



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO DE CIENCIAS



PAPEL DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DEL OVARIO SOBRE EL CICLO ESTRAL Y LA OVULACIÓN EN EL MODELO DE LA RATA ADULTA HEMICASTRADA

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS QUÍMICAS
AREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA:

Q.F.B. DULCE ELENA LETRAS LUNA

DIRECTOR DE TESIS

D.C. LOURDES MILLÁN PÉREZ PEÑA
INSTITUTO DE CIENCIAS
BUAP

ASESOR DE TESIS

D.C. JOSÉ LUIS MORÁN PERALES
INSTITUTO DE CIENCIAS
BUAP

Junio 2018

<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	4
<u>RESUMEN</u>	6
<u>MARCO TEÓRICO</u>	7
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO.....	7
MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DEL OVARIO	8
DESARROLLO FOLICULAR	11
OVULACIÓN.....	15
CICLO ESTRAL	19
INERVACIÓN OVÁRICA	23
ASIMETRÍA OVÁRICA	25
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DOPAMINÉRGICAS.....	29
METABOLISMO DE LA DOPAMINA.....	35
DOPAMINA EN EL OVARIO.....	36
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y BALANCE ÓXIDO-REDUCCIÓN	39
PAPEL DE LAS ERO EN LA FUNCIÓN OVÁRICA	41
<u>ANTECEDENTES</u>	44
<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	45
<u>JUSTIFICACIÓN</u>	46
<u>HIPÓTESIS</u>	46
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	46
<u>OBJETIVOS PARTICULARES</u>	47
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	48
TÉCNICA DE LA HEMICASTRACIÓN	50
TÉCNICA DE LA MICROINYECCIÓN.....	50
EUTANASIA Y AUTOPSIA GENERAL.....	51
ANÁLISIS DE LA OVULACIÓN COMPENSADORA (OC).....	52
PERFUSIÓN INTRACARDIACA Y FIJACIÓN DE TEJIDOS	52
CRIOPRESERVACIÓN DE OVARIOS.....	52

CORTES HISTOLÓGICOS.....	52
INMUNOHISTOQUÍMICA ACOPLADA A FLUORESCENCIA	53
CUANTIFICACIÓN DE INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO: MALONDIALDEHÍDO (MDA), 4-HIDROXI-ALQUENALES (4-HDA) Y NITRITOS (NO ₂ ⁻).....	53
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	54
<u>RESULTADOS</u>	<u>54</u>
OVULACIÓN COMPENSADORA (OC) DELOVARIO REMANENTE.....	54
RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO 1 (RDA1), TIPO 2 (RDA2) Y DARPP-32.....	55
EFECTO DEL BLOQUEO FARMACOLÓGICO DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO 2 (RDA2) SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RDA2 Y DARPP-32	60
EFECTO DEL BLOQUEO FARMACOLÓGICO DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO 1 (RDA1) SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RDA1	64
INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL OVARIO	66
<u>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</u>	<u>68</u>
EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO 2 (RDA2) ACTÚA DE FORMA LATERALIZADA SOBRE LA OVULACIÓN COMPENSADORA DEL OVARIO (OC).....	69
EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO 2 REGULA LA ACTIVACIÓN DE DARPP-32 EN LAS CÉLULAS DEL FOLÍCULO OVÁRICO.....	70
EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO 1 INCREMENTA SU EXPRESIÓN DESPUÉS DEL ANTAGONISMO	70
EL ANTAGONISMO DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS INCREMENTA EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL OVARIO: EFECTOS EN EL ANIMAL ENTERO O HEMICASTRADO.....	71
PAPEL DE LOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS EN EL CONTEXTO GENERAL DE LAS FUNCIONES OVÁRICAS.....	73
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>75</u>
<u>PERPECTIVAS</u>	<u>75</u>
<u>REFERENCIAS</u>	<u>76</u>

LISTA DE ABREVIATURAS

17 β -HSD: 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa

20 α -HSD: enzima 20-hidroxiesteroide deshidrogenasa

3-HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

AMPA: 3,5-hidroxi-metil-4-isoxazol-propiónico α amino)

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ATP: Adenosin trifosfato

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico

BMP-15: Proteína morfogénica ósea

C / EBP: Proteína de unión a la secuencia

CAAT

Cdk5: Cinasa dependiente de ciclina 5

CGP: Células germinales primordiales

CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina

Ciclooxigenasa-2 (COX-2)

COMT: Catecol-O-metiltransferasa

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

CXCL12: Factor derivado de células estromales-1

D2L: Receptor dopaminérgico 2 forma larga

D2S: Receptor dopaminérgico 2 forma corta

DA: Dopamina

DARPP-32: Fosfoproteína regulada por AMPc y dopamina de 32 kDA

DAT: Transportador de dopamina

DDH1 o AKR1C1: Dihidrodiol deshidrogenasa

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DOPAL: 3,4-dihidroxifenilacetaldehído

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGP: Factor de crecimiento epidermal

EGR-1: Proteína de respuesta de crecimiento temprano-1

ERK: Cinasa regulada por señales extracelulares

ERO: Especies reactivas de oxígeno

FHC: Ferritina de cadena pesada

3-MT: 3-metoxitiramina

AC: Adenilato ciclasa

Ad4BP: Proteína de unión a Ad4

ADAMTS-1: Metalopeptidasa con motivos trombospondina tipo 1

FIGLA: Factor de la línea germinal

FSH: Hormona folículo estimulante

GABA_A: Ácido gamma aminobutírico A

GDF-9: Factor de crecimiento diferencial

GEF: Factores de intercambio de nucleótidos de guanina

GIRK: Canales de potasio

GKS-3: Glucógeno sintasa cinasa-3

GnRH: Hormona liberadora de

gonadotropinas

GPCR: Receptores acoplados a proteína G

GPx: Glutación peroxidasa

GST-pi: Glutación S-transferasa pi

hCG: Gonadotropina coriónica humana

HCO: Hipertrofia compensadora del ovario

IL-1: Interleucina-1

IL-8: Interleucina-8

InsL3: Péptido similar a la insulina 3

LH: Hormona luteinizante

MAO: Monoamino oxidasa

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos

MT3: Metalotioneína-3

mTORR: Cinasa diana de la rapamicina en células de mamífero

NAT: Transportador de Noradrenaina

NF-kB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NMDA: N-metil-D-aspartato

NOS: Nervio ovárico superior

NPO: Nervio del plexo ovárico

OC: Ovulación compensadora

P450AROM: Aromatasa P450

P450SCC: Enzima de desdoblamiento de la cadena lateral del colesterol
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGE2: Prostaglandina E2
PGF2 α : Prostaglandina F2 α
PI3K: Cinasa de fosfatidilinositol-3
PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA: Proteína cinasa A
PKC: Proteína cinasa dependiente de calcio
PKD: Cinasa dependiente de fosfoinosítido
PLC: Fosfolipasa C
PP1: Proteína fosfatasa 1
PP2A: Proteína fosfatasa 2A
PPAR: Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
PR: Receptor de progesterona
PTEN: Homólogo de tensina
Rap1: Ras-proximal 1
RDA: Receptores dopaminérgicos

RDA1: Receptor dopaminérgico 1
RDA2: Receptor dopaminérgico 2
RDA3: Receptor dopaminérgico 3
RDA4: Receptor dopaminérgico 4
RDA5: Receptor dopaminérgico 5
SCF: Factor de células madres
SMG: Ganglio mesentérico superior
SNC: Sistema nervioso central
SOD: Superóxido dismutasa
StAR: Proteína aguda esteroideogénica
TGF: Factor de crecimiento transformante
TH: Tirosina hidroxilasa
TNF: Factor de necrosis tumoral
TrkA: Receptor de tirosina cinasa
TRPV1: Receptor de potencial transitorio V1
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
VIP: Péptido intestinal vasoactivo
VMAT2: Transportador vesicular de monoaminas 2

RESUMEN

El estrés oxidativo está relacionado con más de 100 enfermedades, entre las cuales se encuentran patologías reproductivas como la endometriosis, el síndrome de ovario poliquístico e incluso en la infertilidad. Se ha demostrado en células de la granulosa, que la dopamina es capaz de incrementar la concentración de especies reactivas de oxígeno. Por otra parte, se ha utilizado a la hemicastración o hemiovariectomía como una técnica que permite analizar asimetrías funcionales y fisiológicas entre los ovarios. En dicho modelo se ha estudiado que la administración local de una dosis de sulpiride, antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos tipo 2 (RDA2) retrasa 24 horas la presencia del estro vaginal y disminuye la ovulación compensadora solo en el ovario derecho *in situ* respecto al izquierdo. Con el fin de aclarar los efectos del bloqueo farmacológico de los RDA en el ovario, se analizó el efecto de la microinyección de sulpiride o SCH23390 (antagonista del RDA tipo 1: RDA1), en la gónada que permanece *in situ* en el modelo del animal hemiovariectomizado, sobre el desarrollo de la ovulación compensadora, la presencia del RDA1, del RDA2 y la proteína DARPP-32, así como su efecto en la generación de especies reactivas de oxígeno a través de indicadores de estrés oxidativo. Ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV cíclicas, fueron hemiovariectomizadas a las 09:00 h de la mañana del estro, recibieron una microinyección de sulpiride o SCH23390 dentro de la bursa del ovario *in situ* a las 13:00 h en el día del diestro-1. Los animales se sacrificaron cada 24 horas hasta la presencia del estro vaginal. Como grupos testigo se utilizaron animales hemicastrados con administración de vehículo (ácido ascórbico o solución salina) y como grupo control animales hemicastrados sin microinyección.

Otros grupos de animales hemicastrados o enteros (sin hemiovariectomía) fueron microinyectados con sulpiride o SCH23390 y se sacrificaron cada cuatro horas después de la microinyección. El homogeneizado de los ovarios fue utilizado para cuantificar indicadores de lipoperoxidación: malonilaldehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA), así como la producción de nitritos.

Los resultados del presente estudio muestran que ambos antagonistas retrasaron la presencia del estro vaginal mientras que el antagonista del RDA2 redujo la ovulación compensadora sólo del ovario derecho *in situ*. Se mostró que el RDA2 se expresa asimétricamente en el tejido ovárico en los días del estro y del diestro-1, mientras que el receptor RDA1 y la proteína DARPP-32 fue detectada en los cuatro días del ciclo estral, con menor expresión el día del diestro-2 y proestro. El bloqueo farmacológico del RDA2 incrementa la activación de la proteína DARPP-32 en el animal hemicastrado y se observó un aumento a las 48 horas después de la microinyección. Así también, cuando se antagoniza el sistema dopaminérgico ovárico con sulpiride o SCH23390 en el animal entero, se incrementa la lipoperoxidación cuatro y doce horas después de la microinyección respectivamente, este efecto se mantuvo hasta por dieciséis horas. En este mismo modelo, se observó un aumento en la concentración de nitritos cuando se administró el sulpiride a las cuatro horas, en tanto que para el SCH23390 doce horas después. Sin embargo, en el animal hemicastrado ocurrió un incremento de la lipoperoxidación cuatro horas después sólo cuando el ovario derecho permanece *in situ*.

Los resultados del presente estudio nos permiten inferir que bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos, aumenta el metabolismo de la dopamina que tiene como consecuencia el incremento del estrés oxidativo que deriva en daño a nivel de membranas celulares incrementando la lipoperoxidación, como resultado la alteración de las células productoras de hormonas esteroides sexuales en el ovario, además de que la ausencia de la unión de dopamina a su receptor interfiriere en la vía de señalización mediada por la DARPP-32.

MARCO TEÓRICO

Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

El hipotálamo y la hipófisis guardan relaciones anatómicas y funcionales estrechas, a su vez, estas estructuras regulan la función de diversas glándulas endocrinas, como la tiroides, las glándulas adrenales y las gónadas. La hipófisis se compone de dos áreas principales: el lóbulo anterior o adenohipófisis, que deriva embriológicamente de una invaginación ascendente de la cavidad bucal: la bolsa de Rathke, y el lóbulo posterior o neurohipófisis, que procede de una invaginación descendente del piso del tercer ventrículo. La hipófisis se comunica con el hipotálamo a través del tallo hipotalámico o hipofisario (Guyton y Hall, 2012).

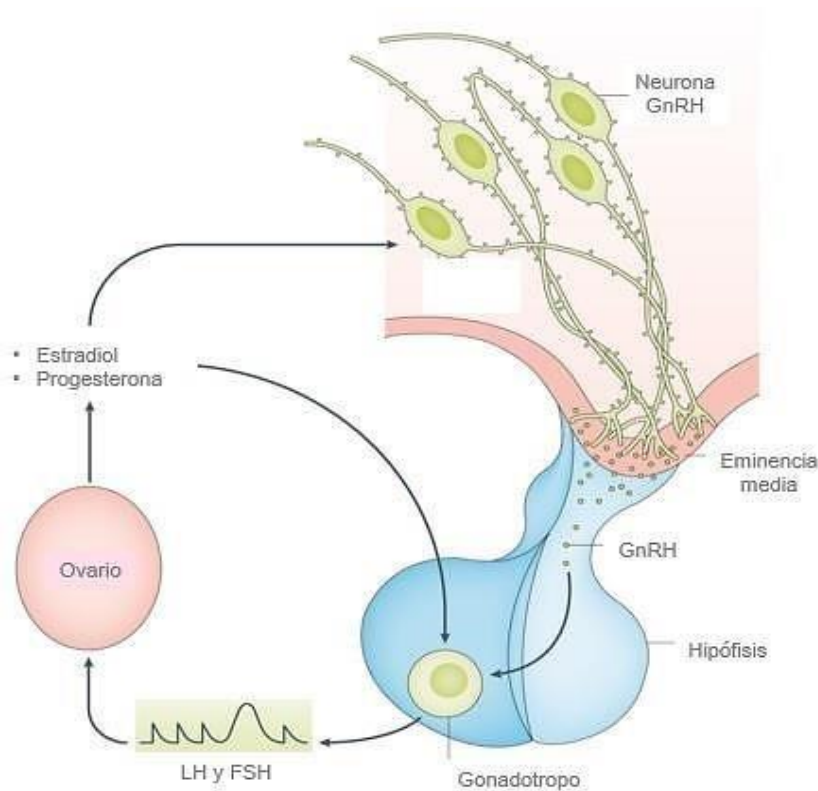


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. De manera general, la GnRH viaja por el sistema porta hipotalámico hipofisario hasta la adenohipófisis, en respuesta, se secreta FSH y LH, ambas hormonas llegan al ovario donde se unen a sus receptores en los tejidos funcionales de la gónada (Tomado y modificado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

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido hipotalámico que regula la secreción de las hormonas hipofisarias, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo

estimulante (FSH). La GnRH se libera de forma pulsátil hacia al sistema circulatorio portal hipotálamo-hipofisario para luego ser transportada a la hipófisis anterior (Neil et al, 2001; Gründker et al, 2002). Las hormonas gonadotrópicas hipofisarias LH, FSH, prolactina y gonadotropina coriónica humana (hCG) llevan a cabo la regulación de la función ovárica. Las dos primeras proceden de las células basófilas de la adenohipófisis y tienen una estructura glucoproteica, con dos cadenas α y β . La cadena α es común en ambas, siendo la β específica de cada una de ellas. La FSH estimula la maduración del folículo del ovario mientras que la LH provoca la ruptura del folículo durante la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Tresguerres y Castillo, 1993). Los folículos primordiales y primarios son insensibles a la acción de las gonadotropinas. Al llegar a la pubertad la FSH ejerce una acción estimulante del desarrollo folicular a la vez que produce aromatización estrogénica y síntesis de inhibina. El incremento en la secreción de FSH produce la maduración de la reserva de folículos primarios a secundarios. Los folículos que maduran producen estrógenos, principalmente estradiol. La hormona es transportada en la circulación hasta la hipófisis y el hipotálamo. Concentraciones bajas de estradiol mantienen a las células productoras de FSH y LH en un nivel de baja sensibilidad para la acción de GnRH, retroalimentación negativa. Con la maduración del folículo aumentan los niveles de estradiol séricos. Inmediatamente antes de la ovulación los niveles de estradiol son altos y aumentan la sensibilidad del receptor de GnRH en células gonadotropas de la hipófisis, retroalimentación positiva. La LH provoca el proceso de ovulación y la posterior luteinización, por lo que las células de la granulosa que antes producían estradiol ahora sintetizan principalmente progesterona. El folículo se transforma en cuerpo lúteo. El estradiol junto con la progesterona inhibe por retroalimentación negativa la producción de FSH y LH en la hipófisis (Schmidt y Thews, 1992; Tresguerres y Castillo, 1993) (Figura 1).

Morfología y función del ovario

El ovario y los testículos, así como la glándula adrenal producen y liberan hormonas esteroideas derivadas del colesterol bajo el control del eje hipotálamo- adenohipófisis. Las principales funciones de las gónadas en los adultos son la producción tanto de hormonas esteroideas como de células sexuales maduras: los gametos. Las hormonas esteroideas son

esenciales en la diferenciación sexual, el desarrollo fetal, el crecimiento y la maduración sexual. (Nussey y Whitehead, 2001).

El ovario de los mamíferos es un órgano par ubicado en la cavidad peritoneal que se encuentra a cada lado del útero, está ligado por el mesovarium al ligamento superior ancho desde el útero hasta la pared de la cavidad pélvica (Gougeon, 2004). Constituye la unidad estructural y funcional del sistema reproductor femenino, cuyas funciones son reguladas por las gonadotropinas hipofisarias FSH y LH, las cuales están coordinadas con las propias secreciones del ovario (Chedrese, 2003).

Cuando el ovario maduro es analizado en una sección media sagital, se diferencian claramente dos zonas: una externa, denominada corteza y una interna, la médula. La superficie ovárica se encuentra recubierta por una sola capa de células cúbicas que recibe el nombre de epitelio germinal, que a su vez se encuentra invaginada por una cubierta de tejido conectivo colagenoso denominado túnica albugínea (Espey y Richards, 2006). Los folículos en reposo están ubicados en la corteza ovárica, en una capa avascular que se encuentra debajo de la túnica albugínea. Por el contrario, folículos en crecimiento (sanos o atrésicos) y los cuerpos lúteos (frescos o viejos) se encuentran al borde de la médula cortical, abundante en vascularización. Los folículos están rodeados por un entorno complejo y dinámico de células estromales, vasos sanguíneos y ramas del sistema nervioso autónomo. La médula ovárica contiene una compleja red de tejido conectivo denso que envuelve a las células del estroma, vasos sanguíneos y linfáticos (Gougeon, 2004) (Figura 2).

En el estroma ovárico se encuentran cuatro clases principales de células intersticiales que por sus características y posición en el ovario se clasifican en primarias, tecales, secundarias e hiliares. Las células intersticiales primarias comienzan a aparecer en el ovario fetal y desaparecen más tarde. Las células intersticiales tecales son las más importantes del ovario y proceden del estroma; migran hacia la membrana basal del folículo donde se disponen en bandas para formar, después de su diferenciación, cuando adquieren receptores a LH, a las tecas interna y externa (Erickson, 1995). La migración hacia la membrana basal tiene lugar cuando el ovocito está madurando y el folículo contiene 2 o 3 capas de células de la granulosa (Grenwald y Roy, 1994). Cuando los folículos no ovulan y entran en atresia, las células intersticiales tecales se transforman

en células intersticiales secundarias formando grupos de células glandulares esparcidas en el estroma. Conjuntamente estas células conforman la llamada glándula intersticial (Ham y Cormack, 1983). Finalmente, las células intersticiales hiliares se localizan en el hilio y son muy similares a las células de Leydig del testículo (Erickson, 1995).

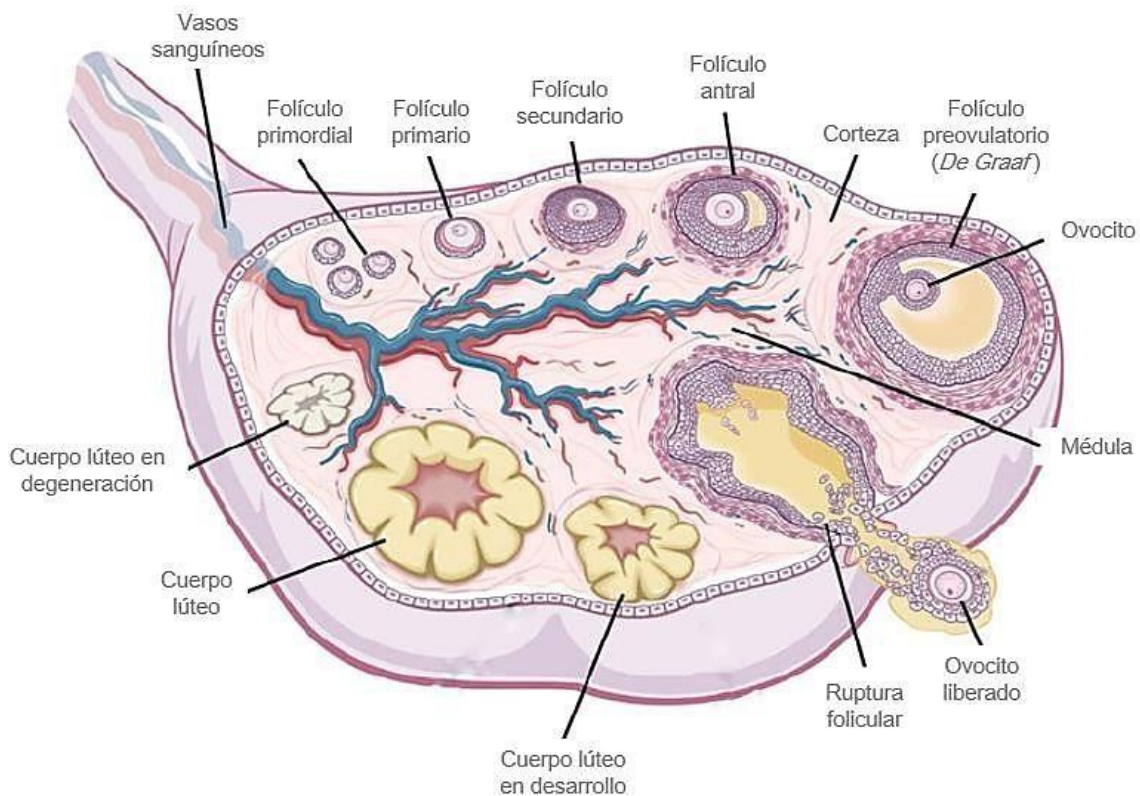


Figura 2. Representación de la estructura del ovario y sus principales componentes anatómico-funcionales. El ovario se diferencia en dos zonas: Médula y corteza. En la médula se observa la inervación y vascularización que recibe el ovario, mientras que en la corteza se encuentran folículos en diferentes etapas del desarrollo. A partir de un folículo primordial, el folículo pasa por diversas etapas de desarrollo antes de ser expulsado durante la ovulación: primario, secundario, antral y preovulatorio. Posterior a la ovulación, las células de la granulosa y teca interna restantes se convertirán en el cuerpo lúteo (Tomado y modificado de Desai et al, 2014).

La principal característica de la capacidad reproductiva de las hembras es su actividad cíclica, la cual se ve fuertemente reflejada en el crecimiento y desarrollo de los folículos, los cuales son la unidad funcional del ovario. Normalmente los ovarios humanos producen un folículo dominante que produce una sola ovulación durante cada ciclo menstrual; sin embargo, en animales poliovulantes hay más de un folículo dominante en cada ciclo. Los folículos dominantes

son los responsables de la producción de estradiol durante la fase folicular del ciclo. Después de la ovulación, los folículos dominantes degeneran y se transforman en cuerpos lúteos, los cuales secretan concentraciones altas de progesterona durante la fase lútea de cada ciclo (Williams y Erickson, 2012).

El folículo está conformado por un ovocito, que se encuentra rodeado a lo largo de su desarrollo por células de la granulosa, incluyendo aquellas que conformarán su corona radiada, el *cumulus ooforo*, un antro folicular, células de la teca interna, tejido conectivo y células de la teca externa (Espey y Richards, 2006). El cuerpo lúteo es una glándula endocrina transitoria formada por células foliculares que permanecen después de la ovulación. Es el resultado de una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células de la teca interna y la capa granulosa del folículo preovulatorio. Su formación se encuentra asociada al incremento sérico de LH (Xuejing et al., 2013).

Desarrollo folicular

La foliculogénesis inicia con el reclutamiento de folículos primordiales de la reserva folicular en crecimiento y culmina con la ovulación o la muerte por atresia. Este proceso puede dividirse en dos fases. La primera fase, denominada preantral o independiente de gonadotropinas, se caracteriza por el crecimiento y diferenciación del ovocito. La segunda, llamada también fase antral o dependiente de gonadotropinas, es caracterizada por un incremento del tamaño del folículo (Williams y Erickson, 2012) (Figura 3).

Los ovocitos se desarrollan desde las células germinales primordiales (CGP), las cuales migran en el desarrollo temprano de la gónada para convertirse en ovogonia. La foliculogénesis comienza con el reclutamiento de células pregranulosas en el ovocito para formar el folículo primordial en el ovario fetal o neonatal. En esta etapa, el ovocito se detiene en Profase I de la meiosis (Picton et al, 1998).

Las proteínas del ovocito y de las células de la granulosa son fundamentales para la supervivencia y el reclutamiento del folículo primordial. Las proteínas específicas del ovocito incluyen a los factores de transcripción de hélice bucle hélice básica, específicos de la espermatogénesis y ovogénesis (Sohlh1 y Sohlh2), así como el factor de la línea germinal (FIGLA) que también tiene un dominio hélice bucle hélice, los cuales pueden promover la supervivencia y

activación del folículo primordial mediante la regulación de la expresión de genes críticos río debajo de la secuencia de ADN (Pangas et al, 2006; Toyoda et al, 2009). Similarmente, los factores de transcripción homeóticos LHX8 y NOBOX controlan la expresión de varios genes del ovocito que regulan el desarrollo folicular, incluido el factor de crecimiento transformante (TGF) miembro de la familia del factor I factor de crecimiento diferencial 9 (GDF-9) y la proteína morfogénica ósea 15 (BMP-15). Las proteínas GDF-9 y BMP-15 derivadas del ovocito, promueven la proliferación de células de la granulosa en la etapa del folículo primario. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) son factores secretados por ovocitos que regulan positivamente la activación del folículo y aumentan la expresión del factor de células madre (SCF) en células de la granulosa. Por otro lado, El SCF derivado de células granulosas interactúa con el receptor c-kit tirosina quinasa en el ovocito para promover su crecimiento y se requiere para la activación del folículo primordial. Existe evidencia que señala que la activación de la señalización mediada por SCF a través del receptor c-kit de ovocitos, conduce a la inactivación de FOXO3a a medida que se produce la activación del folículo (Yoshida et al, 1997; Parrot y Skinner, 1999) (Figura 3).

El folículo primario se caracteriza por la presencia de una o más células granulosas cuboidales que están restringidas a una lámina que rodea al ovocito. Los eventos más importantes en el desarrollo de los folículos primarios incluyen la expresión del receptor de FSH, el crecimiento y la diferenciación del ovocito (Williams y Erickson, 2012). Las células de la granulosa comienzan a expresar a los receptores de FSH en la etapa del folículo primario. Entre los factores que provocan la expresión del receptor de FSH se incluyen la misma FSH, la activina, el adenosín monofosfato cíclico (AMP) cíclico y TGF (Findlay y Drummond, 1999).

A medida que la foliculogénesis preantral continúa, la estructura del folículo comienza a cambiar. Los principales cambios que se producen durante el desarrollo del folículo secundario incluyen la acumulación de un mayor número de células de la granulosa que forman múltiples capas alrededor del ovocito y la adquisición de una capa de células de la teca. El desarrollo de un folículo primario a uno secundario completamente desarrollado es el resultado de un proceso regulatorio activo autocrino / paracrino que involucra factores de crecimiento producidos por el propio ovocito, como GDF-9 y BMP-15 (Williams y Erickson, 2012) (Figura 3).

La formación del antro anuncia las fases finales de la foliculogénesis y la transición de la regulación intraovárica a la extraovárica. En las mujeres, el eje hipotálamo-hipófisis-gónada coordina la maduración del folículo, el comportamiento sexual y la preparación fisiológica para el embarazo. Antes de la maduración del eje, se reclutan folículos para desarrollar folículos primordiales, pero no se pueden formar folículos antrales sin el estímulo de las gonadotropinas (Knobil y Neill, 2006). En el folículo antral, las células de la granulosa y el ovocito se distribuyen como una masa de células con una forma precisa. Esta organización espacial da lugar a distintos subtipos de células de la granulosa: las de membrana, del área periantral y las del *cumulus oophorus*. Todas las células de la granulosa expresan receptores de FSH durante el desarrollo del folículo antral; sin embargo, cada grupo de células de la granulosa está influyen por su posición para expresar un estado diferenciado específico en respuesta a la estimulación con FSH. Por ejemplo, las células de la membrana granulosa expresan la aromatasa P450 (P450AROM) y el receptor LH, mientras que las células periantrales y del *cumulus* no (Erickson y Shimasaki, 2000).

En mujeres con ciclos normales, el folículo dominante se selecciona al final de la fase lútea del ciclo menstrual (Gougeon, 1996). La tasa de mitosis en las células de la granulosa parece aumentar bruscamente (~ 2 veces) después de la fase lútea media, lo que sugiere que la luteólisis contribuye de alguna manera a un aumento de la mitosis en las células de la granulosa en el conjunto de pequeños folículos antrales. La primera señal para que se lleve a cabo la selección del folículo dominante, es que las células de la granulosa continúan dividiéndose a un ritmo relativamente rápido mientras que la proliferación se ralentiza en los otros folículos, la tasa mitótica de las células de la granulosa y la teca se mantiene alta a través del resto del desarrollo del folículo antral (Williams y Erickson, 2012).

