1 and DA2 receptors. This suggests that the neural information resulting from the DA ligand to its DA1 and DA2 receptors in the ovaries may regulate follicular development and estrogen synthesis by granulosa cells.

In the present study, we observed that DA2 > DA1 ovarian receptors blockade induced by HLP microinjection into the ovarian bursa resulted in higher progesterone levels, while blocking DA1 or DA2 receptors did not. Such differences could be related to prolactin secretion increases

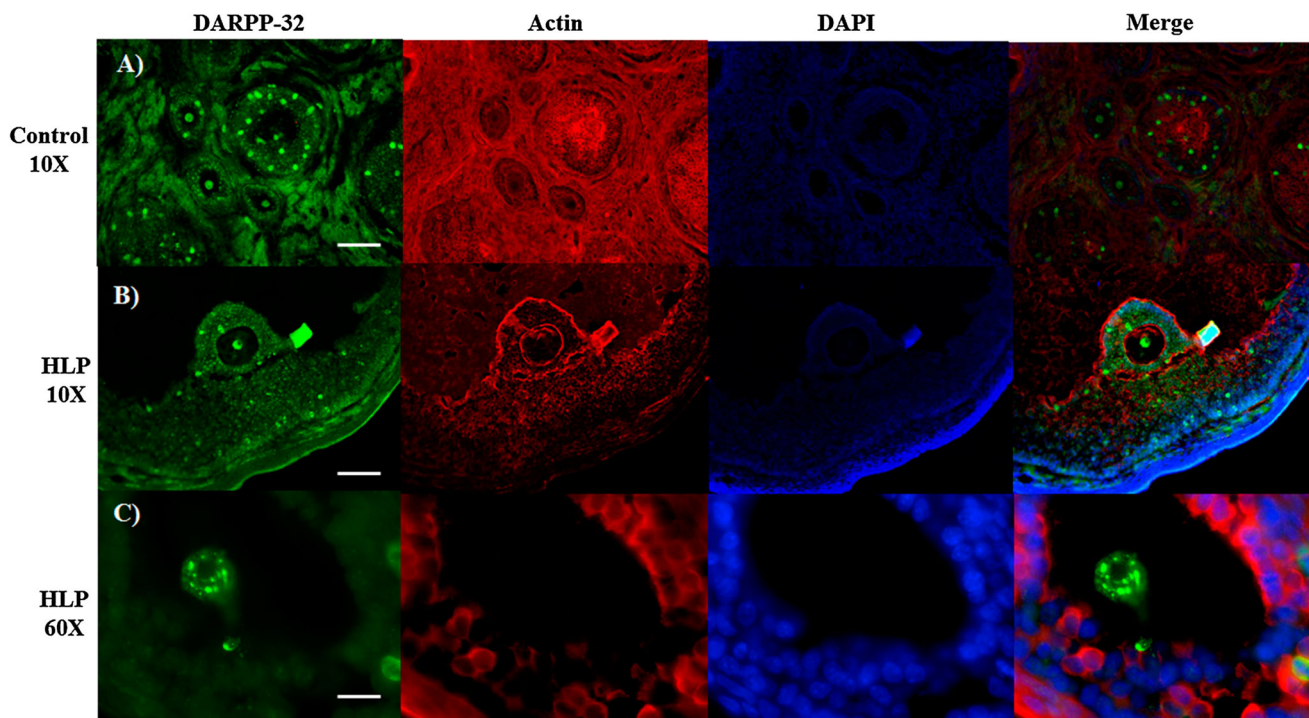


Fig. 7 Effects of the DA1/DA2 blocking receptors at 13:00 h on diestrus-1 in the DARPP-32 immunoreactivity in ovarian follicles on the predicted estrus day. The ovarian sections were stained with anti-DARPP-32 antibody (*left column*), anti-actin antibody (*middle column*), and nuclear staining with DAPI (*right column*). *Merged images* are shown in the last column (*green* DARPP-32; *red* actin; *blue* nuclear staining). **a** The DARPP-32 was expressed in granulosa

cells of the ovarian follicles of rats injected into the ovarian bursas with saline. **b** and **c** The ovarian follicles of rats injected with HLP showing the DARPP-32 protein immunoreactivity in the theca and granulosa cells on different size follicles. The actin showed the cytoarchitecture of the granulosa or theca cells of the ovarian follicles, *Bar* 100 or 50 μ m

induced by blocking DA1/DA2 receptors, but not by the transient blockade of DA1 or DA2 receptors [40, 41].

