BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

TESIS:

EFECTOS DEL ANTAGONISMO DE LOS RECEPTORES OVÁRICOS DA1 O DA2 SOBRE LA OVULACIÓN ESPONTÁNEA EN LA RATA ADULTA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIÓLOGO

PRESENTA:

ESTEFANIE MONSERRAT GARCÍA PORRAS

DIRECTOR EXTERNO:

D.C. JOSÉ LUIS MORÁN PERALES

INSTITUTO DE CIENCIAS

BUAP

DIRECTOR INTERNO:

D.C. ALFONSO DANIEL DÍAZ FONSECA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

BUAP

Puebla, Pue., Junio 2015

Índice

Índice de Figuras 5

Tabla de Abreviaturas 6

Resumen 7

1. Introducción 9

2. Marco Teórico 10

2.1 Ovario 10

2.2 Desarrollo Folicular 11

2.3 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario 12

2.4 Ciclo Estral en la Rata 14

2.5 Inervación Ovárica 17

2.6 Las Catecolaminas en el Ovario 19

2.7 Dopamina en el Ovario 20

2.7.1 Antagonistas Dopaminérgicos 21

3. Antecedentes 22

4. Justificación 23

5. Hipótesis 24

6. Objetivos 24

6.1 Objetivo General 24

6.2 Objetivos Particulares 24

7. Diagrama Metodológico 25

7.1 Laparotomía Dorso Bilateral 25

7.2 Inmunohistofluorescencia 26

8. Metodología Experimental 27

8.1 Animales de Experimentación 27

8.2 Registro del Patrón de Ciclicidad Vaginal (Ciclo Estral) 27
8.3 Grupos Experimentales 27
8.4 Preparación de los fármacos..... 28
8.4.1 SCH23390: 28
8.4.2 Sulpiride: 28
8.5 Preparación de Hormonas..... 29
8.5.1 Solución Stock de GnRH 29
8.5.2 Solución de GnRH sintética 29
8.5.3 Solución de Benzoato de Estradiol..... 29
8.6 Laparotomía Dorso Bilateral 29
8.7 Reemplazo Hormonal 30
8.7.1 Reemplazo de la Señal Hipotalámica:..... 30
8.7.2 Reemplazo de la Señal Ovárica: 30
8.8 Extracción de Tejidos..... 30
8.8.1 Sacrificio por Decapitación 31
8.8.2 Perfusión Intracardiaca y Fijación de Tejidos 31
8.9 Criopreservación de Ovarios 31
8.10 Cortes Histológicos 31
8.11 Inmunohistoquímica Acoplada a Fluorescencia..... 31
8.12 Análisis Estadístico 32
9. Resultados..... 33
9.1 Ovulación Espontánea 33
9.1.1 El procedimiento quirúrgico no afecta la tasa de animales ovulantes 33
9.1.2 La microinyección en bursa de NaCl 0.9% induce una disminución en la tasa de animales ovulantes..... 33

9.1.3 La microinyección en bursa de ácido ascórbico 0.1% no afecta la ovulación espontánea 33

9.1.4 El receptor DA1 es más activo durante el diestro 1 33

9.1.5 El receptor DA2 permanece activo desde la noche del estro hasta la mañana del diestro 2 34

9.2 Análisis de los efectos del Remplazo Hormonal 36

9.3 Inmunohistofluorescencia 38

10. Discusión de Resultados 42

11. Conclusiones 45

12. Bibliografía 46

13. Anexo 57

Índice de Figuras

Figura 1. Diferentes estadios de crecimiento de los folículos..... 10

Figura 2. Eje Hipotálamo Hipófisis Ovario..... 13

Figura 3. Secuencia de eventos que ocurren durante el ciclo estral..... 14

Figura 4. Muestras de frotis de las fases del ciclo estral..... 15

Figura 5. Perfil de secreción de gonadotropinas y esteroides sexuales en los diferentes días y horas del ciclo estral de la rata. 16

Figura 6. Inervación simpática del ovario vía nervio ovárico superior.. 18

Figura 7. Variación en la TAO de los grupos control y vehìculo..... 34

Figura 8. Variación en la TAO de los grupos con SCH 23390 y su vehículo. 35

Figura 9. Variación en la TAO de los grupos con Sulpiride y su vehículo. 35

Figura 10. Efecto del remplazo hormonal a grupos con TAO<50%. 37

Figura 11. Efecto del antagonismo de los receptores DA1 o DA2 ováricos sobre la inmunorreactividad a DARPP32.. 39

Figura 12. Efecto del antagonismo de los receptores DA1 o DA2 ováricos sobre la inmunorreactividad a TH.. ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 13. Efecto del antagonismo de los receptores DA1 o DA2 ováricos sobre la inmunorreactividad a DBH..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla de Abreviaturas

AA	Ácido Ascórbico
AC	Adenilato ciclasa
ASB	Albúmina Sérica de Bovino
BE	Benzoato de Estradiol
CE	Ciclo Estral
D1	Diestro 1
D2	Diestro 2
DA	Dopamina
DA1	Receptor Dopaminérgico Tipo 1
DA2	Receptor Dopaminérgico Tipo 2
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DARPP32	Fosfoproteína de 32 kDaltones Regulada por Dopamina y cAMP
DBH	Dopamina-ß-Hidroxilasa
E	Estro
EEDQ	2-Etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina
FSH	Hormona Folículo Estimulante
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
LH	Hormona Luteinizante
MIB	Micro Inyección Bilateral
NE	Norepinefrina
NOS	Nervio Ovárico Superior
P	Proestro
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PPEF	Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher
SCH23390	Hidrocloruro de R(+)-7-Cloro-8-hidroxi-3-metil-1-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1H-3-benzazepina
TAO	Tasa de Animales Ovulantes
TH	Tirosina Hidroxilasa
SPD	Sulpiride

Resumen

En el modelo experimental de la rata, se ha descrito la participación de diversos sistemas de neurotransmisión y neuromodulación que desempeñan papeles importantes en la regulación del ciclo estral y la ovulación. Existe un interés creciente por analizar los sistemas periféricos que contribuyen para que el sistema nervioso central ejerza el control sobre las funciones reproductivas en la hembra, particularmente en las funciones ováricas.

El propósito del presente estudio fue analizar el papel funcional de la dopamina ovárica sobre la regulación de la ovulación espontánea y la expresión de algunos indicadores de su actividad funcional, como la presencia de la proteína DARPP32 y las enzimas clave para la biosíntesis de catecolaminas: TH y DBH, por medio del bloqueo farmacológico de los receptores DA1 o DA2 en los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta.

Se usaron grupos de ratas de la cepa CII-ZV con ciclos estrales regulares de cuatro días, a las cuales se les realizó una microinyección dentro de las bursas ováricas de los antagonistas selectivos del receptor DA1: SCH23390 o del receptor DA2: Sulpiride, a las 8:00, 13:00 ó 20:00 h en cada uno de los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron en la mañana del estro esperado.

La ovulación espontánea disminuyó significativamente en aquellos grupos en los cuales se antagonizó el receptor DA1 a las 8:00, 13:00 y 20:00 h del diestro 1; el reemplazo hormonal con GnRH en estos grupos restableció la ovulación, sin embargo, el remplazo con benzoato de estradiol sólo fue efectivo en los grupos tratados a las 8:00 y 20:00 h. Cuando se antagonizó el receptor DA2 se observó un bloqueo absoluto de la ovulación espontánea en los grupos tratados desde las 20:00 h del estro hasta las 8:00 h del diestro 2 y nuevamente en el grupo tratado a las 20:00 h del mismo día. El remplazo hormonal con GnRH restableció la ovulación significativamente en estos grupos; el benzoato de estradiol fue inefectivo en el restablecimiento de la ovulación únicamente en el grupo tratado a las 20:00 h del diestro 1.

Se observó inmunorreactividad positiva para DARPP32 en las células de la granulosa y para TH y DBH en las células de la teca en los grupos tratados con SCH23390 en diestro 2, proestro y estro. Sin embargo, en los grupos tratados con Sulpiride no se observó inmunorreactividad para estos indicadores en el tejido ovárico en ninguno de los días del ciclo estral. En los animales tratados con los antagonistas DA1 o DA2 que presentaron ausencia de ovulación no se observaron marcas inmunorreactivas para DARPP32, TH o DBH en los folículos ováricos analizados, lo que nos permite sugerir que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos afecta las señales que resultan con la expresión de estos indicadores bioquímicos de la actividad catecolaminérgica, lo que pone de manifiesto la relevancia biológica de la señal dopaminérgica en los tejidos ováricos encargados de la secreción de esteroides sexuales, clave para que la ovulación ocurra.

En conjunto, estos resultados sugieren que el sistema dopaminérgico ovárico desempeña un papel estimulante en la regulación de los mecanismos que conducen a la ovulación espontánea de la rata y es variable durante el ciclo estral. Se observó que el receptor DA2 desempeña un papel estimulante de mayor duración sobre los mecanismos que controlan la ovulación a diferencia del receptor DA1. En todos los grupos hay variaciones en la tasa de animales ovulantes durante la fase luteal a diferencia de la fase folicular, donde prácticamente no se ve afectada la ovulación espontánea, lo cual sugiere que durante la primera mitad del ciclo la unión de dopamina a sus receptores ováricos es fundamental para que ocurra la ovulación. Aparentemente el bloqueo de los receptores dopaminérgicos en el ovario afecta los mecanismos de retrocontrol positivo de los estrógenos sobre el hipotálamo, lo que conduce a la interrupción de secreción de GnRH y con ello, la falla ovulatoria.

1. Introducción

Todas las funciones del organismo tienen como objetivo asegurar la supervivencia del sujeto. Entre esas funciones, la reproducción es una de las más importantes, porque de ella depende la preservación de la especie. La reproducción es resultado de la integración de múltiples fenómenos en los que participan todos los órganos y sistemas del cuerpo. La regulación de las funciones del sistema reproductor en la hembra está a cargo del sistema hipotálamo-hipófisis-ovario y es resultado de la interacción de diferentes hormonas secretadas por la adenohipófisis, los ovarios e incluso por otras glándulas (como: neurohipófisis, adrenales y timo), cuya regulación ocurre a lo largo del ciclo estral.

El sistema nervioso es el dirigente principal de los otros sistemas del organismo. Su papel es fundamental ya que cualquier variación (sea positiva o negativa) afecta la calidad de la información nerviosa y la capacidad de los órganos para responder a estas variaciones. Se ha demostrado que el sistema nervioso desempeña un papel crucial en el control de la función reproductiva pues hay una conexión neuronal multisináptica entre el cerebro y las gónadas que regula de forma paralela las funciones ováricas; éstas conexiones están mediadas por señales químicas de origen diverso (neurotransmisores, neuromoduladores, hormonas, entre otras) que pueden actuar de forma endócrina o parácrina sobre las células blanco en los ovarios. Entre las principales señales químicas que afectan el funcionamiento de las gónadas están las catecolaminas. La dopamina y sus receptores han sido detectados en el tejido ovárico, pero su papel específico aún no se ha aclarado.

El propósito del presente trabajo fue analizar el efecto del antagonismo de los receptores DA1 o DA2 en los ovarios de la rata adulta sobre la ovulación espontánea y la presencia de algunos indicadores biológicos relacionados con la dopamina.

2. Marco Teórico

La edad reproductiva femenina está caracterizada por ciclos rítmicos, durante los cuales hay una variación en la secreción de hormonas, lo que conlleva a cambios físicos a nivel de órganos reproductores (útero, ovarios) y que tienen como finalidad la ovulación y preparación del organismo para una posible gestación (Guyton & Hall, 2006).

2.1 Ovario

En los mamíferos, el ovario es el sitio de almacenamiento y desarrollo de los ovocitos formados durante la vida embrionaria. La principal función de la gónada es la maduración del ovocito para la fertilización y exitosa propagación de la especie (McGee & Hsueh, 2000; Espey & Richards, 2006). Además, el ovario constituye el principal portador de las células secretoras de hormonas femeninas que desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios de la hembra, así como las características adecuadas durante la preñez (Hunzicker & Mayo, 2006).

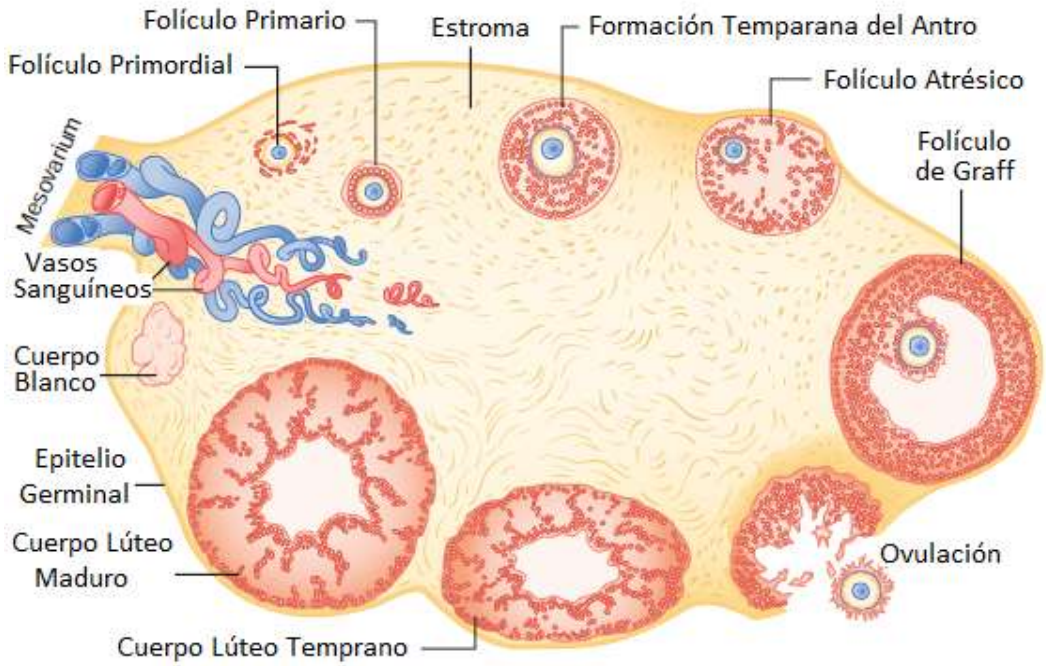


Figura 1. Representación de los diferentes estadios del crecimiento de los folículos: Primordial, Primario, Secundario, Folículo ovulatorio (o de Graff); Ovulación hasta la formación e involución del cuerpo lúteo. (Strauss III & Williams, 2009).

Durante la etapa adulta de los mamíferos, que en las mujeres comprende desde los 12-13 hasta los 45-50 años (Tresguerres, 2010) y que en la rata comienza a partir de los 36-39 días (Arata, et al., 1981), la superficie del ovario es nodular y se encuentra cubierta por una capa mono estratificada de células cúbicas, llamada epitelio germinal. Ésta cubierta epitelial está frecuentemente invaginada hacia el tejido conectivo subyacente llamado túnica albugínea, formando pequeños pliegues. Por debajo se encuentran dos zonas: la llamada zona cortical y la zona medular (Erickson & Schreiber, 2001). La primera comprende al estroma ovárico (formado por tejido conectivo laxo, fibroblastos y precursores de células tecales), y folículos en distintos estadios de maduración, atrésicos y cuerpos lúteos. La zona medular que se encuentra muy vascularizada e inervada, contiene células de tipo muscular y tejido conectivo laxo (Irusta, 2008; König & Liebich, 2006).