El mecanismo subyacente de selección implica el aumento de FSH en plasma, durante el ciclo menstrual, el aumento de la FSH comienza unos días antes de que la progesterona plasmática caiga a niveles basales al final de la fase lútea. Los niveles de FSH permanecen elevados durante la primera semana de la fase folicular del ciclo. Los niveles incrementados y sostenidos de FSH circulante son necesarios para la selección y la fertilidad femenina. La disminución de la producción de estradiol e inhibina A por el cuerpo lúteo son las principales causas del aumento secundario de la FSH y la selección dominante del folículo del ovocito (Williams y Erickson, 2012).

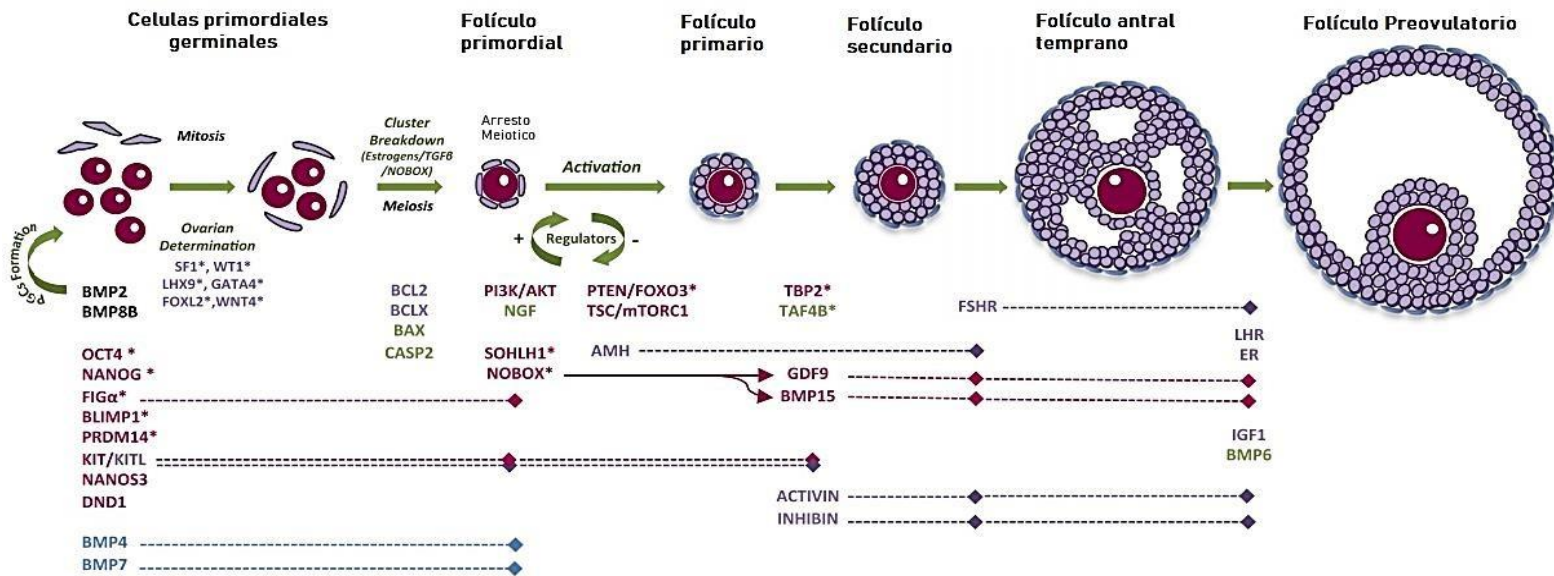


Figura 2. Figura representativa de los factores implicados en la formación de células germinales primordiales (PGC y el desarrollo folicular. Los factores ováricos producidos por las células de la teca / células estromales (en azul), células somáticas / granulosa (en morado), células germinales (en rojo) y granulosa (verde) participan y regulan el desarrollo de ovocitos y folículos en cada uno de las etapas definidas a lo largo del desarrollo folicular. Los factores de transcripción involucrados se indican con una estrella (*). Las proteínas del ectodermo embrionario adicional que participan en la formación de PGC están indicadas en negro (Tomado y modificado Sánchez y Smitz, 2012)

En los mamíferos, el 99.9% de los folículos (ovocitos) mueren por atresia. Una propiedad fundamental de la atresia es la activación de la apoptosis en las células del ovocito y la granulosa. La apoptosis es un proceso complejo que implica vías de señalización acopladas a la muerte celular programada (Danial y Korsmeyer, 2004). Este evento fisiológico puede iniciarse por señales externas (vía extrínseca) mediante la unión del ligando al "receptor de muerte" de la superficie celular para la señalización, tal como es inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) o el ligando Fas. Las vías de muerte celular intrínseca (intracelular) están mediadas por alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial que causan la liberación de factores proapoptóticos en el citoplasma, y típicamente están controladas por proteínas de la familia B / linfoma-2 (Bcl-2). Ambas vías generan la activación de caspasas, una familia de cisteinil aspartato proteasas específicas de aspartato de cisteína, como los mediadores finales de la muerte celular programada (Williams y Erickson, 2012).

Ovulación

La ovulación es un proceso dinámico que conlleva cambios en la integridad de la superficie del folículo, que inicia con un incremento de LH, que posteriormente implica cascadas de varias vías, así como la interacción de distintos tipos de células y compartimentos celulares (Douglas et al, 2010). El proceso de ovulación requiere las acciones colectivas del sistema endocrino, las señales inmunes y los factores paracrinos intraováricos. Los distintos compartimentos celulares en el folículo preovulatorio (el ovocito, las células de la granulosa y las células de la teca) tienen diferentes respuestas, pero están coordinadas a las señales hormonales y otras señales que controlan la ovulación (Williams y Erickson, 2012).

Durante el desarrollo del folículo antral, la supresión de la expresión del receptor de LH en células granulosas del *cumulus* da como resultado un incremento en la expresión de los receptores de LH en las células murales de la granulosa. Lo que indica que estas células sirven como el compartimento del folículo responsable en gran medida de la transducción de la señal de la LH ovulatoria. La LH activa la vía de señalización de la proteína Gs / AMPc / Proteína cinasa A (PKA) para inducir respuestas transcripcionales, así como activar otras vías de señalización que incluyen la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). En respuesta a la oleada de LH, estas vías de señalización inducen de manera

rápida cambios en el perfil de expresión de genes de las células murales de la granulosa. En particular, se generan los factores de transcripción como la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), Sp1 y Sp3, y la transcripción directa de reguladores transcripcionales adicionales que incluyen el receptor de progesterona, proteína de respuesta de crecimiento temprano-1 (EGR-1) y la proteína de unión a la secuencia CAAT (C / EBP) (Russell y Robker, 2007). El receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR), miembro de la superfamilia de receptores nucleares regulado por el receptor de progesterona, se transcribe activamente en estas mismas células después del aumento de LH. (Kim et al, 2008).

Las células del *cumulus* reciben el estímulo ovulatorio de la LH indirectamente a través de factores difusibles como los ligandos de tipo EGF provenientes de las células murales de la granulosa. La FSH se une a sus receptores localizados en las células del *cumulus* acopladas a las rutas de señalización de AMPc / PKA y del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) que al parecer facilitan la expresión de genes relacionados a la ovulación.

Las prostaglandinas también son mediadores que participan activamente en la ovulación, por ejemplo, la prostaglandina E2 (PGE2) se genera rápidamente en las células del *cumulus* a través de la inducción de la expresión del gen de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Posteriormente la PGE2 luego actúa de manera autocrina estimulando a su receptor el cual activará a la vía Gs / adenilato ciclasa (AC)/ AMPc (Ben-Ami et al, 2006).

La Interleucina-1 (IL-1) es secretada, probablemente por leucocitos localizados dentro del compartimento de la teca en donde actuará de forma paracrina induciendo a las células del *cumulus* a sintetizar los componentes de su matriz extracelular. El ovocito es responsable de secretar los factores de crecimiento de la familia del TGF, como a GDF-9 y BMP-15, las cuales producen la diferenciación del fenotipo de las células del *cumulus* (Eppig et al, 2002). Por otro lado, la participación del sistema endocrino y de varios compartimentos foliculares da como resultado la elaboración de una matriz extracelular única entre las células del *cumulus* en un proceso llamado "mucificación" o "expansión del cumulus" el cual es crítico para que se produzca la ovulación (Williams y Erickson, 2012) (Figura 2).

Después de un estado de reposo prolongado, en el folículo preovulatorio, el ovocito reanuda la meiosis durante la secuencia de ovulación. El núcleo del ovocito, conocido como

"vesícula germinal", sufre una serie de cambios que implican la emisión del primer cuerpo polar y la progresión de la meiosis a la segunda metafase meiótica. La meiosis se detiene en esta etapa y no continúa más allá, a menos que el óvulo sea fecundado. La maduración meiótica es un evento vital en la ovulación porque es obligatorio para la fertilización (Williams y Erickson, 2012).

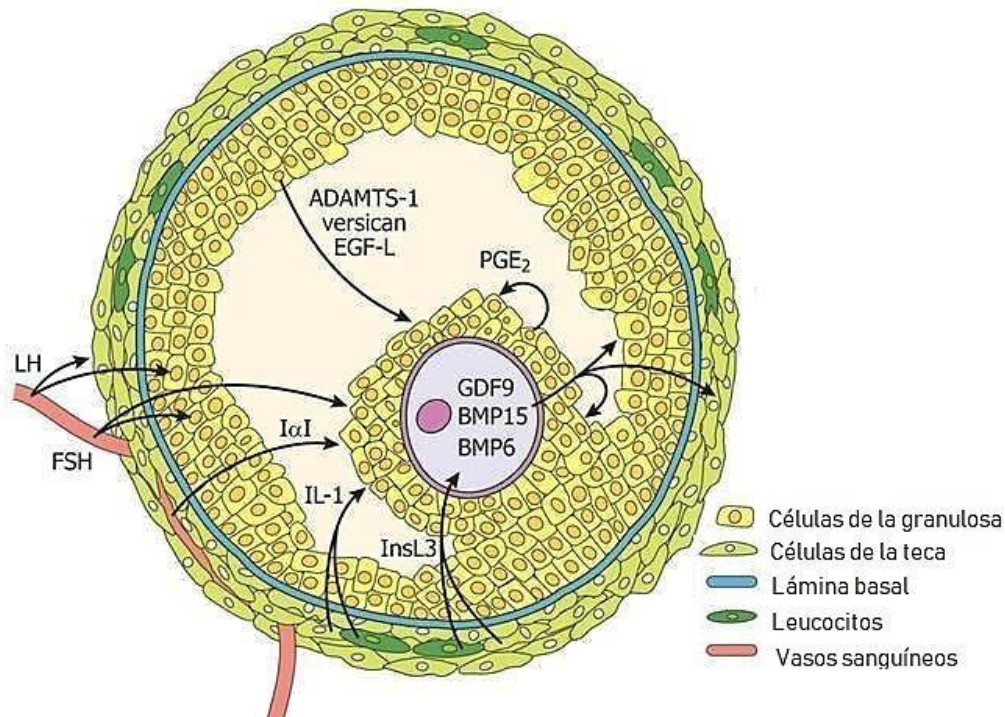


Figura 4. Vías de señalización y mediadores de la ovulación. Las oleadas ovulatorias de FSH y LH estimulan a las células de múltiples folículos. La señalización de LH es transducida por las células de la teca, mientras que la señalización de la FSH es transducida por la granulosa. Las células de la teca (o leucocitos dentro de la capa de teca) secretan IL-1, una citocina que estimula la expansión de células del cumulus, e InsL3, un péptido que puede desencadenar una reducción en los niveles de AMPc en los ovocitos. Las células de la granulosa secretan ligandos de tipo EGF, factores de crecimiento que transducen la respuesta ovulatoria a las células del cumulus. Además, secretan versican y ADAMTS-1, que se convierten en componentes de la matriz extracelular de las células del cumulus. El inhibidor de la tripsina del torrente sanguíneo se reubica para formar parte de la matriz celular del cumulus. La PGE2 generada por las células del cumulus actúa de manera autocrina para promover la producción de AMPc. Los morfógenos de los ovocitos, incluidos GDF-9, BMP-15 y BMP-6, junto con otras moléculas de señalización múltiple generadas tanto dentro como fuera del folículo, modulan las células del cumulus, las células de la granulosa y las respuestas de las células de la teca a las señales ovulatorias. Interleucina-1 (IL-1); péptido similar a la insulina 3 (InsL3), ligandos de tipo EGF II (Egf-L ()), inhibidor de tripsina, prostaglandina E2; (PGE2) (Tomado y modificado de Williams y Erickson, 2012).

El cambio más dramático durante la ovulación se relaciona con la formación de un orificio en la superficie del ovario, conocido como mácula pelúcida o estigma, a través del cual el óvulo y las células del *cúmulus* salen del folículo. La formación del estigma implica una combinación de

apoptosis celular, migración celular y digestión proteolítica de las capas de la matriz extracelular. La LH está directamente involucrada en la formación del estigma. En respuesta al aumento de LH, el folículo preovulatorio produce progesterona y prostaglandina (Russell y Robker, 2007). Las señales adicionales relacionadas con la remodelación de las células de teca están mediadas por el factor de crecimiento nervioso (NGF) y al receptor de tirosina cinasa (TrkA). La expresión de NGF y TrkA se inducen en células de la teca en respuesta al pico de LH. Las interacciones NGF / TrkA conducen a una pérdida de comunicación intercelular al alterar las uniones gap entre las células de la teca que dan como resultado un mayor comportamiento migratorio (Disen et al, 1996).

La ovulación implica la liberación del ovocito provocando que la proteasa metalopeptidasa con motivos trombospondina tipo 1 (ADAMTS-1) sea sintetizada en células murales de la granulosa, para ser secretada y localizada dentro del complejo de células del *cumulus*, en donde funciona para separar las proteínas de la matriz extracelular (Russel et al, 2003).

Además de la remodelación estructural, la capa de la teca sufre alteraciones rápidas en el suministro vascular en respuesta a la señal de LH ovulatoria. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus vías de señalización en el interior de la célula, son necesarios para la angiogénesis folicular durante el crecimiento del folículo antral, además en los primates existe evidencia que la remodelación vascular mediada por VEGF es importante para la ruptura del folículo. El VEGF promueve la permeabilidad vascular, lo que permite una entrega más eficiente de factores transmitidos por la sangre, incluida la LH y la FSH, y las células inmunes al folículo. De hecho, los niveles elevados de VEGF, con el consiguiente aumento en la permeabilidad vascular, se han relacionado con el síndrome de hiperestimulación ovárica iatrogénica (Levin et al, 1998). Las células inmunes, que incluyen macrófagos y leucocitos, llegan a la capa de la teca por la vasculatura y liberan citocinas, proteasas y radicales libres que promueven la remodelación adicional de la pared del folículo. Estas vías de señalización convergen para generar una cascada de eventos proteolíticos y de remodelación que conducen a la degradación controlada de la matriz estromal ovárica que recubre el folículo y la subsiguiente formación de estigma y la liberación del complejo ovocito-*cumulus* maduro (Williams y Erickson, 2012).

El cuerpo lúteo se desarrolla a partir de las células de la pared del folículo ovulatorio, su formación se produce antes de la ovulación, pero se hace más notoria después de la ruptura del folículo y se prolonga durante un número de días específico para cada especie hasta que el cuerpo lúteo está completamente formado (Espey y Lipner, 1994). La luteinización es un evento que envuelve la proliferación, diferenciación celular y la remodelación tisular. Se compone de dos importantes procesos: la hipertrofia y diferenciación de las células esteroideogénicas de los folículos a células luteales y el rápido desarrollo de vasos sanguíneos (angiogénesis) (Espey y Lipner, 1994). Este fenómeno inicia a través de cambios bioquímicos y morfológicos que se llevan a cabo en las células de la teca interna y en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios. El incremento en los niveles séricos de LH desarrolla el proceso de luteinización.

Las células del cuerpo lúteo se originan de dos tipos diferentes de células secretoras de esteroides provenientes del folículo ovulatorio, las células de la granulosa y las células de la teca. Así, el cuerpo lúteo se compone de dos tipos de células luteales: células granuloso- luteínicas y células teca- luteínicas (Espey y Lipner, 1994; XueJing et al, 2013).

Si la implantación no ocurre, el cuerpo lúteo se degenera por un proceso llamado luteólisis. La muerte del cuerpo lúteo humano es histológicamente aparente 8 días después de la ovulación. El primer signo es la contracción de las células de la granulosa-luteínicas. Por el contrario, las células de la teca-luteínicas aparecen hiperestimuladas selectivamente durante la luteólisis temprana. Finalmente, la luteólisis destruye todas las células del cuerpo lúteo. Histológicamente, todo lo que queda es un nódulo de tejido conectivo denso llamado *corpus albicans* (Williams y Erickson, 2012).

Ciclo Estral

El ciclo estral de la rata dura de 4 a 5 días, la ovulación se produce espontáneamente. Las fases del ciclo son proestro, estro (al final del cual ocurre la ovulación), diestro-1 y diestro-2 (Gorbman et al., 1983; Hebel y Stromberg, 1986; Martin, 1979) (Tabla 1).

Los días del ciclo estral se diferencia por cambios en la citología vaginal que se repite de manera cíclica durante la vida fértil de la rata hembra y son fiel reflejo de los cambios hormonales que ocurren en cada ciclo estral (Tabla 1). Es importante señalar que la influencia del fotoperiodo

es fundamental para que se presenten ciclos regulares de cuatro o de cinco días de duración (Figura 5). La presencia de un ciclo estral de mayor duración es relativamente anormal y reflejaría cambios importantes en el patrón de secreción de hormonas a consecuencia de diversos factores (Montes y Luque, 1988).

Durante el Diestro-1 o metaestro, la presencia dominante de leucocitos es la característica más evidente de esta etapa de recuperación post-ovulación. Los leucocitos son pequeños y con un citoplasma granuloso, pueden o no ir acompañados de una pequeña cantidad de células epiteliales nucleadas y algunas células basófilas (Westwood, 2008). En la etapa correspondiente al Diestro-2 se mantiene la presencia de leucocitos. En el ovario, los cuerpos lúteos recién formados de la ovulación anterior han alcanzado su tamaño máximo, siendo éste el mejor marcador ovárico para establecer esta etapa (Goldman et al, 2007). Posteriormente, durante el Proestro, se observa una gran cantidad de células epiteliales visiblemente nucleadas y distintivamente redondas las cuales pueden o no aparecen agrupadas, ocasionalmente también se puede observar una pequeña cantidad de células epiteliales escamosas cornificadas. El día siguiente al Proestro ocurre el Estro, esta etapa se caracteriza por la presencia de células epiteliales escamosas cornificadas, generalmente se observan agrupadas, sin un núcleo observable y con una forma irregular, el citoplasma es altamente granular (Hubscher, 2005) (Tabla 1).

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

El ciclo ovárico está bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El crecimiento folicular ocurre por la estimulación de FSH, los folículos ováricos a su vez secretan estrógenos que tiene un efecto de retroalimentación positiva sobre la secreción de LH por la adenohipófisis, observándose LH al final del Proestro, disparando así la ovulación. Los estrógenos también

estimulan el epitelio vaginal y la queratinización del mismo. En el útero inducen hiperemia y acumulación de fluido. Tras el estro, los folículos que han liberado óvulos se transforman en cuerpos lúteos durante la fase del diestro. El cuerpo lúteo secreta progesterona y en menor grado estrógenos. La progesterona induce la mucificación del epitelio vaginal. Durante el diestro-1, en el útero se inicia la degeneración del epitelio, si no ha habido fertilización del ovulo. Al final de la fase del diestro, vuelve a comenzar la maduración de otros folículos ováricos y a regenerar los epitelios vaginal y uterino (Gorbman et al., 1983; Hebel y Stromberg, 1986; Martin, 1979).

Tabla 1. Ciclo estral. Resumen de los cambios a nivel de ovario, útero, epitelio vaginal y conducta en las distintas fases del ciclo estral de la rata. (Tomado de De la Cruz y Pasaro, 1998)

Fase	Ovario	Útero	Vagina	Conducta y Duración
Estro	Maduración de folículos. Ovulación.	Máxima distención. Inicio de degeneración del epitelio uterino.	Epitelio grueso. Capa de células cornificadas en la superficie. Frotis vaginal con abundancia en células escamosas.	Receptividad máxima. Lordosis. Copulación. 25 a 27 horas.
Diestro-1	Formación de cuerpos lúteos.	Alguna degeneración vacuolar pero también regeneración.	Descamación del epitelio cornificado. Epitelio delgado. Invasión de leucocitos. Frotis vaginal con abundancia de células escamosas y leucocitos	No hay receptividad. 6 a 8 horas.
Diestro-2	Crecimiento de cuerpos lúteos. Folículos de varios tamaños.	Regeneración del epitelio uterino.	Epitelio delgado. Regeneración del epitelio. Frotis vaginal con abundancia de leucocitos y células epiteliales	No hay receptividad. 55 a 57 horas.
Proestro	Crecimiento rápido de folículos. Degeneración de los cuerpos lúteos del ciclo previo.	Útero distendido con fluido aumentando su tamaño.	Epitelio grueso. Células epiteliales superficiales. Frotis vaginal con abundancia de células epiteliales.	Estado receptivo a la copulación hacia el final del Proestro. 12 a 14 horas.

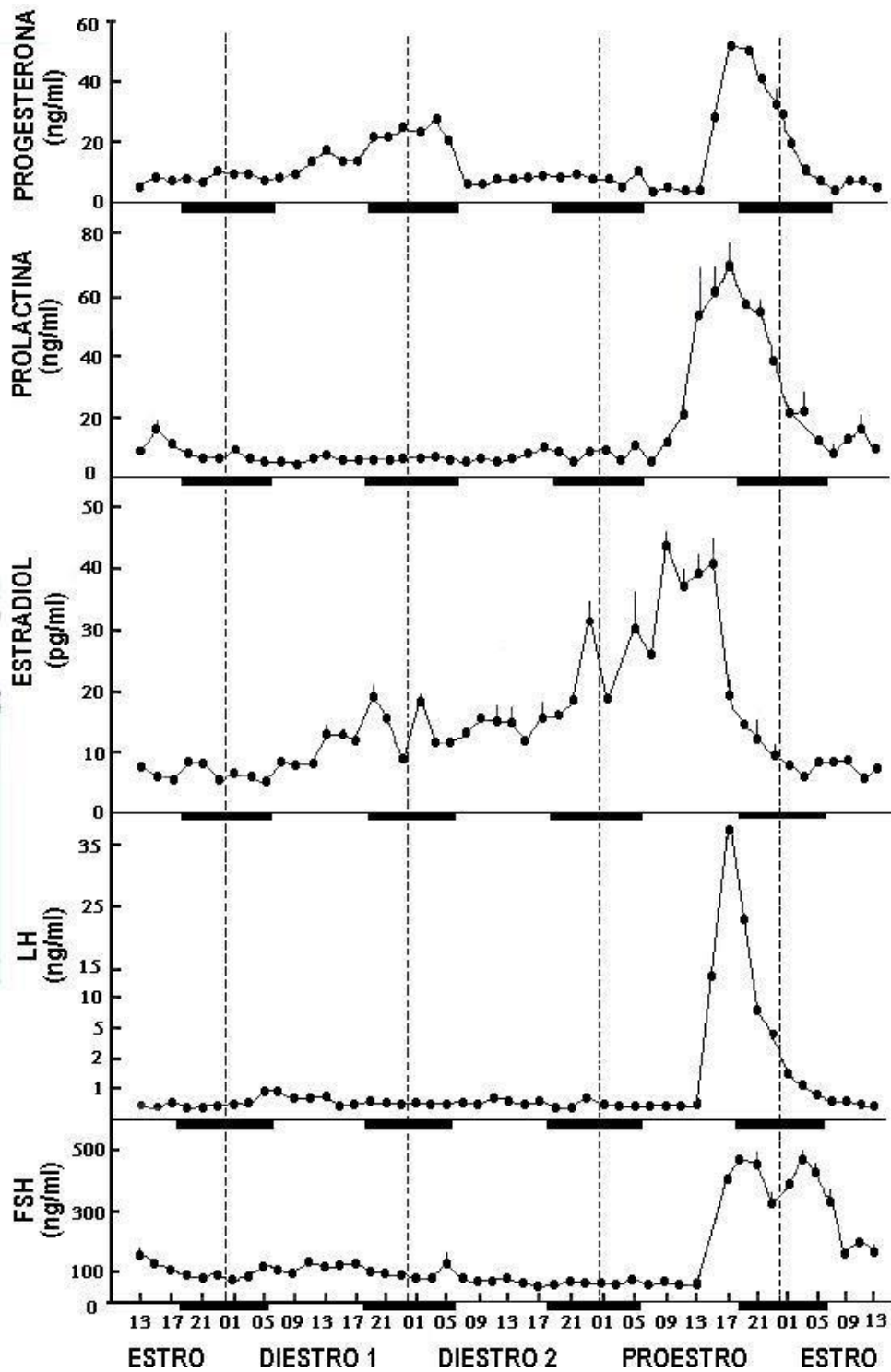


Figura 5. Perfiles de la secreción de las principales hormonas adenohipofisarias y ováricas durante el ciclo estral de 4 días en la rata adulta Estro, Diestro-1, Diestro-2 y Proestro. Se observa el pico preovulatorio de LH en el proestro seguido de un incremento de las otras hormonas. Estos son los perfiles en cada ciclo estral si no hay fecundación. (Tomado de Smith et al., 1975).

Inervación ovárica

Las funciones de los ovarios son reguladas por las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis y por el sistema nervioso autónomo (Burden, 1985; Doganay et al, 2009). El ovario es inervado por una extensa red de nervios del sistema nervioso autónomo que provienen de fibras pre- y postganglionares de tipo simpático y parasimpático. En cuyas terminales se liberan una serie de neurotransmisores al interior del ovario, algunos de los cuales se consideran reguladores de la esteroidogénesis, el desarrollo folicular temprano y la ovulación (Gougeon, 2004). Las fibras preganglionares simpáticas se originan de cuerpos celulares en la asta intermediolateral del cordón espinal en los segmentos T_{10} y T_{11} , mientras que las fibras postganglionares se originan del *plexo ovárico y celiaco* (Erickson, 1995).

La inervación simpática que recibe el ovario de la rata proviene de dos rutas: nervio del plexo ovárico (NPO) que acompaña a la arteria ovárica y el nervio ovárico superior (NOS) que viaja junto con el ligamento suspensorio e inerva vasos sanguíneos, células de la glándula intersticial y células de la teca interna (Gerenday y Halasz, 1997). Mientras que la inervación parasimpática proviene del nervio vago, el cual contiene pépticos como la somatostatina, sustancia P, gastrina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Ojeda et al., 1983; Dissen y Ojeda, 1999). Las neuronas que dan origen al nervio se localizan en el núcleo ambiguo; el núcleo cardio-neumo-entérico; el núcleo dorsal del vago y la parte inferior del núcleo del fascículo solitario (Bouchet y Willeret, 1978).

El NPO es un nervio bilateral y tiene una longitud de 2.5 a 3 cm desde el ovario hasta el primer ganglio prevertebral. El NPO derecho e izquierdo viaja adyacente a lo largo de la arteria ovárica y se bifurca durante aproximadamente 3 mm antes de llegar al ovario, mientras que otra rama se dirige al útero. El NPO derecho tiene un origen doble, una rama surge del ganglio mesentérico superior (SMG) y la segunda del plexo mesentérico. Las fibras postganglionares del NPO izquierdo se originan de la rama anastomótica del ganglio lumbar del tronco simpático y de la rama anastomótica del nervio esplácnico (Pastelin et al, 2017) (Figura 6).