To our knowledge, no evidence on the direct effects of DA antagonists on ovarian function has been reported. HLP treatment (0.1 mg/kg i.v) has been shown to cause long-lasting increases of progesterone levels in bitches [42]. According to Arbogast and Ben-Jonathan [43], progesterone, but not estradiol, maintains the plateau of prolactin levels by reducing the activity of hypothalamic DA neurons, leading to an absence of functional DA input to lactotrophs in the anterior pituitary. As a result, prolactin levels remain elevated for a prolonged period, producing a broad profile that contrasts with the sharp and symmetrical LH surge.

According to Taketa et al. [44] rats injected with SPD during 4 days show higher levels of prolactin SR-BI, StAR, progesterone 50sc, and 3β -HSD in new corpus luteum, resulting in higher levels of progesterone. The authors suggest that SPD elevates progesterone through activation of PRL secretion in the pituitary. Mostafapour et al. [45] showed that rats injected with SPD during 28 days had significantly lower LH, FSH, and estradiol serum levels, while progesterone and prolactin levels increased. In the

present study, the injection of SPD into the ovaries did not result in significant changes in progesterone levels, and the animals ovulated 24–48 h after the predicted day of estrus, suggesting that prolactin secretion was not enhanced by injecting SPD into the ovaries. During the formation of the corpora lutea, there is an increase in the angiogenesis, which dynamics are regulated by activating and inhibitors factors [46]. The binding of DA to its DA2 receptors inhibits vascular endothelial growth factor a mediator of ovarian angiogenesis. DA2 receptors are present in the vasculature of corpora lutea [47–49]. The injection of a DA2 agonist diminishes vascular hyper-permeability observed in prepubertal rats injected with PMSG–hCG without affecting ovarian angiogenesis. In present study, the blockade of DA2 receptors by SPD microinjection into the ovaries blocked ovulation, suggesting that the life span of the corpora lutea present in the ovaries could be prolonged, resulting in an alteration in the luteolytic mechanisms, modifying the follicular growth and maturation. Since GnRH injection to SPD-microinjected rats induced ovulation, the follicular growth and maturation were partially affected.

Although HLP and SPD are DA2 dopaminergic blockers that induce hyperprolactinemia, higher doses of SPD are probably required to increase progesterone levels [45]. Studies have shown that in cultures of ovarian rat cells treated with pregnant-mare-serum gonadotropin (PMSG) progesterone levels increased when incubated with DA1 agonists [18]. In the present study, rats injected with a DA1 dopaminergic blocker did not show changes in progesterone levels, suggesting that exist different effects if stimulates or blocks the DA receptor.

According to Rey-Ares et al. [14], only DA1 and DA2 mRNAs are present in the rat's ovarian endocrine cells, with a stronger presence in the theca and interstitial cells and corpus luteum than in granulosa cells. In the present study, blocking DA2 > DA1 receptors resulted in higher TH immunoreactivity in the theca, suggesting that ovarian cells increased DA synthesis. Moreover, in this study showed in vivo that the DA ligand interacts with DA1 receptor at the intracellular level by phosphorylation of DARPP-32 on Thr 34 in granulosa cells responsible for the synthesis of steroid hormones such as estradiol. DARPP-32 is phosphorylated on Thr 34 in response to DA acting via a cAMP-dependent protein kinase (PKA). Its phosphorylation is increased by DA1, but not DA2 [50]. For that reason, the present study is consistent with the other authors that the DA regulates the endocrine ovarian function as the synthesis of steroid hormones in the granulosa cells and corpus luteum [3, 14]. And not all granulosa cells are activated simultaneously, probably the activity of DA receptors depends on the day of the estrous cycle.

Taken together, present results suggest that at the beginning of the estrus cycle, the DA ligand to its DA1 receptors at the ovarian level generates neural signals required for regulating the follicular development and ovulation. The release of GnRH, and its dependence on estradiol serum levels is related to the type of DA receptors that has been activated. The ligand of DA to DA2 ovarian receptors, and perhaps other peripheral and central DA2 receptors, participates in the regulation of gonadotropins and the positive feedback of estradiol during diestrus-2 at both ovarian and central levels. The increase in ovarian DARPP-32 expression in animals with ovarian DA2 receptor blockade suggest that the granulosa cells play a role in the synthesis of steroids hormones thought the activation of DA1 receptor on diestrus-1.

Acknowledgments This work was supported by CONACYT Grant 316181 to B. Venegas. We thank MSc Alvaro Domínguez-González for the assistance in the English revision.

Conflict of interest The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research.