2.2 Desarrollo Folicular

El proceso de foliculogénesis comprende el crecimiento del folículo y su pasaje a través de los distintos estadios de desarrollo, desde el momento en que emerge del pool de folículos formado durante la ovogénesis hasta el momento en el cual es ovulado o entra en atresia (Rajkovic, et al., 2006). En las ratas, 4 días después del nacimiento (Mandl, 1963), las ovogonias son transformadas en ovocitos primordiales los cuales se rodean de una capa única de células foliculares aplanadas llamada granulosa. Estos folículos continuamente abandonan el reservorio para convertirse en folículos primarios. A medida que el ovocito aumenta de tamaño, la capa única de células aplanadas se convierte en una capa de células cúbicas y mediante mitosis originan las células granulosas que formarán posteriormente un epitelio estratificado. Entre el ovocito y las células granulosas circundantes, se originan espacios donde se deposita una sustancia que representa el inicio de la zona pelúcida, mucopolisacáridos secretados por las células de la granulosa, que más tarde originarán un halo translúcido que rodea al ovocito (Hirshfield, 1991)(Figura 1).

A medida que los folículos aumentan de tamaño, van desplazándose gradualmente hacia el interior de la corteza. A través de sucesivas divisiones

mitóticas de las células de la granulosa, el folículo primario pasa a un estadio preantral, denominado folículo secundario. En este estadio las células de la granulosa conforman una población homogénea y adquieren receptores de alta afinidad para la hormona folículo estimulante (FSH) y hormonas esteroideas; simultáneamente se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células originadas del estroma que forman la teca. Las células tecales comienzan la diferenciación con la adquisición de receptores a la hormona luteinizante (LH) y la capacidad de biosíntesis de esteroides. Posteriormente se forma una cavidad central (antro) y el folículo se convierte en folículo terciario. Los folículos preovulatorios son aquellos que han alcanzado los estadios finales de crecimiento y maduración (Irusta, 2008) (Figura 1).

2.3 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

La actividad gonadal de la hembra está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y por el sistema nervioso autónomo (Lawrance & Burden, 1980; Donagay, et al., 2010). El ciclo reproductivo comienza durante la pubertad cuando el hipotálamo empieza a liberar la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) de forma pulsátil (Figura 3), la cual viaja por el sistema portal hipotalámico-hipofisiario (Neal-Perry & Santoro, 2006) y cuando se une a receptores específicos al nivel del gonadotropo adenohipofisiario estimula la secreción de FSH y LH (Richards & Pangas, 2010) (Figura 2).

Las gonadotropinas llegan al ovario y estimulan sus tejidos blanco de manera específica: la LH se une a los receptores que se encuentran en el ovocito y las células de la teca, promoviendo la síntesis de andrógenos, maduración del ovocito, ovulación, luteinización de las células foliculares y la síntesis progesterona; por su parte, la FSH se une a sus receptores presentes en las células de la granulosa e induce la aromatización de los andrógenos producidos en la teca y así la producción de estrógenos, además, estimula el desarrollo folicular y la síntesis de inhibina (Tresguerres, 2010; Vilalta & Puig, 2007).

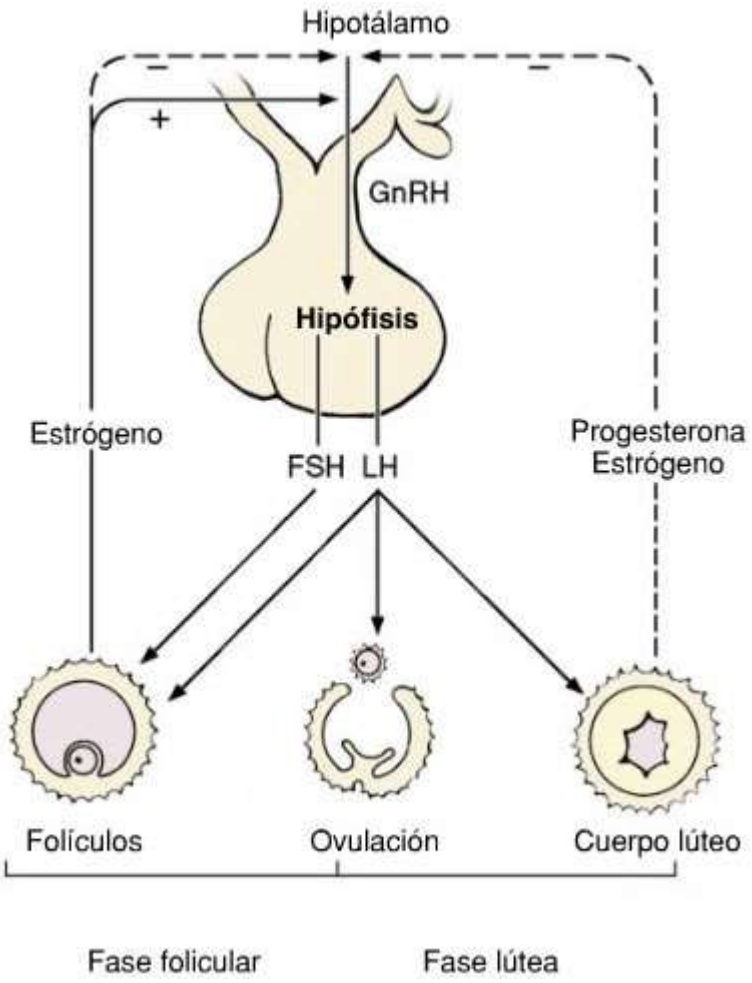


Figura 2. Eje Hipotálamo Hipófisis Ovario. El hipotálamo secreta GnRH de forma pulsátil, la cual estimula a la adenohipófisis para producir y liberar gonadotropinas (LH y FSH); ambas actúan sobre el ovario, en el cual se produce el proceso de ovulación y secreción de hormonas sexuales femeninas: estrógenos y progesterona. La concentración de estas hormonas sexuales regula la secreción de GnRH durante el ciclo reproductor. Este mecanismo de control es llamado *feedback* (estimulante + ó inhibitorio -) (Serrano, J. 2010).

Una vez ocurrida la ovulación hay una disminución de los niveles de estrógenos y comienza la fase luteínica. Las células de la granulosa se someten a cambios morfológicos, las células tecales y los vasos se mezclan para dar lugar al cuerpo lúteo, el cual será el responsable de la secreción de hormonas durante la fase post-ovulatoria del ciclo (Tresguerres, 2010). Si la fertilización no ocurre, el cuerpo lúteo degenera y una nueva fase folicular se desarrolla (Figura 1 y Figura 3). Esta serie de eventos neuroendócrinos y endócrinos llamados ciclo estral se repite de manera cíclica a lo largo de la vida fértil de las hembras.

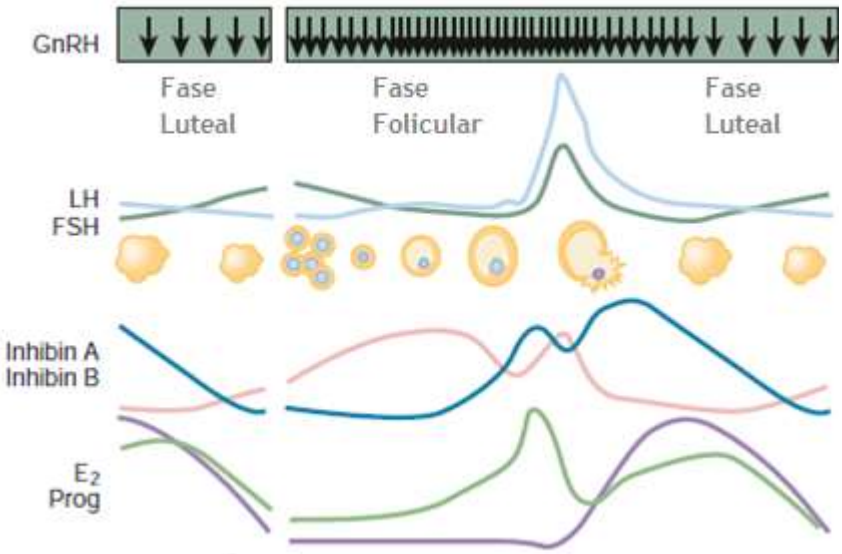


Figura 3. Secuencia de eventos que ocurren durante el ciclo estral en relación a las fases del ciclo ovárico y los cambios de frecuencia de los pulsos de la GnRH. La fase luteal culmina con la involución del cuerpo lúteo y el cese de la producción de progesterona; se inicia la fase folicular y la producción creciente de estrógenos por parte de los folículos hasta que se presente los picos preovulatorios de las gonadotropinas, condicionantes de la ovulación y el reinicio de la fase luteal (Strauss III & Williams, 2009).

2.4 Ciclo Estral en la Rata

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación espontánea cuyos ciclos ováricos ocurren durante todo el año. Gracias a éstas características, sumadas a su fácil reproducción y mantenimiento, la rata de laboratorio es un modelo ideal para el estudio de las funciones ováricas (Freeman, 2006). En la rata, el ciclo estral dura aproximadamente 4 días: metaestro (o diestro 1), diestro (o diestro 2), proestro y estro. Heape (1900) describió los días del ciclo estral de la siguiente forma: el proestro es la fase del ciclo estral en que se alcanza la máxima producción de estrógenos y el animal se prepara para la manifestación del celo; el estro es el periodo en el cual la hembra es receptiva a la cópula, conducta precedida por un incremento súbito en la secreción de progesterona, si la ovulación ocurre, el estro es seguido por el metaestro y después por el diestro que es el periodo en el cual el tracto reproductor se prepara para recibir el óvulo fecundado y varía de duración dependiendo de la especie. Si la fertilización no ocurre, el ciclo comienza nuevamente (Freeman, 2006).

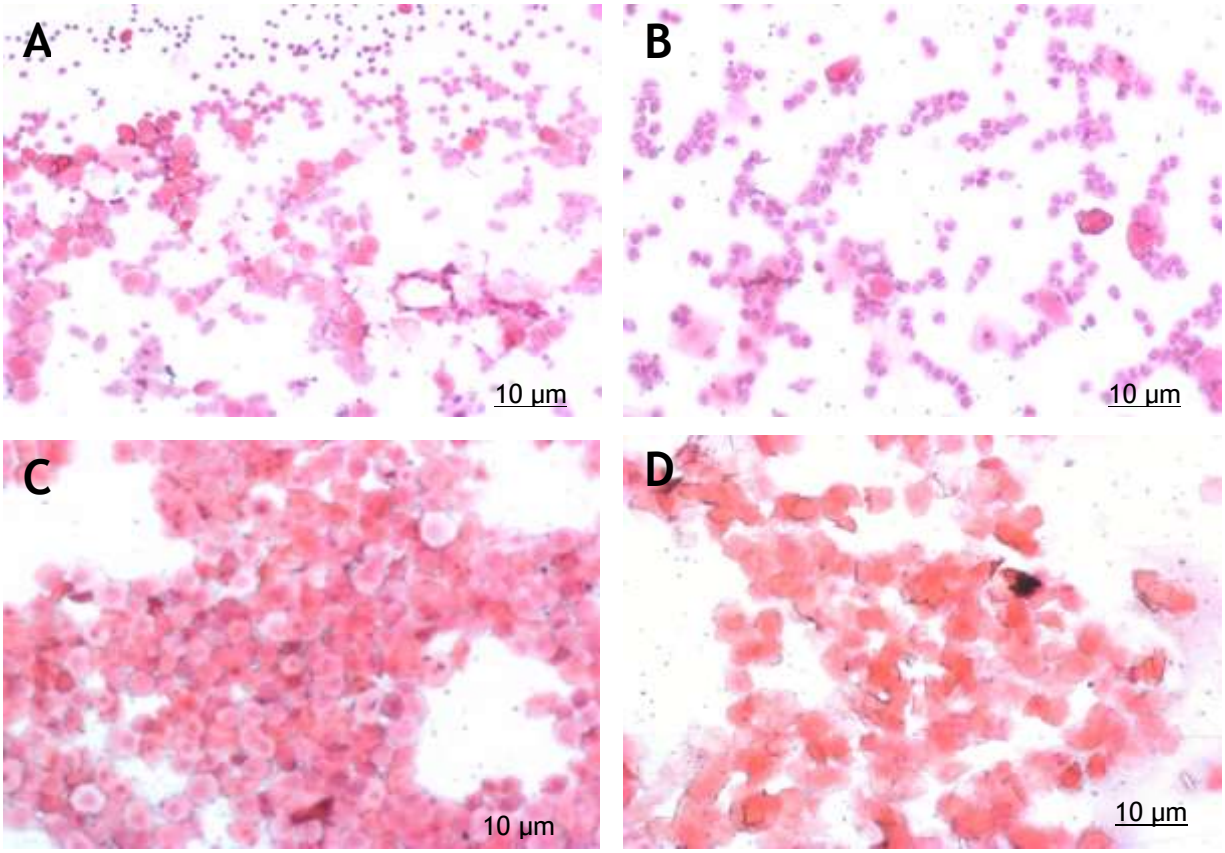


Figura 4. Muestras de frotis de las fases del ciclo estral identificadas por el cambio de la citología del epitelio vaginal. En A y B se observa un frotis típico de diestro, con una gran cantidad de leucocitos rodeando algunas células epiteliales. En B se observa un frotis característico de proestro, con una gran cantidad de células nucleadas y total ausencia de leucocitos. En D se observa un frotis característico de estro con una gran cantidad de células epiteliales de aspecto cornificado. (Tomadas en el laboratorio de Toxicología de la Reproducción).

Las fases del ciclo estral pueden ser identificadas por las modificaciones morfológicas que experimenta el epitelio vaginal como resultado de los cambios hormonales que ocurren a lo largo del ciclo.

Diestro 1: Se caracteriza por una gran cantidad de leucocitos que rodean células de descamación y a un escaso número de células epiteliales nucleadas (Figura 4A).

Diestro 2: De aspecto semejante al Diestro 1 pero con una menor cantidad de células epiteliales de descamación (Figura 4B).

Proestro: Es caracterizado por la ausencia de leucocitos una gran cantidad de células epiteliales con núcleos bien definidos y bordes regulares (Figura 4C).

Estro: Es caracterizado por una gran cantidad de células epiteliales anucleadas, con bordes cornificados y de aspecto escamoso (Figura 4D).

La duración de las diferentes fases del ciclo estral se ha podido determinar por los patrones del cambio citológico del epitelio vaginal por medio de frotis; diestro 1 dura de 6 a 8 horas, el diestro 2 de 55 a 57 horas, el proestro dura de 12 a 14 horas y el estro de 25 a 27 horas (Freeman, 2006). A lo largo de estas fases las concentraciones hormonales van cambiando rápidamente (Figura 5).