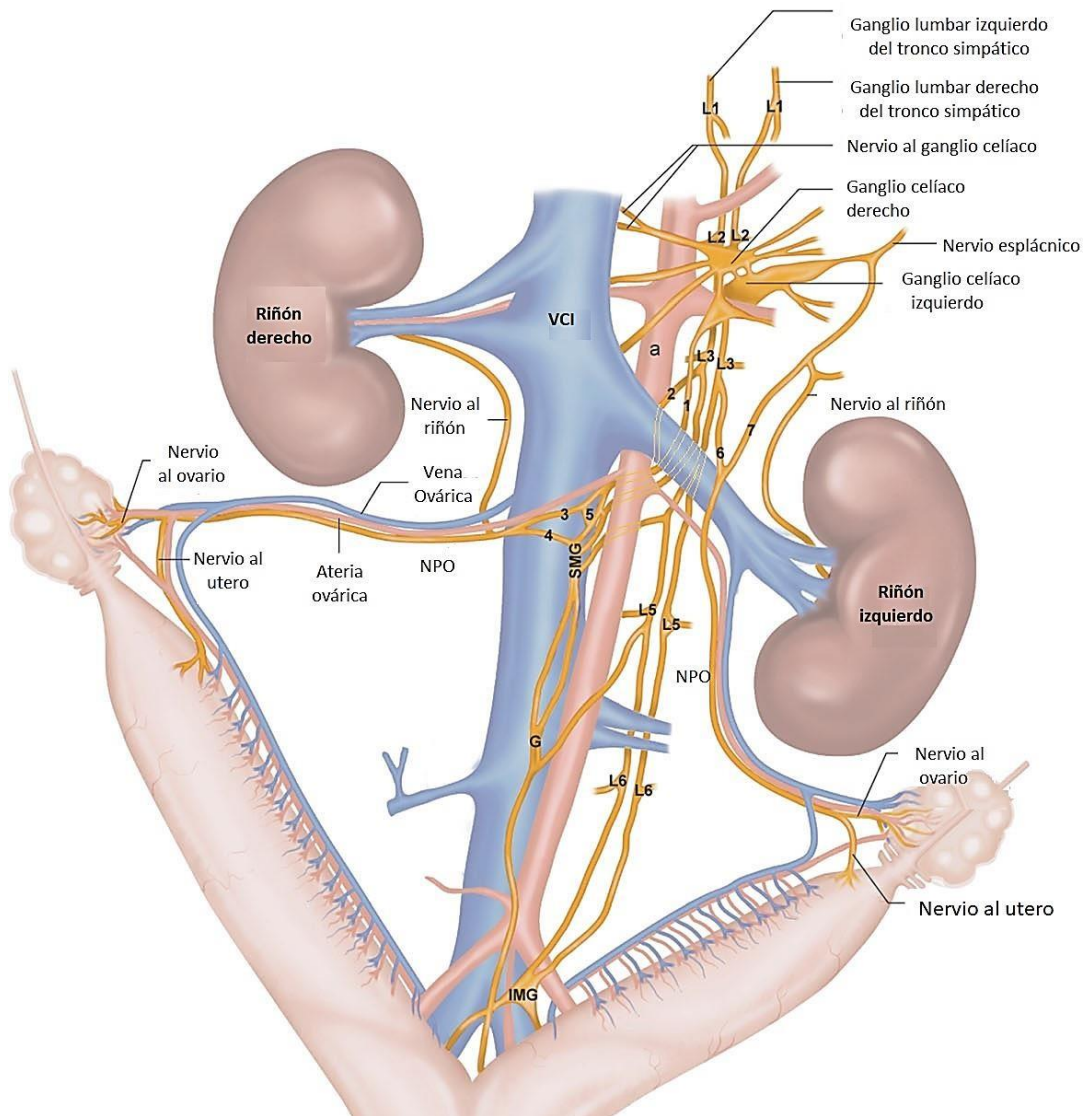


Figura 6. Esquema que muestra el origen y la distribución del nervio del plexo ovárico, así como la localización del ganglio mesentérico superior de la rata hembra. Nervio del plexo ovárico (NPO), aorta (a), vena cava inferior (VCI), ganglio mesentérico superior (SMG) ganglio mesentérico inferior (IMG), ganglio lumbar del tronco simpático. 1: rama celiaca, 2: rama lumbar, 3: rama anastomótica, 4: rama mesentérica superior, 5: plexo mesentérico, 6: rama anastomótica del ganglio lumbar del tronco simpático, 7: rama anastomótica del nervio esplácnico (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7). Modificado de Pastelin et al, 2017.

En el ovario de los primates existe una red de neuronas, varias de ellas catecolaminérgicas (Dees et al,1995). En la rata, desde el período juvenil (10 a 20 días de edad) en adelante, las neuronas están presentes en el hilio ovárico, la médula y en la corteza ovárica. El tamaño del soma neuronal aumenta durante el período prepuberal, alcanzando sus valores máximos antes de la pubertad. Las neuronas catecolaminérgicas se encuentran tanto en la corteza ovárica como

en la médula, y están aisladas o agrupadas en estructuras ganglionares. Algunas neuronas muestran inmunorreactividad al neuropéptido Y (D'Albora et al, 2002). Se han identificado cuatro tipos de ganglios en ratas postpúberes y adultas jóvenes: mesovarial, hiliar, medular y ganglionar cortical. También se encontraron neuronas aisladas dispersas en los vasos sanguíneos que llegaban a la médula del ovario y cerca de los folículos (D'Albora y Barcia, 1996). Mientras que en la cobaya se ha identificado neuronas catecolaminérgicas, positivas al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y al receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) en ovarios de cobayas neonatas y adultas, donde el número de neuronas se encuentran en mayor proporción en la edad adulta (Luna et al, 2015).

La capacidad de los neurotransmisores contenidos en los nervios ováricos para estimular la esteroidogénesis en ovarios de ratas, ha conducido a la hipótesis de que estos intervienen en el desarrollo prepuberal del ovario. Estudios semicuantitativos que evaluaron los cambios en la densidad de fibras nerviosas durante el desarrollo postnatal en ovarios de *Macaca mulatta* le han aportado credibilidad a esta hipótesis, ya que mostró un incremento significativo en la densidad de fibras nerviosas simpáticas y VIP-enérgicas entre el periodo neonatal y el tiempo esperado hasta la pubertad, aproximadamente de 3 años. No se encontraron cambios durante la etapa adulta ni tampoco en el desarrollo de la inervación sensorial (Gougeon, 2004).

Asimetría ovárica

Los ovarios de las aves tienen funciones asimétricas, ya que el ovario izquierdo es el único que ovula y secreta estradiol mientras que el ovario derecho se encuentra atrofiado. Al extirpar quirúrgicamente el ovario ovulante, el ovario remanente no se desarrolla como tal, sino que crece como un testículo y secreta testosterona (Álvarez et al, 2009).

En mamíferos poliovulantes, se han observado diferencias en la capacidad ovulatoria del ovario izquierdo y derecho. En murciélagos la asimetría es más notoria, siendo más frecuente que el ovario derecho sea el más dominante (Wimsatt, 1979). En la rata, el ovario izquierdo ovula dos ovocitos más comparado con el ovario derecho (Domínguez et al., 2003). El ovario izquierdo tiene una capacidad mayor para secretar progesterona (Barco et al, 2003; Flores et al, 2005) y testosterona en respuesta a una hemicastración (Flores et al, 2006).

En la rata hembra, la cantidad de GnRH, la cual se sintetiza en el hipotálamo es mayor en el lado derecho respecto al izquierdo del hipotálamo (Gerendai et al., 1978). La lesión del hipotálamo anterior sobre el lado derecho inhibe el desarrollo de la hipertrofia compensadora del ovario después de una hemiovariectomía (Fukuda et al., 1984). De manera similar, la lesión derecha del área preóptica del hipotálamo da como resultado la disminución del número de ovocitos liberados (Cruz et al, 1987) y un implante de atropina o de haloperidol en el hipotálamo anterior derecho bloquea por completo la ovulación (Cruz et al, 1989; Morán y Domínguez, 1995).

El uso de técnicas de rastreo transneuronal realizado a través de la inyección del virus de pseudorrabia ha permitido identificar la existencia de vías multisinápticas entre el cerebro y los ovarios de la rata. El marcaje de neuronas relacionadas con ambos ovarios fue detectado en el núcleo del tracto solitario, en el núcleo dorsal del vago, en el grupo celular A₅ noradrenérgico, en el magnus del rafe y en el núcleo paraventricular hipotalámico. Cuando la inyección se realiza en el ovario izquierdo se observa que el patrón de marcaje es diferente al observado para el ovario derecho, ya que también se logra observar el marcaje en el núcleo caudal del Rafe (Gerendai et al., 2005; Gerendai et al., 1998; Toth et al., 2007), sin embargo; Klein y Burden en 1998, no encontraron diferencias en el número de neuronas entre el lado derecho o izquierdo del ganglio celiaco superior (origen de la mayoría de las fibras postsinápticas del ovario) de ratas adultas (Klein y Burden, 1988). Por otra parte, estudios recientes indican lateralización en la innervación ya que la inyección del trazador retrógrado (True Blue) dentro del ovario derecho o izquierdo demuestra que estas conexiones se producen de manera asimétrica, mientras que el ovario izquierdo proyecta de manera ipsi- y contralateral, mientras que el ovario derecho únicamente mantiene conexiones ipsilaterales (Morán et al, 2005).

La hemiovariectomía, hemicastración u ovariectomía unilateral, es un modelo experimental usado para analizar la existencia de asimetrías funcionales entre los ovarios, incluyendo la habilidad de secreción de hormonas por cada ovario. La hemiovariectomía, es una intervención quirúrgica en la cual se retira un ovario y se deja el contralateral, este procedimiento resulta en el incremento de peso en el ovario que permanece *in situ* que es atribuido a la hipertrofia compensadora del ovario (HCO), así como a la restauración de la ovulación completa conocida como ovulación compensadora (OC) (Domínguez et al., 2003; Morales et al., 2007). En

ratas adultas hemicastradas, cuando el ovario derecho permanece *in situ* 27/32 animales ovulan en el día del estro esperado mientras que en el ovario izquierdo *in situ* sólo 16/38 lo hacen. La vagotomía unilateral y contralateral restaura la ovulación en el ovario izquierdo (Chávez et al., 1987).

La hemiovariectomía izquierda en ratas a las 13:00 horas del día del estro no causa cambios en la concentración de progesterona. Mientras tanto, la concentración sérica de testosterona incrementa y las concentraciones de estradiol disminuyen significativamente. Por otra parte, la hemiovariectomía derecha no muestra cambio en los niveles de progesterona, testosterona y estradiol séricos. La inyección de sulfato de atropina a ratas con hemiovariectomía izquierdo provoca el incremento en los niveles de progesterona, una significativa reducción en los niveles séricos de testosterona y una reducción no significativa en los niveles de estradiol. Ratas con hemiovariectomía derecha, o con bloqueo colinérgico, no mostraron cambios en la concentración de progesterona y un incremento significativo en los niveles de testosterona y estradiol (Barco et al., 2003; Domínguez et al., 2003). Esto demuestra la capacidad asimétrica de los ovarios de sintetizar hormonas esteroideas después de la hemiovariectomía.

Cuando la hemiovariectomía se realiza en ratas de 20 días de edad, el porcentaje de ovulación compensadora por el ovario izquierdo fue mayor que la del derecho. La destrucción de la innervación sensorial por administración de capsaicina resulta en el incremento de la ovulación compensadora en el ovario derecho y la disminución por el izquierdo. Estos resultados sugieren que la respuesta compensadora del ovario depende del ovario que permanece *in situ* (Apolonio et al, 2000). Además, dichos resultados sobre la innervación ovárica demuestran que el papel del ovario derecho o izquierdo son afectados por distintas vías (Domínguez et al, 2003).

Después de una hemiovariectomía, temporalmente se reduce el efecto de retroalimentación negativa llevada a cabo por la inhibina, por lo cual la adenohipófisis aumenta la liberación de FSH lo que conlleva al reclutamiento de folículos pequeños (King et al., 1995). Algunos autores señalan que tanto la FSH como la LH se incrementan cuatro horas posteriores a la cirugía (De Greef et al, 1975; Ackland et al, 1990) mientras que otros mencionan que la elevación es mayor para FSH que para la LH, cinco horas postcirugía (Welschen y Dullaart, 1974).

La concentración de progesterona en la rata adulta hemiovariectomizada, resulta en una mayor concentración de la hormona dos horas después de la cirugía, mientras que la concentración de estradiol en el metaestro disminuye una hora después, con un aumento significativo a las veintidós horas postoperación, lo que sugiere que la concentración de progesterona depende del tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia (Butcher, 1977). Contradictoriamente, en otro estudio no se observaron cambios en la concentración de progesterona nueve días después de la hemiovariectomía; sin embargo, en este estudio no se consideró la etapa del ciclo estral en la que se realizó la cirugía (Gerandai et al, 1995).

Los mecanismos que desarrollan la HCO y OC en ratas hemicastradas han sido analizados a través de cambios en la secreción de gonadotropinas por la hipófisis y de hormonas esteroides ováricas. Muchos de los resultados obtenidos de ratas hemiovariectomizadas no pueden ser completamente explicados en términos puramente endocrinológicos. Por ejemplo, la concentración de FSH en plasma de ratas cíclicas se incrementa durante las primeras 6-12 horas después de una hemiovariectomía cuando se realiza a las 8:00 h del día de diestro-2 comparado con los valores control. Sin embargo, cuando la cirugía se realiza después de las 17:00 horas del día de diestro-2, la OC no ocurre al siguiente ciclo (Otani y Sasamoto, 1982).

La denervación del NOS en ratas con hemiovariectomía afecta la HCO y la tasa de animales ovulantes, efectos que dependen del día del ciclo y del ovario remanente. En animales con ovario izquierdo *in situ*, la denervación del NOS no afecta la tasa de animales ovulantes, pero el número de ovocitos liberados es menor al control y la HCO aumenta solo en los animales a los que se realizó la denervación en proestro. En este mismo modelo, cuando el ovario derecho es el que permanece *in situ*, la denervación del NOS derecho disminuye la tasa de animales ovulantes y las ratas ovulan sólo un ovocito, pero la HCO aumenta cuando la sección del NOS se realiza en los días del día de diestro-2 y proestro (Chávez y Domínguez, 1994.)

Estos resultados permiten llegar a la conclusión que los mecanismos compensadores del ovario se explican debido a que al extirpar un ovario se produce una estimulación nerviosa aguda de todas las inervaciones que llegan al ovario *in situ* y modifica la respuesta de las células endocrinas a las señales hormonales. Seccionar los nervios que inervan un ovario causa una estimulación neural aguda del órgano denervado y las áreas del SNC con conexiones neuronales

a los ovarios. La respuesta fisiológica resultante de seccionar una de las vías que llegan al ovario es diferente a la respuesta producida por la extirpación de un ovario ya que el ovario parcialmente denervado todavía tiene dos vías neuronales que regulan sus funciones (Dominguez y Cruz-Morales, 2011).

Vías de señalización dopaminérgicas

La dopamina (DA) es un neurotransmisor catecolaminérgico ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (SNC) y en algunas zonas periféricas incluyendo el sistema cardiovascular y renal. En el cerebro, la DA está involucrada en el control de los movimientos, la cognición, las emociones, la memoria, la recompensa y el mecanismo de la regulación de la secreción de prolactina por la hipófisis (Tresguerres y Castillo, 1993). Varias enfermedades se han relacionado con alteraciones de la transmisión de DA, trastornos neuropsiquiátricos, como el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, el síndrome de Tourette, esquizofrenia, psicosis, depresión, etc. y con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis múltiple (Borta y Höglinger, 2006).

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

Los receptores dopaminérgicos (RDA) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). A través del uso de técnicas de clonación molecular se han podido detectar cinco tipos de receptores dopaminérgicos, los cuales se encuentran acoplados a proteínas G, se dividen en dos familias farmacológicas denominadas DAR tipo 1 (RDA1) y tipo 2 (RDA2). Los receptores de la familia DAR1 (subtipos RDA1 y RDA5) están acoplados a proteínas Gs y estimulan la formación de AMPc como principal mecanismo de transducción de señales. Los subtipos pertenecientes a la familia RDA2 (RDA2, RDA3 y RDA4) inhiben la formación de AMPc, activan canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca²⁺ a través de canales dependientes del voltaje, efectos mediados también por proteínas G (G_{ai} y G_{ao}). Varias enfermedades neurológicas

humanas, incluyendo la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia, se cree que son manifestaciones de desequilibrios entre los RDA y la DA (Mayerhofer et al, 1999; Bahena et al, 2000; Banihashemi y Albert, 2002).

Los RDA1 son cadenas de 446 residuos de aminoácidos y específicamente, el subtipo RDA1, es el receptor a DA más abundante en el SNC (Jackson y Westlind, 1994; Weiner y Molinoff, 1994; Missale et al, 1998). Se encuentran principalmente en el tubérculo olfatorio, el neocórtex, el núcleo *accumbens*, las islas de Calleja, la amígdala, el núcleo subtalámico, la sustancia negra y el cerebelo. Niveles moderados del RDA1 han sido detectados en la corteza cerebral, el tálamo y el globo pálido (Jackson y Westlind, 1994). Los RDA1 comparten 80% de homología en la secuencia de aminoácidos con RDA5 en los dominios transmembrana y juega un papel importante en la actividad locomotora, los sistemas de recompensa, el aprendizaje y la memoria.

Típicamente el RDA1 induce la activación de la AC por medio de la activación directa de las proteínas de unión a nucleótidos de guanosa (de ahí su denominación como proteínas G), la subunidad $G_{\alpha s/olf}$ de la proteína G se une a la subunidad catalítica C2 de la enzima que induce la interacción entre las subunidades C1- C2 de la AC, a su vez esto último, induce la conversión de la adenosina trifosfato (ATP) en AMPc. El AMPc interactúa con las subunidades reguladoras de la PKA que inducen la liberación de las subunidades catalíticas que fosforilan diferentes sustratos (Sunahara y Taussig, 2002). Una de las proteínas más estudiadas que participan en la regulación de la vía de transducción de señales mediada por RDA y PKA es la fosfoproteína regulada por AMPc y dopamina de 32 kDa (DARPP-32). De hecho, los RDA colocalizan con DARPP-32 en varias regiones del cerebro. La fosforilación de la DARPP-32 por la PKA en el residuo de treonina 34, induce la inhibición de la proteína fosfatasa 1 (PP1), mientras que la fosforilación del residuo de treonina 75 de DARPP-32 por la cinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) induce la inhibición de PKA (Rajput et al, 2009) causando un bucle de retroalimentación en la activación de la PKA (Fig. 8). La activación de la PKA, así como la inhibición de la PP1 mediada por PKA, pueden causar directamente los cambios en el estado de fosforilación de varios canales, tales como los receptores de ácido 3,5-hidroxi-metil-4-isoxazol-propiónico- α -amino (AMPA), ácido gamma aminobutírico A ($GABA_A$) y N-metil-D-aspartato (NMDA); canales que juegan un papel importante en las propiedades eléctricas de las neuronas (Hernández-López et al, 2000). La PKA directamente

o a través de DARPP-32 puede regular a ERK 1 y 2 que participan en los cambios de expresión génica (Figura 7); estas vías se han relacionado con afecciones patológicas como la enfermedad de Parkinson (Rangel-Barajas et al, 2015).

El RDA1 puede provocar una vía alternativa de señalización del AMPc independiente de PKA. Por ejemplo, el AMPc puede activar a la vía de la MAPK a través de proteínas Ras, como la superfamilia de factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), que son activadores de pequeñas proteínas G Ras y tipo Ras; en concreto, se ha mostrado que el AMPc activa a Ras-proximal 1 (Rap1) que está involucrada en la polaridad celular y la migración; Rap1 puede también activar la señalización vía MAP cinasas implicada en la fosforilación de factores de transcripción tales como CREB, que están implicados en la activación o represión génica (Neves et al, 2002).

La familia RDA1 también activa una vía de transducción de señales que se ha relacionado con diversos trastornos neuropsiquiátricos. La activación de la fosfolipasa C (PLC) mediante la interacción de RDA1 con $G_{\alpha q}$ en lugar de $G_{\alpha s / \text{olf}}$, provoca que PLC se active e incremente la acumulación de inositol trifosfato (IP3), que a su vez se une a sus receptores en los compartimentos intracelulares que inducen la liberación de Ca^{2+} intracelular (Fig.8). El Ca^{2+} juega un papel importante, no sólo en las vías que causan la activación de la señalización de proteínas tales como la proteína cinasa dependiente de calcio (PKC), sino también en la modulación de la liberación de neurotransmisores por exocitosis. Se ha demostrado que esta vía de señalización particular se produce en la corteza primaria y prefrontal (Loos et al, 2010).

La activación del RDA1 también está relacionada con la regulación del gradiente electroquímico a través de Na^+ / K^+ -ATPasa, que bombea el sodio fuera de la célula y el potasio dentro de las células. Se ha demostrado que la activación del RDA1 inhibe la Na^+ / K^+ -ATPasa a través de las vías de señalización de PKA y PKC en el cuerpo estriado (Nishi et al, 1999) (Figura 7); también se ha demostrado que los RDA1 están relacionados con la homeostasis del sodio en el riñón.

Los RDA2 como se ha mencionado antes, consisten en los receptores RDA2, RDA3 y RDA4. El RDA2 tiene 2 formas generadas por procesamiento alternativo (“splicing”) del ARNm. La forma corta (D2S) está formada por 414 aminoácidos en el humano y 415 en la rata, mientras que la forma larga (D2L) tiene 443 y 444 aminoácidos respectivamente. El RDA2 ha sido detectado en

alta densidad en el neocórtico, el tubérculo olfatorio, el núcleo *accumbens*, las islas de Calleja y el área tegmental ventral. Se encuentra también en cantidades moderadas en la sustancia negra reticulada, la sustancia negra compacta, la corteza cerebral, el globo pálido, la amígdala, el tálamo y el hipotálamo (Mansour et al, 1990; Jackson y Westlind, 1994). Los RDA2 comparten 75 % de homología en las regiones transmembrana con RDA3, mientras que la identidad con RDA4 es de apenas del 53 %.

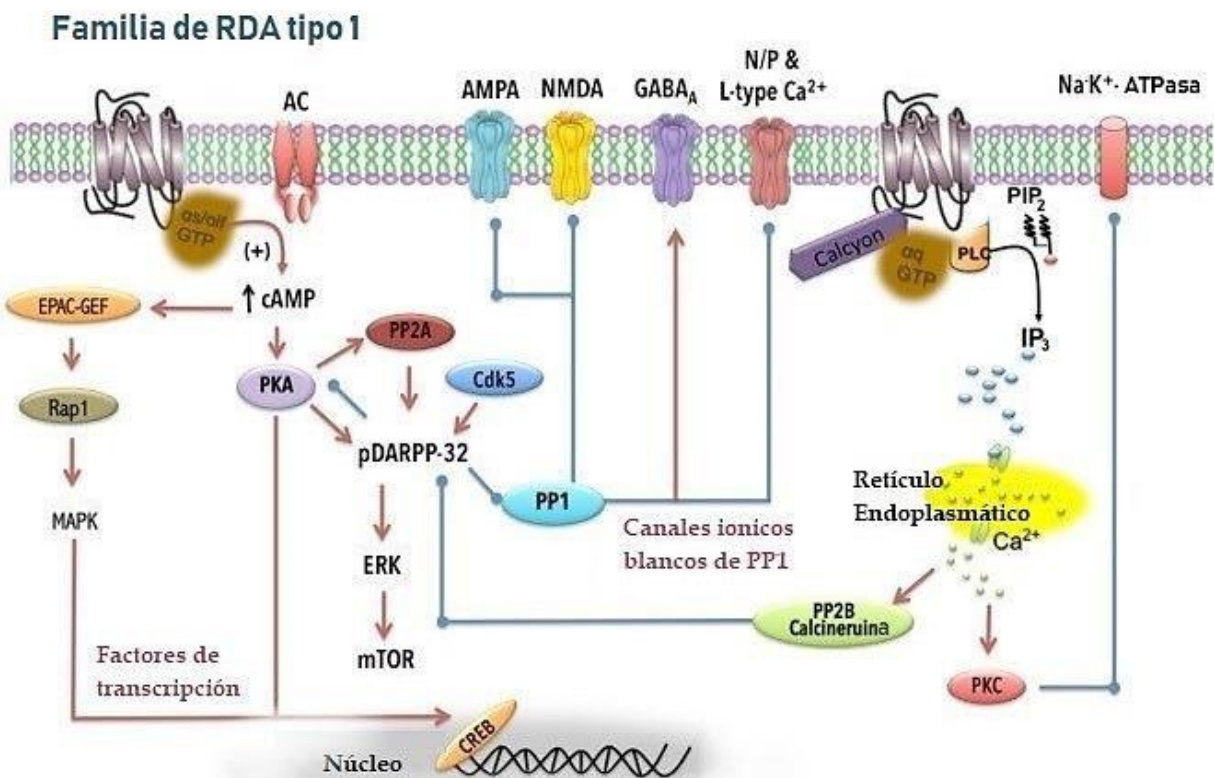


Figura 7. Vías de señalización mediadas por el receptor dopaminérgico tipo 1. Se muestran los efectos mediados por DA a través de RDA1 mediante la activación de señales intracelulares. Los efectos estimuladores están indicados con flechas rojas y los efectos inhibitorios en líneas azules que terminan con un círculo (Tomado de Rangel-Barajas et al, 2015).

La activación de esta familia de receptores típicamente conduce a la inhibición de la actividad de la AC, así como la inhibición de la PKA y la DARPP-32; sin embargo, ligeras pero complejas diferencias en la respuesta funcional y activación de vías de señalización han sido

observadas en receptores de esta familia, especialmente para el subtipo RDA3 (Fig. 9). Por ejemplo, se ha demostrado que RDA2 induce una fuerte inhibición de la fosforilación inducida por acumulación de AMPc en las células HEK-293, mientras que la estimulación de RDA3 en las células HEK-293 transfectadas mostraron escaso o ningún efecto inhibitorio sobre de la actividad AC (Chio et al, 1994). Las discrepancias podrían ser debidas a una expresión diferencial de las isoformas de la AC, porque los receptores RDA3 fueron capaces de inhibir la actividad de la enzima cuando fueron cotransfectados con la isoforma V de la AC, pero no con la isoforma VI (Zaworski et al, 1999). Además, la isoforma V de la AC se expresa ampliamente en las regiones cerebrales dopaminérgicas, especialmente en el cuerpo estriado y se ha sugerido que puede tener un papel importante en la ansiedad y la depresión.

Los RDA2 también modulan canales de potasio (GIRK) (Figura 8), que median la respuesta eléctrica neuronal, a través de receptores acoplados a proteínas $G_{\alpha i/o}$. El efecto sobre la respuesta eléctrica en neuronas parece ser mediado por las subunidades de las proteínas G, para el RDA2 y RDA4 a través de las subunidades $\beta\gamma$, pero no para RDA3 (Pillai et al, 1998).

Se ha demostrado que los RDA2 también son capaces de activar vías de señalización celulares relacionadas con la proliferación como la señalización de MAPK. La activación de ERK1/2 ha sido observada en diferentes líneas celulares como en células HEK-293, COS 7 y las de glioma C6; los RDA2 y RDA4 muestran algunas diferencias en la intensidad de activación de ERK / MAPK en comparación con RDA3 (Beom et al, 2004). Por otra parte, el complejo de GPCRs- β -arrestina también activa ERK / MAPK una vez que el receptor se internaliza. Recientemente se demostró que el complejo RDA2- β -arrestina puede activar ERK, efecto que no ocurrió con la activación del RDA3. Sin embargo, en las mismas condiciones se encontró que ERK podría ser activado por RDA3 en células COS-7 sólo cuando $G_{\alpha o}$ es coexpresada, pero no $G_{\alpha i}$, mientras que los RDA2 pueden mediar la activación de ERK por ambas isoformas $G_{\alpha i/o}$ y por el complejo RDA2R- β -arrestina (Figura 8) (Jin et al, 2013).

Familia de RDA tipo 2

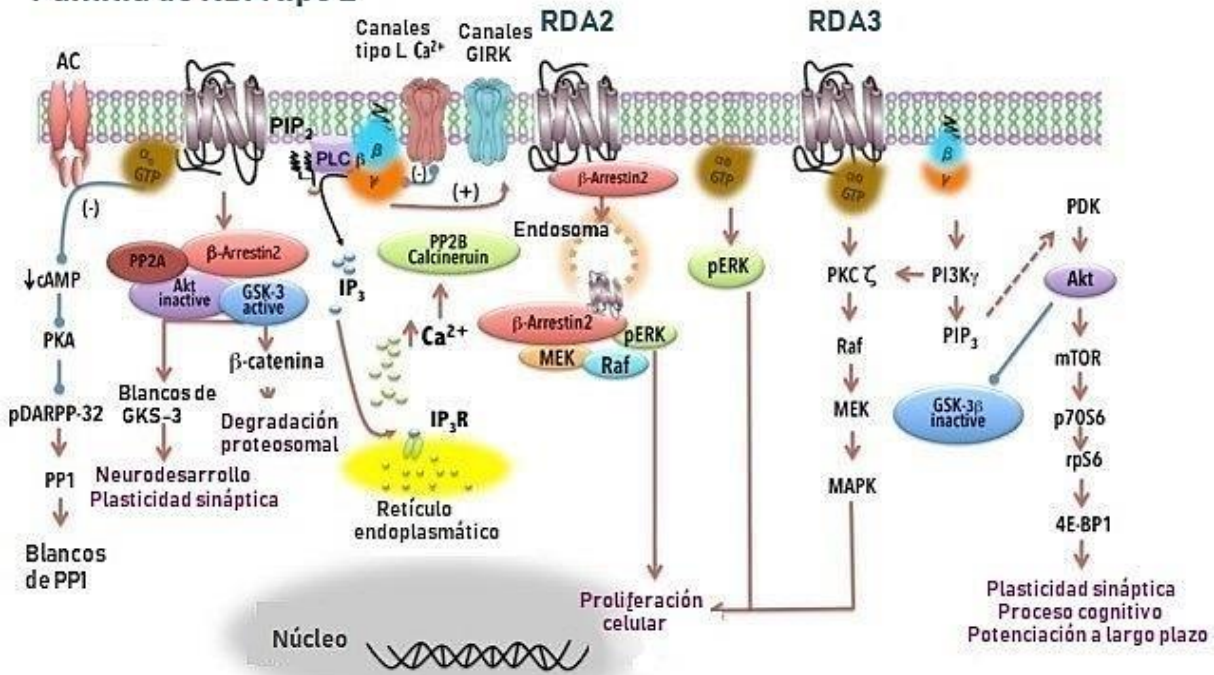


Figura 8. Vías de señalización mediadas por el receptor dopaminérgico tipo 2. Se muestran los efectos mediados por DA a través de RDA2 mediante la activación de señales intracelulares. Los efectos estimuladores están indicados con flechas rojas y los efectos inhibitorios en líneas azules que terminan con un círculo (Tomado de Rangel-Barajas et al, 2015).

