



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Maestría en Biología de la Reproducción Animal

PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS M2 PRESENTES EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN A LO LARGO DEL CICLO ESTRAL DE LA RATA ADULTA

T E S I S

para obtener el grado de Maestra en Biología de
la Reproducción Animal que presenta:

Biól. Mónica Ingrid Gutiérrez Estrada

COMITÉ TUTORAL

Codirectora Interna

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Área de Neurociencias. Depto. de Biología de la Reproducción, UAM-I.

Codirector externo

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. FES Zaragoza, UNAM.

Asesora

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. FES Zaragoza, UNAM.

18-03-2020 CDMX.

Comité tutorial

Codirectora Interna

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Área de Neurociencias, Biología de la Reproducción.
Profesora Titular “C” de Tiempo Completo
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

aja@xanum.uam.mx

Codirector Externo

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.
Profesor de Carrera Titular “C” de Tiempo Completo
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

rcasala@hotmail.com

Asesora

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.
División de estudio de posgrado de investigación
Profesor de Carrera Titular “C” de Tiempo Completo
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

mecbloy@yahoo.com.mx

Jurado

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

Profesor de Carrera Titular "C" de Tiempo Completo

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

mecbloy@yahoo.com.mx

M. en B. E. Gabriela López

Área de Reproducción Animal Asistida.

Dpto. Biología de la Reproducción,

Profesora Asociado "D" tiempo Completo

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

galope@docencia.izt.uam.mx

M. en I.BS.H. Angélica Flores Ramírez

Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

Profesor de Carrera Titular "C" de Tiempo Completo

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

angy1414@hotmail.com

Dra. Ma. Del Rosario Tarrago Castellanos

Departamento de biología de la reproducción

Profesora Titular "C" de Tiempo Completo

Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.

mrtc@xanum.uam.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para poder realizar mis estudios de posgrado:

No. De becario CONACyT: 638151

Registro de la MBRA ante CONACyT: 003797

A la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa:

- Por permitirme realizar mis estudios de posgrado en la Maestría de Biología de la Reproducción Animal.
- Por el apoyo económico brindado en el programa: Apoyo extraordinario a los alumnos de posgrado registrados en el PNPC 2019

Al posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud por el apoyo para difundir algunos de los resultados del presente estudio.

El presente trabajo de investigación fue financiado por CONACyT:

No. Título del proyecto registrado en CONACyT: La participación de los núcleos supraquiasmáticos en la regulación de las funciones del ovario, presenta un ritmo circádico que varía durante el ciclo estral y es asimétrica. La rata adulta como modelo de estudio.

No. De proyecto CONACyT: 236908

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Participación de los receptores muscarínicos M2 presentes en el núcleo supraquiasmático sobre la regulación de la ovulación a lo largo del ciclo estral de la rata adulta” con fecha de 18 de marzo de 2020.

Presidenta

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán

Secretaria

Dra. Ma. Del Rosario Tarrago Castellanos

Vocal

M. en I.BS.H. Angélica Flores Ramírez

Vocal.

M. en B. E. Gabriela López

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi coite tutorial:

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Por ser parte de esta investigación, por brindarme su confianza y darme todo el apoyo necesario durante este proceso.

A los miembros del jurado:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. María del Rosario Tarrago Castellanos

M. en I.B.S.H Angélica Flores Ramírez

M. en B.E. Gabriela López

Por su tiempo y sus valiosas contribuciones en la realización de este proyecto.

Al **Dr. Roberto**, por todas las críticas constructivas, comentarios y sugerencias que me brindo durante este proceso. Además, por siempre brindarme su apoyo y confianza.

Agradezco enormemente a la **Mtra. Angélica**, por el enorme apoyo que me ha brindado desde que la conozco, por siempre tener las palabras indicadas cuando más lo necesitaba y sobre todo por brindarme su valiosa amistad y confianza.

A la **Dra. Anabel**, por aceptar ser mi asesora, por brindarme su confianza, por su paciencia y por todos sus consejos que me brindo.

A la **Dra. Esther**, por su apoyo incondicional en todo momento durante este tiempo y por siempre estar al pendiente de mi trabajo. Gracias por toda su dedicación.

A la **Dra. Adriana**, al **Dr. Román** y la **Dra. Elizabeth** del bioterio de la FES Zaragoza por la producción y el mantenimiento de los animales utilizados en este estudio.

A **Cintia**, **Gina** y **Camilo**, por su tiempo dedicado en la enseñanza de la técnica estereotáxica utilizada en este estudio.

A mis compañeros de laboratorio: **Ilse**, **linda** y **Carlos** por brindarme siempre su apoyo incondicional, por colaborar en la realización de este trabajo y por hacerme sentir siempre parte de su equipo.

A **Angie**, por el tiempo que me brindo al escucharme cuando requería desahogarme, por mostrarme que siempre puedo contar con su apoyo y por su amistad.