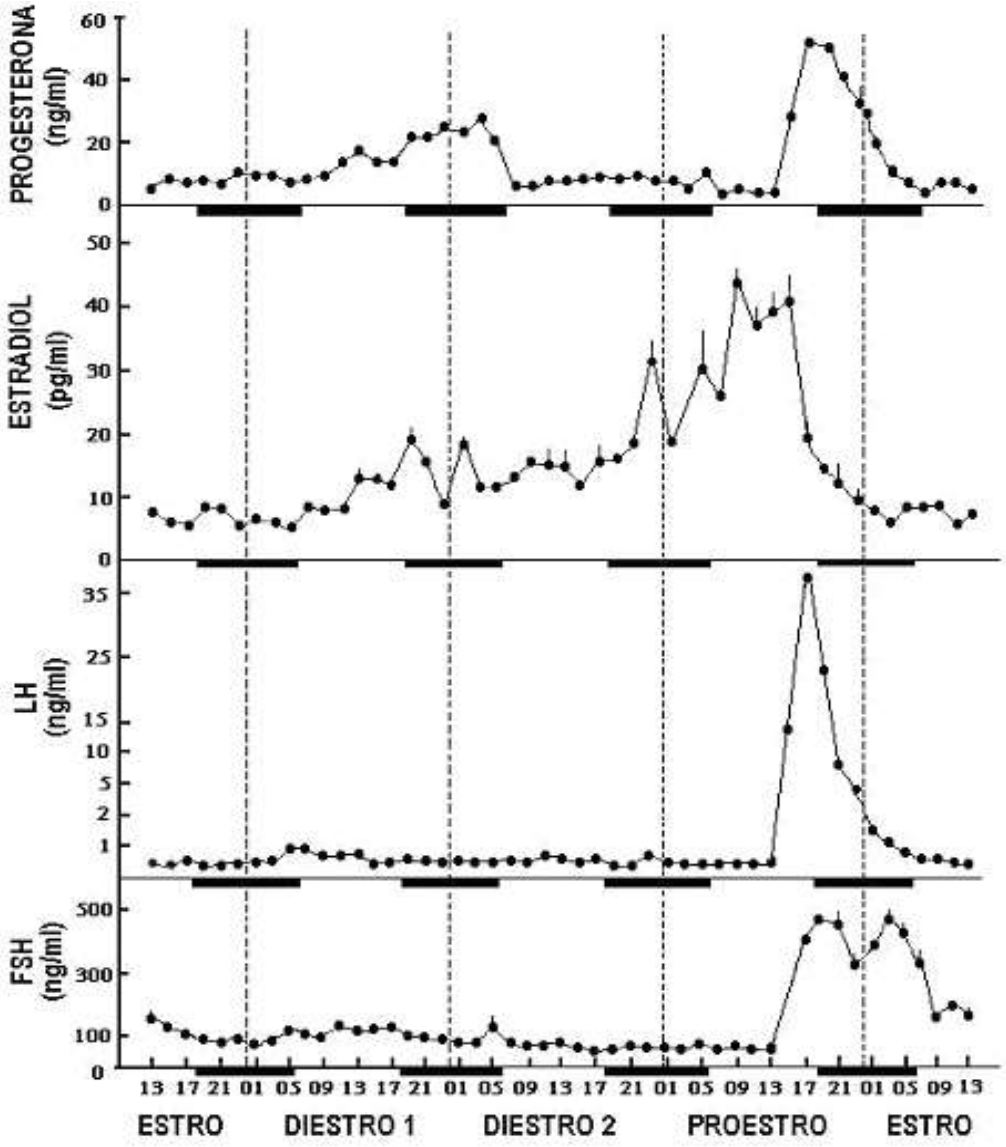


Figura 5. Perfil de secreción de gonadotropinas y esteroides sexuales en los diferentes días y horas del ciclo estral de la rata (Freeman, 2006).

2.5 Inervación Ovárica

La regulación de las funciones ováricas no sólo depende del efecto de las gonadotropinas sino también de los efectos moduladores de la inervación ovárica sobre la secreción de hormonas sexuales y la ovulación (Gerendai & Halász, 1997).

El ovario recibe tanto inervación intrínseca como extrínseca. Esta extensa red de nervios provienen de fibras pre y postganglionares de tipo simpático y parasimpático (Gerendai & Halász, 1997). Los nervios extrínsecos son en su mayoría simpáticos y éstas fibras preganglionares se originan de cuerpos celulares en el asta intermediolateral del cordón espinal en los segmentos T_{10} y T_{11} (Burden, 1978), mientras que las fibras postganglionares se originan del plexo ovárico (Aguado & Ojeda, 1984) y celiaco y llegan al ovario a través del nervio ovárico superior (NOS) (Gerendai & Halász, 1997)(Figura 6). El NOS es una rama del plexo celiaco y sus cuerpos celulares están presentes en los segmentos T_7 al L_2 del ganglio de la raíz dorsal y en los segmentos T_{10} a L_3 del ganglio paravertebral (Klein & Burden, 1988). El NOS transita por el ligamento suspensorio y el plexo ovárico, acompañando a la arteria ovárica (Gerendai & Halász, 1997). La principal función de la inervación extrínseca es regular el flujo sanguíneo ovárico pero también afecta la función endócrina de las células ováricas (Strauss III & Williams, 2009). Las fibras nerviosas provenientes del plexo ovárico y del NOS llegan al ovario hasta el estroma ovárico, junto con los vasos sanguíneos. Una parte de estos nervios atraviesan la corteza ovárica, inervando el tejido intersticial ovárico y formando un plexo alrededor de los folículos. Los nervios alcanzan tanto la teca interna como la externa, pero no la granulosa (Burden, 1978).

La inervación simpática de los ovarios en mamíferos se relaciona con la regulación de las funciones ováricas como la esteroidogénesis (Aguado & Ojeda, 1984), y el desarrollo folicular (Curry, et al., 1984; Greiner, et al., 2008). Se ha reportado que el ovario derecho está más inervado por fibras simpáticas que el izquierdo (Gerendai & Halász, 1997). El componente parasimpático consta de dos partes principales: una se deriva del nervio vago y entra al hilio vía el plexo ovárico. Este plexo está formado por axones adrenérgicos embebidos en una matriz

de colágena que inervan a los oviductos y al ligamento ancho proyectándose hacia el interior del ovario junto a la arteria y la vena ovárica (Klein & Burden, 1988). Otras fibras parasimpáticas preganglionares se encuentran en el tercer y cuarto nervios sacros, los cuales se derivan del nervio hipogástrico inferior (Burden, 1978).

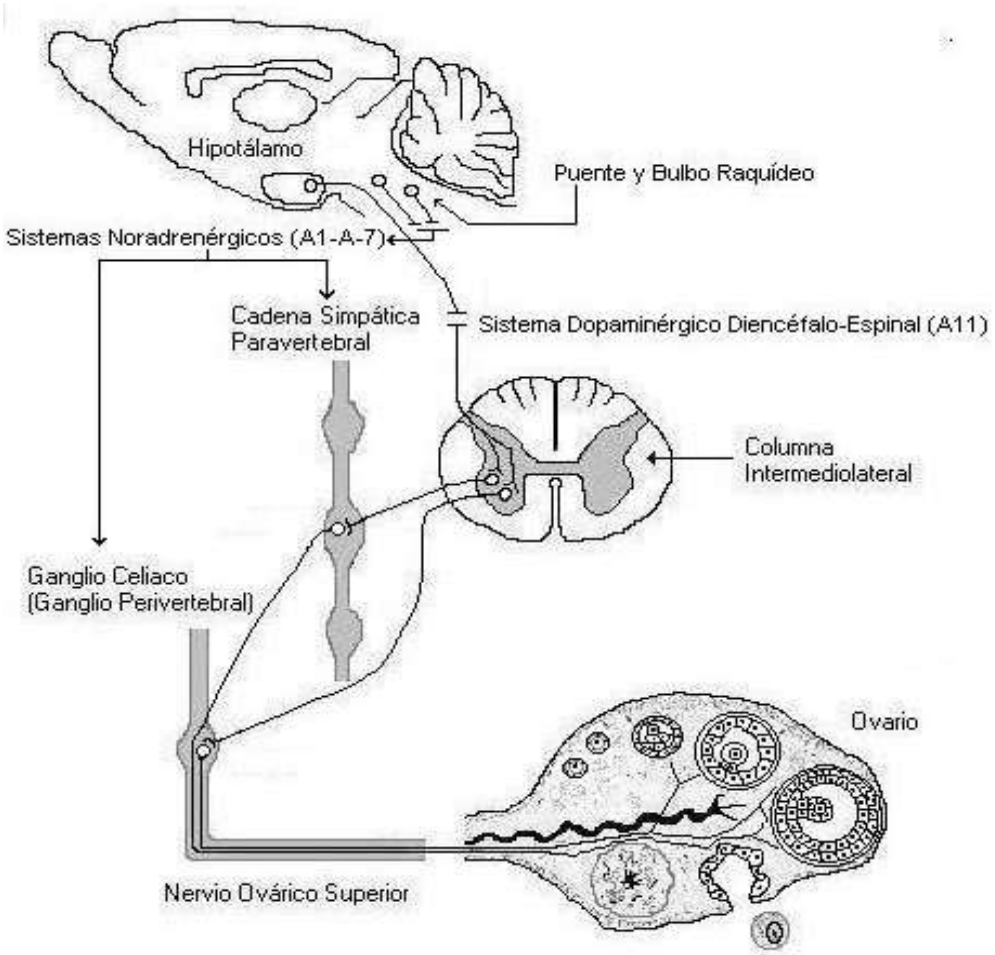


Figura 6. Inervación simpática del ovario vía nervio ovárico superior. Los cuerpos neuronales que proyectan al ovario se localizan en el ganglio celiaco y los ganglios de la cadena simpática paravertebral. Estas reciben proyecciones desde neuronas que se localizan: 1) al nivel del tallo cerebral (somas noradrenérgicos A_1 al A_7); y 2) al nivel de la columna intermediolateral de la médula espinal y que se conectan con neuronas dopaminérgicas (somas A_{11}) desde el hipotálamo (Dissen & Ojeda, 1998).

Las fibras que inervan al ovario son de tipo catecolaminérgicas, colinérgicas y peptidérgicas (Calka, 1988). Las fibras nerviosas catecolaminérgicas, están involucradas en el control de la función ovárica (Lara, et al., 2002). Y, en éstas, la

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

2.6 Las Catecolaminas en el Ovario

En los mamíferos, las catecolaminas pueden llegar al ovario por el torrente sanguíneo desde las glándulas adrenales o ser liberadas por las neuronas simpáticas que inervan al ovario (Lawrance & Burden, 1980). Como ya se mencionó, la inervación ovárica es principalmente de tipo catecolaminérgico, en la cual la noradrenalina es el neurotransmisor más importante (Ben-Jonathan, et al., 1984).

En la rata, el nervio ovárico superior proporciona el mayor aporte de fibras noradrenérgicas al ovario (Klein & Burden, 1988) pero también recibe esta información por vía sanguínea desde la médula adrenal. En 1980 Lawrence and Burden encontraron que la denervación ovárica reduce pero no elimina el contenido de noradrenalina, lo que sugiere la existencia de una fuente intrínseca de catecolaminas. Posteriormente, Ben-Jonathan y colaboradores (1984), postularon que una fuente más de noradrenalina es producida *in situ* por el ovario. Se encontró que las células foliculares son las encargadas de la síntesis catecolaminas ya que se encontraron altos niveles de éstas en fluido folicular pero no en suero (Bahr & Ben-Jonathan, 1985). Además, se encontró que las células tecales producen más catecolaminas que las células de la granulosa. Esta teoría fue reafirmada al encontrar la presencia de la enzima limitante de la síntesis de catecolaminas: tirosina hidroxilasa (TH) en ovarios de ratas (D'Albora, et al., 2000), monos (Dees, et al., 1995) y humanos (Anesetti, et al., 2001). Las neuronas intraováricas contienen TH y dopamina ß-hidroxilasa (DBH) (Mayerhofer, et al., 1998).

Existen evidencias que sugieren que los nervios adrenérgicos podrían participar en: 1) ovulación (Jacobowitz & Wallach, 1967), 2) la secreción de gonadotropinas y actividad del ciclo estral y 3) influir en la secreción de hormonas esteroides y el desarrollo de los folículos ováricos (Burden, et al., 1985).

2.7 Dopamina en el Ovario

La dopamina (DA) está relacionada con el control de varias funciones cerebrales como: movimiento, aprendizaje y reproducción (Jackson & Westlind, 1994). Los receptores a dopamina están acoplados a proteínas G, que se encargan de mediar las acciones de la dopamina a nivel central y periférico. Los receptores a dopamina son más abundantes en cerebro, pero también se encuentra en retina y algunos órganos periféricos como el riñón (Rankin, et al., 2010). Se han identificado cinco subtipos de receptores a dopamina en mamíferos, los cuales se dividen en dos familias:

Tipo de Receptor Dopaminérgico	Función
DA1: incluye receptor a dopamina subtipo 1 y 5	Receptores acoplados a proteínas G_s y estimulan la activación de adenilato ciclasa (AC), resultando en la producción de AMP cíclico.
DA2: incluye receptor a dopamina subtipo 2, 3 y 4	Acoplados a proteínas G_i y no están acoplados al funcionamiento de la AC.

La dopamina ovárica proviene de la inervación extrínseca, de las glándulas adrenales y de las células tipo neurona. Se han encontrado grandes concentraciones de dopamina en el líquido antral de folículos preovulatorios de humanos (Mayerhofer, et al., 1999). Estudios recientes han demostrado que la dopamina no es sólo un precursor de la síntesis de NA, ya que ejerce sus propios efectos. En el ovario humano y en cultivos de células granulosas y luteales sus efectos han alcanzado los receptores DA1 mediados por la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (Mayerhofer, et al., 1999; 2000). Por otro lado, la hibridación *in situ* ha revelado la existencia de DBH y genes transportadores de DA en ovocitos, lo que indica la habilidad de estas células de metabolizar DA exógena en NA (Mayerhofer, et al., 1998).

La fosfoproteína de 32 kDaltones regulada por dopamina y AMP cíclico (DARPP32) es capaz de actuar como tercer mensajero y se ha encontrado en células granulosas luteinizadas del ovario humano. Al unirse la dopamina a sus receptores DA1, la fosforilación de esta proteína se aumenta (Mayerhofer, et al., 2000).

2.7.1 Antagonistas Dopaminérgicos

Los antagonistas dopaminérgicos juegan un papel importante como tratamiento contra diversos padecimientos psiquiátricos y neurológicos, y también como herramienta de investigación (Tabla 1).

Tabla 1. Características farmacológicas de los receptores dopaminérgicos (Bahena, et al., 2000).

	DA1		DA2		
Subtipo	D_1	D_5	D_2	D_3	D_4
Afinidad por DA	µM	Submicromolar	µM	nM	Submicromolar
Agonistas selectivos	SKF38393	SKF38393	Quinpirol	Bromocriptina	?
Ki (nM)					
Dopamina	2000	250	2000	30	450
Apomorfina	700	400	70	70	4
Bromocriptina	700	500	5	7	300
Quinpirole	1400		1400	40	50
SKF38393	150	100	10000	5000	10000
Agonistas selectivos	SCH23390	SCH23390	Haloperidol	UH232	Clozapina
Ki (nM)					
Haloperidol	30	40	0.6	3	5
Sulpiride	40000	80000	10	20	50
SCH23390	0.3	0.3	1000	1000	3500
Espiperona	350	3500	0.06	0.6	0.08
Risperidona	-	-	5	7	7
Raclopride	18000	-	1.8	3.5	2400

SCH23390: Es un antagonista selectivo de los receptores DA1 y se usa en estudios de enfermedades neurológicas relacionadas con la dopamina como la enfermedad de Parkinson y ha sido de gran ayuda para determinar la ubicación topográfica de receptores DA1 en el cerebro. Por su especificidad a los receptores DA1 es ampliamente utilizado en estudios para entender el papel de la dopamina en funciones y enfermedades neurológicas (Bourne, 2001).