La estimulación de los RDA2 activa la señalización de Akt. *In vivo*, se ha demostrado la activación de Akt en el cuerpo estriado después de la administración de agonistas del RDA2 (Brami-Cherrier et al, 2002). El efecto de los RDA3 también se ha estudiado *in vivo* e *in vitro*. En ratones *knock out* a RDA3 se demostró que participan en la fosforilación de Akt. *In vitro*, los RDA3 fueron capaces de aumentar la actividad de IP3K y PKC. La activación de Akt regula la actividad de la cinasa diana de la rapamicina en células de mamíferos (mTOR). Por el contrario, la inactivación de la Akt (por la proteína fosfatasa 2A (PP2A)), inactiva las dos isoformas de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GKS-3 α y β). La GSK-3 es una proteína cinasa abundantemente expresada en el cerebro y está implicada en cascadas de transducción de señales relevantes para el desarrollo neurológico y también regula la degradación del proteosoma a través de β -catenina, que participa en las enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas como el desorden bipolar y la esquizofrenia. Un estudio reciente demostró que RDA3 activa Akt, que activa a mTOR que a su vez activa dos proteínas río abajo p70S6 y 4E-BP1, probablemente mediado por la cinasa

dependiente de fosfoinosítido (PKD) y también causa la inactivación de GSK-3 mediante la fosforilación Akt (Figura 9) en las neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado (Salles et al, 2013), estas vías se han relacionado con la plasticidad sináptica, el proceso cognitivo, la potenciación a largo plazo y depresión a largo plazo.

Metabolismo de la dopamina

La degradación enzimática de la DA en sus metabolitos inactivos, es llevada a cabo por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y por la monoamino oxidasa (MAO). Esta acción degradativa puede ser realizada por las diferentes isoformas de las MAO, MAO-A y MAO-B. Cabe señalar que COMT es predominantemente expresada en células gliales, pero en neuronas, la enzima está ausente o se encuentra en niveles muy bajos. MAO-B se encuentra principalmente en los astrocitos, mientras que MAO-A predomina en las neuronas catecolaminérgicas del SNC. La MAO descompone a la dopamina a 3,4-dihidroxiacetilfenilaldehído (DOPAL), que a su vez se degrada para formar ácido 3,4-dihidroxiacetilfenilacético (DOPAC) por la acción de la enzima aldehído deshidrogenasa (López-Pérez et al, 2015) (Figura 9).

Otra vía para el metabolismo de la DA implica a la enzima COMT, que la convierte en 3-metoxitiramina (3-MT). Por lo tanto, 3-MT se reduce por la MAO a ácido homovanílico y se elimina por la orina. Como resultado, la inhibición de la MAO ha sido considerada como una terapia adyuvante en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson (Mousseau y Baker, 2012). Los inhibidores de la MAO se utilizan para aumentar los niveles de DA y no para disminuir la producción de peróxido de hidrógeno.

Las neuronas tienen diferentes sistemas antioxidantes, por ejemplo, la catalasa y glutatión peroxidasa, para hacer frente a la producción de peróxido de hidrógeno. Cabe recalcar que el metabolito DOPAC derivado de la MAO es probablemente mucho más tóxico que el peróxido de hidrógeno. La inactivación de DA en el cerebro, el cuerpo estriado y los ganglios basales está mediada por la recaptura vía transportadores de DA seguida por la acción enzimática de la MAO, que la metaboliza a DOPAC. Sin embargo, hay pocos transportadores de DA (DAT) en la corteza frontal, lo que promueve a la ruptura de DA a través de otra vía que implica el transportador de noradrenalina (NAT). La velocidad de degradación de la DA es generalmente más rápida en la vía

DAT que en la NAT. En ratón, la DA se degrada en el núcleo caudado través de la vía DAT en menos de 200 milisegundos, en comparación con los 2000 milisegundos en la corteza frontal (Grace y Bunney, 1984).

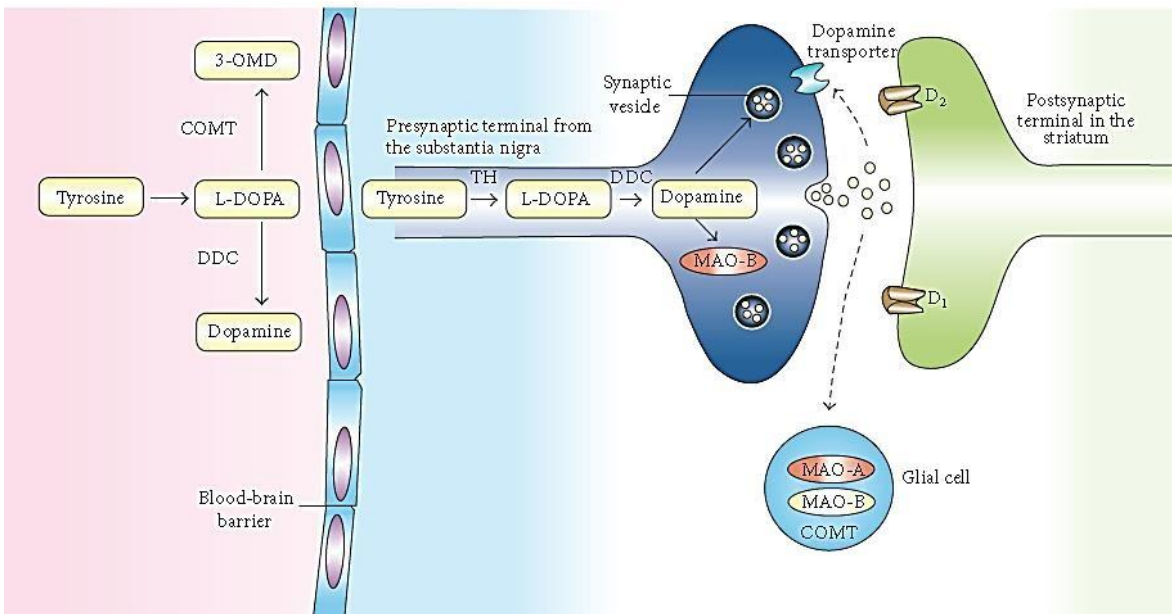


Figura 9. Metabolismo de la DA. Se muestran las diferentes vías por las cuales la DA es metabolizada, ya sea por la Catecol O metil transfesa (COMT) o por las Monoaminooxidasas (MAO) (Tomada y modificada de Moussa et al, 2006).

Dopamina en el ovario

En el ovario se han detectado concentraciones relativamente elevadas de noradrenalina, una catecolamina implicada en la modulación del crecimiento folicular, la esteroidogénesis, las funciones del cuerpo lúteo y el desarrollo de la HCO, entre otras funciones (Battista y Condon, 1986; Bronzi et al, 2015). También se ha demostrado la presencia de dopamina y sus receptores en diferentes tejidos del ovario (Mayerhofer et al, 2000; Gay et al, 2004; King et al, 2005; Rey-Ares et al, 2007).

En el ovario humano se ha detectado la presencia de dopamina y de RDA1 en el cuerpo lúteo de humano (Mayerhofer et al., 1999, 2000), en la yegua (King et al., 2005), en la rata (Rey-

Ares et al., 2013) y en la vaca (Parillo, 2013). Se ha descrito el repertorio de los RDA presentes en las células de la granulosa, se encuentran presentes cuatro de los cinco receptores con excepción del RDA3, siendo el RDA2 el de mayor expresión (Rey-Ares et al., 2007). En la rata también se ha identificado la presencia RDA tanto del tipo 1 como del tipo 2 (Mayerhofer et al, 2000; Gay et al, 2004). El ovario cuenta con su propio sistema de recaptura de DA, ya que en células de la granulosa humana se encuentran el transportador de dopamina (DAT), la catecol-O-metiltransferasa (COMT), las monoaminoxidasas A y B, además del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), mientras que en cepas de ratas Wistar y Sprague-Dawley se demostró que expresan tanto DAT como VMAT2 (Greiner et al, 2007; Saller et al, 2014).

Los ovocitos de *Macaca mulatta* utilizan dopamina para la posterior síntesis de noradrenalina gracias a la enzima tirosina hidroxilasa presente en estos ovocitos (Mayerhofer et al, 1998.). El papel de la dopamina ovárica aún se desconoce, pero se especula que podría estar regulando las funciones ováricas. Se ha observado que la DA disminuye el crecimiento de varios tipos de tumores malignos en ratones y dicho efecto se atribuyó a la inhibición de la proliferación de células tumorales o a la estimulación de la respuesta inmune (Wick, 1978; Wick, 1981). Posteriormente se demostró la presencia de receptores dopaminérgicos en las células endoteliales (Bacic et al, 1991). Incluso, se ha observado que ciertos tipos de tumores son más activos cuando pierden la actividad dopaminérgica medida en las células endoteliales de los vasos sanguíneos que los nutren (Basu et al, 1995). En un estudio sobre cáncer de ovario en el ratón, se transfectaron intraperitonealmente células tumorales ováricas secretoras de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), resultando en un descenso de la angiogénesis al inyectar DA. Del mismo modo, mediante estudios con agonistas y antagonistas dopaminérgicos, se pudo observar que el efecto antiangiogénico de la dopamina se realiza a través de la activación del receptor DA2 y no a través de la modulación de otros receptores de la misma familia (Basu et al, 2001).

En un estudio sobre el síndrome de hiperestimulación ovárica en mujeres se demostró que en el líquido folicular se encontraba incrementado el VEGF y la interleucina (IL-) 8; en este mismo estudio, el cultivo de células humanas de la granulosa luteinizantes de estas pacientes se mostró que DA es capaz de inhibir a VEGF y en dosis bajas reduce la permeabilidad sin afectar la

migración y la formación de tubos capilares de células endoteliales (Chen et al, 2010). La angiogénesis es esencial en el establecimiento del embarazo donde VEGF está involucrado además del factor de crecimiento placentario, IL-8 y angiopoyetinas (Plaisier, 2011).

En cuerpos lúteos de conejas pseudopreñadas se identificó la presencia de DA y de los receptores RDA1 y RDA3 en cuerpos lúteos en distintas etapas de desarrollo. Cuando se añadieron agonistas dopaminérgicos del RDA1 o del RDA3 a un cultivo de cuerpos lúteos en distintas etapas de la pseudopreñez, se encontró que en cuerpos lúteos tempranos el agonista del RDA1 aumentó la liberación de progesterona y prostaglandina E2 (PGE2), mientras que el agonista del RDA3 disminuyó la progesterona y aumentó la liberación de la prostaglandina F2 α (PGF2 α) en cuerpos lúteos medios y tardíos. Estos resultados proporcionan evidencia de que el sistema DA/RDA ejerce una función moduladora dual en la vida útil del cuerpo lúteo *in vitro*. El RDA1 es luteotrópico mientras que el RDA3 es luteolítico (Parillo et al, 2014).

El grupo de Domínguez y colaboradores ha evaluado los efectos fisiológicos de las catecolaminas ováricas (Domínguez et al, 1982; Domínguez et al, 1985), con el uso de antagonistas de sus receptores en los diferentes días del ciclo estral de la rata a distintas horas. Se demostró que el bloqueo farmacológico de RDA promueve una falla ovulatoria, que depende del día del ciclo estral y la hora en el que se realizó (Domínguez et al 1987, Venegas et al 2015), además de interrumpir el desarrollo folicular e incrementar la atresia folicular (Ramírez-Ávila, 2001; Pastelín-Rojas, 2003).

En estudios recientes, se ha demostrado que la DA puede incrementar la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en células humanas de la granulosa, un fenómeno que es independiente de la unión a su receptor, pero se encuentra directamente relacionado con el sistema de recaptura y su metabolismo. El efecto se observó en pacientes con síndrome de ovario poliquístico y en mujeres sanas, donde se demostró que la DA presente en el líquido folicular se encuentra incrementada en las pacientes con el síndrome, así como los niveles del mensajero del DAT, MAO A y MAO B. En este mismo estudio se probó que el uso de inhibidores del DAT y de la MAO en cultivo de células de la granulosa de mujeres sanas, estimuladas previamente con DA, disminuye la concentración de ERO (Saller et al, 2014).

Por otra parte, existe evidencia que permite suponer que el sistema dopaminérgico ovárico actúa de manera asimétrica, al evaluar la función del RDA2 en la rata adulta hemicastrada, se encontró que el bloqueo farmacológico del RDA2, modifica la ovulación compensadora (OC) y la hipertrofia compensadora del ovario (HCO) solamente cuando el ovario derecho permanece *in situ* (Letras et al, 2016). En el mismo modelo, se evaluó el efecto de la administración local del SCH23390, antagonista específico del RDA1, dentro de la bursa ovárica del ovario remanente donde indujo la disminución de la OC, en ambos ovarios *in situ*, pero disminuyó HCO sólo cuando el ovario que permanece *in situ* es el izquierdo (Guzmán-Herrera, 2018).

Especies reactivas de oxígeno y balance óxido-reducción

Las ERO son generadas durante el metabolismo del oxígeno dando origen a tres principales radicales: ion superóxido, peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1992). Estos radicales son inestables y altamente reactivos; interactúan con ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, carbohidratos o cualquier otra molécula cercana provocando una serie de reacciones en cadena que resultan en daño y muerte celular. Las ERO están implicadas en más de 100 enfermedades (Evans et al, 2004).

Las ERO son generadas por diferentes vías de manera natural en los organismos. Algunas ERO son producidas por reacciones no enzimáticas, por ejemplo: vía reacción de Fenton en presencia de metales iónicos de transición (Halliwell y Gutteridge, 1998). Las reacciones biológicas que transfieren electrones y las reacciones de oxigenasas, las cuales utilizan al oxígeno molecular como sustrato, también generan cantidades importantes de ERO. Desde la cadena transportadora de electrones se producen ERO en condiciones fisiológicas. Otro sistema conocido que produce ERO a través de sistemas enzimáticos son las Xantina deshidrogenasas, las cuales están relacionadas con el sistema de metabolismo de las purinas (Harrison 2002). La generación de ERO por el sistema P540 es importante en la síntesis de hormonas esteroides (Fujii et al, 2005) Se ha demostrado que las ERO actúan sobre proteínas de señalización celular, modificando vías de señalización relacionadas con crecimiento, proliferación y muerte celular (Mittler et al, 2011). Las ERO interactúan con el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), activando su vía por la inactivación de I κ B α ; también

interactúan con la vía de las MAPK, ya que pueden activar los receptores del factor de crecimiento epidermal (EGF) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los cuales activan principalmente la vía de ERK (Poillet-Perez et al, 2015). Las ERO también actúan sobre la vía de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) /Akt involucrada en funciones críticas para la célula como la síntesis de proteínas, la progresión del ciclo celular, proliferación, apoptosis, autofagia y resistencia a fármacos en respuesta a factores de crecimiento, hormonas y citocinas (Sarbasov et al, 2005). Las ERO inactivan al homólogo de tensina (PTEN), el cual regula la síntesis de PIP3 e inhibe la activación de Akt, mediante la oxidación de residuos de cisteína (Leslie y Downes et al, 2002). Recientemente también se ha demostrado que la subunidad reguladora de PKA es objetivo de oxidación por las ERO sobre la cisteína 17, la cual permite la formación de un puente disulfuro entre dos subunidades, provoca la disociación del complejo de PKA (Papa et al, 2012).

En un estado fisiológico, el nivel de las ERO celulares es estable en un equilibrio dinámico, y este equilibrio se modula por medio de procesos celulares que las producen y las eliminan. Existen dos sistemas antioxidantes: enzimáticos y no enzimáticos (Agarwal et al, 2005). La principal categoría de las enzimas antioxidantes es la superóxido dismutasa (SOD) que de acuerdo al metal que contienen se clasifican en dos grupos: SDO1 (contienen Cu y Zn) y SDO2 (contienen Mn). La SOD2, en la matriz mitocondrial convierte el superóxido que no puede difundirse a través de las membranas, en H₂O₂ que luego se reduce a agua por la catalasa. En cambio, la SOD1 reduce principalmente el superóxido del espacio intermembrana y el citosol a H₂O₂. Además, la Glutación peroxidasa (GPx), la Glutación S-transferasa pi (GST-pi), la metalotioneína-3 (MT3), la ferritina de cadena pesada (FHC) y la Dihidrodiol deshidrogenasa (DDH1 o AKR1C1) también juegan un papel decisivo en el proceso antioxidante (Meloni y Vasák, 2011) (Figura 10).

Los antioxidantes no enzimáticos están determinados por la ingesta dietética, siendo vitaminas y minerales como vitamina C, vitamina E, selenio, zinc, taurina, hipotaurina, glutatión, beta caroteno y caroteno (Agarwal et al, 2005).

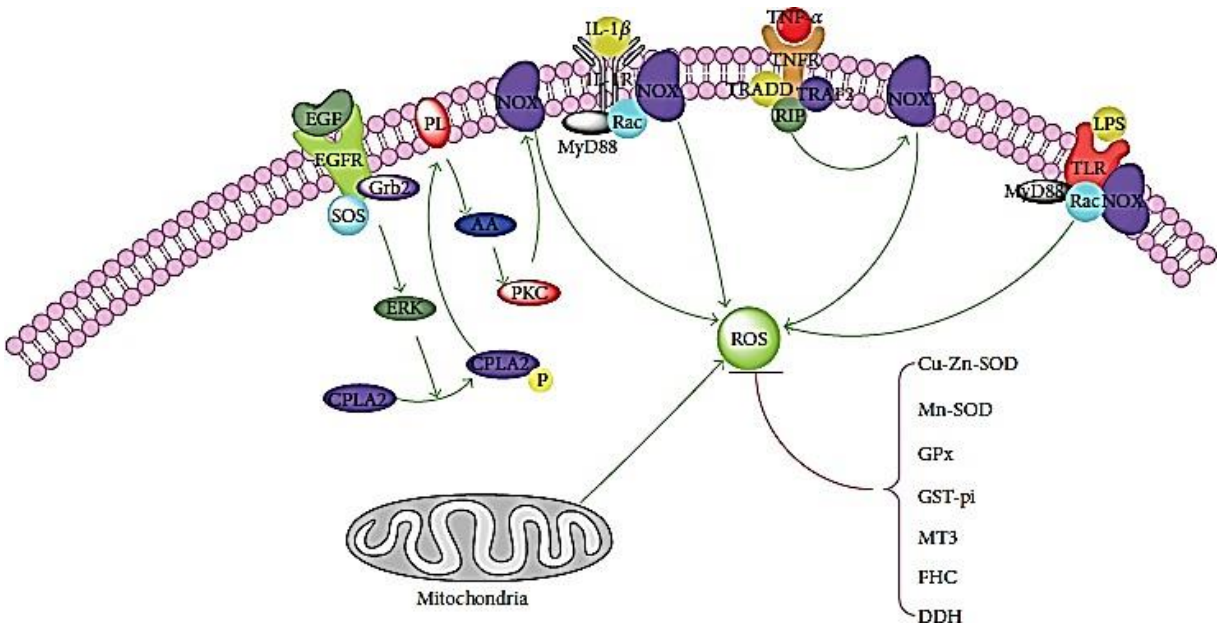


Figura 10. Homeostasis de las especies reactivas de oxígeno intracelulares NOX, NADPH oxidasa, Factor de necrosis tumoral α (TNF α), Factor de crecimiento epidermal (EGF), Interleucina 1 β (IL-1 β), Superóxido dismutasa (SOD), Glutacion peroxidasa (GPx), Glutacion 5-transferasa pi (GST-pi), metalotioenina-3 (MT3), Ferritina de cadena pesada (FHC), Dihidrodol dehidrogenasa (DDH), receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR), Dominio asociado a muerte TNFRSF1A (TRADD), Factor de diferenciación mieloide (MyD88), Receptor tipo Toll (TLR), Fosfolipasa citosólica A2 (cPLA2). (Tomado de Zhang et al, 2015)

Papel de las ERO en la función ovárica

En estudios realizados en animales y humanos, se ha mostrado la presencia de las ERO en el tracto reproductivo femenino, ovarios, oviducto e incluso en embriones. Estos compuestos han sido involucrados en funciones reproductivas como la maduración del ovocito, esteroidogénesis ovárica, la función del cuerpo lúteo y la luteólisis (Fujii et al, 2005). El ovario es un órgano activo metabólicamente, está bajo una continua variedad de estrés. Durante el desarrollo folicular se forman ERO cuando se producen estrógenos debido al aumento en la actividad de citocromo P450 (Ortega-Camarillo et al, 1999). Las ERO tienen un papel durante la ovulación que en algunos aspectos es similar al proceso de inflamación (Espey, 1980). La ovulación es suprimida ante la presencia de agentes que inhiben la respuesta inflamatoria. Las ERO son generadas durante la inflamación y es lógico pensar que existe una relación entre la producción de ERO y la ruptura folicular (Espey et al, 1982) (Figura 11).

Marcadores del estrés oxidativo como la SOD1, SOD2, glutatión peroxidasa, y glutamil sintetasa han sido investigados en ovario. La expresión de varios biomarcadores de estrés oxidativo ha demostrado que se encuentran en ovarios humanos en estado fisiológico sano (Suzuki et al, 1999). Todas las etapas foliculares han sido examinadas para la expresión de SOD incluyendo folículos primordiales, primarios, preantrales, antrales y folículos atrésicos (Shiotani et al, 1991; Suzuki et al, 1999). Se encontró la presencia de SOD en células de la teca interna de folículos antrales (Shiotani et al, 1991), para localizar los núcleos de células de la teca y la granulosa se utilizó el anticuerpo contra la proteína de unión a Ad4 (Ad4BP), la cual es un factor de transcripción esteroideogénico que induce la transcripción de la enzima P450 esteroideogénica. La correlación entre la expresión de Ad4BP y la SOD sugiere una asociación entre las ERO y la esteroideogénesis (Suzuki et al, 1999).

Tanto la granulosa humana como las células lúteas responden al peróxido de hidrógeno, por ejemplo, la producción de progesterona y estradiol se reduce cuando se agrega peróxido de hidrógeno a un cultivo de células lúteas estimuladas por gonadotropina coriónica humana. Existe un delicado equilibrio entre las ERO y las enzimas antioxidantes en los tejidos ováricos. Las enzimas antioxidantes neutralizan la producción de ERO y protegen al ovocito (Behrman et al, 2001).

El papel de las ERO en el tejido ovárico sigue siendo un tema de debate. Finkel en el 2011 propuso la idea de que las ERO pueden ser moléculas importantes de señales fisiológicas de las células del ovario (Finkel, 2011). Un estudio hecho en ratones donde se utilizaron antioxidantes inyectados en la bursa ovárica demostró que las ERO son necesarias para los eventos ovulatorios, incluyendo la expansión del cúmulo y la producción de progesterona inducida por LH en los folículos preovulatorios. Los antioxidantes disminuyeron también la tasa de ovocitos liberados. En células de la granulosa, las ERO actúan como mediadores de la LH, del factor de crecimiento epidérmico y de la señalización vía de MAPK lo que implica que, al menos en los roedores, las ERO son necesarias en el ovario (Shkolnik et al, 2011; Agarwal, 2012).

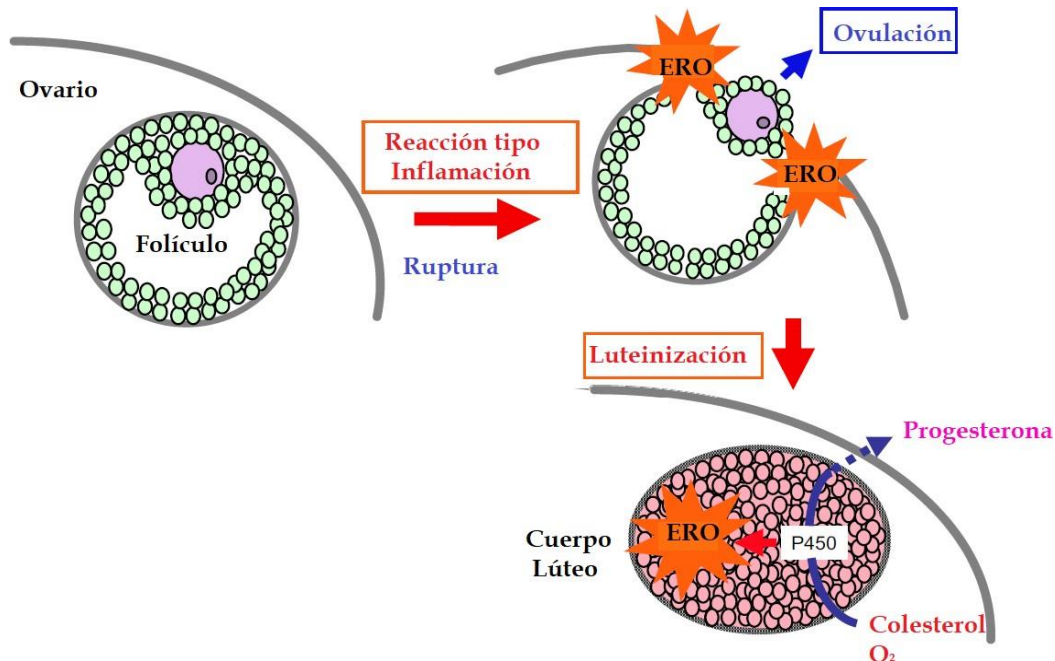


Figura 11. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) durante la ovulación y la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo. La ovulación es un proceso tipo inflamatorio. Las ERO se producen localmente durante la ruptura folicular y pueden estar involucradas durante el proceso de ovulación. Las ERO son generadas también por el cuerpo lúteo por la vía de la monooxigenasa durante la síntesis de hormonas esteroides (Tomado y modificado de Fujii et al, 2005).

La hipoxia de las células de la granulosa incrementa la concentración de ERO; sin embargo, es un evento normal durante el crecimiento de folículos ováricos (Tropea et al, 2006), asimismo la limitación de oxígeno es conocida por estimular la angiogénesis folicular y se ha probado que una falla de la angiogénesis en los folículos ováricos contribuye a la atresia folicular (Greenwald y Terranova, 1988). Además, se sabe que las ERO puede actuar como transductores de señal o mensajeros intracelulares de la respuesta angiogénica (Pearlstein et al, 2002).

Por otra parte, se ha probado que el incremento de las ERO se asocia a la disminución de la producción de hormonas esteroides (Kodaman et al, 2001) y además se encuentran relacionadas a diversas patologías, por ejemplo, en el síndrome de ovario poliquístico, las ERO se encuentran incrementadas mientras que la concentración de enzimas antioxidantes disminuye (Palacio et al, 2006). Además, se han encontrado aumentadas en el líquido folicular de pacientes con endometriosis (Ebisch et al, 2006). Por otro lado, en pacientes infértiles se ha mostrado que en el fluido peritoneal las ERO están incrementadas y las enzimas antioxidantes disminuidas

(Polak et al, 2001). El envejecimiento aparentemente está asociado con la disminución de la eficacia del sistema antioxidante ovárico (Ebisch et al, 2006).

ANTECEDENTES

En 1987 Domínguez y colaboradores evaluaron los efectos de un antagonista dopaminérgico en diferentes fases del ciclo estral sobre la ovulación y la distribución de la población folicular de los ovarios de la rata adulta. En este experimento se utilizaron ratas hembra con ciclos estrales regulares de cuatro días que fueron tratadas con una dosis única de haloperidol, antagonista de los receptores dopaminérgicos, en diferentes horas de cada uno de los días del ciclo estral: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro. Los animales se sacrificaron en la mañana del estro esperado. El haloperidol impidió la ovulación espontánea en estos animales cuando se administró en el estro y diestro-1, pero fue menos efectivo cuando se inyectó en el diestro-2 y en el proestro (Domínguez et al, 1987). La población folicular de los ovarios mostró alteraciones en el crecimiento de los folículos que dependieron del momento en el que se realizó el bloqueo sistémico de los receptores a dopamina. La interpretación de estos resultados permitió sugerir que la información dopaminérgica que se genera durante la primera mitad del ciclo estral es fundamental para que la secuencia de eventos neuroendócrinos y endócrinos que culminan con la ovulación ocurra de manera normal.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la importancia del sistema dopaminérgico ovárico, confirmando las observaciones de Domínguez y colaboradores tres décadas atrás, en donde las ratas adultas en el día del diestro-1 del ciclo estral, el sistema de RDA es indispensable para que se presente la ovulación el día del estro esperado. Este estudio se realizó con la administración de tres diferentes antagonistas dopaminérgicos: haloperidol antagonista inespecífico, sulpiride antagonista del RDA2 y SCH23390 antagonista del RDA1 dentro de la bursa ovárica en diferentes horarios a lo largo del ciclo estral. El sulpiride y el haloperidol se comportaron de manera semejante “bloqueando” la ovulación cuando se administraban en la noche del estro, en el día del diestro-1 y en la mañana del diestro-2; en contraste, el SCH23390 tuvo efectos solo en la mañana y en la noche del diestro-1. También se pudo mostrar el aumento en la expresión de tirosina hidroxilasa en los animales administrados con haloperidol, lo que

podría indicar un aumento en la síntesis de DA, mientras que, la expresión de la DARPP-32 se incrementó de igual manera (proteína que se activa por la unión de la DA al RDA1) (Venegas et al, 2015).