A mis bebés de laboratorio a **Ana**, **Fany**, **Gaby**, **Antonio**, **Ale** y **Eduardo**, por permitirme transmitirles mi conocimiento, gracias por todas las risas y ocurrencias. Gracias por ser auténticos, por hacer que el día en el laboratorio sea más lindo. Le agradezco el hacerme romper la dieta algunas veces, solamente ya no sean tan “gordos” por favor.

DEDICATORIA

A mi mamá: que siempre has sido mi apoyo y soporte. Gracias por alentarme a ser mejor cada día y enseñarme a no rendirme nunca. Gracias por todo lo que has hecho por mí, TE AMO y te adoro mamá.

A mi padre: porque fue el mejor amigo que pude tener en mi vida, por enseñarme a dar siempre lo mejor de mí. Por eso y por tantas cosas más, gracias. Te extraño y me haces mucha falta. TE AMO papá.

A mi hermano: que siempre has sido un ejemplo seguir y por ser mi compañía. Te amo mucho.

A mis tíos (Javier, Israel y Edith): que siempre me han motivado con su ejemplo a ser una mejor persona y sobre todo por creer en mí. Gracias por estar presentes en mi vida, los amo con todo mi corazón.

A Jesús: por acompañarme durante este proceso, por ser mi confidente y por apoyarme siempre. Gracias por impulsarme y motivarme a cumplir mis metas y sueños. Gracias por hacerme tan feliz. Sea cual sea el destino que nos depare el universo, siempre te amere con todo mí ser. Gracias por formar parte de mi vida.

A Karla y Karina: por alentarme a seguir adelante, por apoyarme siempre, porque son unas mujeres increíbles, porque las admiro mucho. Las quiero con todo mi corazón.

Y no menos importante a mi gordito: por desvelarte conmigo, porque sin importar el sueño que podías tener o lo incomodo que podías estar, siempre permaneciste a mi lado.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
I. Introducción	
o Regulación neuroendocrina de la ovulación.....	5
o Regulación circadiana de la ovulación.....	19
o Sistema colinérgico central y periférico.....	21
o Receptores colinérgicos.....	30
o Fármacos que bloquean o estimulan a los mAChR.....	37
II. Antecedentes.....	44
III. Planteamiento del problema.....	56
IV. Justificación.....	57
V. Pregunta de investigación.....	58
VI. Hipótesis.....	58
VII. Objetivo.....	58
VIII. Materiales y métodos.....	59
IX. Resultados	
o Análisis histológico de los cortes de cerebro.....	67
o Grupo testigo intacto.....	68
o Inserción de la cánula directriz en el NSQ-I o NSQ-D.....	69
o Microinyección con solución salina en el NSQ-I.....	71
o Bloqueo de los m ₂ AChR por la microinyección de galamina en el NSQ-I.....	73
o Microinyección con solución salina en el NSQ-D.....	75
o Bloqueo de los m ₂ AChR por la microinyección de galamina en el NSQ-D.....	77
o Efecto del bloqueo de la ovulación.....	79
o Remplazo de la señal hipotalámica	81
X. Discusión de resultados	83
XI. Conclusiones.....	91
XII. Referencias.....	92

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina	LH	Hormona luteinizante
AChE	Acetilcolintransferasa	LHR	Receptor a LH
AChR	Receptores colinérgicos	mAChR	Receptor muscarínico
AHA	Área hipotalámica anterior	m#AChRs	Subtipos de receptores muscarínicos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	MBH	Hipotálamo medio basal
AVPV	Área anteroventral periventricular	M.C.	Masa corporal
BE	Benzoato de estradiol	mPOA	Área preóptica rostral
Ca²⁺	Calcio	nAChRs	Receptores nicotínicos
ChT	Transportador de colina	Na⁺	Sodio
DBB	Banda diagonal de broca	NSQ	Núcleo supraquiasmático
DHA	Área hipotalámica dorsal	P₄	Progesterona
E₂	Estradiol	PAO	Porcentaje de animales ovulantes
ER-α	Receptor a estrógenos alfa	PMSG	Gonadotropina sérica de yegua preñada
FSH	Hormona estimulante del folículo	POA	Área preóptica
FSHR	Receptor a FSH	POA-AHA	Área preóptica e hipotalámica-anterior
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas	s.c.	Subcutánea
GnRH-R	Receptor a GnRH tipo 1	SNC	Sistema nervioso central
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G	SNP	Sistema nervioso periférico
hCG	Gonadotropina coriónica humana	T	Testosterona
i.p.	Intraperitoneal	TAO	Tasa de animales ovulantes
K⁺	Potasio	VIP	Péptido intestinal vasoactivo
Kp	Kisspeptina	VP	Arginina vasopresina

RESUMEN

La ovulación es un proceso regulado por señales neuroendocrinas provenientes del hipotálamo, la hipófisis, los ovarios, etc. En el hipotálamo se secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual estimula en la adenohipófisis la liberación de las gonadotropinas. La secreción de la GnRH es modulada por diversas hormonas o neurotransmisores que la regulan de manera estimulante o inhibitoria. Diversos estudios han mostrado que el sistema muscarínico participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación y la secreción de hormonas esteroides, lo cual varía en función de la etapa del ciclo estral y la hora del día.