Sulpiride: Es un antagonista dopaminérgico para receptores tipo DA2 (Rankin, et al., 2010). Es usado como fármaco antipsicótico en tratamientos clínicos para psicosis y depresión (Caley & Weber, 1995). El tratamiento crónico con Sulpiride aumenta la sensibilidad de los receptores DA2 pero no afecta la capacidad de respuesta de los receptores DA1 (Memo, et al., 1981).

3. Antecedentes

En 1987 Domínguez y colaboradores evaluaron los efectos del antagonismo de los receptores DA1 y DA2 en los diferentes días del ciclo estral sobre la ovulación en la rata adulta. En ese experimento se utilizaron ratas con ciclos regulares de cuatro días que fueron inyectadas intramuscularmente con haloperidol (antagonista DA1 y DA2) en diestro 1, diestro 2, proestro o estro en diferentes horarios (9:00, 13:00 ó 21:00 h) y fueron sacrificadas en la mañana del siguiente estro esperado. El haloperidol bloqueó la ovulación cuando se administró en diestro 1 o estro pero fue menos efectivo cuando se administró en la tarde del diestro 2 o durante el proestro. Estos resultados permitieron sugerir que la información dopaminérgica es fundamental para que la secuencia de eventos neuroendócrinos y endócrinos que culminan con la ovulación se lleve a cabo de manera normal. Por otro lado, la administración subcutánea de una dosis de haloperidol en la primera (Ramírez-Ávila, 2001) o en la segunda mitad del ciclo estral (Pastelín, 2003) interrumpe el ciclo e inhibe de modo claro la secreción de gonadotropinas y de estrógenos. Si bien estos efectos pudieran ser explicados por la interrupción de la secreción de gonadotropinas, el reemplazo hormonal fue ineficaz para restablecer la función ovárica (Vargas-Torres, 2002), lo que permite suponer que el bloqueo sistémico de los receptores DA1 y DA2 afecta la secreción de las gonadotropinas y están involucrados de manera directa en los mecanismos que controlan la función ovárica.

Recientemente, se han evaluado los efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos ováricos sobre la ovulación espontánea en la rata adulta, usando haloperidol ó 2-Etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) inyectado dentro de las bursas ováricas en las diferentes horas y días del ciclo estral. En estos estudios se ha encontrado que el antagonismo de estos receptores provoca la inhibición de la ovulación espontánea por interrupción de la secreción preovulatoria de GnRH, lo que depende del día y la hora en que se realiza la microinyección (Venegas, et al., 2012; 2013; 2014).

4. Justificación

Se ha mostrado que la dopamina y sus receptores, tanto el DA1 como el DA2, están presentes en el ovario, sin embargo, no es claro si el papel de estos receptores es idéntico o cada uno tiene una función específica.

Con base en lo anterior, se propone estudiar el papel de los receptores DA1 o DA2 usando fármacos antagonistas selectivos administrados dentro de las bursas ováricas para evaluar su actividad sobre la ovulación espontánea y la expresión de señales intracelulares relacionadas con la presencia de dopamina y, además, saber si estos receptores actúan de forma idéntica o cada uno tiene actividades diferentes.

El funcionamiento de los órganos y sistemas corporales son controlados por el sistema nervioso central y cualquier variación en éste, repercute en el funcionamiento de estos órganos y sistemas. Este estudio nos ayudará a comprender mejor el papel del sistema endócrino y nervioso del ovario y la posible regulación que ejerce la dopamina al unirse a sus receptores en este órgano. Dicha información podrá ser utilizada para entender el funcionamiento de la gónada femenina y ayudar a entender las causas de algunas patologías como: infertilidad, anovulación, síndrome de ovario poliquístico, entre otras.

5. Hipótesis

El antagonismo de los receptores DA1 o DA2 a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral indujo un bloqueo de la ovulación espontánea y una disminución en la expresión de DARPP32, TH y DBH. Dichos cambios dependerán del día del ciclo estral y de la hora del antagonismo farmacológico.

6. Objetivos

6.1 Objetivo General

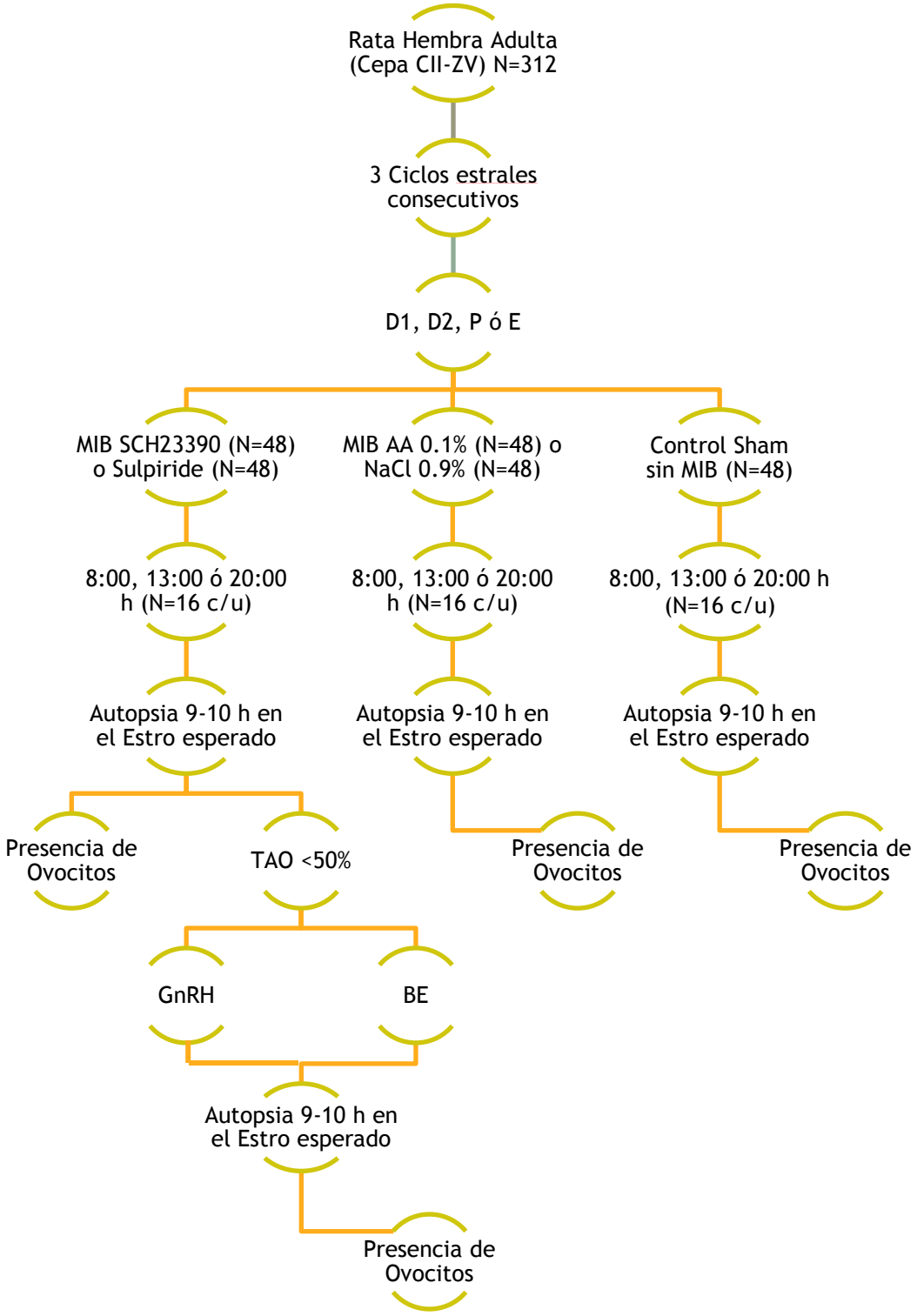
Analizar los efectos del antagonismo de los receptores ováricos DA1 o DA2 en los diferentes días del ciclo estral sobre la ovulación espontánea y la presencia de señales intracelulares relacionadas con la dopamina.

6.2 Objetivos Particulares

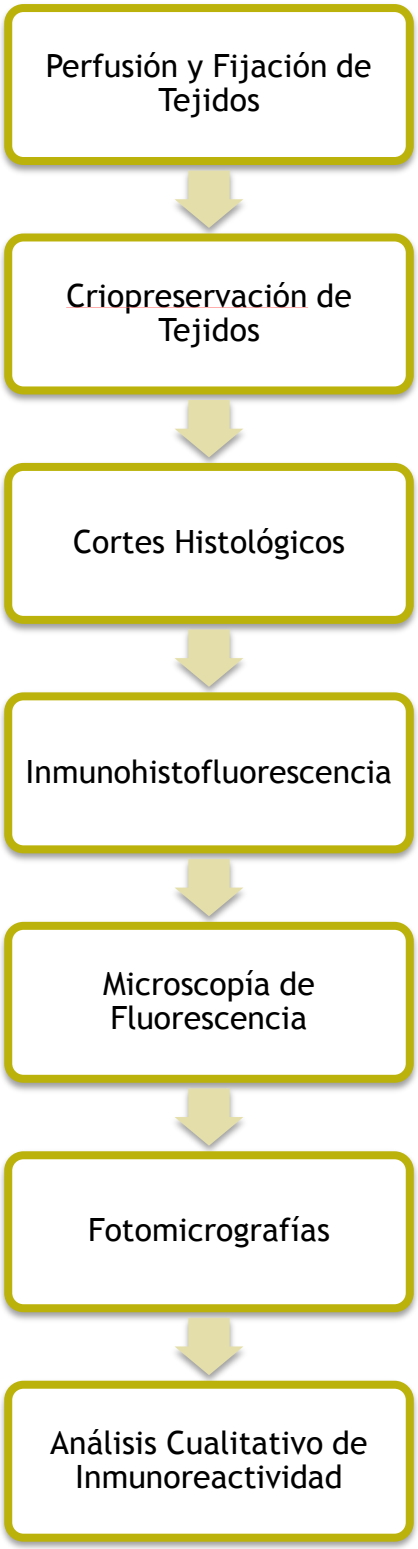
1. Analizar los efectos del bloqueo de los receptores DA1 o DA2 sobre la ovulación espontánea de la rata adulta cíclica en los diferentes días y horas del ciclo estral.
2. Analizar los efectos del reemplazo hormonal de la señal hipotalámica u ovárica en aquellos grupos experimentales en los que se haya bloqueado el receptor DA1 o DA2 y que tengan una tasa de animales ovulantes menor al 50%.
3. Analizar los efectos del bloqueo de los receptores DA1 o DA2 sobre la expresión de DARPP32, TH y DBH.

7. Diagrama Metodológico

7.1 Laparotomía Dorso Bilateral



7.2 Inmunohistofluorescencia



8. Metodología Experimental

8.1 Animales de Experimentación

Se utilizaron ratas hembras adultas vírgenes de la cepa CII-ZV (N=312), con edades de 90 a 120 días y con peso corporal de 200 a 250 g, provenientes del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura, humedad, ciclo luz/oscuridad de 14/12 h, agua y alimento *ad libitum*.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la BUAP y se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

8.2 Registro del Patrón de Ciclicidad Vaginal (Ciclo Estral)

Diariamente, entre las 09:00 y las 10:00 horas se registraron los cambios citológicos individuales por medio de frotis vaginales a todos los animales. Las muestras de la células del epitelio vaginal fueron analizadas con el objetivo 10X con un microscopio Leica CME para evaluar los cambios citológicos y determinar en qué día del ciclo estral (CE) se encontraban. En este estudio sólo se utilizaron animales con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración.

8.3 Grupos Experimentales

Todas las ratas que presentaron al menos tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días (animales cíclicos) fueron divididas en los diferentes grupos experimentales de acuerdo al horario, día del ciclo y tratamiento farmacológico (Tabla 2).

Grupos con Antagonistas Dopaminérgicos (SCH23390 o Sulpiride):

Ratas cíclicas a las que se les administró 20 µL de solución de SCH23390: Antagonista reversible del receptor DA1 ([5 µg/µL] diluido en NaCl 0.9%) o Sulpiride: Antagonista reversible del receptor DA2 ([10 µg/µL] diluido en Ácido Ascórbico 0.1%) dentro de cada bursa ovárica.

Grupos con Vehículo:

Ratas cíclicas a las que se les administró 20 µL de NaCl 0.9% ó 20 µL de Ácido Ascórbico 0.1% dentro de cada bursa ovárica.

Grupo Control:

Animales cíclicos a los que se les realizó la laparotomía bilateral e inspección del ligamento que sostiene al útero sin exteriorizar los ovarios ni administrar ninguna sustancia.

Tabla 2 Grupos experimentales formados con los animales a los que se les realizó cirugía con los diferentes tratamientos a los diferentes horarios (08:00, 13:00 y 20:00 h) y en los diferentes días del CE.

Grupos/Día CE	Estro	Diestro 1	Diestro 2	Proestro
Control	8:00, 13:00 o 20:00 h			
NaCl 0.9%	8:00, 13:00 o 20:00 h			
Ácido Ascórbico 0.1%	8:00, 13:00 o 20:00 h			
SCH 23390	8:00, 13:00 o 20:00 h			
Sulpiride	8:00, 13:00 o 20:00 h			

8.4 Preparación de los fármacos

8.4.1 SCH23390:

(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) Se preparó a una concentración de 5 mg/ml y para su dilución se utilizó NaCl 0.9 %.

8.4.2 Sulpiride:

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

8.5 Preparación de Hormonas

8.5.1 Solución Stock de GnRH

Se pesaron 2 mg de GnRH sintética (LHRH, Cat. L-1898; Sigma Inc.) y se diluyeron en 10 ml de agua destilada; la solución se aforo a 50 ml obteniéndose una concentración final de 40 µg/ml.

8.5.2 Solución de GnRH sintética

Se tomó 1 ml de solución stock y se aforó hasta 5 ml con agua destilada; la concentración de la solución resultante es de 8 µg/ml.

8.5.3 Solución de Benzoato de Estradiol

De acuerdo a Everett y Sawyer (1949) se pesaron en balanza de precisión (0.1 mg) 20 mg de cristales de Benzoato de Estradiol (BE; Sigma Products Inc., Catálogo: B-8515, ß-Estradiol 3-benzoate). Los cristales se disolvieron en 100 µL de acetona seguido de la incorporación de 900 µL de aceite vegetal de canola (Solución Stock a concentración final de: 20 mg/mL). Inmediatamente, se tomaron 10 µL de la solución stock de BE y se aforó a 1 ml (1000 µL) con aceite vegetal de canola puro (Solución Oleosa a concentración final de: 0.2 mg/mL). La solución oleosa de BE se guardó en frasco ámbar con sello de goma (cada mililitro de solución oleosa alcanza para 40 dosis recomendadas de BE de 10µg que equivalen a 100 UI de estrógeno por cada una).

8.6 Laparotomía Dorso Bilateral

Las ratas que cumplieron con la condición de ciclicidad fueron sometidas a cirugía. Cabe señalar que para las cirugías en el horario de las 20:00 horas se mantuvieron las condiciones de oscuridad y se trabajó únicamente con luces rojas para no alterar su ciclo circadiano.