Se ha descrito que la DA ha sido encontrada en el líquido folicular de folículos preovulatorios humanos en altas concentraciones y en cultivo de células de la granulosa de folículos humanos se ha mostrado la presencia de cuatro de los cinco subtipos de RDA. En el ovario de la rata se encontró el ARNm de los receptores tipo I y tipo II en los cuerpos lúteos y en tejido intersticial mientras que en los folículos ováricos es moderada su presencia (Rey-Ares et al, 2007). Se sabe también que el ovario cuenta con el sistema de recaptura de DA; en células de la granulosa humana se encuentran el DAT, la COMT, las MAO A y B, además del VMAT2 (Greiner et al, 2008; Saller et al, 2014). Aunque el papel de las ERO en el tejido ovárico aún está en debate, es muy probable que sean generadas como señales inductoras que conduzcan a la ovulación cíclica (Shkolnik et al, 2011). La DA puede incrementar la generación de ERO, incremento asociado al metabolismo de DA, ya que la inhibición de la DAT y de las MAOs provocan la disminución de las ERO (Saller et al, 2014).

Con base a lo anterior, existe evidencia que permite suponer que el sistema dopaminérgico ovárico actúa de manera asimétrica, ya que al evaluar la función del RDA2 en el modelo del animal hemicastrado, se encontró que el bloqueo farmacológico del RDA2 inducido por la administración local de sulpiride dentro de la bursa ovárica del ovario remanente, disminuye la OC y aumenta la HCO cuando el ovario derecho permanece *in situ*, pero no lo hace cuando el que permanece es el ovario contralateral (Letras et al, 2016). En este mismo modelo, se ha evaluado el efecto del antagonista del RDA1; SCH23390, donde se encontró que la OC disminuye en ambos ovarios, mientras que disminuye la HCO sólo cuando el ovario que permanece *in situ* es el izquierdo (Guzmán-Herrera, 2018).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los efectos observados por el bloqueo farmacológico de los RDA podría explicarse por la expresión diferencial de los receptores de acuerdo al día del ciclo estral y al ovario; es decir, que en los días donde se han observado cambios por la administración de los antagonistas específicos podrían ser los días de mayor expresión de los receptores y que al bloquear un receptor particular,

el sistema puede responder para compensar la disminución de sus funciones modificando la expresión de los receptores bloqueados además del incremento en la concentración de dopamina, dando como resultado un desequilibrio en la función ovárica modulada por el sistema dopaminérgico ovárico.

Por otra parte, el incremento de DA ovárica resultaría en un incremento de su metabolismo, como resultado un incremento en la generación de ácido homovanílico y peróxido de hidrógeno, provocando un aumento de las especies reactivas de oxígeno con efecto en el balance óxido-reducción, el cual podrían influir en la ovulación. Sin embargo, actualmente no hay evidencias que respalden esta hipótesis.

JUSTIFICACIÓN

El sistema dopaminérgico ovárico es indispensable para que se lleve a cabo la ovulación dentro del ciclo ovárico, además de estar relacionado con el desarrollo de la HCO y la OC con una posible función lateralizada. Sin embargo, no existe suficiente evidencia que describa el papel funcional de la DA presente en los tejidos ováricos. Incluso, se ignora si la DA detectada en los compartimentos anatómicos funcionales del ovario procede de terminales nerviosas o de algún otro tejido ovárico.

Otros trabajos en los que se ha analizado el papel de la DA en la periferia postulan que actúa como un modulador de las funciones renales y es factible que en los ovarios desempeñe funciones semejantes; sin embargo, faltan estudios que respalden esta hipótesis.

HIPÓTESIS

El bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos en el ovario remanente de la rata adulta hemicastrada, realizado en el día del diestro-1, disminuirá la ovulación compensadora; incrementará la expresión de la DARPP-32, del receptor DA1 y del receptor DA2, así como en la generación de indicadores de estrés oxidativo.

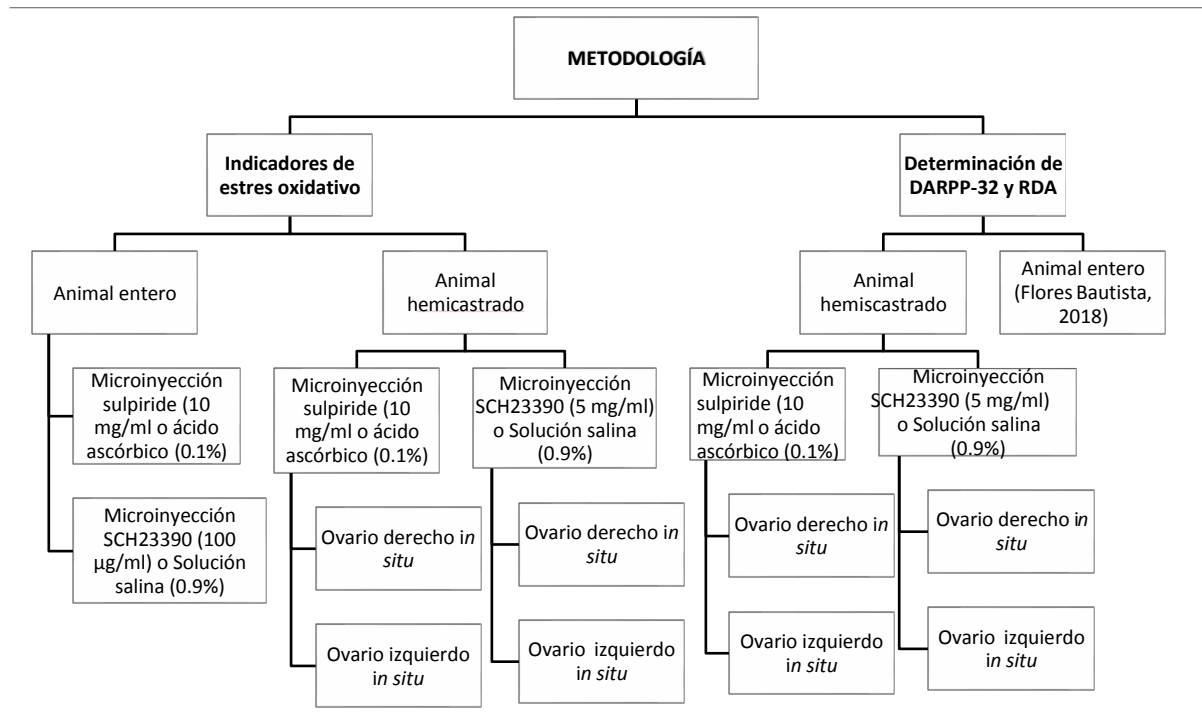
OBJETIVO GENERAL

Analizar el papel funcional de la dopamina ovárica del ovario remanente en el modelo del animal hemicastrado y cómo incide en el desarrollo de la OC e identificar si existe relación con la

presencia de indicadores bioquímicos en la gónada remanente como la expresión de la DARPP-32 y los receptores RDA1 y RDA2, así como en la generación de indicadores de estrés oxidativo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar los efectos del bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos RDA1 o RDA2 sobre la ovulación compensadora del ovario derecho o izquierdo *in situ* de la rata adulta hemicastrada.
- 2) Analizar los efectos del bloqueo agudo del receptor RDA2 sobre proteínas relacionadas a su activación como la proteína DARPP-32 y el receptor RDA2, en el ovario de la rata adulta hemicastrado con ovario derecho o izquierdo *in situ*.
- 3) Analizar los efectos del bloqueo agudo del receptor RDA1 sobre la presencia del mismo receptor, en el ovario de la rata adulta hemicastrado con ovario derecho o izquierdo *in situ*.
- 4) Evaluar los efectos del bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos RDA1 o RDA2 en la generación de especies reactivas de oxígeno en el ovario de la rata adulta entera.
- 5) Evaluar los efectos del bloqueo agudo de los receptores dopaminérgicos RDA1 o RDA2 en la generación de especies reactivas de oxígeno en el ovario de la rata adulta hemicastrada con ovario izquierdo *in situ*.



Esquema 1. Metodología general. Se muestran las pruebas realizadas: Determinación de DARPP-32 y receptores dopaminérgicos (RDA) del ovario derecho o izquierdo in situ en los animales hemicastrados con microinyección de sulpiride (10 mg/ml) o SCH23390 (5 mg/ml), con sus respectivos vehículos. Cuantificación de indicadores de estrés oxidativo en el animal entero o hemicastrado del ovario derecho o izquierdo, después de la microinyección de sulpiride o SCH23390 con sus respectivos vehículos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos del presente trabajo se ajustaron a las recomendaciones de la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio) y fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado de los Animales de Laboratorio (CICUAL-BUAP).

Se utilizaron 192 ratas hembras adultas de la cepa *C57BL/6J*, animales caracterizados por ser cíclicos, con edades de 90-120 días y con peso corporal de 200-250 g, mantenidas en condiciones de iluminación controlada (14 horas luz / 10 horas oscuridad; luces de las 05:00 a las 19:00 h) y con libre acceso al agua y al alimento balanceado.

Con el fin de controlar las fases del ciclo reproductor, se realizaron los registros del ciclo estral por medio de la toma diaria de frotis vaginal que se tomó diariamente entre las 09:00 y las 10:00 h. Una vez que los animales presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración

(diestro 1, diestro 2, proestro y estro; ratas cíclicas) se dividieron en los diferentes grupos experimentales que se señalan en la tabla 3(Tabla 2).

Tabla 2. Asignación del número animales utilizados en los distintos grupos experimentales según el modelo utilizado: Animal entero y animal hemicastrado. Clasificados por las pruebas realizadas a cada grupo: cuantificación de indicadores de estrés oxidativo o identificación de DARPP-32 y receptores dopaminérgicos (RDA).

Modelo	Número de animales		Pruebas realizadas
Animal entero	80		Indicadores de estrés oxidativo
Animal hemicastrado	40	Ovario izquierdo <i>in situ</i> : 20 Ovario derecho <i>in situ</i> : 20	Indicadores de estrés oxidativo
	72	Ovario izquierdo <i>in situ</i> : 36 Ovario derecho <i>in situ</i> : 36	Identificación de DARPP-32, RDA1 y RDA2
Número total de animales	192		

Para la determinación de los indicadores de estrés oxidativo en el animal entero, se llevó a cabo la microinyección del antagonista o vehículo a las 13:00 horas del día del diestro-1 (ver líneas abajo: *Técnica de Microinyección*). Todos estos animales fueron sacrificados en cuatro distintos horarios después de la microinyección: 17:00, 21:00, 01:00 y 05:00 h.

Tras la autopsia, los ovarios fueron disecados y pesados en balanza de precisión de 0.1 mg y homogeneizados en frío durante 2 minutos. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 40 minutos para obtener el sobrenadante, el cual se conservó en congelación para un análisis posterior de las concentraciones de los indicadores de estrés oxidativo.

Con el fin de medir las concentraciones tisulares de los indicadores de estrés oxidativo en el animal hemicastrado, se realizó la microinyección del antagonista o su vehículo a las 13:00 horas del día del diestro-1 (ver líneas abajo: *Técnica de Microinyección*). Todos estos animales fueron sacrificados a las cuatro horas después de la microinyección.

Tras la autopsia, el ovario izquierdo o derecho *in situ* fue disecado, pesado en balanza de precisión de 0.1 mg y homogeneizados en frío durante 2 minutos, de modo semejante a los animales enteros.

Otros grupos de animales hemicastrados fueron programados para el análisis histológico de los receptores dopaminérgicos y de la proteína DARPP-32. Los cuales se sacrificaron cada 24 horas después de la microinyección, a lo largo de los días del ciclo estral hasta la presencia del estro vaginal previa anestesia con una dosis letal de pentobarbital sódico (80 mg/kg peso; ip), para ser perfundidos por punción intracardiaca con 200 ml de NaCl 0.9% y 200 mL de paraformaldehído al 4 % en PBS.

Técnica de la hemicastración

Entre las 09:00 y 10:00 h del día del estro, se formaron dos grupos de animales de 56 ratas cada uno, con hemicastración derecha o izquierda. La técnica consistió en sedar a los animales con vapores de isoflurano, una vez sedados, los animales se colocaron sobre una tabla de disección; fueron afeitados del costado derecho o izquierdo retirando el pelo de la zona intercostal, desde la región de las costillas inferiores hasta la región pélvica donde se pliega la pata derecha o izquierda. En seguida, se limpió la piel con solución antiséptica de clorhexidina 2 % y posteriormente fueron sometidos a una laparotomía que consistió en realizar una incisión sagital de aproximadamente 1 cm de piel y 0.5 cm del músculo abdominal. Posteriormente con ayuda de una pinza de punta fina, se exteriorizó según el caso, el ovario derecho o el izquierdo que fue removido.

En el ovario extirpado se diseco el oviducto y se contó el número de ovocitos liberados; el ovario fue pesado en balanza de precisión y su peso expresado en miligramos/100 gramos de peso corporal.

En todos los animales hemicastrados se reanuda la toma de frotis vaginales desde el día siguiente y solo fueron elegidos para la siguiente etapa aquellos animales que presentaron al menos tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días.

Técnica de la microinyección

Grupos de ratas cíclicas enteras o hemicastradas se sometieron a una microinyección de los antagonistas dopaminérgicos o de sus vehículos, en el caso de las hemicastradas del ovario derecho o izquierdo, según el caso, fueron distribuidos en dos grupos generales de animales hemiovariectomizados de acuerdo al ovario *in situ*. De modo semejante a la técnica de

hemicastración, el ovario fue exteriorizado y sometido a la microinyección de SCH23390 o sulpiride como se narra a continuación.

Los animales fueron sedados con vapores de isoflurano a las 13:00 h del día del diestro-1. Se localizó la bursa ovárica del ovario remanente y se inyectaron 20 µL de solución de SCH23390 (5 mg/ml; Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA; Vehículo: Solución salina 0.9%) o sulpiride (10 mg/ml; Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA; Vehículo: ácido ascórbico 0.1% + 1 gota de ácido acético glacial), dentro de la bursa ovárica derecha o izquierda con una jeringa Hamilton. La microinyección se realizó con una bomba de perfusión nanomolar a una velocidad de 2.12 µL/s hasta infiltrar 20 µL de solución, seguida de 60 segundos de reposo antes de retirar de la bursa la aguja del microinyector. Cada uno de los grupos testigo fue sometido al mismo procedimiento y recibieron 20 µL de uno de los vehículos arriba indicados.

Una vez realizada la microinyección, se limpió el campo quirúrgico con solución antiséptica de clorhexidina 2% y se devolvió el órgano a la cavidad peritoneal. Las heridas fueron suturadas con seda quirúrgica y finalmente se colocó sobre la herida solución de sulfato de plata en spray como cicatrizante.

Eutanasia y autopsia general.

Todos los animales utilizados en el presente trabajo después de las manipulaciones experimentales fueron programados para eutanasia y autopsia de acuerdo con los criterios recomendados por la NOM-062-ZOO-1999. Ellos fueron sacrificados entre las 08:00 y 09:00 horas de la mañana del estro vaginal observado y sometidos, según el caso a los siguientes procedimientos: 1). Los animales asignados a la determinación de indicadores de estrés oxidativo fueron exsanguinados en un cuarto aislado y ventilado previamente sedados con vapores de isoflurano y a todos ellos se les disecaron los ovarios para ser homogenizados y centrifugados en frío para obtener los sobrenadantes para el análisis de los indicadores de estrés oxidativo. 2) Los grupos de animales hemicastrados asignados para la determinación de DARPP-32 y los receptores dopaminérgicos, fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico (80 mg/kg peso; ip) para ser perfundidos por punción cardíaca de paraformaldehído 4 % en PBS. Posterior a la

fijación, se diseccionó de inmediato el oviducto remanente, que fue inspeccionado en un estereomicroscopio para buscar signos de ovulación y la presencia de ovocitos.

Análisis de la ovulación compensadora (OC)

Para analizar el grado de OC en los animales hemicastrados sometidos a la microinyección, los datos del número de ovocitos liberados (NOL) por el ovario extirpado y del remanente se incorporan en la siguiente fórmula:

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

Perfusión intracardiaca y fijación de tejidos

Los animales designados para la identificación de los receptores dopaminérgicos y de la DARPP-32 por inmunohistofluorescencia (ver más abajo), fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital sódico (80 mg/kg peso; ip) y perfundidos por punción cardiaca con 200 ml de NaCl 0.9 % y 200 mL de paraformaldehído 4% en PBS (buffer de fosfatos: fosfato de sodio monobásico 0.1 mM y fosfato de sodio dibásico 0.1 mM, pH 7.4). Finalizada la perfusión, se extrajeron los oviductos para buscar la presencia de ovocitos y los ovarios fueron conservados en una solución de paraformaldehído 4 % a 4 °C hasta su posterior tratamiento de criopreservación.

Criopreservación de ovarios

Los ovarios obtenidos y previamente fijados fueron lavados con PBS 1X por 24 horas a 4 °C y posteriormente colocados en frascos con concentraciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30 %), manteniéndolos en inmersión durante 24 horas a 4 °C en cada solución, con el fin de prepararlos para el posterior corte histológico en frío.

Cortes histológicos

Los órganos previamente criopreservados fueron cortados a 14 micras de grosor usando un criostato (Microm HM 505 N) a una temperatura de -20 °C. Los cortes se colocaron en

portaobjetos previamente recubiertos por una capa de silano ((3-aminopropil) trietoxisilano; Sigma-Aldrich).

Inmunohistoquímica acoplada a fluorescencia

Los tejidos adheridos a los portaobjetos fueron lavados tres veces por 10 minutos con PBS 1X y delimitados con plumón hidrofóbico (ImmEdge). Posteriormente, los tejidos se permearon con Tritón X-100 al 0.5 % en PBS 1X durante treinta minutos y se bloquearon con albúmina sérica de bovino (ASB) libre de IgGs (Sigma) al 10 % en PBS 1X durante 3 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.

En la siguiente etapa, los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario en cámara húmeda durante 48 horas a 4 °C. Los anticuerpos primarios que se utilizaron en este estudio son: anti-DA1 (Santa Cruz Biotechnology) (1: 100); anti-DA2 (Santa Cruz Biotechnology) (1: 100), anti-DARPP32 (Santa Cruz Biotechnology) (1:200) por separado.

Para la inmunodetección indirecta se utilizó un anticuerpo secundario específico conjugado con fluoresceína 5-isotiocianato (FITC) (1:200) o rodamina (1:200), durante una hora a 4 °C en cámara húmeda protegidos de la luz. Finalmente, las preparaciones fueron montadas con el reactivo Vecta-Shield conjugado con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), (un intercalador de ácidos nucleicos), en un cuarto oscuro.

Las observaciones y el análisis de la inmunorreactividad se realizaron en un microscopio (Olympus BX41) acoplado a una lámpara de fluorescencia y con los filtros: azul y verde. El registro de las imágenes observadas fue llevado a cabo con una cámara digital (DFC-300 FX) acoplada al microscopio con el objetivo 10X. Las fotomicrografías obtenidas con ayuda del software Image-Pro Plus 6.3 (Media Cybernetics), se almacenaron para realizar posteriormente el análisis cualitativo de la inmunorreactividad en las células de los folículos ováricos.

La cuantificación de la marca inmuorreactiva se realizó en el software Image J del National Institutes of Health.

Cuantificación de indicadores de estrés oxidativo: Malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-alquenales (4-HDA) y nitritos (NO₂⁻)

La producción de óxido nítrico fue estimada a través del contenido del ion nitrito (NO_2^-) en los sobrenadantes de los ovarios utilizando el método de Griess. El reactivo de Griess se compone de volúmenes iguales de dihidrocloruro de N-1-naftiletilendiamino 0.1 % disuelto en agua destilada y sulfanilamida al 1.32 % disuelto en ácido acético glacial al 60 %. La absorbancia se determinó en un espectrofotómetro (Biorad SmartSpect 3000) a 540 nm. La concentración de nitritos se determinó interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de NaNO_2 (0.5 a 10 μM), la cual se determinó paralelamente en cada ensayo.

Los niveles de MDA y 4-HDA fueron cuantificados por el método de Gerard-Monnier se tomaron 100 μL del sobrenadante del ovario, se le adicionaron 650 μL de la solución 1 (compuesta de N-metil-2-fenilindol a una concentración de 10.3 mM en acetonitrilo y metanol), 100 μL de agua destilada, 150 μL de ácido metanosulfónico. Las muestras se homogeneizaron y se incubaron por una hora a 45 °C en baño maría; después de la incubación, se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos y se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro a 586 nm. La concentración de MDA y 4-HDA fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en la curva patrón de MDA (1,1,3,3-tetrametoxipropano de 0.5 a 5 μM), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo

Análisis estadístico

Los resultados del porcentaje de OC fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; en aquellos en que se compararon pares de medias, se utilizó la U de Mann-Whitney. La cuantificación de la marca de DARPP-32, RDA1, RDA2, MDA + 4HDA y NO_2^- fueron sometidos a análisis de varianza múltiple seguido de la prueba de Tukey. En todos los casos se consideró estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad sea menor o igual al 0.05.

RESULTADOS

Ovulación compensadora (OC) del ovario remanente

En el grupo de animales hemicastrados sacrificados al día del estro vaginal se evaluó la duración del ciclo estral y la OC después de la microinyección de los antagonistas dopaminérgicos, tanto en aquellos con el ovario izquierdo *in situ* como en los que permanecieron con el ovario

derecho *in situ*. Se observó un aumento en la duración del ciclo estral en los animales que recibieron la microinyección con sulpiride, el antagonista de los RDA2, independientemente del ovario que permaneció *in situ*, el ciclo estral tuvo una duración de 5.0 ± 0.0 días (n=6) respecto a los 4.0 ± 0.0 días (n=6) en el grupo control (ácido ascórbico) y en el grupo testigo (n=10); animales hemicastrados sin microinyección). Por otra parte, el efecto de SCH23390, antagonista de RDA1, indujo un retraso significativo en la aparición del estro vaginal en 4.8 ± 0.2 días (n=7) en comparación al grupo control (solución salina) y al grupo testigo de 4.0 ± 0.0 días.

El grado de OC que desarrollaron los grupos testigo hemicastrados del ovario izquierdo o del derecho fue semejante (ovario derecho *in situ*: 164.3 ± 26.6 vs ovario izquierdo *in situ*: 149.5 ± 27.1 , ns). La microinyección de sulpiride tiende a disminuir el grado de OC en el grupo con ovario derecho *in situ* (sulpiride(n=6): 65.4 ± 14.3 % OC vs vehículo (n=6): 145.8 ± 18.2 % OC; $p < 0.002$, U de Mann-Whitney), lo que no ocurrió cuando se administró el SCH23390. No se observaron diferencias significativas en la OC entre los grupos con ovario izquierdo *in situ* (Tabla 3).

Tabla 3. Media de la duración del ciclo estral en días \pm e.e.m. y porcentaje de la ovulación compensadora \pm e.e.m. de los animales hemicastrados (HX) del ovario derecho o izquierdo que se sacrificaron en la mañana del estro vaginal observado entre las 09:00 y 10:00 h luego de recibir una microinyección de sulpiride o de SCH23390 dentro de la bursa ovárica del ovario remanente, con sus respectivos vehículos (* $P < 0.05$, U de Mann-Whitney).

Tratamiento	Duración del Ciclo Estral (días)	Ovario <i>in situ</i>	% Ovulación Compensadora
Ácido ascórbico	4.0 ± 0.0	derecho	145.8 ± 18.2
Sulpiride	$5.0 \pm 0.0^*$		$65.4 \pm 14.3^*$
Ácido ascórbico	4.0 ± 0.0	izquierdo	120.8 ± 16.4
Sulpiride	$5.0 \pm 0.0^*$		99.9 ± 16.2
Solución salina	4.0 ± 0.0	derecho	147.9 ± 34.3
SCH23390	$4.8 \pm 0.2^*$		77.4 ± 19.6
Solución salina	4.0 ± 0.0	izquierdo	101.5 ± 14.1
SCH23390	$4.8 \pm 0.2^*$		47.3 ± 22.8
HX sin microinyección	4.0 ± 0.0	derecho	164.3 ± 26.6
	4.0 ± 0.0	izquierdo	149.5 ± 27.1

Receptor dopaminérgico tipo 1 (RDA1), tipo 2 (RDA2) y DARPP-32

Con la finalidad de caracterizar el patrón de la presencia de los receptores RDA1, RDA2 y DARPP-32 a lo largo del ciclo estral en el modelo de la rata hemicastrada, se muestra la marca

inmunorreactiva positiva de los receptores RDA1, RDA2 y de la proteína DARPP32 por inmunofluorescencia en cortes de tejido ovárico a lo largo de los cuatro días del ciclo estral en animales hemicastrados del ovario derecho o del ovario izquierdo sin tratamiento, se presenta a continuación.

El análisis del RDA1 a lo largo del ciclo estral en los animales hemicastrados intactos reveló que el receptor se presenta en todos los días del ciclo estral, en ambos ovarios. Sin embargo, la marca disminuye hacia el día del proestro tanto para el ovario derecho *in situ* como para el ovario contralateral (Figura 12a, 13a y 14a).

Al analizar el RDA2 por día del ciclo en el grupo testigo hemicastrado intacto, se observaron cambios que dependen del ovario que permanece *in situ*. En los animales hemicastrados intactos con ovario derecho *in situ*, solo en el día del estro se encontró marcaje positivo en los folículos ováricos, tanto en las células de la granulosa e incluso en tejido intersticial; en los otros días del ciclo no se observó marcaje. En cambio, dicha expresión ocurrió únicamente en el día del diestro-1 en los grupos con el ovario izquierdo *in situ* en los mismos compartimentos ováricos (Figuras 12b, 13b y 14b).

Se encontró clara presencia de la proteína DARPP-32 en células de la granulosa de los folículos ováricos, en los grupos testigo hemicastrados con ovario derecho *in situ* en los cuatro días del ciclo estral (Figura 14c). Sin embargo, se encontró una mayor marca para la proteína en el día del estro comparado con los demás días del ciclo estral. También se observa un descenso gradual de la expresión de la DARPP-32 hasta el diestro-2, misma que se mantiene hasta el proestro (Figura 14c).

En el ovario izquierdo *in situ* la proteína DARPP-32 se expresa a lo largo de todo el ciclo estral en células de la granulosa (Figura 14c). DARPP-32 presentó una expresión parecida en los cuatro días del ciclo, sin mostrar un aumento estadísticamente significativo hacia el día del estro como se observó para el ovario derecho *in situ* (Figura 14c)

Cabe indicar que al comparar los cambios en la expresión de esta proteína entre los ovarios *in situ*, en el día del estro se observa que el ovario derecho presenta una expresión tres veces mayor en el día del estro comparada al ovario izquierdo (Figura 14c).

OVARIO DERECHO

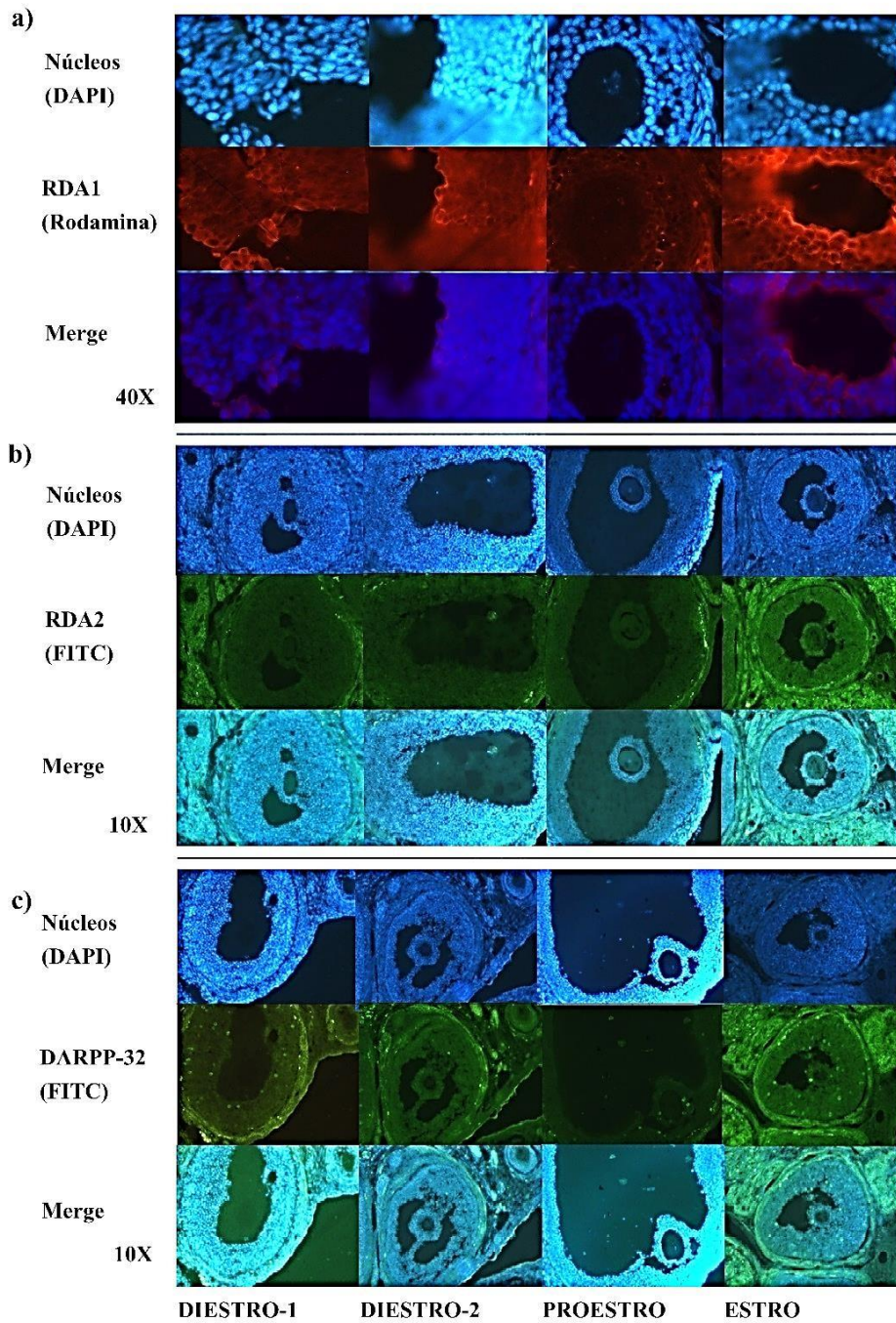


Figura 12. Patrón de la presencia de RDA1, RDA2 y DARPP-32 en el ovario derecho in situ a lo largo del ciclo estral en ratas hemicastradas con ovario derecho in situ sin tratamiento. a) Receptor dopaminérgico tipo 1 (RDA1), b) Receptor dopaminérgico tipo 2 (RDA2) y c) DARPP-32. Se observa en azul los núcleos teñidos con DAPI, en rojo el RDA1 teñido con rodamina, en verde el RDA2 y DARPP-32 teñidos por separado con FITC y la colocalización de ambas imágenes (merge).