References

1. L.I. Aguado, Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc. Res. Tech.* **59**(6), 462–473 (2002). doi:10.1002/jemt.10232
2. I. Gerendai, P. Banczerowski, B. Halasz, Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine* **28**(3), 309–318 (2005). doi:10.1385/ENDO:28:3:309
3. A. Mayerhofer, H.C. Hemmings Jr, G.L. Snyder, P. Greengard, S. Boddien, U. Berg, C. Brucker, Functional dopamine-1 receptors and DARPP-32 are expressed in human ovary and granulosa luteal cells in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**(1), 257–264 (1999). doi:10.1210/jcem.84.1.5378
4. A. Mayerhofer, G.D. Smith, M. Danilchik, J.E. Levine, D.P. Wolf, G.A. Dissen, S.R. Ojeda, Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(18), 10990–10995 (1998)
5. H. D'Albora, J.J. Barcia, Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci. Lett.* **205**(1), 65–67 (1996)
6. W.L. Dees, J.K. Hiney, T.D. Schulte, A. Mayerhofer, M. Danilchik, G.A. Dissen, S.R. Ojeda, The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology* **136**(12), 5760–5768 (1995). doi:10.1210/endo.136.12.7588334
7. H. D'Albora, P. Lombide, S.R. Ojeda, Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* **300**(1), 47–56 (2000)
8. P.G. Hofmann, A. Baez Saldana, T. Fortoul Van Der Goes, M. Gonzalez del Pliego, G. Gutierrez Ospina, Neuroendocrine cells are present in the domestic fowl ovary. *J. Anat.* **222**(2), 170–177 (2013). doi:10.1111/joa.12002
9. J.M. Bahr, N. Ben-Jonathan, Preovulatory depletion of ovarian catecholamines in the rat. *Endocrinology* **108**(5), 1815–1820 (1981). doi:10.1210/endo-108-5-1815
10. P.A. Denning-Kendall, M.L. Wild, D.C. Wathes, Regional differences in catecholamine concentrations in bovine ovaries analysed by high-performance liquid chromatography. *J. Endocrinol.* **129**(2), 221–226 (1991)
11. A. Mayerhofer, S. Fritz, R. Grunert, S.L. Sanders, D.M. Duffy, S.R. Ojeda, R.L. Stouffer, D1-Receptor, DARPP-32, and PP-1 in the primate corpus luteum and luteinized granulosa cells: evidence for phosphorylation of DARPP-32 by dopamine and human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**(12), 4750–4757 (2000). doi:10.1210/jcem.85.12.7084
12. S.S. King, A.G. Campbell, E.A. Dille, J.F. Roser, L.L. Murphy, K.L. Jones, Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domest. Anim. Endocrinol.* **28**(4), 405–415 (2005). doi:10.1016/j.domaniend.2005.02.001
13. S.S. King, K.L. Jones, B.A. Mullenix, D.T. Heath, Seasonal relationships between dopamine D1 and D2 receptor and equine FSH receptor mRNA in equine ovarian epithelium. *Anim. Reprod. Sci.* **108**(1–2), 259–266 (2008). doi:10.1016/j.anireprosci.2007.08.007
14. V. Rey-Ares, N. Lazarov, D. Berg, U. Berg, L. Kunz, A. Mayerhofer, Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **5**, 40 (2007). doi:10.1186/1477-7827-5-40
15. R. Dominguez, C.M. Gaitan, S.A. Mendez, A. Ulloa-Aguirre, Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *J. Endocrinol.* **113**(1), 37–44 (1987)
16. R. Dominguez, D. Zipitria, L. Riboni, R. Revilla, Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation

- throughout the estrous cycle of the rat. *J. Interdiscip. Cycle Res.* **16**(1), 63–72 (1985). doi:[10.1080/09291018509359872](https://doi.org/10.1080/09291018509359872)
17. S. Isobe, The role of the dopaminergic system in the rat ovary. *Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi* **70**(4), 457–464 (1994)
 18. H. Mori, S. Arakawa, T. Ohkawa, R. Ohkawa, S. Takada, T. Morita, S. Okinaga, The involvement of dopamine in the regulation of steroidogenesis in rat ovarian cells. *Horm. Res.* **41**(Suppl 1), 36–40 (1994)
 19. J. Bodis, M. Koppan, L. Kornya, H.R. Tinneberg, A. Torok, The effect of catecholamines, acetylcholine and histamine on progesterone release by human granulosa cells in a granulosa cell superfusion system. *Gynecol. Endocrinol.* **16**(4), 259–264 (2002)
 20. F. Papenfuss, J. Bodis, H.R. Tinneberg, H. Schwarz, The modulatory effect of catecholamines on gonadotropin-stimulated granulosa cell steroid secretion. *Arch. Gynecol. Obstet.* **253**(2), 97–102 (1993)
 21. M.L. Rankin, L.A. Hazelwood, R. Benjamin Freer, Y. Namkung, B.E. Rex, R.A. Roof, D.R. Sibley, Molecular pharmacology of the dopamine receptors, in *Dopamine handbook*, vol. 1, ed. by L.L. Iversen, D.S. Iversen, S.B. Dunnett, A. Bjorklund (Oxford University Press, New York, 2010), pp. 63–87
 22. G. Emilien, J.M. Maloteaux, M. Geurts, K. Hoogenberg, S. Cragg, Dopamine receptors: physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol. Ther.* **84**(2), 133–156 (1999)
 23. C. Moran, A. Franco, J.L. Moran, A. Handal, L. Morales, R. Dominguez, Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac-superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat. *Endocrine* **26**(2), 147–152 (2005). doi:[10.1385/endo:26:2:147](https://doi.org/10.1385/endo:26:2:147)
 24. C. Moran, F. Zarate, J.L. Moran, A. Handal, R. Dominguez, Lateralization of the connections of the ovary to the celiac ganglia in juvenile rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **7**, 50 (2009). doi:[10.1186/1477-7827-7-50](https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-50)
 25. G. Rosas, M.I. Ramirez, R. Linares, A. Trujillo, R. Dominguez, L. Morales-Ledesma, Asymmetric steroidogenic response by the ovaries to the vasoactive intestinal peptide. *Endocrine* **48**(3), 968–977 (2015). doi:[10.1007/s12020-014-0449-x](https://doi.org/10.1007/s12020-014-0449-x)
 26. J.L. Moran, M.E. Cruz, R. Dominguez, Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic or anterior hypothalamic area performed on each day of the estrous cycle of adult rats. *Brain Res. Bull.* **33**(6), 663–668 (1994)
 27. J.L. Moran, R. Dominguez, Effects of the unilateral implant of haloperidol at the preoptic-anterior hypothalamic area, on ovulation. *Endocrine* **3**(6), 391–393 (1995). doi:[10.1007/bf02935642](https://doi.org/10.1007/bf02935642)
 28. R.F. Weick, E.R. Smith, R. Dominguez, A.P. Dhariwal, J.M. Davidson, Mechanism of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. *Endocrinology* **88**(2), 293–301 (1971). doi:[10.1210/endo-88-2-293](https://doi.org/10.1210/endo-88-2-293)
 29. A. Díaz, L. De Jesús, L. Mendieta, M. Calvillo, B. Espinosa, E. Zenteno, J. Guevara, I.D. Limón, The amyloid- β 25–35 injection into the CA1 region of the neonatal rat hippocampus impairs the long-term memory because of an increase of nitric oxide. *Neurosci. Lett.* **468**(2), 151–155 (2010). doi:[10.1016/j.neulet.2009.10.087](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.10.087)
 30. C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**(7), 671–675 (2012)
 31. F.X. Donadeu, O.J. Ginther, Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. *Reprod. (Camb. Engl.)* **124**(6), 875–885 (2002)
 32. G. Mari, M. Morganti, B. Merlo, C. Castagnetti, F. Parmeggiani, N. Govoni, G. Galeati, C. Tamanini, Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep anestrus mares. *Theriogenology* **71**(6), 959–965 (2009). doi:[10.1016/j.theriogenology.2008.11.001](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.11.001)
 33. L. Zoldag, S. Fekete, I. Csaky, A. Bersenyi, Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology* **55**(8), 1657–1666 (2001)
 34. M.J. Fell, J.C. Neill, K.M. Marshall, Effects of the classical antipsychotic haloperidol and atypical antipsychotic risperidone on weight gain, the oestrous cycle and uterine weight in female rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **14**(5), 385–392 (2004). doi:[10.1016/j.euroneuro.2003.12.001](https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2003.12.001)