La mesa quirúrgica y el equipo de cirugía fueron desinfectados con una solución de clorhexidina 2%. Las ratas fueron anestesiadas con éter etílico inhalado y posteriormente rasuradas desde la región de las costillas inferiores hasta la región pélvica donde se pliegan cada una de las patas de ambos costados. Se procedió a colocar al animal sobre una tabla de disección en posición decúbito lateral y limpiar

la piel con clorhexidina 2%. Con ayuda del bisturí, realizar una incisión sagital de aproximadamente 1 cm de piel y de 0.5 cm de músculo abdominal hasta ingresar a la cavidad peritoneal y exteriorizar el ovario. Con una bomba de perfusión nanomolar (Stoelting Co. Illinois, USA) conectada a una jeringa Hamilton de 100 µL con una aguja hipodérmica (25G x 16mm), se administraron 20 µL del fármaco correspondiente: SCH23390 o Sulpiride o de los vehículos: NaCl 0.9% o ácido ascórbico 0.1% dentro de cada bursa ovárica (2.12 µL/s) y esperar 20 segundos antes de retirar la aguja de la bursa. Finalmente, se reingresó el ovario a la cavidad peritoneal y suturó con seda quirúrgica el músculo abdominal y la piel. Se aplicó una gota de azul piotánico como cicatrizante en la herida. Esta técnica se realizó de forma similar en el otro ovario.

Para las ratas del grupo control se realizó la técnica antes mencionada pero sin exteriorizar los ovarios ni administrar ninguna sustancia.

8.7 Reemplazo Hormonal

Únicamente se hicieron los reemplazos hormonales en aquellos grupos que presentaron una tasa de ovulación menor al 50%. Estos grupos fueron sometidos a laparotomía dorso bilateral, siguiendo el protocolo explicado anteriormente y posteriormente fueron tratados con una dosis de GnRH sintética o benzoato de estradiol como se describe a continuación:

8.7.1 Reemplazo de la Señal Hipotalámica:

A las 14 horas del día del proestro esperado posterior a la cirugía, se administraron 3.7 µg/kg peso de GnRH sintética de forma intramuscular.

8.7.2 Reemplazo de la Señal Ovárica:

A las 14 horas del día del diestro 2 esperado posterior a la cirugía, se administraron 10 µg de benzoato de estradiol de forma subcutánea.

8.8 Extracción de Tejidos

Todos los animales fueron sacrificados entre las 08:00 y 09:00 horas de la mañana del estro vaginal esperado.

8.8.1 Sacrificio por Decapitación

Dos animales de cada grupo fueron decapitados en cuarto aislado y ventilado. Se extrajo la sangre del tronco y se disecaron de inmediato los oviductos, los cuales fueron inspeccionados en un estéreo-microscopio para buscar signos de ovulación y la presencia de ovocitos.

8.8.2 Perfusión Intracardiaca y Fijación de Tejidos

Dos animales de cada grupo fueron anestesiados con pentobarbital sódico (80 mg/kg peso) por vía intraperitoneal) para ser 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 nM 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.

8.9 Criopreservación de Ovarios

Los ovarios obtenidos por la técnica de fijación de tejidos fueron lavados con PBS por 24 horas a 4°C y posteriormente pasados a frascos con concentraciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30 %), manteniéndolos durante 24 horas a 4°C en cada solución, con el fin de prepararlos para el posterior corte histológico en frio.

8.10 Cortes Histológicos

Los órganos previamente criopreservados se cortaron a 20 micras de grosor usando el crióstato (Microm HM 505 N) a una temperatura de -20°C. Los cortes se colocaron en portaobjetos previamente recubiertos por una capa de Poly-L-Lisina (Sigma-Aldrich).

8.11 Inmunohistoquímica Acoplada a Fluorescencia

Los tejidos adheridos a los portaobjetos fueron lavados tres veces por 10 minutos con PBS y delimitados con plumón hidrofóbico (ImmEdge). Posteriormente, los tejidos se permearon con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante treinta minutos y se bloquearon con albúmina sérica de bovino (ASB) libre de IgGs (Sigma) al 2 % en

PBS durante 1 hora 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 que se utilizaron fueron: anti-DARPP32 (Santa Cruz biotechnology) (1:500); anti-TH (Santa Cruz biotechnology) (1: 100); anti-DBH (Santa Cruz biotechnology) (1: 100) por separado. Para la inmunodetección indirecta se utilizó un anticuerpo secundario bioespecífico conjugado con fluoresceína 5-isotiocianato (FITC) (1:100), durante una hora a 4°C en cámara húmeda y protegidos de la luz. Finalmente, las preparaciones se montaron con medio 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 se capturó con una cámara digital (DFC-300 FX) acoplada al microscopio y con el objetivo 40X. Las fotomicrografías obtenidas con ayuda del software Image-Pro Plus 6.3 (Media Cybernetics), se almacenaron y posteriormente se realizó el análisis cualitativo de la inmunorreactividad en las células de los folículos ováricos.

8.12 Análisis Estadístico

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

$$TAO = \frac{\text{Número de ratas que ovularon}}{\text{Total de ratas del grupo}} \times 100$$

Todos los resultados de ovulación espontánea obtenidos se analizaron usando la Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher (PPEF). En todos los casos se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias que fueron iguales o menores a 0.05.

9. Resultados

9.1 Ovulación Espontánea

9.1.1 El procedimiento quirúrgico no afecta la tasa de animales ovulantes

Para verificar que el procedimiento quirúrgico *per se* no afectara la ovulación, los animales fueron sometidos a laparotomía dorso bilateral pero sin exteriorizar los ovarios ni hacer la microinyección (grupos control). Los resultados en estos grupos indican que la laparotomía dorso bilateral no afecta la ovulación espontánea (45/48) ya que más del 93% de los animales ovularon después del procedimiento quirúrgico (Figura 7).

9.1.2 La microinyección en bursa de NaCl 0.9% induce una disminución en la tasa de animales ovulantes

Con la finalidad de evaluar los cambios que pudiera inducir el vehículo del SCH23390 sobre la ovulación espontánea se realizó una microinyección dentro de las bursas de NaCl 0.9% en los diferentes días y horas del ciclo estral. Se encontró una disminución en la TAO (34/52) respecto a los datos de los grupos control (Figura 7). La disminución de la TAO es más evidente en los grupos tratados a las 8:00 h del diestro 1 y a las 20:00 del estro ($p<0.05$ PPEF).

9.1.3 La microinyección en bursa de ácido ascórbico 0.1% no afecta la ovulación espontánea

Con la finalidad de evaluar los cambios que pudiera inducir el vehículo del Sulpiride sobre la ovulación espontánea se realizó una microinyección dentro de las bursas de ácido ascórbico 0.1% en los diferentes días y horas del ciclo estral. No se encontró una disminución significativa en la TAO (46/51) respecto a los datos de los grupos control (Figura 7).

9.1.4 El receptor DA1 es más activo durante el diestro 1

Para evaluar el papel de los receptores DA1 presentes en el ovario y su papel en la ovulación espontánea, se usó un antagonista selectivo de los receptores DA1 (SCH23390). Al comparar los resultados de los grupos tratados con SCH23390 (55/74) y aquellos tratados con su vehículo, se encontraron cambios significativos

en la TAO de los grupos administrados en D1 y E a las 20:00 h (Figura 8). Sin embargo, dado que la microinyección de NaCl 0.9% induce cambios en la TAO, es más factible comparar los efectos del antagonismo de los receptores DA1 con aquellos animales cuyos ovarios permanecieron intactos y no se modificó la ovulación; tenemos así que, al comparar los animales tratados con SCH23390 vs el grupo control, resulta evidente que el antagonismo de los receptores DA1 durante el diestro 1 disminuye significativamente la ovulación.

9.1.5 El receptor DA2 permanece activo desde la noche del estro hasta la mañana del diestro 2

Para evaluar el papel de los receptores DA2 presentes en el ovario y su papel en la ovulación espontánea, se usó un antagonista selectivo de los receptores DA2 (Sulpiride). Al comparar los resultados de los grupos tratados con Sulpiride (29/65) y aquellos tratados con su vehículo, se encontraron cambios significativos en la TAO de los grupos administrados en diestro 1 a las 13:00 h, diestro 2 a las 8:00 y 20:00 h y estro a las 20:00 (Figura 9). Dichos resultados permiten ver que el antagonismo del receptor DA2 conlleva a un bloqueo de la ovulación, además, estos receptores son más activos desde la noche del estro hasta la noche del proestro.

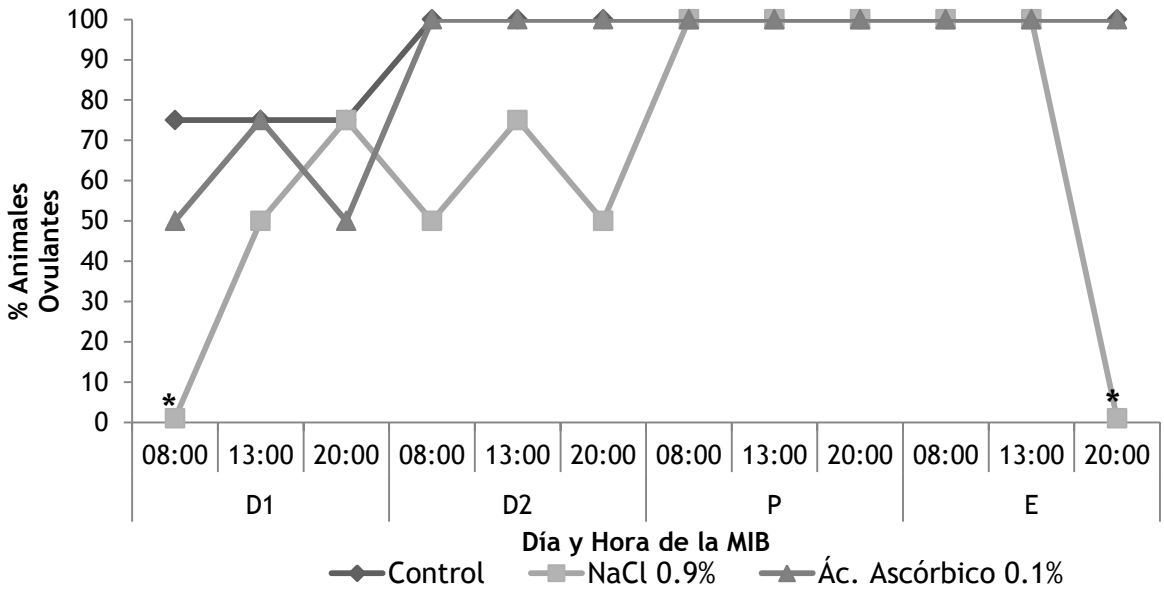


Figura 7. Variación en la TAO de los grupos control y sham: NaCl 0.9% y Ác. Ascórbico 0.1% a lo largo del ciclo estral (*p<0.05 vs los demás grupos; PPEF).

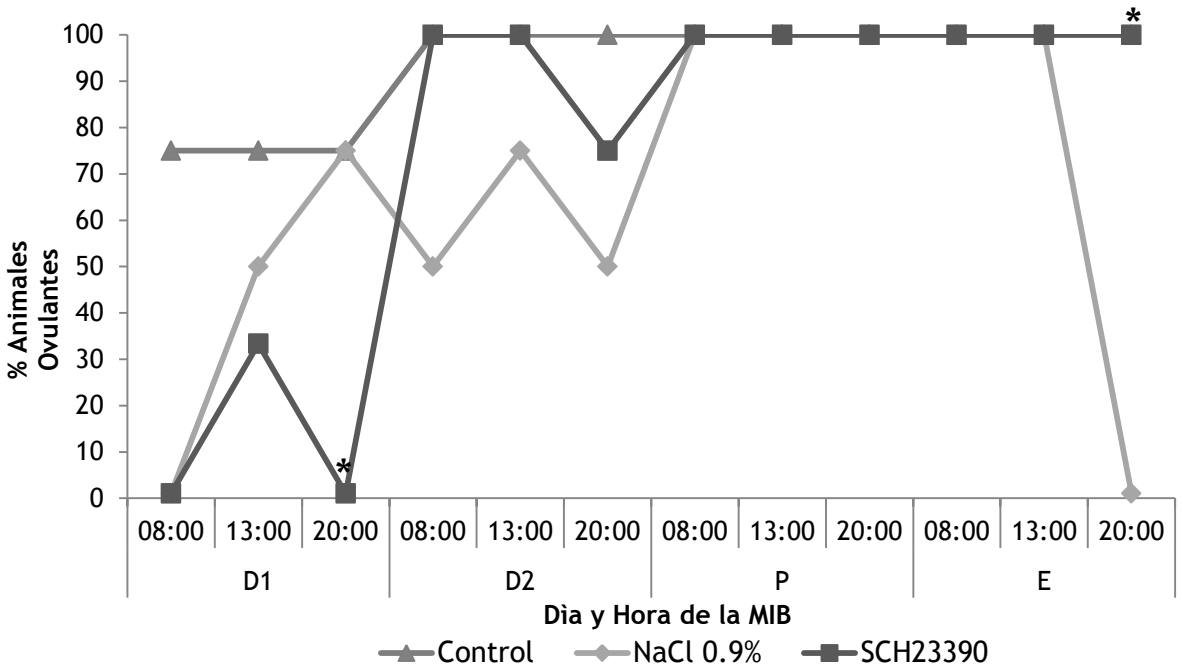


Figura 8. Variación en la TAO de los grupos tratado con SCH23390 y su vehículo: NaCl 0.9% a lo largo del ciclo estral (*p<0.03 vs vehículo; PPEF).

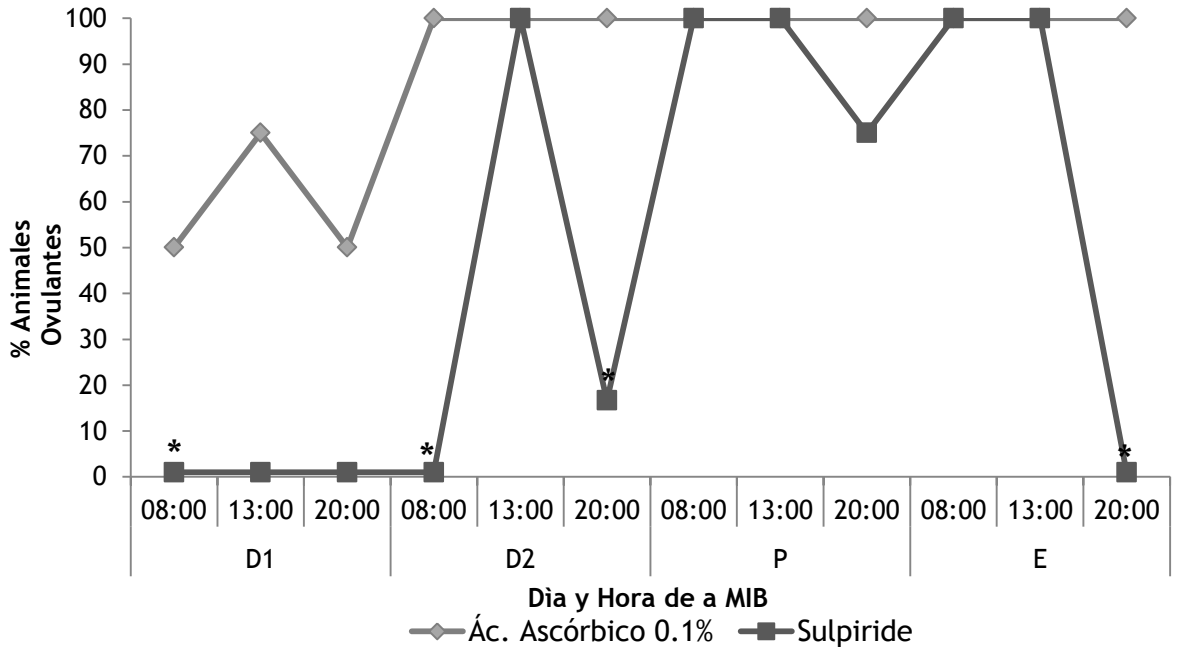


Figura 9. Variación en la TAO de los grupos tratados con Sulpiride y su vehículo: Ác. Ascórbico 0.1% a lo largo del ciclo estral (*p<0.03 vs correspondiente sham; PPEF).