OVARIO IZQUIERDO

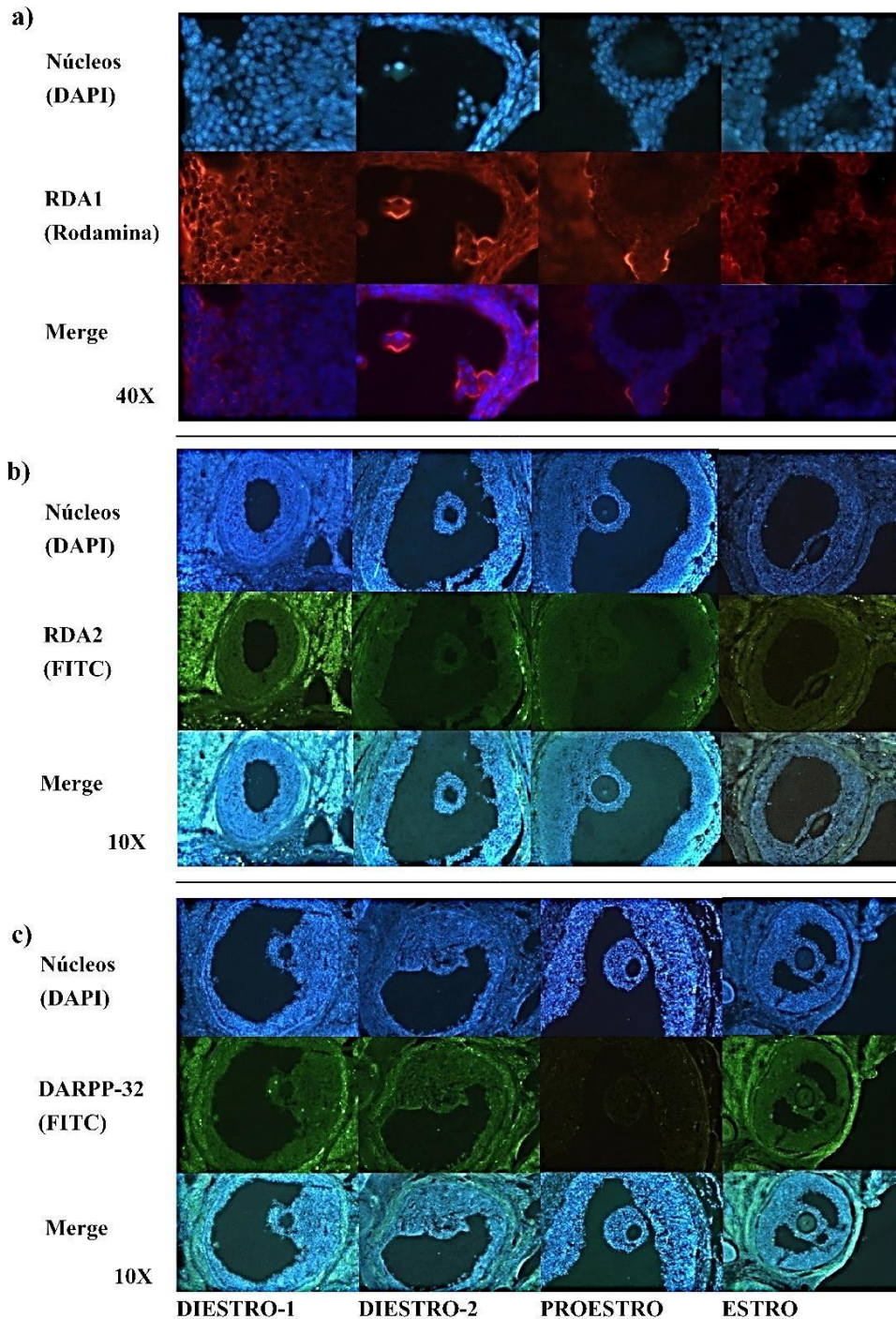


Figura 13. Patrón de presencia de RDA1, RDA2 y DARPP-32 en el ovario derecho in situ a lo largo del ciclo estral en ratas hemicastradas con ovario izquierdo in situ sin tratamiento: a) Receptor dopaminérgico tipo 1 (RDA1), del b) Receptor dopaminérgico tipo 2 (RDA2) y c) DARPP-. Se observa en azul los núcleos teñidos con DAPI, en rojo el RDA1 teñido con rodamina, en verde el RDA2 y DARPP-32 teñidos por separado con FITC y la colocalización de ambas imágenes (merge).

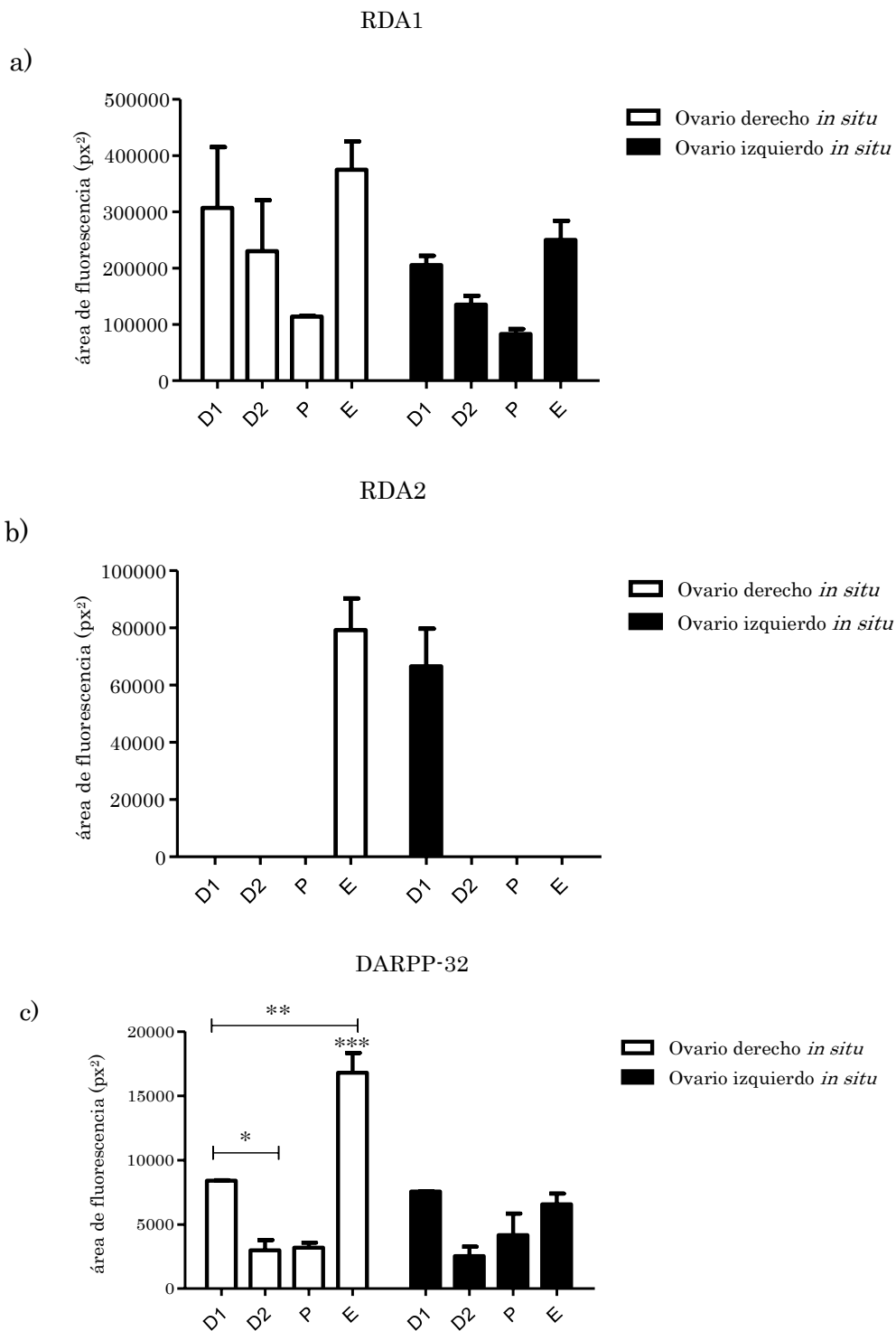


Figura 14. Cuantificación de la marca positiva del RDA1, RDA2 y DARPP-32 a lo largo del ciclo estral en la rata adulta hemicastrada del ovario derecho o izquierdo *in situ*. Media \pm e.e.m del número de píxeles al cuadrado (px²). a) receptor dopaminérgico tipo 1 (RDA1), b) receptor tipo 2 (RDA2) y c) DARPP-32. Las columnas en blanco muestran los datos para el ovario derecho y en negro para el ovario izquierdo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$; ANOVA de una vía seguida de prueba de prueba de Tukey-Kramer).

Efecto del bloqueo farmacológico del receptor dopaminérgico tipo 2 (RDA2) sobre la expresión del RDA2 y DARPP-32

Como se muestra en la Tabla 3, el ciclo estral de los animales hemicastrados con ovario derecho o izquierdo *in situ* luego del tratamiento con sulpiride se alargó un día que nombramos como “diestro-3”, por la citología vaginal característica del día del diestro.

Al analizar la presencia del RDA2 en los animales microinyectados con sulpiride no se detectó inmunomarcaje positivo para el receptor RDA2 en ninguno de los compartimentos ováricos analizados a lo largo del ciclo estral en ambos ovarios *in situ*, incluso en los grupos tratados con el vehículo (Figura 15a y 16a).

Respecto a la proteína DARPP-32, se observó marcaje positivo en las células de la granulosa de los folículos en el ovario derecho *in situ* (Figura 16b). Sin embargo, la marca inmunorreactiva es significativamente mayor en el “diestro-3” comparada con los otros días del ciclo tratados con el antagonista y los grupos con vehículo (Figura 17a).

En el caso de los animales hemicastrados con ovario izquierdo *in situ* tratados con sulpiride, la proteína DARPP-32 también se expresó en todos los días del ciclo estral (Figura 16b). También se observó un incremento de la marca positiva de la proteína, aunque no estadísticamente significativo, en el día del “diestro-3” respecto a los otros días del ciclo y con su vehículo. No se encontraron cambios aparentes cuando se comparan ambos ovarios (Figura 17b).

No se encontraron cambios entre los grupos vehículos y los animales hemicastrados sin microinyección.

OVARIO DERECHO

ÁCIDO ASCÓRBICO

SULPIRIDE

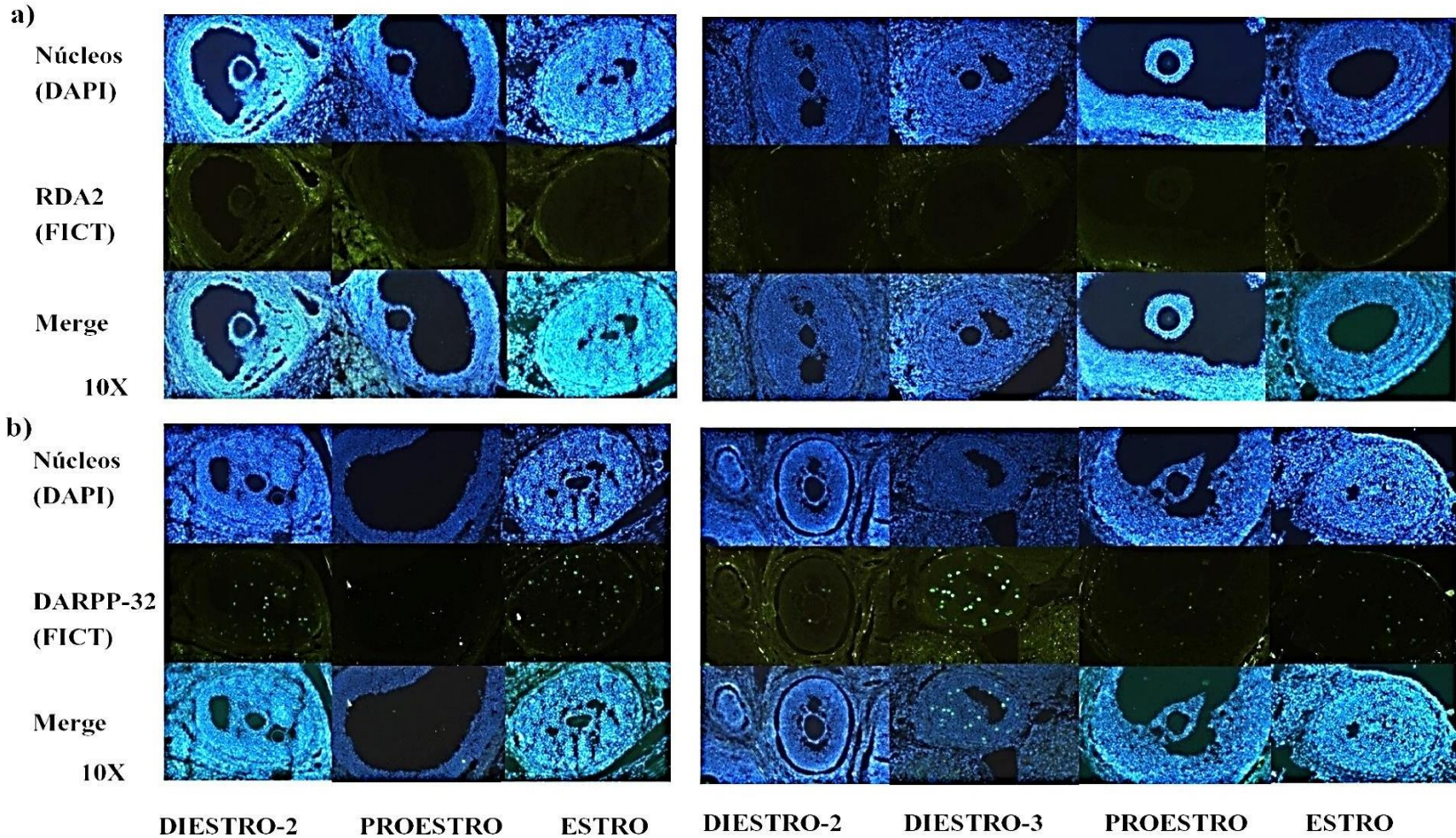


Figura 15. Seguimiento de la marca positiva del RDA2 y de DARPP-32 a lo largo del ciclo estral en ratas hemicastradas con ovario derecho in situ después de una microinyección de sulpiride o su vehículo (ácido ascórbico) realizada en el diestro-1: a) Receptor dopaminérgico tipo 2 (RDA2) y b) DARPP-32. Se observa en azul los núcleos teñidos con DAPI, en verde el receptor DA2 y DARPP-32 teñido con FITC por separado.

OVARIO IZQUIERDO

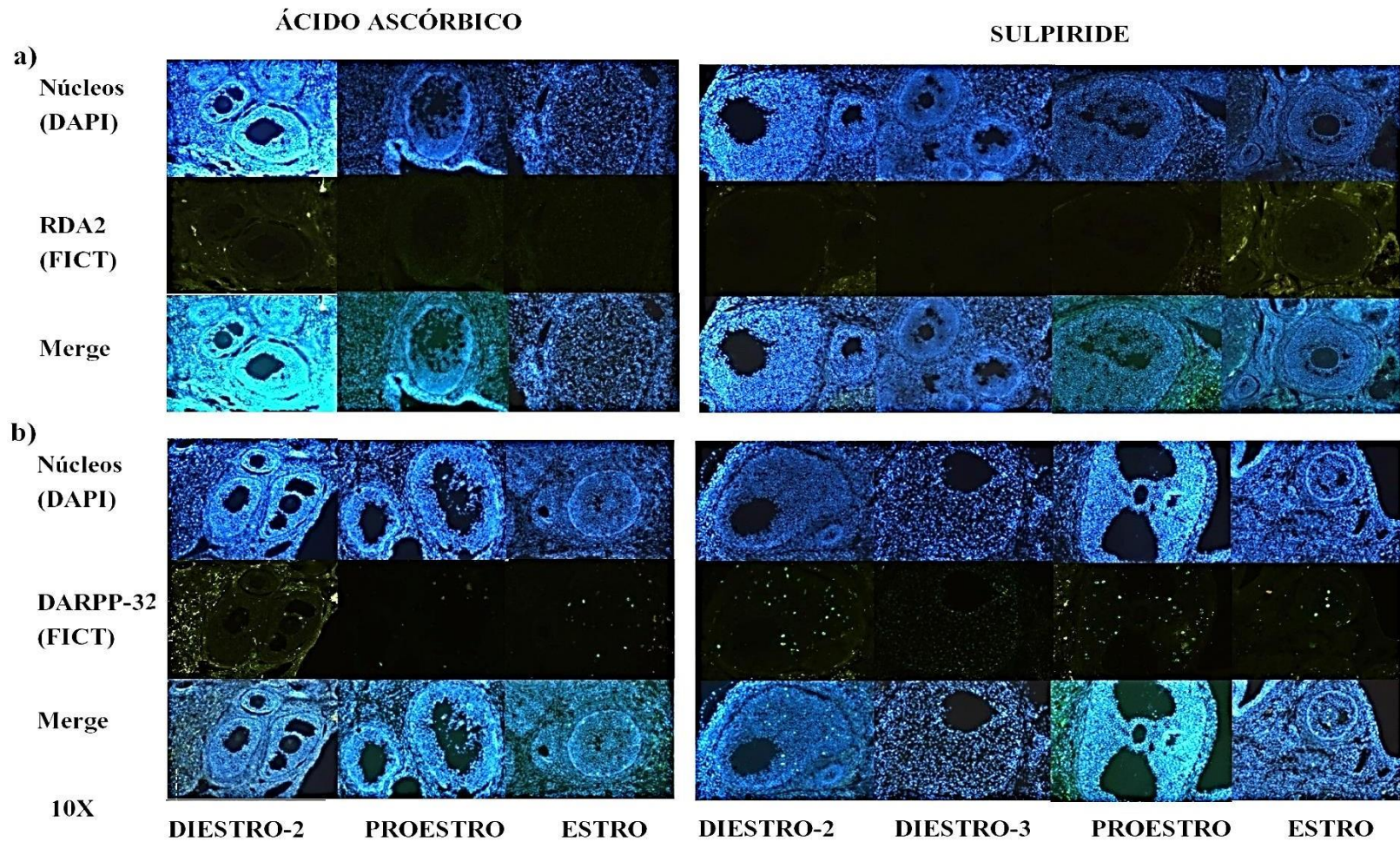
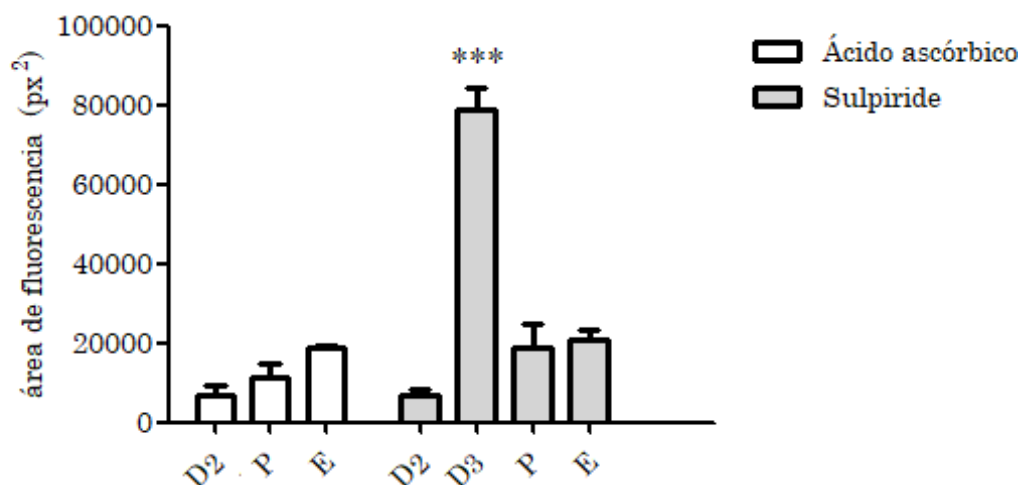


Figura 16. Seguimiento de la marca positiva del RDA2 y de DARPP-32 a lo largo del ciclo estral en ratas hemicastradas con ovario izquierdo in situ después de una microinyección de sulpiride o su vehículo (ácido ascórbico) realizada en el diestro-1: a) Receptor dopaminérgico tipo 2 (RDA2) y b) DARPP-32. Se observa en azul los núcleos teñidos con DAPI, en verde el receptor DA2 y DARPP-32 teñido con FITC por separado.

DARRP-32

a)

OVARIO DERECHO *IN SITU*



b)

OVARIO IZQUIERDO *IN SITU*

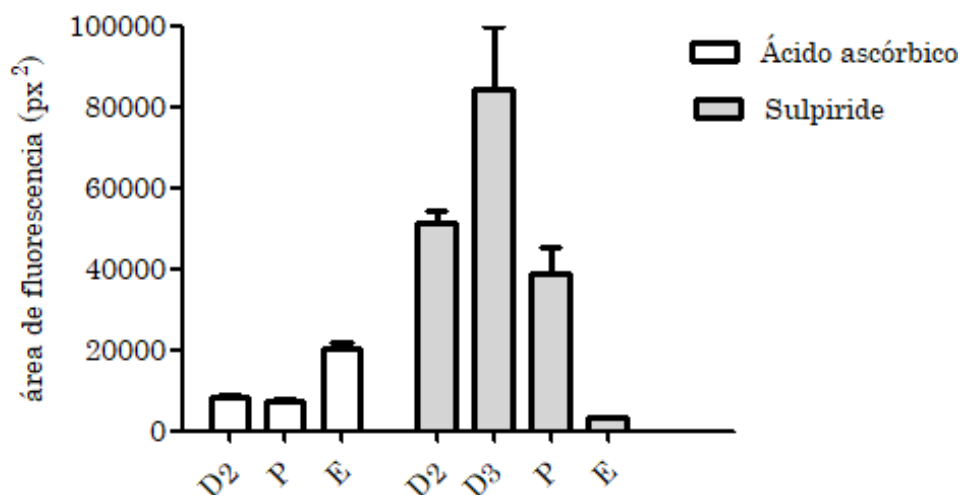


Figura 17. Cuantificación de la marca de DARPP-32 después de la microinyección de sulpiride a lo largo del ciclo estral en ratas hemicastradas con ovario derecho o izquierdo in situ. Media \pm e.e.m del número de píxeles al cuadrado (px²) de la expresión de DARPP-32 a) Ovario derecho in situ y b) Ovario izquierdo in situ. Se observa en blanco los datos para el vehículo (ácido ascórbico) y en gris para el antagonista de RDA2 (sulpiride). (***) $P < 0.001$. ANOVA de una vía seguida de prueba de prueba de Tukey-Kramer).

Efecto del bloqueo farmacológico del receptor dopaminérgico tipo 1 (RDA1) sobre la expresión del RDA1

La microinyección de ácido ascórbico no modificó la expresión del receptor RDA1 en el animal hemicastrado. Al comparar la expresión del receptor cuando se antagoniza con SCH23390, aparentemente no se observaron diferencias significativas entre los grupos testigo ni entre los ovarios *in situ* (Figura 18 y 19). No se encontraron cambios entre los grupos vehículos y los animales hemicastrados sin microinyección.

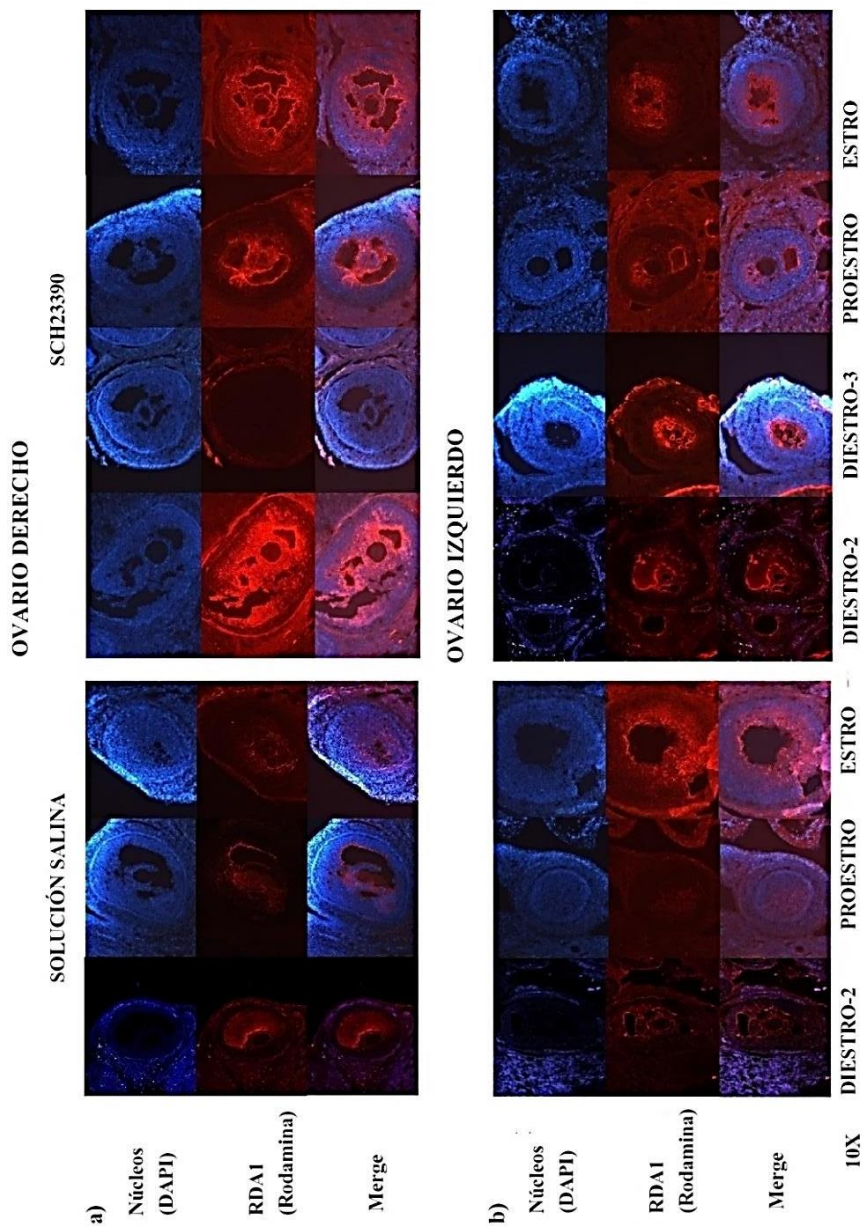


Figura 18. Seguimiento de la presencia del receptor dopaminérgico tipo 1 (RDA1) a lo largo del ciclo estral en ratas hemicastradas con a) ovario derecho o con b) ovario izquierdo *in situ* después de una microinyección de SCH23390 o su vehículo (solución salina isotónica) realizada en el diestro-1. Se observa en azul lo núcleos teñidos con DAPI, en rojo el RDA1 teñido con rodamina.