 35. K. Maeda, S. Ohkura, Y. Uenoyama, Y. Wakabayashi, Y. Oka, H. Tsukamura, H. Okamura, Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res.* **1364**, 103–115 (2010). doi:[10.1016/j.brainres.2010.10.026](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.026)
 36. N.P. Evans, G.E. Dahl, D.T. Mauger, V. Padmanabhan, L.A. Thrun, F.J. Karsch, Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system. *Endocrinology* **136**(12), 5511–5519 (1995). doi:[10.1210/endo.136.12.7588302](https://doi.org/10.1210/endo.136.12.7588302)
 37. M.E. Freeman, Chapter 43: neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat, in *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, 3rd edn., ed. by J.D. Neill, T.M. Plant, D.W. Pfaff, J.R.G. Challis, D.M. Kretser, J.S. Richards, P.M. Wassarman (Academic Press, St Louis, 2006), pp. 2327–2388
 38. N.P. Evans, G.E. Dahl, V. Padmanabhan, L.A. Thrun, F.J. Karsch, Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology* **138**(12), 5408–5414 (1997). doi:[10.1210/endo.138.12.5558](https://doi.org/10.1210/endo.138.12.5558)
 39. J.W. Everett, Central neural control of reproductive functions of the adenohypophysis. *Physiol. Rev.* **44**(3), 373–431 (1964)
 40. T. Baptista, E. Araujo de Baptista, N.M. Ying Kin, S. Beaulieu, D. Walker, R. Joobar, J. Lalonde, D. Richard, Comparative effects of the antipsychotics sulpiride or risperidone in rats I: bodyweight, food intake, body composition, hormones and glucose tolerance. *Brain Res.* **957**(1), 144–151 (2002)
 41. B.J. Kinon, J.A. Gilmore, H. Liu, U.M. Halbreich, Hyperprolactinemia in response to antipsychotic drugs: characterization across comparative clinical trials. *Psychoneuroendocrinology* **28**(Suppl 2), 69–82 (2003)
 42. M. Goiny, S. Cekan, K. Uvnas-Moberg, Effects of dopaminergic drugs on plasma levels of steroid hormones in conscious dogs. *Life Sci.* **38**(25), 2293–2300 (1986)
 43. L.A. Arbogast, N. Ben-Jonathan, The preovulatory prolactin surge is prolonged by a progesterone-dependent dopaminergic mechanism. *Endocrinology* **126**(1), 246–252 (1990). doi:[10.1210/endo-126-1-246](https://doi.org/10.1210/endo-126-1-246)
 44. Y. Taketa, M. Yoshida, K. Inoue, M. Takahashi, Y. Sakamoto, G. Watanabe, K. Taya, J. Yamate, A. Nishikawa, Differential stimulation pathways of progesterone secretion from newly formed corpora lutea in rats treated with ethylene glycol monomethyl ether, sulpiride, or atrazine. *Toxicol. Sci.* **121**(2), 267–278 (2011). doi:[10.1093/toxsci/kfr062](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr062)
 45. S. Mostafapour, S. Zare, R.A. Sadrkhanlou, A. Ahmadi, M. Razi, Sulpiride-induced hyperprolactinemia in mature female rats: evidence for alterations in the reproductive system, pituitary and ovarian hormones. *Int. J. Fertil. Steril.* **8**(2), 193–206 (2014)
 46. G. Macchiarelli, S.A. Nottola, M.G. Palmerini, S. Bianchi, M. Maione, C. Lorenzo, G. Stifano, E. Di Marco, S. Correr, Morphological expression of angiogenesis in the mammalian ovary as seen by SEM of corrosion casts. *Italian J. Anat. Embryol.* **115**(1–2), 109–114 (2010)
 47. F. Delgado-Rosas, R. Gomez, H. Ferrero, F. Gaytan, J. Garcia-Velasco, C. Simon, A. Pellicer, The effects of ergot and non-ergot-derived dopamine agonists in an experimental mouse model of endometriosis. *Reprod. (Camb. Engl.)* **142**(5), 745–755 (2011). doi:[10.1530/rep-11-0223](https://doi.org/10.1530/rep-11-0223)

48. R. Gomez, H. Ferrero, F. Delgado-Rosas, M. Gaytan, C. Morales, R.C. Zimmermann, C. Simon, F. Gaytan, A. Pellicer, Evidences for the existence of a low dopaminergic tone in polycystic ovarian syndrome: implications for OHSS development and treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**(8), 2484–2492 (2011). doi:[10.1210/jc.2011-0075](https://doi.org/10.1210/jc.2011-0075)
49. R. Gomez, M. Gonzalez-Izquierdo, R.C. Zimmermann, E. Novella-Maestre, I. Alonso-Muriel, J. Sanchez-Criado, J. Remohi, C. Simon, A. Pellicer, Low-dose dopamine agonist administration blocks vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated vascular hyperpermeability without altering VEGF receptor 2-dependent luteal angiogenesis in a rat ovarian hyperstimulation model. *Endocrinology* **147**(11), 5400–5411 (2006). doi:[10.1210/en.2006-0657](https://doi.org/10.1210/en.2006-0657)
50. C.C. Ouimet, P.E. Miller, H.C. Hemmings Jr, S.I. Walaas, P. Greengard, DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. III. Immunocytochemical localization. *J. Neurosci.* **4**(1), 111–124 (1984)