9.2 Análisis de los efectos del Remplazo Hormonal

Los remplazos hormonales se realizaron en los grupos donde se produjo un bloqueo de la ovulación mayor al 50%, con la finalidad de descubrir a que nivel (ovárico o hipotalámico) se ejercían los cambios producidos por el antagonismo de los receptores DA1 o DA2. De manera general, el remplazo de la señal hipotalámica con GnRH indujo la recuperación de la ovulación en el 100% en los grupos tratados con SCH23390 a las 8:00, 13:00 o 20:00 h en D1. Por otra parte, el reemplazo de la señal ovárica con benzoato de estradiol restableció la ovulación en el 100% de los animales tratados con SCH23390 a las 8:00 y 20:00 h del D1; sin embargo, a las 13:00 h sólo la restableció parcialmente (Figura 10).

Por otra parte, la administración de GnRH restableció significativamente la ovulación en los grupos tratados con Sulpiride a las 8:00, 13:00 o 20:00 h del D1, 08:00 o 20:00 h del D2 y a las 20:00 h del día del E. El restablecimiento de la señal ovárica con benzoato de estradiol fue poco eficaz durante el D1 ya que sólo se reestableció la ovulación en el 50 y 75% de los animales a las 8:00 y 13:00 h respectivamente, siendo totalmente ineficiente a las 20:00 h. Durante el D2 se reestableció la ovulación en un 100% a las 8:00 y 20:00 h y un 75% a las 20:00 del E (Figura 10).

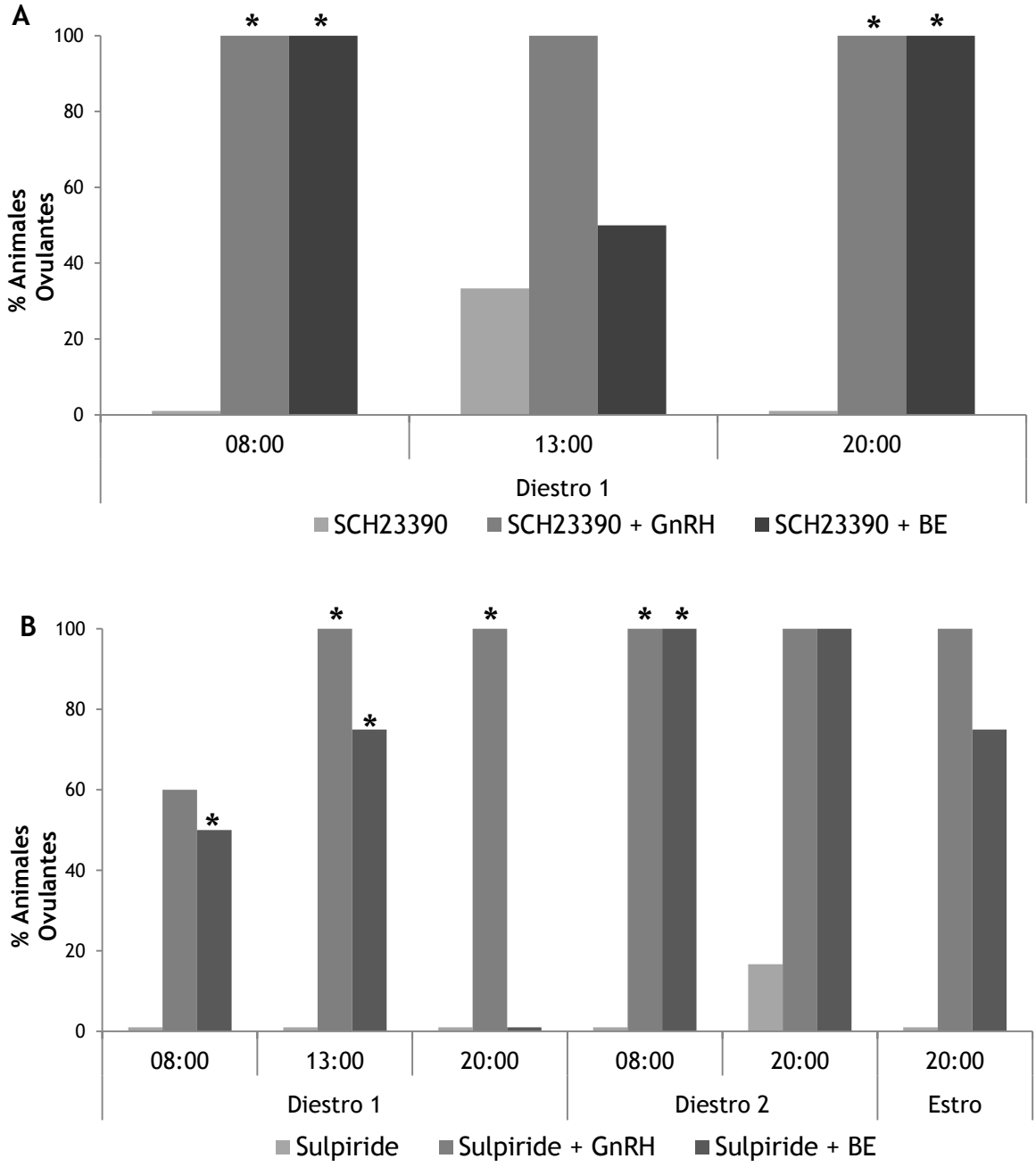


Figura 10. Los animales fueron administrados en diestro 1, diestro 2, proestro o estro a las 8:00, 13:00 o 20:00 h con 20 µL de alguno de los antagonistas dopaminérgicos selectivos (SCH23390 o Sulpiride) dentro de las bursas ováricas; posteriormente, fueron administrados con GnRH o benzoato de estradiol y sacrificados al estro esperado. A los animales a los que se les antagonizó el receptor DA1 (A) el remplazo hormonal de la señal hipotalámica (GnRH) fue eficaz en el 100% mientras que cuando se administró BE sólo se recuperó la ovulación de forma parcial. Por otro lado, a los animales a los que se les antagonizó el receptor DA2 (B) tanto el remplazo de la señal ovárica como hipotalámica presenta problemas, ya que restable la ovulación sólo de forma parcial.

9.3 Inmunohistofluorescencia

En la Figura 11 se observan las fotomicrografías de los cortes histológicos que fueron tratados con el anticuerpo primario anti-DARPP32, la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** corresponde a los cortes tratados con el anticuerpo anti-TH y la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** corresponde a los cortes tratados con el anticuerpo anti-DBH.

En todas las figuras, las fotomicrografías A, B, C y D corresponden a animales que fueron sometidos a laparotomía dorsobilateral con MIB de ácido ascórbico 0.1% en diestro 1, diestro 2, proestro y estro correspondientemente. Se observan marcas inmunorreactivas (color verde) distribuidas en las células de la granulosa en los grupos tratados con anticuerpo anti-DARPP32, mientras que aquellos cortes en los que se utilizó anti-TH o anti-DBH las marcas inmunorreactivas se encuentran en las células de la teca. Todos los animales inyectados con ácido ascórbico 0.1% presentaron marcas inmunorreactivas para todos los anticuerpos.

Las fotomicrografías de las figuras 11, 12 y 13 incisos E, F, G y H corresponden a animales que fueron sometidos a laparotomía dorsobilateral con MIB de SCH23390 en diestro 1, diestro 2, proestro y estro correspondientemente. Se observan marcas inmunorreactivas únicamente en los animales tratados en diestro 2, proestro y estro (figuras 11, 12 y 13 incisos F, G y H. En la Figura 11, se aprecia inmunorreactiidad positiva a DARPP32 en las células de la granulosa mientras que en las figuras 12 y 13, las marcas inmunorreactivas a TH y DBH se observan en las células tecales

Las fotomicrografías I, J, K y L en las figuras 11, 12 y 13 corresponden a animales que fueron sometidos a laparotomía dorsobilateral con MIB de Sulpiride en diestro 1, diestro 2, proestro y estro correspondientemente. No se observó inmunorreactividad a DARPP32, TH o DBH en ninguno de los días del ciclo estral.

Cabe mencionar que los cortes ováricos mostrados en todas las figuras de la A a la H corresponden a animales ovulantes, mientras que las fotografías E a la L corresponden a animales que no ovularon debido al antagonismo de los receptores DA1 o DA2 ováricos.

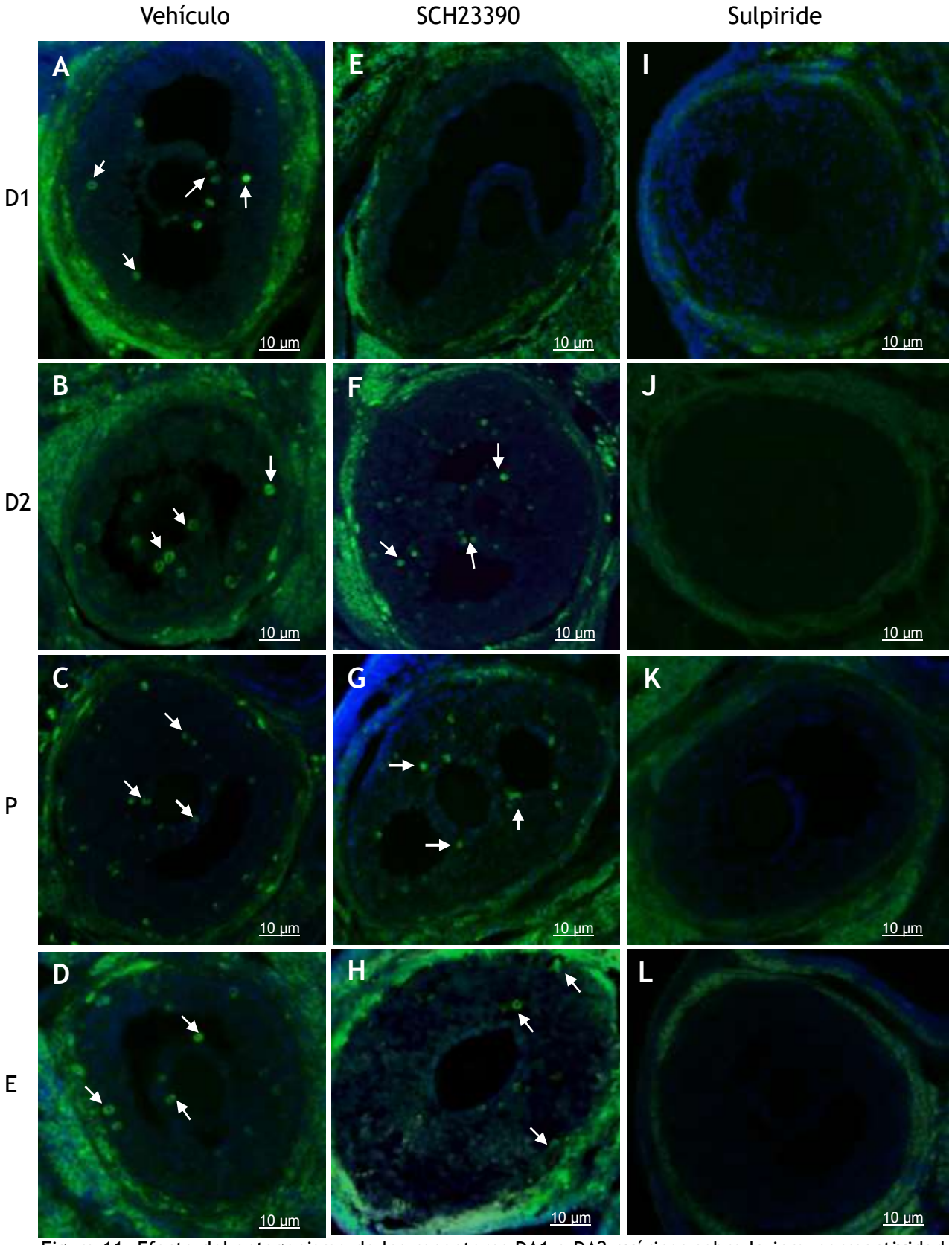


Figura 11. Efecto del antagonismo de los receptores DA1 o DA2 ováricos sobre la inmunorreactividad a DARPP32. Los animales fueron administrados con 20 µL (en cada ovario) de AA 0.1% (vehículo; inciso A a D), SCH23390 (Antagonista DA1; inciso E a H) o Sulpiride (Antagonista DA2; inciso I a L) y sacrificados al siguiente estro esperado. A, B, C, D, F, G, H presentan marcas inmunorreactivas (color verde; señaladas con flecas) en células de la granulosa.

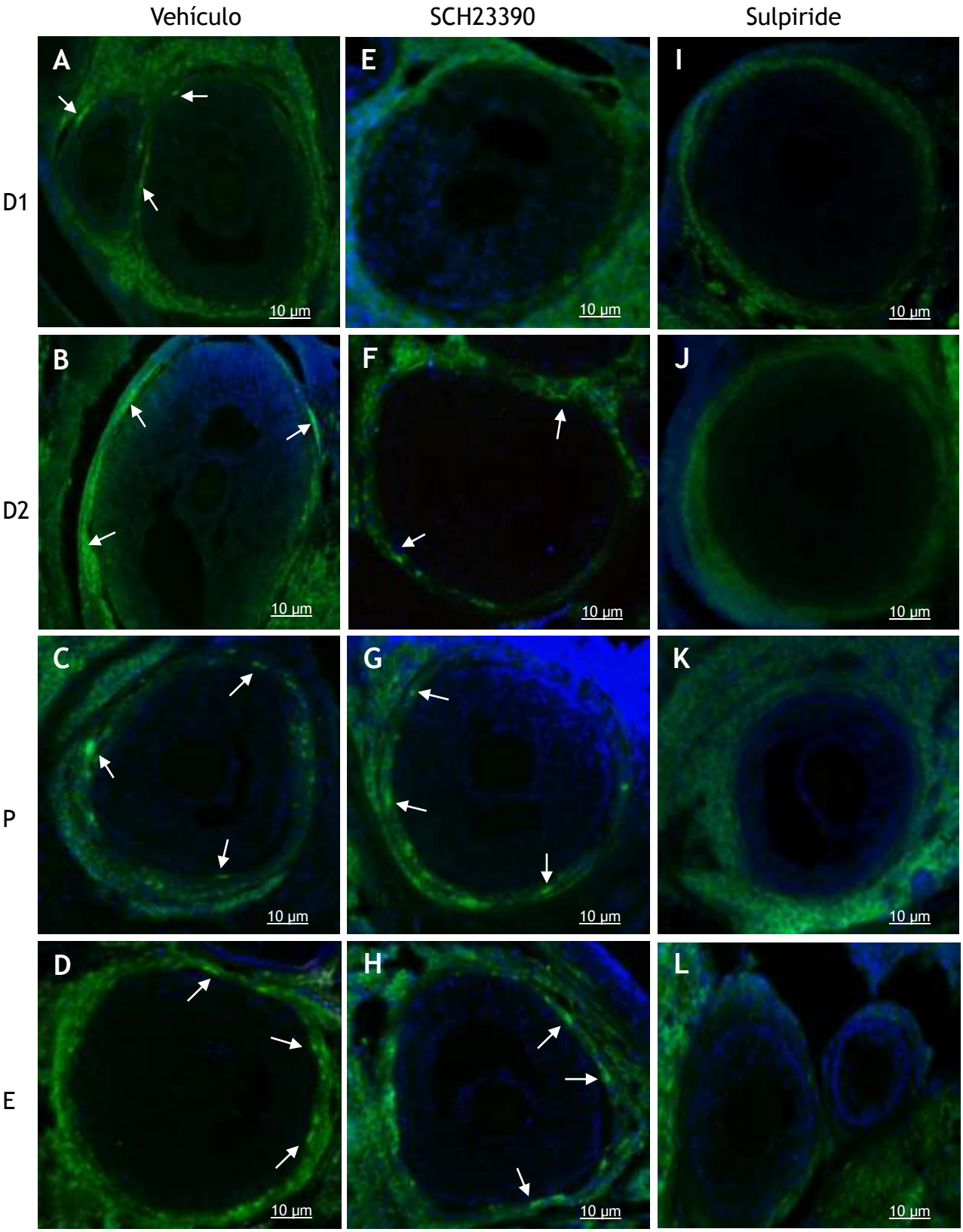


Figura 12. Efecto del antagonismo de los receptores DA1 o DA2 ováricos sobre la inmunorreactividad a TH. Los animales fueron administrados con 20 µL (en cada ovario) de AA 0.1% (vehículo; inciso A a D), SCH23390 (Antagonista DA1; inciso E a H) o Sulpiride (Antagonista DA2; inciso I a L) y sacrificados al siguiente estro esperado. A, B, C, D, F, G, H presentan marcas inmunorreactivas (color verde; señaladas con flecas) en células de la teca.