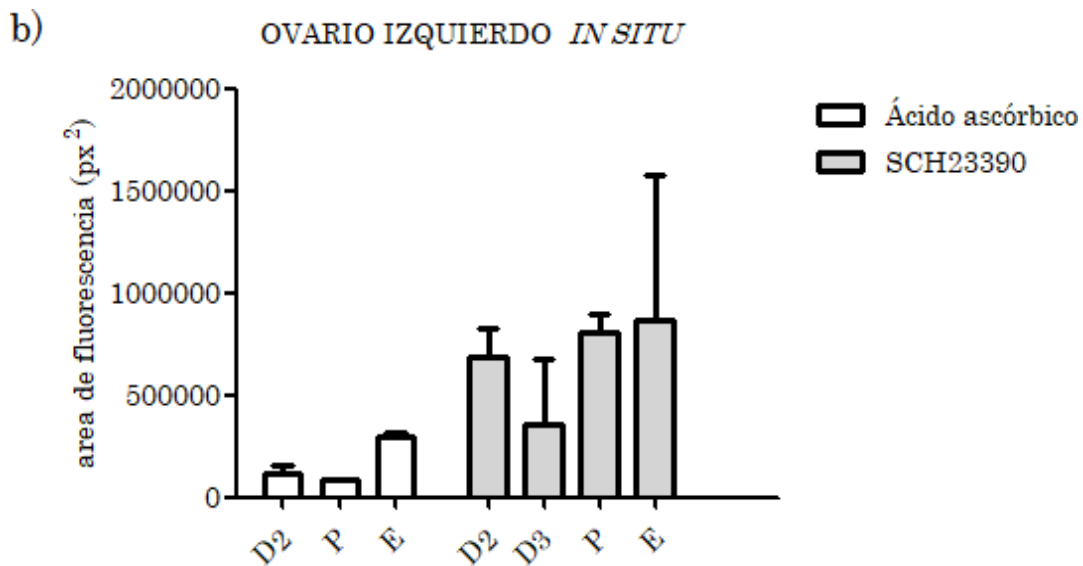
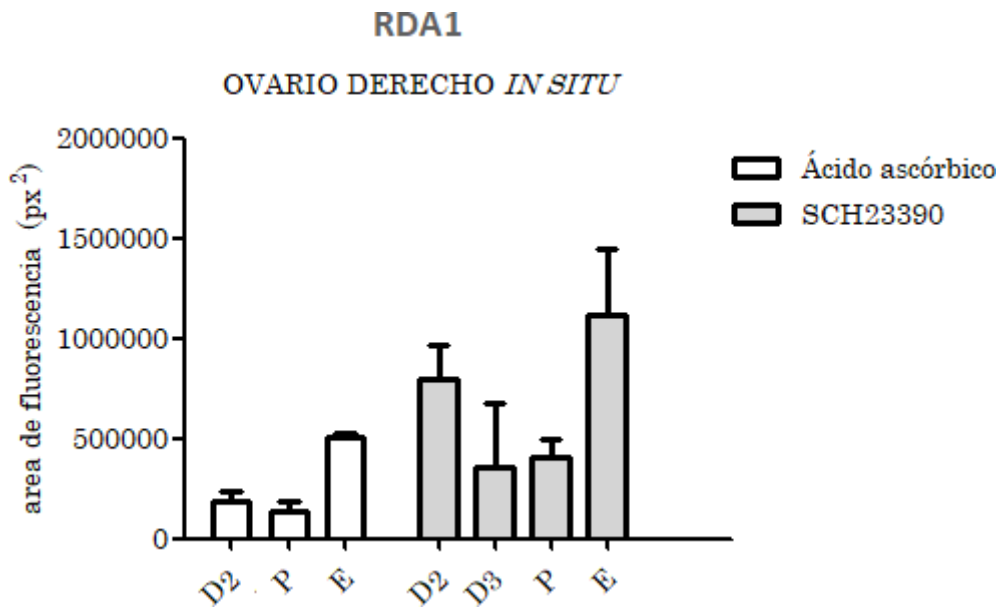


Figura 19. Cuantificación de la marca positiva del RDA1 después de la microinyección de SCH23390 a lo largo del ciclo estral en ratas hemicastradas con ovario derecho o izquierdo *in situ*. Media \pm e.e.m del número de píxeles al cuadrado de la expresión del receptor dopaminérgico 1 (RDA1. a) Ovario derecho o b) Ovario izquierdo *in situ*. Se observa en blanco los datos para el vehículo (ácido ascórbico) y en gris para el antagonista RDA1 (SCH23390).

Indicadores de estrés oxidativo en el ovario

La Figura 20 muestra los datos de las concentraciones de MDA y 4-HDA como marcadores de lipoperoxidación y de nitritos como marcador de la formación de óxido nítrico en animales enteros. Se observó un aumento en la generación de marcadores de lipoperoxidación y de la formación de nitritos después de la microinyección con los antagonistas de los receptores RDA1 y RDA2. El aumento en la lipoperoxidación cuando se utilizó el antagonista RDA1, se presentó doce horas después de la microinyección y se mantuvo hasta las diez y seis horas después. En el caso del antagonista RDA2, el incremento en la lipoperoxidación inicio cuatro horas después de la administración del sulpiride y se mantuvo hasta dieciséis horas después (Figura 20a).

En cuanto a la generación de nitritos, se encontraron cambios que dependieron del tipo de antagonismo, ya que se observaron incrementos a las cuatro horas posteriores a la microinyección del sulpiride, pero hasta las doce horas posteriores a la administración del SCH23390 (Figura 20b).

Los parámetros medidos en los animales hemicastrados, mostraron un incremento en la generación de nitritos después de la hemicastración únicamente en el grupo de animales con ovario izquierdo *in situ* comparado con el ovario *in situ* contralateral y con los otros grupos experimentales (Figura 21b). Esto último significa que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas después la microinyección de los antagonistas o sus vehículos, en ningún parámetro evaluado. Sin embargo, se observó una tendencia en el aumento de la lipoperoxidación en el ovario derecho *in situ* (Figura 21a) mientras que en la formación de nitritos no hay cambios aparentes (Figura 21b).

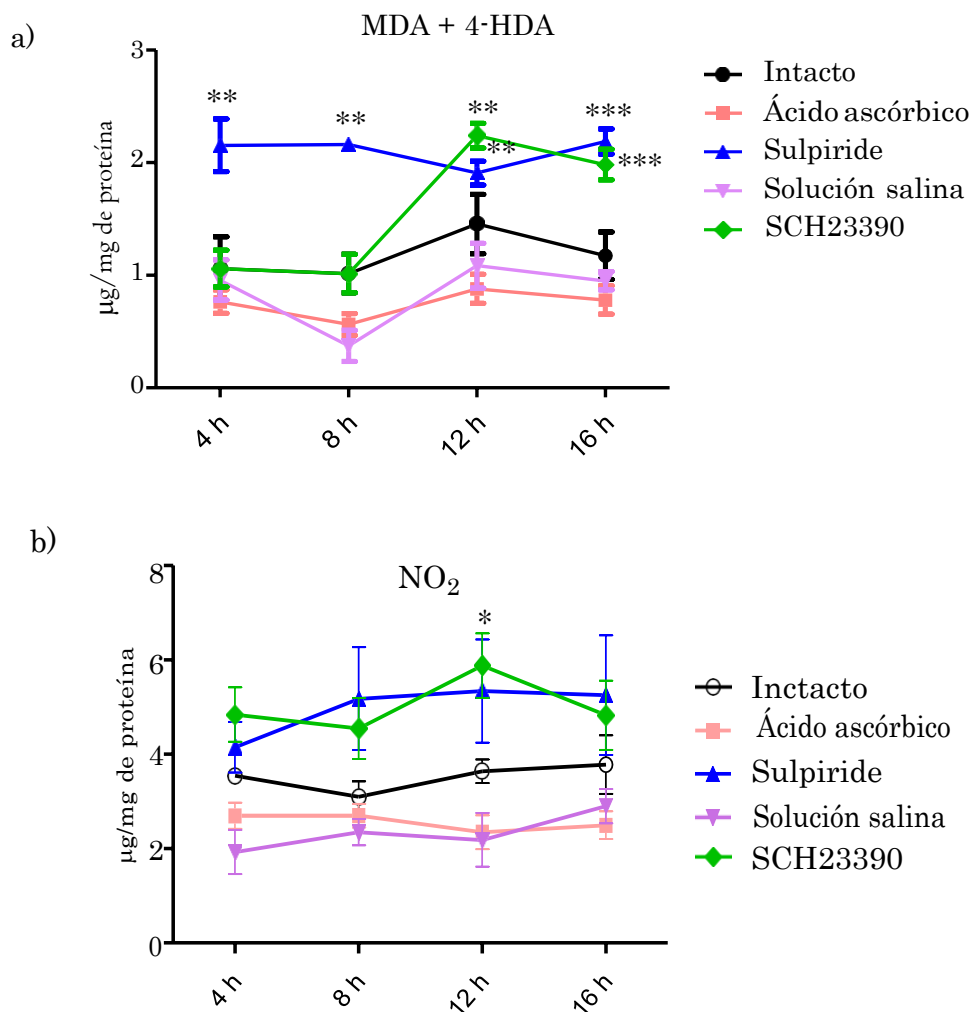


Figura 20. Efecto de la microinyección de los antagonistas dopaminérgicos o sus vehículos en las bursas ováricas sobre la media \pm e.e.m. de las concentraciones de: a) indicadores de lipoperoxidación (MDA + 4-HDA) y b) De la generación de b) nitritos (NO₂) en los ovarios frescos de ratas hembras adultas enteras con ciclos estrales regulares de cuatro días. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p > 0,001$ comparado con su vehículo; ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey-Kramer). Nota: Los animales se dividieron en cinco grupos generales de experimentación; animales intactos (sin microinyección), ácido ascórbico (vehículo), sulpiride (antagonista RDA2), solución salina (vehículo) y SCH23390 (antagonista RDA1). A su vez estos grupos se dividieron en cuatro horarios diferentes después de la microinyección.

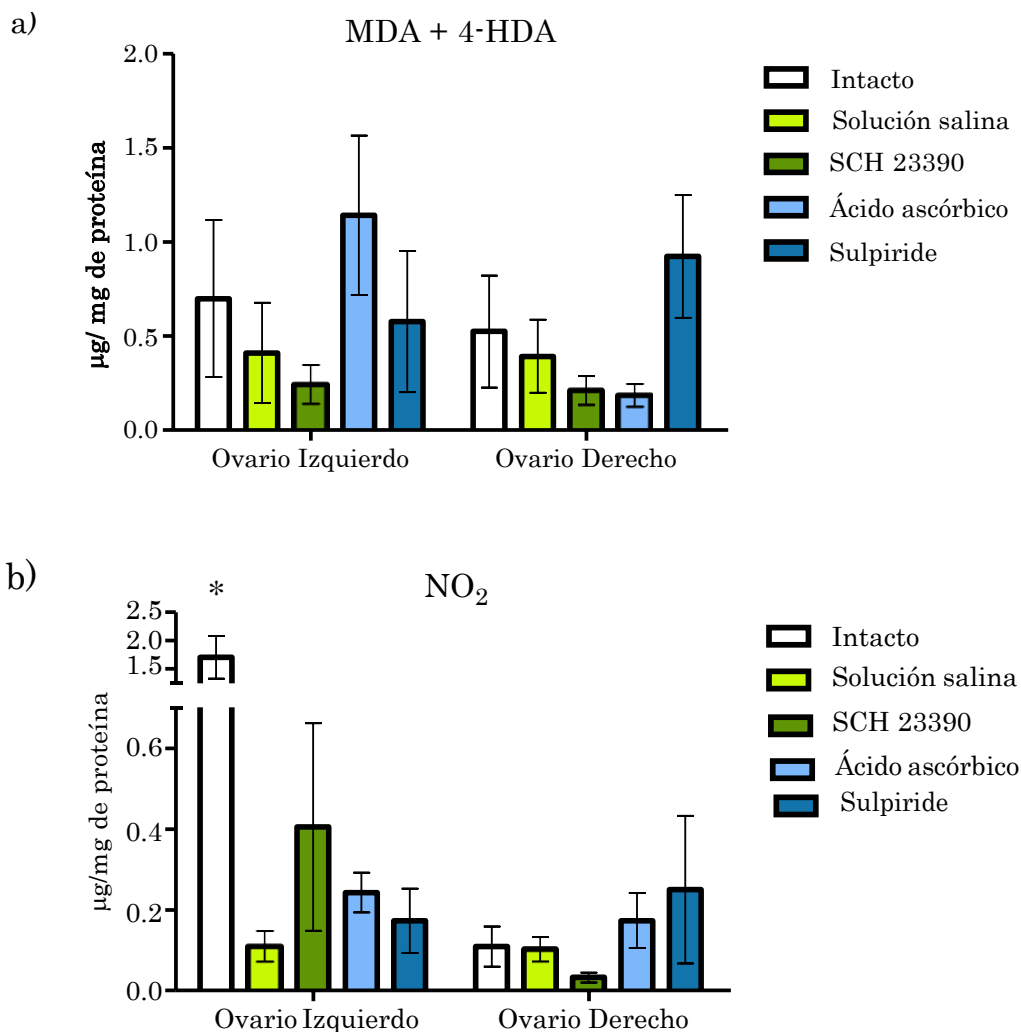


Figura 21. Efecto de la microinyección de los antagonistas dopaminérgicos o sus vehículos en la bursa ovárica sobre la media \pm e.e.m. de las concentraciones de a) indicadores de lipoperoxidación (MDA + 4-HDA) y de la generación de b) nitritos (NO₂) en el ovario remanente de ratas hemicastradas con ciclos estrales regulares de cuatro días. (* $p < 0.05$, comparado con todos los grupos; ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey-Kramer). Los animales se dividieron en cinco grupos generales de experimentación; animales intactos (sin microinyección), ácido ascórbico (vehículo), sulpiride (antagonista RDA2), solución salina (vehículo) y SCH23390 (antagonista RDA1). Estos animales fueron sacrificados cuatro horas después de la microinyección.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados del presente estudio muestran que el bloqueo local de los receptores a la dopamina en el modelo del animal hemicastrado induce cambios en la duración del ciclo estral, en el grado de ovulación compensadora que dependen del tipo de receptor dopaminérgico comprometido, así como del ovario que permanece *in situ*.

El receptor dopaminérgico tipo 2 (RDA2) actúa de forma lateralizada sobre la ovulación compensadora del ovario (OC)

Hemos mostrado que ocurre una disminución de la OC después de la microinyección con sulpiride solamente cuando permanece el ovario derecho *in situ* (Letras et al, 2016); los resultados del presente estudio confirman la tendencia hacia la disminución de la OC en el mismo ovario, lo que sugiere una asimetría en el funcionamiento del sistema dopaminérgico ovárico mediado por el receptor RDA2. Sin embargo, esto no ocurrió cuando se antagonizó el receptor RDA1, ya que la OC fue semejante entre ambos ovarios *in situ* después de la microinyección con SCH23390.

Se sabe que el receptor RDA2 se expresa en el ovario de la rata (Rey-Ares et al, 2007; Ferrero et al, 2014;) sin embargo, no se había analizado en el modelo del animal hemicastrado ni a lo largo del ciclo estral. Cuando se analizó la expresión del receptor RDA2, se observó que ocurre de manera asimétrica, ya que se encontró en el ovario derecho *in situ* solo en el día del estro, mientras que para el ovario izquierdo *in situ* su expresión se presentó en el día del diestro-1. Esta observación refuerza nuestros resultados obtenidos por el análisis de la OC, donde tales cambios se podrían explicar por una distribución asimétrica de los receptores, que varían a lo largo del ciclo estral y del ovario *in situ*. También la expresión diferencial del receptor RDA2 coincide con los resultados reportados por nuestro grupo de investigación para el animal entero, donde se mostró que su antagonismo en el día del estro y diestro-1 retrasó la presencia del estro vaginal, pero no mostró cambios cuando éste se realizó en el día del proestro (Venegas et al, 2015), día en el cual no se encontró el receptor.

Si bien es cierto que al analizar la presencia del receptor RDA1 y de la DARPP-32, se encontraron en todos los días del ciclo estral en los animales hemicastrados, en el ovario derecho *in situ* la proteína DARPP-32 se encuentra en su forma activa con mayor presencia en el día del estro y diestro-1 en comparación con el ovario izquierdo *in situ* ovárico (Letras et al, 2016). En un estudio previo, ya se mostró que al administrar un antagonista del receptor RDA2 en el estro y diestro-1 se disminuyó la OC del ovario derecho *in situ* sin afectar al ovario contralateral. Con base en los resultados del presente trabajo, se puede inferir que en el día del estro y diestro-1 son los de mayor actividad del receptor RDA1, mostrado por el incremento en la expresión de DARPP-32 activa. Los resultados del presente estudio corroboran la existencia de asimetrías a nivel del sistema dopaminérgico ovárico (Letras et al, 2016). Los resultados obtenidos en el animal entero

corroboran esta hipótesis, donde en el día del estro se encuentra la mayor cantidad de marca positiva a la proteína DARPP-32 la cual disminuye hacia el día del estro (Flores Bautista, 2018).

El receptor dopaminérgico tipo 2 regula la activación de DARPP-32 en las células del folículo ovárico

Nuestros resultados indican que al antagonizar al receptor RDA2 se presenta un día más de diestro vaginal (“diestro-3”), caracterizado por una marcada presencia de la proteína DARPP-32 en el tejido ovárico inducida por el bloqueo del receptor. Como se ha mostrado, el receptor RDA2 regula a la DARPP-32 por medio de su inactivación (Chio et al, 1994; Greengard et al, 1999) por lo que al encontrarse inhibido, el receptor provoca una mayor activación de la DARPP-32, como se observó en el día del “diestro-3” en nuestros grupos experimentales. La capacidad reguladora de la DARPP-32 después del antagonismo, es diferente para cada ovario donde la gónada izquierda responde de manera inmediata mientras que la derecha manifiesta esta respuesta hasta 48 horas después de la microinyección (figura 17); esto nos sugiere, que además de una asimetría a nivel del sistema dopaminérgico ovárico, también existe una capacidad de respuesta diferente por parte de los ovarios a un mismo estímulo como se ha observado en el modelo del animal hemicastrado (Domínguez et al, 2003)

Además, nuestros resultados explicarían también los cambios observados en el grado de OC, donde al antagonizar al receptor RDA2 en el día del diestro-1, un día de alta actividad dopaminérgica en el ovario derecho *in situ* demostrado por el aumento de DARPP-32, la OC disminuye solo en el ovario derecho *in situ*. Esto nos sugiere que al bloquear al receptor RDA2, provocaría la desregulación de la vía de señalización dopaminérgica mediada por el receptor RDA1, ya que al no permitir la inhibición del adenilato ciclasa da como resultado un incremento en la actividad de la enzima. Así, se incrementaría la concentración de AMPc y con ello, la activación de PKA misma que conduce en la activación de la DARPP-32 (Mayerhofer et al, 1999), teniendo efectos “rio abajo” de la vía (Greengard et al, 1999) que podrían resultar en alteraciones que provocarían la disminución en la OC.

El receptor dopaminérgico tipo 1 incrementa su expresión después del antagonismo

La expresión del receptor DA1 disminuye gradualmente hasta alcanzar su mínimo grado en la mañana del proestro, independientemente del ovario que permaneció *in situ*. El

antagonismo inducido por la microinyección de SCH23390 en ambos ovarios *in situ*, produjo cambios en la expresión del receptor observándose un incremento, aunque no estadísticamente significativo, en el grado de marcaje al día siguiente del bloqueo farmacológico para desaparecer en el "diestro-3" y luego volver a expresarse en la fase folicular. Llama la atención el hecho que la OC se observó relativamente disminuida. En la rata, la dopamina ovárica a través de la unión al receptor RDA1 está relacionada con la producción de progesterona; la administración de SCH23390 fue capaz de disminuir la concentración de progesterona, pero curiosamente no se observó ningún efecto mediado por el receptor RDA2 (Mori et al, 1994). Con base en este dato, la disminución en la concentración de progesterona provocaría la desregulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en la fase lútea, momento en la que se antagonizó el receptor por lo que, de ocurrir así, sería interesante medir las concentraciones de progesterona en el modelo del animal hemicastrado con el fin de buscar si existen diferencias entre ambos ovarios.

El antagonismo de los receptores dopaminérgicos incrementa el estrés oxidativo en el ovario: efectos en el animal entero o hemicastrado

Los cambios observados en los marcadores de lipoperoxidación en el animal entero se podrían explicar por el incremento en el metabolismo de la dopamina. Se ha mostrado que después de la microinyección del antagonista dopaminérgico haloperidol se incrementó la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de dopamina, lo que fue interpretado como indicador del incremento en la síntesis de dopamina (Venegas et al, 2015). Así, el exceso incrementaría el metabolismo de la propia dopamina, lo cual generaría la producción de peróxido de hidrógeno, producto proveniente de su metabolismo. Nuestros resultados muestran además que existen cambios temporales en la expresión en la generación de los metabolitos del estrés oxidativo que dependen del tipo de receptor involucrado, ya que el sulpiride incrementó la concentración de estos indicadores a partir de las cuatro horas y la sostiene hasta dieciséis horas después del bloqueo del receptor RDA2; en cambio, el SCH23390 incrementó la producción de los indicadores de lipoperoxidación hasta doce horas después de antagonizar al receptor RDA1. Se ha mostrado que el sulpiride posee la capacidad de unirse al receptor RDA2 de manera competitiva además de ser un antagonista selectivo, teniendo nula interacción con los demás receptores RDA a excepción del RDA3 (*DrugBank database*) lo que

explicaría el efecto inmediato sobre la generación de los indicadores de lipoperoxidación, con efectos prolongados en el tejido. De cualquier forma, independientemente del receptor dopaminérgico, que se antagonice, existe un incremento en la generación de los indicadores de estrés oxidativo, lo que a su vez sería el reflejo de una mayor producción de especies reactivas de oxígeno.

Respecto a las concentraciones de nitritos en el tejido ovárico de animales enteros, su presencia se incrementó a partir de las cuatro horas y se sostiene en niveles relativamente elevados hasta por dieciséis horas, independientemente del tipo de receptor dopaminérgico bloqueado. Los cambios significativos también ocurrieron en los mismos horarios donde se incrementaron los indicadores de lipoperoxidación. Esto es relevante, ya que el óxido nítrico está asociado al bloqueo de la P450-aromatasa y disminución de las concentraciones de estrógenos (Sela-Abramovich et al, 2008).

Se ha postulado que el papel de las especies reactivas de oxígeno en el ovario es de suma importancia, ya que son señales químicas necesarias para que se lleve a cabo la ovulación (Finkel, 2011; Shkolnik et al, 2011) y su desbalance está asociado a patologías ováricas e infertilidad (Polak et al, 2001; Ebisch et al, 2006). De manera indirecta, nuestros resultados muestran un incremento de las especies reactivas de oxígeno que determinan el aumento en la tasa de lipoperoxidación, lo que conduciría al daño celular, pudiendo incrementar la atresia folicular, como ya se mostró en un estudio previo de nuestro grupo de investigación en animales tratados con haloperidol (Ramírez-Ávila, 2001), lo que produciría disminución en la producción de hormonas esteroides por parte de las células del folículo ovárico y con ello, modificación en el funcionamiento normal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario; todo esto, podría explicar el retraso de la ovulación que encontramos al administrar los antagonistas específicos.

En el modelo del animal hemicastrado también existen cambios aparentes en la generación de indicadores de estrés oxidativo entre el ovario derecho *in situ* respecto al izquierdo, donde se observó un incremento cuatro horas después de la microinyección del sulpiride, de modo semejante a lo ocurrido en el animal entero. Estos cambios pueden ser explicados por la distribución asimétrica del receptor RDA2, tal y como se mostró en el presente

estudio, ya que el receptor RDA2 se expresa de manera diferencial dependiendo del ovario que permanece *in situ* y del día del ciclo estral.

La generación de nitritos no mostró cambios entre los ovarios remanentes después de la microinyección de los antagonistas. Llama la atención que este parámetro en los animales hemicastrados sin tratamiento, presentó una diferencia notablemente significativa entre los ovarios remanentes; si bien la concentración de indicadores de peroxidación fue semejante entre los ovarios, la concentración de nitritos en el ovario izquierdo *in situ* fue mucho mayor que la detectada en el ovario derecho *in situ*.

Papel de los receptores dopaminérgicos en el contexto general de las funciones ováricas

El papel funcional de los receptores dopaminérgicos en el ovario es importante para que la integración endocrina y neuroendocrina que coordina el eje hipotálamo-adenohipófisis-gónada ocurra de manera cíclica y sincrónica con el evento ovulatorio y la receptividad sexual de la hembra (Domínguez et al, 1987; Venegas et al, 2015; Mani et al, 2001). Nuestros resultados apoyan esta idea porque de acuerdo con nuestras observaciones, el receptor RDA1 y DARPP-32 se incrementan gradualmente hacia el día del estro, es decir, presentan un comportamiento cíclico que coincide con el periodo periovulatorio. En cambio, el receptor RDA2 aparentemente solo debe expresarse en momentos críticos del ciclo estral como un modulador del receptor RDA1, ya que solo se expresó en el estro y diestro-1.

La evidencia permite suponer que los RDA2 y la regulación mediada por DARPP-32 participan de manera asimétrica. La asimetría que se presenta entre los ovarios se puede explicar debido a que entre el ovario derecho e izquierdo existen diferencias que están relacionados con su capacidad para regular las señales del sistema neuroendocrino que participan en la regulación de las funciones ováricas. Estas diferencias regulatorias están relacionadas con las inervaciones recibidas por cada ovario y su comunicación con el SNC. La diferente capacidad ovulatoria por el ovario derecho o izquierdo después de la microinyección del antagonista del RDA2 que apoyan la interpretación de que la información neuronal enviada por la izquierda y ovarios derechos, alcanza diferentes regiones del SNC (Gerandai et al, 2009; Toth et al, 2008).

Hemos visto que cuando los receptores RDA son bloqueados, se incrementa la expresión de TH (Venegas et al, 2015) y, por lo tanto, lo haría la síntesis de dopamina ovárica. Esto último

implica que la dopamina producida en exceso tendría como consecuencia el aumento de su metabolismo. En un estudio en sistema nervioso central se utilizó SCH23390 y mostró que se incrementaron los metabolitos de la dopamina (Tomiyama et al, 1995), dando como resultado la producción de ERO y provocando un aumento en la peroxidación de lípidos de membranas; este aumento en la lipoperoxidación a su vez induciría daño celular que resultaría en un desbalance en las actividades mediadas por las células, como es la producción de hormonas esteroides (Evans et al, 2004; Fujii et al, 2005). Con base en este argumento, en el presente estudio también observamos incremento de óxido nítrico, que se sabe es capaz de bloquear la producción de estrógenos (Sela-Abramovich et al, 2008). El resultado final de estos acontecimientos sería un desbalance en el eje hipotálamo-adenohipósis-gónada.

Cuando se analizaron estos mismos parámetros en el animal hemicastrado, se encontró un efecto similar en la lipoperoxidación solo del ovario derecho *in situ*, pese a que el retraso del ciclo estral se presenta en el ovario izquierdo o derecho *in situ*. Esto sugiere que el efecto en el ovario izquierdo *in situ* se ve amortiguado eficientemente por los sistemas antioxidantes, o bien, se debe a la distribución asimétrica de los receptores RDA como lo muestran nuestros resultados, ya que en el ovario izquierdo *in situ*, el antagonismo sobre el receptor RDA2 tendría un efecto menor sobre la generación de ERO pero aun así, sería capaz de afectar la presencia del estro vaginal. Una tercera explicación sería que el mismo sistema de recaptura y metabolismo presenta una distribución asimétrica.

Por otra parte, si bien en este trabajo sólo se tomó en cuenta a los folículos ováricos, se sabe que en el conejo la dopamina tiene funciones en el desarrollo del cuerpo lúteo o su luteólisis (Parillo et al, 2014). Si en la rata la dopamina se comporta de manera similar, el bloqueo de los receptores podría inducir cambios sobre este compartimento que resultarían en un cambio en su desarrollo que podría influir en la homeostasis ovárica. Este argumento se ve reforzado por el efecto observado en cultivo de células de la granulosa sobre el receptor del VEGF donde se mostró que dopamina fue capaz de bloquear este receptor (Chen et al, 2010), mientras que en otro estudio se observó que la producción del VEGF podría estar regulada por el sistema dopaminérgico ovárico (Ferrero et al, 2015); de ser esto cierto, el antagonismo de los receptores

RDA provocaría que se presentasen cambios a nivel de la angiogénesis que podrían perturbar el funcionamiento del cuerpo lúteo durante su fase funcional (Levin et al, 1998; Basu et al, 2001).

CONCLUSIONES

1. El sistema dopaminérgico es fundamental durante la fase lútea para que se presente la ovulación.
2. El receptor dopaminérgico tipo 2 presenta asimetría funcional.
3. El receptor DA2 y la proteína DARPP-32 están distribuido asimétricamente.
4. EL receptor RDA2 regula a DARPP-32 teniendo efectos más marcados en el ovario derecho *in situ*.
5. La dopamina ovárica está involucrada en el equilibrio óxido-reducción del ovario.

PERPECTIVAS

Para conocer el papel fisiológico de la dopamina como una señal ovárica que desempeña o participa en los mecanismos reguladores de la función reproductiva aún queda mucho por estudiar. Falta por analizar buena parte del procesamiento de las señales intracelulares a diferentes niveles, por ejemplo: qué consecuencias específicas tiene el antagonismo de los receptores dopaminérgicos a nivel de las células tecales y como se verían afectadas las células de la granulosa. Por otra parte, se requiere analizar lo que ocurre con el compartimento luteal por los efectos del antagonismo de los receptores a la dopamina, ya que en el presente estudio la técnica empleada no permitió evaluarlo dada la inmunofluorescencia propia del tejido.

Finalmente, sería interesante probar si en el ovario de la rata existe el mismo repertorio de receptores dopaminérgicos encontrado en las células de la granulosa humana (Rey-Ares et al, 2007), que si bien se tiene una idea de cómo participa el receptor RDA1 y el receptor RDA2 en el contexto general de la regulación del ciclo estral y la ovulación, aún se desconoce el papel de otros subtipos específicos como el RDA3, el RDA4 y el RDA5. Además, es necesario caracterizar en nuestros modelos experimentales *in vivo* el sistema de recaptura o del metabolismo de la

dopamina (transportador de dopamina, el transportador vesicular de monoaminas, los sistemas de monoaminooxidasas, de catecol-orto-metiltransferasa, entre otros).