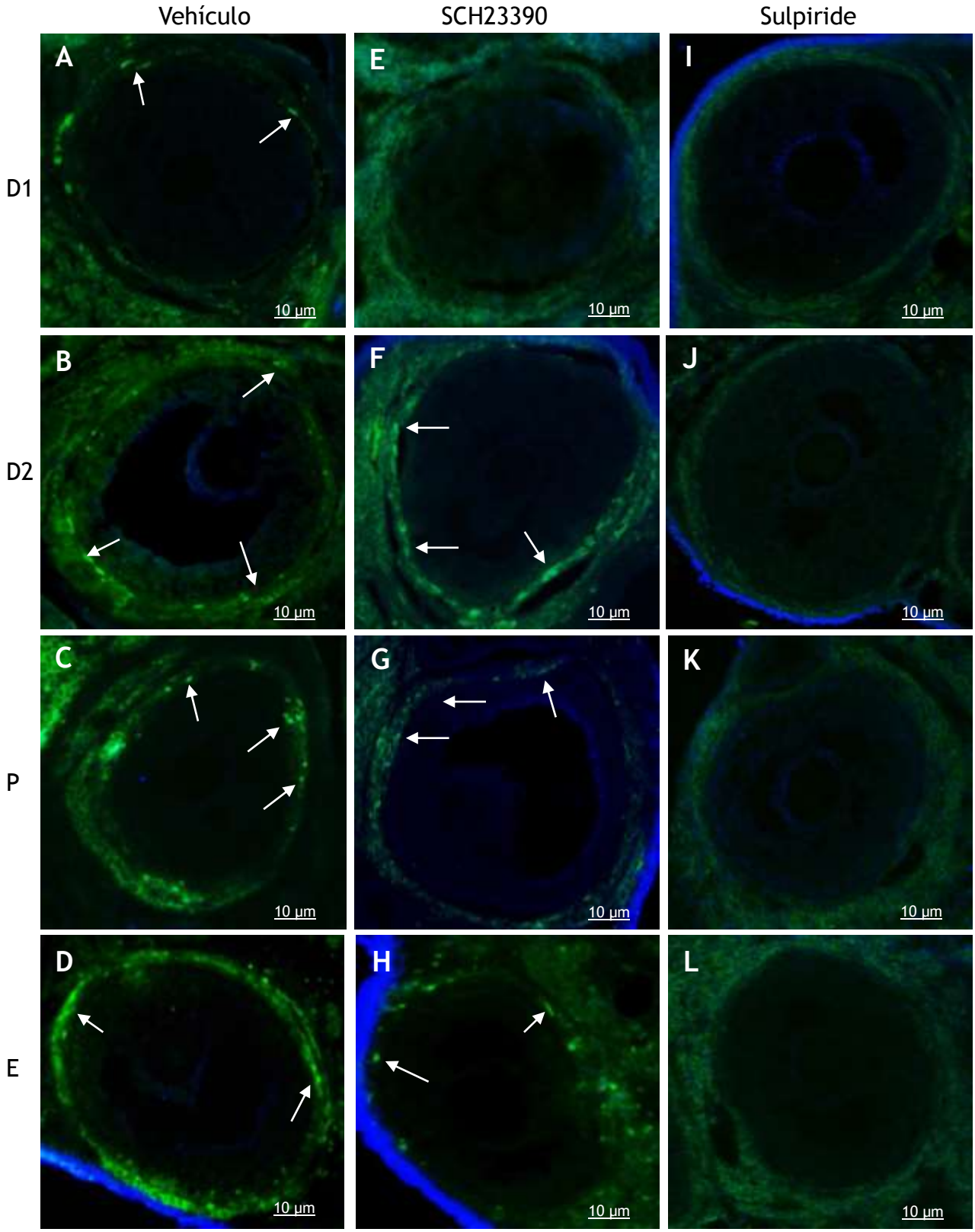


Figura 13. Efecto del antagonismo de los receptores DA1 o DA2 ováricos sobre la inmunorreactividad a DBH. Los animales fueron administrados con 20 µL (en cada ovario) de AA 0.1% (vehículo; inciso A a D), SCH23390 (Antagonista DA1; inciso E a H) o Sulpiride (Antagonista DA2; inciso I a L) y sacrificados al siguiente estro esperado. A, B, C, D, F, G, H presentan marcas inmunorreactivas (color verde; señaladas con flecas)en células de la teca.

10. Discusión de Resultados

Los resultados del presente trabajo confirman que existe una participación diferencial de la dopamina ovárica sobre los mecanismos fisiológicos que conducen a la ovulación, mismos que dependen de la hora y del día del ciclo estral en que se analiza su papel funcional.

La interrupción de la señal dopaminérgica durante el diestro 1 afecta la ovulación espontánea que se espera ocurra en la mañana del siguiente día del estro, independientemente del receptor dopaminérgico que se bloquee. Estos datos son consistentes con las observaciones previas empleando otros antagonistas de la dopamina, como el haloperidol (Domínguez, et al., 1987) y EEDQ (Venegas, et al., 2012; 2013), que también mostraron efectos semejantes sobre la respuesta ovulatoria en ratas cíclicas sometidas al mismo procedimiento quirúrgico.

Estudios recientes en nuestro laboratorio, siguiendo el mismo protocolo de trabajo, usando los mismos fármacos en iguales concentraciones pero sacrificando los animales al estro observado, demuestran que la ovulación no se inhibe, sino que se retrasa (Venegas 2015). El retraso puede deberse a que la retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario no se lleva a cabo en tiempo; al antagonizar los receptores dopaminérgicos no se desencadenan las señales necesarias para la síntesis de estrógenos y, por lo tanto, no alcanzan el nivel suficiente para producir la síntesis de gonadotropinas y el pico preovulatorio de LH.

Se observó que el receptor DA2 desempeña un papel estimulante de mayor duración sobre los mecanismos que controlan la ovulación espontánea en la rata a diferencia del receptor DA1.

Los resultados mostraron que en todos los grupos hay variaciones en la TAO durante la fase luteal (Diestro 1 y Diestro 2) a diferencia de la fase folicular (proestro/estro) donde prácticamente no se ve afectada la ovulación espontánea, con lo cual se sugiere que durante la primera mitad del ciclo la unión de dopamina a sus receptores ováricos es fundamental para llevar a cabo la ovulación espontánea.

El reemplazo hormonal con GnRH en los animales con bloqueo de los receptores dopaminérgicos DA1 o DA2, provocó la restitución de la ovulación en prácticamente todos los animales, lo que sugiere que la unión de la dopamina a sus receptores en el ovario puede regular, como se ha postulado que lo hace la adrenalina, la adecuada secreción de gonadotropinas (Jacobowitz & Wallach, 1967) y esteroides (Burden, et al., 1985) y su consiguiente retroalimentación del eje para la síntesis de gonadotropinas.

Estudios neuroanatómicos y funcionales han mostrado la existencia de una vía nerviosa aferente que viaja desde los ovarios hasta el sistema nervioso central y que posiblemente alcanza a incidir en los centros hipotalámicos que controlan las funciones ováricas (Gerendai, et al., 1995; Toth, et al., 2007; Gerendai, et al., 1998). En el hipotálamo anterior de los roedores se ubican los centros neurales que controlan la descarga de GnRH (Freeman, 2006) y en estructuras cercanas a esta región del diencéfalo se localizan circuitos dopaminérgicos donde se produce el efecto feedback estimulante de los estrógenos que condicionan la descarga preovulatoria de las gonadotropinas (Sanghera, et al., 1991a; 1991b). Lo anterior implica la posibilidad que las señales mediadas por los receptores DA1 y DA2 en los ovarios envíen señales nerviosas hasta las estructuras diencefálicas relacionadas con el control de la secreción de gonadotropinas e indirectamente con la producción de esteroides sexuales en las gónadas, de tal forma que es razonable sugerir el papel diferencial de ambos receptores dopaminérgicos en la regulación funcional del eje hipotálamo -hipófisis-ovario.

Por otra parte, se observó que el reemplazo hormonal con benzoato de estradiol produjo resultados diferentes de acuerdo al receptor dopaminérgico bloqueado, lo cual sugiere la existencia de una relación diferencial entre ambos receptores dopaminérgicos en el control de la secreción de gonadotropinas y la función ovárica. Hay evidencia que indica que los receptores DA1 y DA2 están involucrados en el control de la conducta sexual y que, además, ambos subtipos tienen papeles diferentes pero complementarios (Graham & Pfaus, 2010) por lo cual no es difícil aceptar que ambos receptores actúen de forma diferente.

En los animales tratados con los antagonistas DA1 o DA2 que presentaron ausencia de ovulación no se observaron marcas inmunorreactivas para DARPP32, TH o DBH en los folículos ováricos analizados, lo que nos permite sugerir que el bloqueo de los receptores dopaminérgicos afecta las señales que resultan con la expresión de estos indicadores bioquímicos de la actividad catecolaminérgica y pone en boga la relevancia biológica de la dopamina en los tejidos ováricos encargados de la secreción de esteroides sexuales, clave para que el evento ovulatorio ocurra en tiempo y forma.

Como ya se ha demostrado, al unirse la dopamina al receptor DA1 se activa la fosforilación de DARPP32, la cual se encuentra en células de la granulosa (Mayerhofer, et al., 2000), es por ello que las marcas de inmunorreactividad para DARPP32 sólo se encontraron en las células granulosas. Es interesante denotar que no se encuentran marcas positivas en folículos de animales no ovulantes, es decir, todos los grupos tratados con Supiride y el grupo tratado con SCH23390 en diestro 1. Esto podría confirmar que los receptores DA1 o DA2 tienen un papel importante en los mecanismos que controlan la ovulación.

La presencia de marcas inmunorreactivas a las enzimas encargadas de la síntesis de catecolaminas: TH y DBH únicamente en las células de la teca confirman las observaciones hechas por Mayerhofer y colaboradores (1998) que señalan que las neuronas intraováricas contienen TH y DBH; y aquellas hechas por Bahr y Ben-Jonathan (1985) que sostienen que las células foliculares son las que producen mayor cantidad de catecolaminas.

11. Conclusiones

Los resultados del presente trabajo permiten concluir que:

1 El sistema dopaminérgico de los ovarios participa de manera estimulante en la regulación de los mecanismos que conducen a la ovulación y es variable durante el ciclo estral.

2 El receptor DA1 tiene una función fundamental durante el diestro 1 para que ocurra la ovulación espontánea, mientras que la importancia del receptor DA2 prevalece desde la noche del Estro hasta la noche del diestro 2.

3 La unión de la dopamina a sus receptores ováricos es importante para que se lleve a cabo el feedback positivo de los estrógenos y se produzca la ovualción.

4 En los folículos ováricos, la unión de dopamina a sus receptores induce cambios en la expresión de DARPP32, TH y DBH a lo largo del ciclo estral de la rata.

12. Bibliografía

Aguado, L., & Ojeda, S. (1984). Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology 114(5)*, 1944-1946.

Aguado, L., & Ojeda, S. (1984). Prepubertal Ovarian Function Is Finely Regulated by Direct Adrenergic Influences. Role of Noradrenergic Innervation. *Endocrinology 114(5)*, 1845- 1853.

Aguado, L., Petrovic, S., & Ojeda, S. (1982). Ovarian B -Adrenergic Receptors during the Onset of Puberty: Characterization, Distribution, and Coupling to Steroidogenic Responses. *Endocrinology 110(4)*, 1124- 1132.

Anesetti, G., Lombide, P., D'Albora, H., & Ojeda, S. (2001). Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell and Tissue Research 306(2)*, 231 - 237.

Arata, G., Bishop, W., & Rojas, F. (1981). El inicio de la pubertad en la rata hembra. *Acta Científica Venezolana 32*, 457-462.

Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaño, J. (2000). Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Biomed 11(1)*, 39-60.

Bahr, J., & Ben-Jonathan, N. (1985). Elevated Catecholamines in Porcine Follicular Fluid before Ovulation. *Endocrinology 117(2)*, 620-623.

Ben-Jonathan, N., Arbogast, L., Rhoades, T., & Bahr, J. (1984). Norepinephrine in the rat ovary: ontogeny and de novo synthesis. *Endocrinology 115(4)*, 1426-1431.

Bourne, J. (2001). SCH 23390: The First Selective Dopamine D1-Like Receptor Antagonist. *CNS Drug Reviews 7(4)*, 399-414.

Burden, H. (1972). Adrenergic innervation in ovaries of the rat and guinea pig. *Developmental Dynamics 133(4)*, 455-461.

Burden, H. (1978). Neural modulation of ovarian function. *Trends in Neurosciences 1(2)*, 85-86.

Burden, H. (1978). Ovarian innervation. En R. Jones, *The Vertebrate Ovary: Comparative Biology and Evolution* (págs. 615-638). New York: Plenum.

Burden, H., Lawrence, I., & Louis, T. (1985). The Adrenergic Innervation of the Guinea Pig Ovary During Prenatal and Postnatal Periods. *Cells Tissues Organs 122(3)*, 193-196.

Burden, H., Leonard, M., Smith, C., & Lawrence, I. (1983). The sensory innervation of the ovary: A horseradish peroxidase study in the rat. *The Anatomical Record Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology 207(4)*, 623-627.

Caley, C., & Weber, S. (1995). Sulpiride: an antipsychotic with selective dopaminergic antagonist properties. *The Annals of pharmacotherapy 29(2)*, 152-160.

Calka, J. (1988). The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide. *Biology of Reproduction 39*, 1215-1223.

Curry, T., Lawrence, I., & Burden, H. (1984). Ovarian sympathectomy in the guinea pig II. Effects on follicular development during the prepubertal period and following exogenous gonadotropin stimulation. *Cell and Tissue Research 236*, 593-596.

D'Albora, H., & Barcia, J. (1996). Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neuroscience Letters 205(1)*, 0-67.

D'Albora, H., Lombide, P., & Ojeda, S. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell and Tissue Research 300(1)*, 47-56.

Dees, W., Hiney, J., Schultea, T., Mayerhofer, A., Danilchik, M., Dissen, G., y otros. (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology 136(12)*, 5760-5768.

Dissen, G., & Ojeda, S. (1998). Ovarian Innervation. En E. Knobil, & J. Neill, *Encyclopedia of Reproduction* (págs. 583-589). New York: Academic Press.

Domínguez, R., Gaitán, M., Méndez, A., & Ulloa-Aguirre, A. (1987). Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *Journal of Endocrinology 113(1)*, 37-44.

Domínguez, R., Morales, L., & Cruz, M. (2003). Ovarian Asymmetry. *Annual Review of Biomedical Sciences*.

Donagay, M., Simsek, A., Tapisiz, O., Mulazimoglu, B., Yumusak, N., & Gungor, T. (2010). Superior ovarian nerve (SON) transection leads to stuned follicular maturation: a hitomorphologic and morphometric analysis in the rat model. *Fertility and Sterility 93(5)*, 1711-1714.

Erickson, G. (1995). The ovary: basic principles and concepts. En P. Felig, J. Baxter, & L. Frohman, *Endocrinology and Metabolism* (págs. 973-1048). New York: McGraw-Hill.

Erickson, G., & Schreiber, J. (2001). Morphology and Physiology of the Ovary. En K. Becker, *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism* (págs. 918-935). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Espey, L., & Richards, J. (2006). Ovulation. En J. Neill, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (págs. 425-460). San Diego: Elsevier.

Freeman, M. (2006). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. En J. Neill, *Physiology of Reproduction* (págs. 2327-2388). San Diego: Elsevier.

García, E., Venegas, B., Morán, C., Handal, A., Morán, J., & Domínguez, R. (2014). Efectos de la microinyección de sulpiride o SCH-23390 en las bursas ováricas sobre la ovulación espontánea de la rata adulta. *LVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. Oaxaca, Oax.

Gerendai, I., & Halász, B. (1997). Neuroendocrine Asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinology 18(3)*, 354-381.

Gerendai, I., Banczerowski, P., & Halász, B. (2005). Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine. International Journal of Basic and Clinical Endocrinology 28(3)*, 309-318.

Gerendai, I., Csaba, Z., Vokó, Z., & Csernus, V. (1995). Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology 53(1)*, 299-305.

Gerendai, I., Toth, I., Boldogkoi, Z., Medveczky, I., & Halász, B. (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology 68(4)*, 244-256.

Geva, E., & Jaffe, R. (2004). Ovarian Angiogenesis. En P. Leung, & E. Adashi, *The Ovary* (págs. 305-317). St. Louis: Elsevier.

González, K., Letras, D., Venegas, B., Morán, C., Handal, A., & Morán, J. (2014). Efectos de la microinyección local de haloperidol dentro de las bursas ováricas sobre la duración del ciclo estral y la ovulación en la rata adulta. *LVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. Oaxaca, Oax.

Graham, M., & Pfaus, J. (2010). Differential regulation of female sexual behaviour by dopamine agonists in the medial preoptic area. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior 97(2)*, 284-292.

Greiner, M., Paredes, A., Rey-Ares, V., Saller, S., Mayerhofer, A., & Lara, H. (2008). Catecholamine Uptake, Storage, and Regulated Release by Ovarian Granulosa Cells. *Endocrinology 149(10)*, 4988- 4996.

Guyton, A., & Hall, J. (2006). Female Physiology Before Pregnancy and Female Hormones. En A. Guyton, & J. Hall, *Textbook of Medical Physiology* (págs. 1011-1026). Philadelphia: Elsevier.

Heape, W. (1900). The “sexual season” of mammals and the relation of the "pro-oestrum" to menstruation. *Quarterly Journal of Microscopical Science 2(173)*, 1-70.

Hirshfield, A. (1991). Development of Follicles in the Mammalian Ovary. *International Review of Cytology 124*, 43-101.

Hunzicker, M., & Mayo, K. (2006). Gonadotropin Signaling in the Ovary. En J. Neill, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (págs. 547-580). San Diego: Elsevier.

Irusta, G. (2008). Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: Relación entre la esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis. *Tesis Doctoral*. Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Ishii, S., Ube, M., Okada, M., Adachi, T., Sugimoto, J., Inoue, Y., y otros. (2009). Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity 17) Two-or four-week repeated-dose studies and fertility study of sulpiride in female rats. *The Journal of toxicological sciences 34*, 175-188.

Jackson, D., & Westlind, A. (1994). Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacology & Therapeutics 64(2)*, 291-370.

Jacobowitz, D., & Wallach, E. (1967). Histochemical and chemical studies of the autonomic innervation of the ovary. *Endocrinology 81(5)*, 1132-1139.

Juárez, C., Padilla, J., Venegas, B., Morán, J., Morán, C., Handal, A., y otros. (2013). Análisis del Papel del Sistema Dopaminérgico de los Ovarios en Diferentes Horas Durante el Ciclo Estral Sobre la Ovulación Espontánea en la Rata. *LVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*, (pág. Póster 154). Tlaxcala, Tlax.

Klein, C., & Burden, H. (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating rat ovary. *Neuroscience Letters 85(2)*, 217-222.

König, H., & Liebich, H. (2006). Órganos genitales femeninos. En H. König, & H. Liebich, *Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color* (págs. 135-152). Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana.

Lara, H., Dorfman, M., Venegas, M., Luza, S., Luna, S., Mayerhofer, A., y otros. (2002). Changes in Sympathetic Nerve Activity of the Mammalian Ovary During a Normal Estrous Cycle and in Polycystic Ovary Syndrome: Studies on Norepinephrine Release. *Microscopy Research and Tecnique 59(6)*, 495-502.

Lara, H., Porcile, A., Espinoza, J., Romero, C., Luza, S., Fuhrer, J., y otros. (2001). Release of norepinephrine from human ovary. *Endocrine. International Journal of Basic and Clinical Endocrinology 15(2)*, 187-192.

Lawrance, I., & Burden, H. (1980). The Origin of the Extrinsic Adrenergic Innervation to the Rat Ovary. *The Anatomical Record Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology 196(1)*, 51- 59.

Mancini, A., Guitelman, A., Vargas, C., Debeljuk, L., & Aparicio, N. (1976). Effect of sulpiride on serum prolactin levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 42(1)*, 181-184.

Mandl, A. (1963). Pre-Ovulatory Changes in the Oocyte of the Adult Rat. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Section B Biology 158*, 105-118.

Mayerhofer, A., & Fritz, S. (2002). Ovarian Acetylcholine and Muscarinic Receptors: Hints of a Novel Intrinsic Ovarian Regulatory System. *Microscopy Research and Technique 59(6)*, 503-508.

Mayerhofer, A., Fritz, S., Nert, R., Sanders, S., Duffy, D., Ojeda, S., y otros. (2000). D1-Receptor, DARPP-32, and PP-1 in the Primate Corpus Luteum and Luteinized Granulosa Cells: Evidence for Phosphorylation of DARPP-32 by Dopamine and Human Chorionic Gonadotropin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 85(12)*, 4750-4757.

Mayerhofer, A., Hemmings, H., Snyder, G., Greengard, P., Boddien, S., Berg, U., y otros. (1999). Functional Dopamine-1 Receptors and DARPP-32 Are Expressed in Human Ovary and Granulosa Luteal Cells in Vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84(1)*, 257-264.

Mayerhofer, A., Smith, G., Danilchik, M., Levine, J., Wolf, D., Dissen, G., y otros. (1998). Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell–cell regulatory loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences 95(18)*, 10990-10995.

McGee, E., & Hsueh, A. (2000). Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles. *Endocrine Reviews 21(2)*, 200-214.

Memo, M., Battaini, F., Spano, P., & Trabucchi, M. (1981). ulpiride and the role of dopaminergic receptor blockade in the antipsychotic activity of neuroleptics. *Acta psychiatrica Scandinavica 63(4)*, 314-324.

Morán, C., Franco, A., Morán, J., 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(2)*, 147-152.

Morán, J., & Domínguez, R. (1995). Effects of the unilateral implant of haloperidol at the preoptic-anterior hypothalamic area, on ovulation. *Endocrine. International Journal of Basic and Clinical Endocrinology 3(6)*, 391-393.

Morán, J., & Domínguez, R. (1997). Differences in the sensitivity of the right and left side of the preoptic anterior hypothalamic area to the effects of a unilateral implantation of Haloperidol, performed on the day of oestrous, on spontaneous ovulation. *Medical Science Research 25(7)*, 465-466.

Neal-Perry, G., & Santoro, N. (2006). Aging in the Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis. En J. Neill, *Physiology of Reproduction* (págs. 2729-2755). San Diego: Elsevier.

Neill, J., & Knobil, E. (2006). *Physiology of Reproduction*. Amsterdam: Elsevier.

Ota, H., Wakizaka, A., & Fukushima, M. (1986). Modulation of ovarian LH receptor and serum hormone levels in rats with hyperprolactinemia induced by administration of ovine prolactin or sulpiride. *The Tohoku journal of experimental medicine 148(2)*, 213-227.

Pastelín, 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*. Puebla: Benemérita Universida Autónoma de Puebla. Escuela de Biología.

Radovanovic, A., Micic, M., & Gledic, D. (2002). Localization of monoamine positive structures in the ovary and oviduct of developing rats. *Acta veterinaria 52(4)*, 211-222.

Rajkovic, A., Pangas, S., & Matzuk, M. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En J. Neill, *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (págs. 383-423). San Diego: Elsevier.

Ramírez-Ávila, B. (2001). Efectos de la administración secuencial de GnRH sobre la ovulación en ratas adultas con bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico. *Tesis Profesional*. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Escuela de Biología.

Rankin, M., Hazelwood, L., Free, B., Namkung, Y., Rex, E., Roof, R., y otros. (2010). Molecular Pharmacology of the Dopamine Receptors. En L. Iversen, S. Iversen, S. Dunnett, & A. Björklund, *Dopamine Handbook* (págs. 63-87). New York: Oxford University Press.

Rey-Ares, V., Lazarov, N., Berg, D., Berg, U., Kunz, L., & Mayerhofer, A. (2007). Dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reproductive Biology and Endocrinology 5*, 40.

Richards, J., & Pangas, S. (2010). The Ovary: Basic Biology and Clinical Implications. *The Journal of Clinical Investigation 120(4)*, 963-972.

Robinson, R., Woad, K., Hammond, A., Laird, M., Hunter, M., & Mann, G. (2009). Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction 136(6)*, 869-881.

Sampaio, G. E. (2009). Regulación por Andrógenos y Estrógenos de la Gliosis tras Lesiones Cerebrales en Ratas. *Tesis Doctoral*. Madrid: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

Sanghera, M., Anselmo-Franci, J., & McCann, S. (1991). Effect of medial zona incerta lesions on the ovulatory surge of gonadotrophins and prolactin in the rat. *Neuroendocrinology 54(5)*, 433-438.

Sanghera, M., Grady, S., Smith, W., Woodward, D., & Porter, J. (1991). Incertohypothalamic A13 dopamine neurons: Effect of gonadal steroids on tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology 53(3)*, 268-275.

Stabanfeldt, G., Davidson, A., & Brinsko, S. (2005). Reproducción y Lactación. En J. Cunningham, & B. Klein, *Fisiología Veterinaria* (págs. 373-428). Madrid: Elsevier.

Strauss III, J., & Williams, C. (2009). The Ovarian Life Cycle. En S. Yen, & R. Jaffe, *Reproductive Endocrinology* (págs. 155-190). Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.

Tamanini, C., & De Ambrogi, M. (2004). Angiogenesis in Developing Follicle and Corpus Luteum. *Reproduction in Domestic Animals 39(4)*, 206-216.

Toth, I., Banczerowski, P., Boldogkői, Z., Tóth, J., Szabó, A., Halász, B., y otros. (2008). Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary : A double viral tracing study. *Brain Research Bulletin 77(5)*, 0-311.

Toth, I., Wiesel, O., BoldogkőI, Z., Bálint, K., Tapaszti, Z., & Gerendai, I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microscopy research and technique 70(8)*, 710-718.

Tresguerres, J. (2010). Fisiología del Eje Hipotálamo.Hipófiso-Ovárico. En J. Tresguerres, *Fisiología Humana* (págs. 1041-1058). Madrid: Mc Graw Hill.

Vargas-Torres. (2002). Efectos del bloqueo farmacológico de la información dopaminérgica sobre el ciclo estral de la rata: análisis de los mecanismos que inhiben la función de los ovarios. *Tesis Profesional*. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Escuela de Biología.

Venegas, B., García, E., Morán, J., Morán, C., Handal, A., Rosas-Murrieta, N., y otros. (2014). Effects of the blockade of DA1 ovarian receptor on spontaneous ovulation and steroids hormones synthesis. *43th Annual Meeting of the Society for*, (págs. 43th Annual Meeting of the Society for NeurosciPoster 752. 2014-S-15222-SfN). Washington, Columbia, EUA.

Venegas, B., Juárez, C., Padilla, J., Morán, J., Morán, C., Handal, A., y otros. (2012). A study of ovarian dopaminegic system on spontaneous ovulation at different steps of estrous cycle of the rat. *Congreso de la Federación de Asociaciones Latinoamericanas y del Caribe de Neurociencias*, (pág. Poster 164). Cancún, QR, México.

Venegas, B., Letras, D., Morán, J., Morán, C., Rosas-Murrieta, N., Handal, A., y otros. (2014). El ovario presenta actividad dopaminérgica y regula la síntesis de hormonas esteroides en el diestro-1. *LVII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. Oaxaca, Oax.

Venegas, B., Padilla, J., Juárez, C., Morán, J. M., Rosas-Murrieta, N., Handal, A., y otros. (2013). La dopamina ovárica participa en la regulación de la ovulación espontánea y la síntesis de estrógenos en la rata adulta. *XXXVIII Reunión Anual Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C*. San Andrés Cholula , Puebla.

Venegas, B., Padilla, J., Juárez, C., Morán, J., Morán, C., Handal, A., y otros. (2012). Does ovarian dopamine involved in the regulation of ovarian function and spontaneous ovulation in the adult rat? *Annual Meeting for the Society for Neuroscience*, (pág. Poster 382.07/YY1). New Orleans.

Venegas, B., Padilla, J., Juarez, C., Morán, J., Morán, C., Rosas-Murrieta, N., y otros. (2012). La dopamina ovárica participa en la regulación del ciclo ovárico en la rata adulta. *XXXVII Reunión Anual Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C*. Pachuca, Hidalgo.

Venegas, B., Padilla, J., Juárez, C., Morán, J., Morán, C., Rosas-Murrieta, N., y otros. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptors on ovulation. *Endocrine*, 1-14.

Venegas, B., Rosas-Murrieta, N., Padilla, J., Juárez, C., Morán, J., Morán, C., y otros. (2013). The dopamine is involved in the regulation of spontaneous ovulation and estrogen synthesis in the adult rat. *Annual Meeting for the Society for Neuroscience*, (págs. Poster 752. 2013-S-10073-SfN). San Diego, CA.

Vilalta, N., & Puig, A. (2007). Gonadotropins (LH and FSH) and adrenocorticotropin (ACTH). *Endocrinología y Nutrición 54(2)*, 109-117.

13. Anexo

Presentación de Trabajos en Congresos

"EFECTOS DE LA MICROINYECCIÓN DE SULPIRIDE O SCH23390 EN LAS BURSAS OVÁRICAS SOBRE LA OVULACIÓN ESPONTÁNEA DE LA RATA ADULTA"