REFERENCIAS

- Ackland JF, D'Agostino J, Ringstrom SJ, Hostetler JP, Mann BG, Schwartz NB. (1990) Circulating radioimmunoassayable inhibin during periods of transient follicle-stimulating hormone rise: secondary surge and unilateral ovariectomy. *Biol Reprod.* 43(2):347-52.
- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. (2012) The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*; 10:49.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. (2005) Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 3:28.
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. (2001) Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction.* 121:647-653.
- Álvarez DA, Pérez EH, De La Cruz T, Hernández M, Torres JK, Sánchez AP. (2009) *Fisiología animal aplicada.* ED universidad de Antioquia.
- Apolonio J, Morales L, Domínguez R. (2000) Efecto de la denervación sensorial sobre la hipertrofia compensadora del ovario. XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Cancún, México 3-7 septiembre Abstr C177
- Bachvarova R, Cohen EM, De Leon V, Tokunaga K, Sakiyama S, Paynton BV. (1989) Amounts and modulation of actin mRNAs in mouse oocytes and embryos. *Development.* 106:561-565.
- Bahena TR, Flores G, Arias JA. (2000) Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed.* 11:39-60.
- Baker TG, Franchi LL. (1967) The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *Journal of Cell Science.* 2: 213-224.
- Banihashemi B, Albert PR. (2002) Dopamine-D2S Receptor Inhibition of Calcium Influx, Adenylyl Cyclase, and Mitogen-Activated Protein Kinase in Pituitary Cells: Distinct Requirements. *Molecular Endocrinology.* 16(10):2393-2404.
- Barco AI, Flores A, Chavira R, Damina-Matsumura P, Dominguez R. (2003) Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the *in situ* ovary. *Endocrine.* 21:2091-16.
- Basic F, Uematsu S, McCarron RM, Spatz M. (1991) Dopaminergic receptors linked to adenylate cyclase in human cerebrovascular endothelium. *J Neurochem.* 57:1774-1780.
- Basu S, Dasgupta PS, Chowdhury JR. (1995) Enhanced tumor growth in brain dopamine-depleted mice following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment. *J Neuroimmunol.* 60:1-8.
- Basu S, Nagy JA, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer IA, Bliss VS, Manseau EJ, Dasgupa PS, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. (2001) The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med.* 7(5):569-74.
- Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. (2001) Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig.* 8: 40-42.
- Ben-Ami I, Freimann S, Armon L, Dantes A, Strassburger D, Friedler S, Raziel A, Seger R, Ron-El R, Amsterdam A. (2006) PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Mol Hum Reprod.* 12:593-599.
- Beom S, Cheong D, Torres G, Caron Mg, Kim KM. (2004) Comparative studies of molecular mechanisms of dopamine D2 and D3 receptors for the activation of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem.* 279:28304-28314.
- Brami-cherrier K, Valjent E, Garcia M, Pages C, Hipskind RA, Caboche J. (2002) Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *J Neurosci.* 22:8911-8921.
- Bronzi CD, Adriana S, Orozco V, Rodríguez D, Rastrilla AM, Sosa ZY, Casais M. (2015) Noradrenaline modulates the presence of gonadotropin-releasing hormone in ovary. The importance of its interrelation on the ovarian

- steroidogenesis and apoptosis on dioestrus II in rat. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 154: 39-46.
- Bruzzone R, White TW, Paul DL. (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem*. 238:1-27.
- Burden HW. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: *Catecholamines As Hormone Regulators*. Eds. Jonathan N, Bahr JM, Weiner RI. Serono Symposia Publications. Raven Press. New York, pp. 262-278.
- Butcher RL. (1977) Changes in gonadotropins and steroids associated with unilateral ovariectomy of the rat. *Endocrinology*. 101: 830-840.
- Chavez R, Cruz ME, Dominguez R. (1987) 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.
- Chedrese J. (2003) Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular: Efectos de los esteroides. *Rev. Col Cienc. Pec*. 16(2):171-82.
- Chen SU, Chou CH, Lin CW, Lee H, Wu JC, Lu HF, Chen CD, Yang YS. (2010). Signal mechanisms of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian hyperstimulation syndrome: dopamine targets their common pathways. *Hum Reprod*. 25:757-67.
- Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. (2007) Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 148(8):3580-90.
- Chio CI, Lajiness ME, Huff RM. (1994) Activation of heterologously expressed D3 dopamine receptors: comparison with D2 dopamine receptors. *Mol Pharmacol*, 45:51-60.
- Choi Y, Rajkovic A, (2006) Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of GDF9 and POU5f1 promoters. *J Biol Chem*. 281:35747-35756.
- Conti M, Hsieh M, Park JY, Su YQ. (2006) Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol*. 20:715-723.
- Crisp TM, Dessouky DA, Denys FR. (1970) The fine structure of the human corpus luteum of early pregnancy and during the progestational phase of the menstrual cycle. *Am J Anat*. 127:37-69.
- Cruz ME, Chavez R, Dominguez R. (1986) Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adults rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *La Revista de Investigación Clínica*. 38:167-171.
- Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R. (1989) Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J Endocrinol*. 123(3):437-9.
- D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Dees WL, Ojeda SR (2002) Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech*. 59: 484-489.
- D'Albora H, Barcia JJ (1996) Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci Lett* 205: 65-67.
- Danial NN, Korsmeyer SJ. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*. 116:205-219.
- de Greef WJ, Dullaart J, Zeilmaker GH. (1975) Serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin and progesterone concentrations and follicular development in the pseudopregnant rat after unilateral ovariectomy. *J Endocrinol*. 66(2):249-56.
- de la Cruz RR, Pasar R. (1998) Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. *Revista de enseñanza universitaria*. 545-554.
- Dees WL, Hiney JK, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA, Ojeda SR. (1995) The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology*. 136(12):5760-8.
- Desai N, Ludgin J, Sharma R, Anirudh RK, Agarwal A (2013). Female and male gametogenesis. En: *Falcone T, Hurd WW, eds. Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*. 2nd ed. New York, NY: Springer. 3: 43-62.
- Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, Persani L. (2004) Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet*. 75:106-111.
- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Les Dees CW, Lara HE, Ojeda SR. (1996) A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology*. 137:198-209.
- Dissen GA, Ojeda S. (1999) Ovarian innervation. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neill JD. Academia Press. New York, Vol 3:583-589.

- Doganay M, Simsek A, Tapisiz OL, Mulazimoglu BS, Yumusak N, Gungor T. (2009) Superior ovarian nerve (SON) transaction leads to stunted follicular maturation: a histomorphologic and morphometric analysis in the rat model. *93(5):1711-4.*
- Dominguez R, Cruz-Morales S. (2011) The Ovarian Innervation Participates in the Regulation of Ovarian Functions. *Endocrinol Metabol Syndrome. S4:001*
- Dominguez R, Cruz ME, Chávez R. (1989) Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: "Growth Factors and the Ovary". Edt. A.N. Hirshfield. Plenum Press. New York. pp.321-325
- Domínguez R, Gaitan CM, Méndez SA, 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. *Journal of Endocrinology. 113: 37-44.*
- Domínguez R, Morales L, Cruz ME. (2003) Ovarian Asymmetry. *ARBS Anu Rev Biomed Sci. 5:95-104.*
- Domínguez R, Riboni L, Zipitria D, Revilla R. (1982) Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?. *Endocrinology. 95:175-180.*
- Domínguez R, Zipitria D, Riboni L, Revilla R. (1985) Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation throughout the oestrous cycle of the rat. *J Interdis Cycle Res. 16: 285-294.*
- Douglas T, Carrell C, Peterson M. (2010). *Reproductive Endocrinology and Infertility. Dordrecht Heidelberg London Library.*
- DrugBank database. Sulpiride: (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00391>)
- Ebisch IM, Peters WH, Thomas CM, Wetzels AM, Peer PG, Steegers-Theunissen RP. (2006) Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. *Hum Reprod. 21:1725–1733.*
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. (2002) The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proc Natl Acad Sci. 99:2890-2894.*
- Erickson GF, Shimasaki S. (2000) The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol Metab. 11:193-198.*
- Erickson GF. (1995). *The Ovary: Basic Principles and Concepts.* En: *Endocrinology y Metabolism.* Eds. P. Felig, J.D Boxtter y L.A Frohman. 3th Edition. McGraw-Hill. New York. Capitulo 17 pp 973-1013.
- Espey LL, Lipner TM. (1994) Ovulation. En: *The Physiology of Reproduction.* Eds E. Knobil & J.D. Neil. Raven Press, New York, Capitulo 13 pp 725-780.
- Espey LL, Richards S. (2006). Ovulation. En: *The Physiology of Reproduction.* Eds Knobil E, Neil JD. Raven Press, New York, Capitulo 11 pp 425-469.
- Espey LL, Stein VI, Dumitrescu J. (1982) Survey of antiinflammatory agents and related drugs as inhibitors of ovulation in the rabbit. *Fertil Steril.v38:238-247.*
- Espey LL. (1980) Ovulation as an inflammatory reaction – a hypothesis. *Biol Reprod. 22:73-106.*
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res. 567(1):1-61.*
- Ferrero H, García-Pascua MCI, Gaytan M, Morales C, Simon C, Gaytan F, Pellicer A, Gomez RG. (2014) Dopamine receptor 2 activation inhibits ovarian vascular endothelial growth factor secretion in an ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) animal model: implications for treatment of OHSS with dopamine receptor 2 agonists. *Fertility and Sterility. 102(5):1468-1476.*
- Ferrero H, García-Pascual CM, Pellicer N, Simón C, Pellicer A, Gómez R. (2015) Dopamine agonist inhibits vascular endothelial growth factor protein production and secretion in granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol. 13:104.*
- Findlay JK, Drummond AE. (1999) Regulation of the FSH Receptor in the Ovary. *Trends Endocrinol Metab. 10:183-188.*
- Finkel T. (2011) Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol. 194:7–15.*
- Flores A, Velasco J, Gallegos A, Mendoza F, Everardo P, Cruz M, Domínguez R. (2011). Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol. 9: 34.*
- Flores Bautista MC. (2018) Identificación de los receptores dopaminérgicos del ovario a lo largo del ciclo estal de la rata: Efectos del antagonismo específico sobre su expresividad. (Tesis de maestría). Benémerita Universidad autónoma de Puebla.
- Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. (2000) The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol. 163:53-60.*
- Fujii J, Iuchi Y, Okada F. (2005). Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology. 3:43.*

- Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y. (1984) Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: Unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neuroscience Letters*. 51:365-370.
- Gay EA, Urban JD, Nichols DE, Oxford GS, Mailman BR. (2004) Functional Selectivity of D2 Receptor Ligands in a Chinese Hamster Ovary hD2L Cell Line: Evidence for Induction of Ligand-Specific Receptor State. *Molecular pharmacology*. 66 (1) 97-105.
- Gerenda I, Thot IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B. (1998) Neural labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology*. 68: 244-256.
- Gerendai I, Csaba ZS, Voko Z, Csernus V. (1995) Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 53: 299–305.
- Gerendai I, Hálasz B. (1997) Neuroendocrine Asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 18: 354-391
- Gerendai I. (2004) New data on the neural control of gonadal functions. Supraspinal innervation of the gonads. *TMJ*. 54 (3): 218-224.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. (2008) Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 14:159-177.
- Gondos B. (1987a) Comparative studies of normal and neoplastic ovarian germ cells: 1. Ultrastructure of oogonia and intercellular bridges in the fetal ovary. *International Journal of Gynecological Pathology*. 6: 114–123.
- Gondos B. (1987b) Comparative studies of normal and neoplastic ovarian germ cells: 2. Ultrastructure and pathogenesis of dysgerminoma. *International Journal of Gynecological Pathology*. 6: 124–131.
- Gorbman A, Dickoff WW, Vigna RS, Clark NB, Ralph CL. (1983) *Comparative Endocrinology*. New York, John Wiley & Sons. pp.257-276.
- Gougeon A. (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 17:121-155.
- Gougeon A. (2004) *Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects* En: The ovary. Leung P, Adashi E. Elsevier, Academic Press. pp. 29-35.
- Grace A, Bunney BS. (1984) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *The Journal of Neuroscience*. 4(11): 2866–2876.
- Greengard P, Patrick BA, Nairn AC. (1999) Beyond the Dopamine Receptor: the DARPP-32/Protein Phosphatase-1 Cascade. *Neuron*. 23: 435–447.
- Greenwald GS, Terranova PF. (1988) Follicular selection and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. pp. 387–445.
- Greiner M, Paredes A, Rey-Ares V, Saller S, Mayerhofer A, Lara HE. (2008). Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology*; 149:4988-96.
- Grenwald, G, Roy S. (1994) Follicular development and its control. En: *Physiology of Reproduction*. Capítulo 12. Eds. Knobil E, Neill JD. Raven Press, New York. pp. 629-724.
- Gründker C, Günthert AR, Millar RP. (2002) Expression of Gonadotropin-Releasing Hormone II (GnRH-II) Receptor in Human Endometrial and Ovarian Cancer Cells and Effect of GnRH-II on Tumor Cell Proliferation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 87(3):1427-1430.
- Guyton, C.A & E.J. Hall (2012). *Compendio de Fisiología Médica*. 12ª Edición. ed. Bonet SB. Elsevier. Capítulo 75 pp. 564-568.
- Guzmán-Herrera Nataly (2018). Antagonismo del receptor DA-1 inducido por SCH23390 en el tejido ovárico de la rata adulta hemicastrada: análisis de la ovulación compensadora. (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J Lab Clin Med*. 119:598-620.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1998) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ª edition. Oxford: Oxford Science. pp. 980-995.
- Ham A, Cormack D. (1983) El Aparato Reproductor Femenino. En: *Tratado de Histología*. 8ª Edición. Interamericana, México. Capítulo 26 pp. 939-948.
- Harrison R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*. 33:774-797.
- Hebel R, Stromberg MW. (1986) *Anatomy and Embriology of the Laboratory Rat*. Worthsee. BioMed Verlag. pp. 231: 257.

- Herbison A. (2016) Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature reviews endocrinology*. 12: 452-466.
- Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ. (2000) D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β]₁-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci*. 20:8987-8995.
- Hirshfield AN. (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev. Cytol*. 124: 43-101.
- Jackson DM, Westlind AD. (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther*. 64: 291-369.
- Jin M, Min C, Zheng M, Cho DI, Cheong SJ, Kurose H, Kim KM. (2013) Multiple signaling routes involved in the regulation of adenylyl cyclase and extracellular regulated kinase by dopamine D(2) and D(3) receptors. *Pharmacol Res*. 67:31-41.
- Jozwik M, Wolczynski S, Szamatowicz M. (1999) Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod*. 5:409-413.
- Kim J, Sato M, Li Q, Lydon JP, Demayo FJ, Bagchi IC, Bagchi MK. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target of progesterone regulation in the preovulatory follicles and controls ovulation in mice. *Mol Cell Biol*. 28:1770-1782.
- King BF, Britt JH, Esbenshade KL, Flowers WL, Ireland JJ. (1995) Evidence for a local role of inhibin or inhibin α subunits in compensatory ovarian hypertrophy. *Journal of reproduction and fertility*. 104:291-295.
- King SS, Campbell AG, Dille EA, Roser JF, Murphy LL, Jones KL. (2005) Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domest Anim Endocrinol*. 28: 405–415.
- Klein JT, Burden HW. (1988) Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating rat ovary. *Neuroscience Letters*. 85:217-222.
- Knobil E, Neill JD. (2006) *The Physiology of Reproduction*, second ed. New York: Raven Press, pp 817–860.
- Kodaman PH, Behrman HR. (2001) Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. *Endocrinology*. 142:687–693.
- Kunwar PS, Siekhaus DE, Lehmann R. (2006) In vivo migration: a germ cell perspective. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22: 237–265.
- Lawrence IE, Burden HW. (1980) The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the ovary. *Anat Rec*. 196:51-59.
- Leslie NR, Downes CP. (2002) PTEN: the down side of PI 3-kinase signaling. *Cellular Signalling*, 14(4): 285–295.
- Letras D, Handal A, Diaz A, Moran J. (2016) La Sulpirida reduce la ovulación compensadora, pero incrementa la hipertrofia compensadora del ovario derecho en la rata hemi-ovariectomizada. *Revista de Sistemas Experimentales 3 (7)*: 46-59.
- Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A, Pedram A. (1998) Role of vascular endothelial cell growth factor in Ovarian Hyperstimulation Syndrome. *J Clin Invest*. 102:1978-1985.
- Loos M, Pattij T, Janssen MC, Counotte DS, Schoffelmeer AN, Smit AB, Spijker S, Van Gaalen MM. (2010) Dopamine receptor D1/D5 gene expression in the medial prefrontal cortex predicts impulsive choice in rats. *20(5)*:1064-70.
- López-Pérez SJ, Morales-Villagran A, Medina-Ceja L. (2015) Effect of perinatal asphyxia and carbamazepine treatment on cortical dopamine and DOPAC levels. *Journal of Biomedical Science*. 22: 14.
- Maheshwari A, Fowler PA. (2008) Primordial follicular assembly in humans – revisited. *Zygote*. 16: 285–296.
- Makabe S, Naguro T, Stallone T. (2006) Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microsc Res Tech*. 69:436-449.
- Mani KS, Mitchell A, O'Malley BW. (2001) Progesterone receptor and dopamine receptors are required in D9-tetrahydrocannabinol modulation of sexual receptivity in female rats. *PNAS*. 98(3):1249-1254
- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ. (1990) Localization of Dopamine D2 Receptor mRNA and D1 and D2 Receptor Binding in the Rat Brain and Pituitary: An In Situ Hybridization-Receptor Autoradiographic Analysis. *J Neurosci*. 10:2587-2600.
- Martin CR. (1979) *Textbook of Endocrine Physiology*. New York, Oxford University Press. pp. 183—264.
- Mayerhofer A, Fritz S, Grunert R, Sanders SL, Duffy DM, Ojeda SR, Stouffer RL. (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: 4750–4757.
- Mayerhofer A, Hemmings Jr HC, Snyder GL, 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*. 84:257–264.

- Mayerhofer, A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. (1997) A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. 178: 3320-3329.
- McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, Lundy T, O'Connell A, Tisdall DJ. (2000) Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Mol Cell Endocrinol*. 163(1-2):11-20.
- Meloni G, Vařák M. (2011) Redox activity of α -synuclein-Cu is silenced by Zn7-metallothionein-3. *Free Radical Biology and Medicine*. 50 (11): 1471–1479.
- Missale C, Russel NS, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 78:189-225.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognett VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F. (2011) ROS signaling: the new wave?. *Trends in Plant Science*. 16 (5): 300-309.
- Molyneaux K, Wylie C. (2004) Primordial germ cell migration. *International Journal of Developmental Biology*. 48: 537–544.
- Montes GS, Luque EH. (1988) Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)*. 133: 192-199.
- Morales L, Ricardo B, Bolaños A, Chavira AR, Dominguez R. (2007) Ipsilateral vagotomy to unilaterally ovariectomized pre-puberal rats modifies compensatory ovarian responses. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 5:24.
- Morán C, Franco A, Morán JL, Handal A, Morales L, Domínguez R. (2005) Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac-superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*. 26: 147-152
- Morán JL, Domínguez R. (1995). Effects of the unilateral implant of haloperidol at the preoptic-anterior hypothalamic area, ovulation. *Endocrine* 3:399-401.
- 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 (1):36-40.
- Mousseau DD, Baker GB. (2012) Recent developments in the regulation of monoamine oxidase form and function: is the current model restricting our understanding of the breadth of contribution of monoamine oxidase to brain dysfunction? *Current Topics. Medicinal Chemistry*. 12: 2163–2176.
- Neill JD, Duck LW, Sellers JC, Musgrove LC. (2001). A Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Specific for GnRH II in Primates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 282: 1012–1018.
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R. (2002) G protein pathways. *Science*, 296:1636-1639.
- Nishi A, Fisone G, Snyder GI, Dulubova I, Aperia A, Nairn Ac, Greengard P. (1999) Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. *J Neurochem*. 73:1492-1501.
- Nussey S, Whitehead S. (2001) *Endocrinology: An Integrated Approach*. En: *The gonad*. Oxford: BIOS Scientific Publishers. Capitulo 6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK29/>
- Ojeda SR, White SS, Aguado LI, Advis JP, Andersen JM. (1983). Abdominal vagotomy delays onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat. *Neuroendocrinology* 36: 261-267.
- Ortega-Camarillo C, Guzman-Grenfell AM, Hicks JJ. (1999). Oxidation of gonadotrophin (PMSG) by oxygen free radicals alters its structure and hormonal activity. *Mol Reprod Dev*. 52:264–268.
- Otani T, Sasamoto S. (1982) Plasma and pituitary hormone changes and follicular development after unilateral ovariectomy in cyclic rats. *J Reprod Fertil.*; 65(2):347-53.
- Palacio JR, Iborra A, Ulcova-Galova Z, Badia R, Martinez P. (2006) The presence of antibodies to oxidative modified proteins in serum from polycystic ovary syndrome patients. *Clin Exp Immunol* 144:217–222.
- Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, Zhao Y, Westphal H, Matzuk MM, Rajkovic A. (2006) Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:8090-8095.
- Pangas SA, Rajkovic A. (2006) Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Human Reproduction Update*. 12: 65–76.
- Papa S1, Rasmussen DD, Technikova-Dobrova Z, Panelli D, Signorile A, Scacco S, Petruzzella V, Papa F, Palmisano G, Gnoni A, Micelli L, Sardanelli AM. (2012) Respiratory chain complex I, a main regulatory target of the cAMP/PKA pathway is defective in different human diseases, *FEBS Letters*. 58: 568–577.
- Parillo F, Catone G, Gobbetti A, Zerani M. (2013) Cell localization of ACTH, dopamine, and GnRH receptors and PPAR α in bovine corpora lutea during diestrus. *Acta Sci Vet*. 41:1129.
- Parillo F, Maranesi M, Mignini F, Marinelli L, Di Stefano A, Boiti C, Zerani M. (2014) evidence for a dopamine intrinsic direct role in the regulation of the ovary reproductive function: in vitro study on rabbit corpora lutea. *Plos One*. 9(8): e104797.

- Parrott JA, Skinner MK. (1999) Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*. 140:4262-4271.
- Pastelín CF, Rosas NH, Morales-Ledesma L, Linares R, Domínguez R, Morán C. (2017) Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. *J Ovarian Res*. 14;10(1):18.
- Pastelín-rojas, C. (2003). Efectos del bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico durante la segunda mitad del ciclo estral sobre la función ovárica de la rata adulta. Tesis Profesional. Biología, BUAP.
- Pearlstein DP, Ali MH, Mungai PT, Hynes KL, Gewertz BL, Schumacker PT. (2002) Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*. 22:566–573.
- Pepling ME. (2006) From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*. 44: 622–632.
- Peppler RD, Greenwald GS. (1970) Influence of unilateral ovariectomy on follicular development in cycling rats. *Am J Anat*. 127(1):9-14.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. (1998) The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145: 27–37.
- Pillai G, Brown NA, Mcallister G, Milligan G, Seabrook GR. (1998). Human D2 and D4 dopamine receptors couple through betagamma G-protein subunits to inwardly rectifying K⁺ channels (GIRK1) in a *Xenopus* oocyte expression system: selective antagonism by L-741,626 and L-745,870 respectively. *Neuropharmacology*. 37:983-987.
- Plaisier M. (2011) Decidualisation and angiogenesis. *Best Pract Res Clin Obstetr Gynaecol*. 25:259–271
- Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. (2015) Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biology*. 4: 184-192.
- Polak G, Koziol-Montewka M, Gogacz M, Blazkowska I, Kotarski J. (2001) Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 94:261-263.
- Rajput PS, Kharmate G, Somvanshi Rk, Kumar U. (2009) Colocalization of dopamine receptor subtypes with dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) in rat brain. *Neurosci Res*. 65:53-63.
- Ramírez-Ávila B. (2001). Efectos de la administración secuencial de GnRH sobre la ovulación en ratas adultas con bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico. (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Rangel C, Coronel I, Floran B. (2015). Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging and disease*. 6(5):349-368.
- Rey-Ares V1, Lazarov N, Berg D, Berg U, Kunz L, Mayerhofer A. (2007) Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 5: e40.
- Russell DL, Doyle KM, Ochsner SA, Sandy JD, Richards JS. (2003) Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J Biol Chem*. 278:42330-42339.
- Russell DL, Robker RL. (2007) Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update*. 13:289-312.
- Sabatini L, Wilson C, Lower A, Al-Shawaf T, Grudzinskas JG. (1999) Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 72:1027-1034.
- Saller S1, Kunz L, Berg D, Berg U, Lara H, Urra J, Hecht S, Pavlik R, Thaler CJ, Mayerhofer A. (2014) Dopamine in human follicular fluid is associated with cellular uptake and metabolism-dependent generation of reactive oxygen species in granulosa cells: implications for physiology and pathology. *Human reproduction*. 29(3):555-567.
- Salles MJ, Hervé D, Rivet JM, Longueville S, Millan MJ, Girault JA, Mannoury la Cour C. (2013) Transient and rapid activation of Akt/GSK-3beta and mTORC1 signaling by D3 dopamine receptor stimulation in dorsal striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem*, 125:532-544.
- Sánchez F, Smitz J. (2012) Molecular control of oogenesis. *Elsevier*. 1822 (12):1896-1912.
- Sarbasov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor/mTOR complex. *Science*. 307: 1098–1101.
- Sathananthan AH, Selvaraj K, Trounson A. (2000) Fine structure of human oogonia in the fetal ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 161: 3–8.
- Schmidt RF, Thews G. (1992). Fisiología humana. Ed McGraw Hill. España. Pp. 400-411.
- Sela-Abramovich S, Galiani D, Nevo N, Dekel N. (2008) Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: Mechanism of action. *Biol Reprod*. 78(6):1111-8.
- Sforza C, Forabosco A. (1998) Amorphometric approach to the study of human ovarian organogenesis. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*. 103: 51–62.

- Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. (1999) A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:7282-7287.
- Shiotani M, Noda Y, Narimoto K, Imai K, Mori T, Fujimoto K, Ogawa K. (1991) Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in the human ovary. *Hum Reprod*. 6:1349-1353.
- Shkolnik K1, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. (2011) Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *PNAS*. 108:1462-1467.
- Sunahara RK, Taussig R. (2002). Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv*. 2:168-184.
- Suzuki T, Sugino N, Fukaya T, Sugiyama S, Uda T, Takaya R, Yajima A, Sasano H. (1999) Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril*. 72:720-726.
- Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S, Erickson GF. (2002) Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 87:1337-1344.
- Tomiyama K, Koshikawa N, Funada K, Oka K, Kobayashi M. (1995) In vivo microdialysis evidence for transient dopamine release by benzazepines in rat striatum. *J Neurochem*. 65:2790-2795.
- Toth IE, Wiesel O, Boldogkoi Z, Balint K, Tapaszi Z, Gerendai I. (2007) Predominance of supraespal innervation of the left ovary. *Mycrosc ResTech*. 70:710-718.
- Toyoda S, Miyazaki T, Miyazaki S, Yoshimura T, Yamamoto M, Tashiro F, Yamato E, Miyazaki J. (2009) Sohlh2 affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia. *Dev Biol*. 325:238-248.
- Tresguerres, JAF, Castillo C. (1993). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En: Fisiología Humana. 7ª Edición. Capítulo 17. ed Tresguerres JAF. Interamericana-McGrawhill. Pp. 1015-1018.
- Tropea A, Miceli F, Minici F, Tiberi F, Orlando M, Gangale MF, Romani F, Catino S, Mancuso S, Navarra P. (2006). Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis and release by human luteal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 91:2303-2309.
- Van Wezel IL, Rodgers RJ. (1996) Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol Reprod*. 55(5):1003-11.
- Venegas-Meneses B, Padilla JF, Juárez CE, Morán JL, Morán C, Rosas-Murrieta NH, Handal A, Domínguez R. (2015) Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*. 50(3):783-96.
- Weiner N, Molinoff PB. (1994) Catecholamines. En: Basic Neurochemistry. Eds. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. Raven Press, New York. Capítulo 12 pp. 211-281.
- Welschen R, Dullaart J. (1974) Serum concentrations of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after unilateral ovariectomy in the adult rat. *J Endocr*. 63:421-422.
- Wick MM. (1978). Dopamine: a novel antitumor agent active against B-16 melanoma in vivo. *J Invest Dermatol*. 71: 163-4.
- Wick MM. (1981). Levodopa and dopamine analogs: dihydroxy and trihydroxybenzylamines as novel quinol antitumor agents in experimental leukemia in vivo. *Cancer Treat Rep*. 65:861-7.
- Williams CJ, Erickson GF. (2012). Morphology and Physiology of the Ovary. En: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K. editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
- Wimsatt WA. (1979) Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *J Reprod Fertil*. 56:345-57.
- Xuejing Z, Jianhua L, Jiall L, Haoshu L, Kemian G, Sheng C. (2013) Prostaglandin F2a upregulates Slit/Robo expression in mouse corpus luteum during luteolysis. *Journal of Endocrinology*. 218: 299-310.
- Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. (1997) Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol*. 184:122-137.
- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Halász 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: 179-188.
- Luna F, Barrientos E, Alatríste V, Martínez I, Limón ID, González-Flores O. (2015) Morphology and Chemical Phenotype of the Ovarian Intrinsic Neurons in Neonate and Sexually Mature Reproductive Guinea Pig. *Advances in Reproductive Sciences*. 3: 13-26.
- Westwood, F. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic pathology* 36: 375-384.

- Hubscher, C., Brooks, D. y Johnson, D. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry* 80(2): 79-87.
- López, C., Maselli, M., Di Nasso, F., Telleria, C. y Carón, R. (2011). Regulation of prolactin secretion during the estrus in rats: possible role of glucocorticoids. *Reproduction* 142(3):477-485.
- Tóth IE, Banczerowski P, Boldogkői Z, Tóth JS, Szabó A, et al. (2008) Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary: A double viral tracing study. *Brain Res Bull* 77: 306-311.
- Zaworski PG, Alberts GL, Pregenzer JF, Slightom JL, Gill GS. (1999) Efficient functional coupling of the human D3 dopamine receptor to G(o) subtype of G proteins in SH-SY5Y cells. *Br J Pharmacol.* 128:1181-1188.