La ovulación es un proceso periódico. La secreción preovulatoria de GnRH es regulada por señales que provienen del núcleo supraquiasmático (NSQ). El NSQ recibe información colinérgica y se tienen evidencias que muestran que la información colinérgica que llega a ambos lados del NSQ es necesaria para la secreción preovulatoria de la hormona luteinizante (LH) para inducir la ovulación.

Con el fin de analizar a lo largo del ciclo estral la participación de los receptores muscarínicos M2 (m_2 AChR) del núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) sobre la ovulación, en el presente estudio se realizó el bloqueo de los m_2 AChR mediante el uso de un antagonista alostérico. Para ello, se utilizaron ratas hembras, adultas y cíclicas de la cepa CIIZ-V mantenidas en un fotoperiodo $LD=14:10$ con agua y alimento *ad libitum*. A las cuales se les insertó una cánula guía dirigida hacia el NSQ-D o NSQ-I. Después de su recuperación y de presentar tres ciclos estrales consecutivos de 4 días, a las 7:00 h en los días de estro, diestro-1, diestro-2 o proestro, los animales fueron microinyectados con 0.3 μ L de una solución de trietioduro de galamina (26 nmol) o 0.3 μ L de solución vehículo. Los animales fueron sacrificados a las 9:00 h del estro predicho y en la autopsia se cuantificó el número de ovocitos liberados y la tasa de animales ovulantes (TAO).

La microinyección de solución salina en el NSQ-I no modificó la ovulación. El implante de la cánula directriz o la microinyección de solución salina en el NSQ-D no modificó la tasa de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados. En la etapa de estro y proestro, la masa del útero de los animales con microinyección de solución salina en el NSQ izquierdo o derecho fue menor que la del grupo intacto.

La microinyección con galamina, en el NSQ-I en la etapa de diestro-1 resultó en una disminución del número de ovocitos liberados con respecto al grupo control (7.4 ± 2.5 vs. 14.7 ± 0.7). En el proestro, el bloqueo de los receptores m_2 AChR resultó en un aumento del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y por ambos con respecto a su grupo vehículo (8.3 ± 0.4 vs. 7.3 ± 1.3 ; 15.0 ± 0.4 vs. 12.3 ± 0.5 respectivamente).

El bloqueo de los receptores m_2 AChR, en el NSQ-D en el proestro resultó en el bloqueo de la ovulación con respecto a su grupo vehículo (TAO: 7/9 vs. 1/9). En la etapa del diestro-2, los animales presentaron el útero balonado el día del sacrificio a comparación del grupo control (5/6 vs. 0/6).

En ratas que no ovulan, resultado del bloqueo de los m_2 AChR en el NSQ-D en la etapa del proestro, la inyección de LHRH sintética indujo la ovulación, por lo que sugerimos que la activación de los m_2 AChR del NSQ-D es necesaria para la generación del aumento preovulatorio de LHRH/LH.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, sugerimos que los m_2 AChR del NSQ participan de manera diferencial sobre los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de GnRH y la ovulación, lo cual varía en función del NSQs estudiado y de la etapa del ciclo estral.

Palabras clave: Sistema colinérgico, regulación circadiana hormona liberadora de gonadotropinas, hormona luteinizante.

ABSTRACT

Ovulation is a process regulated by neuroendocrine signals from the hypothalamus, pituitary gland, ovaries, etc. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is secreted in the hypothalamus, which stimulates the release of gonadotropins in the adenohypophysis. The secretion of GnRH is modulated by various hormones or neurotransmitters that regulate it in a stimulating or inhibitory manner. Several studies have shown that the muscarinic system participates in neuroendocrine mechanisms that regulate ovulation and steroid hormone secretion, which varies depending on the stage of the estrous cycle and the time of day.

Ovulation is a periodic process. The pre-secretory secretion of GnRH is regulated by signals that come from the suprachiasmatic nucleus (NSQ). The NSQ receives cholinergic information and there is evidence to show that the cholinergic information that reaches both sides of the NSQ is necessary for the pre-secretory secretion of luteinizing hormone (LH) to induce ovulation.

In order to analyze throughout the estrous cycle the participation of the M2 muscarinic receptors (m_2 AChR) of the Suprachiasmatic nucleus left (NSQ-I) or right (NSQ-D) on ovulation, in the present study the blockade of m_2 AChR was performed through the use of an antagonist allosteric. For this, female, adult and cyclic rats of the CIIZ-V strain maintained in a photoperiod $LD = 14: 10$ with water and food *ad libitum* were used. To which a guide cannula was inserted directed towards the NSQ-D or NSQ-I. After recovery and presenting three consecutive 4-day estrous cycles, at 7:00 h on the days of estrus, right-handed, right-handed or proestrus, the animals were microinjected with 0.3 μ L of a triethiodide solution of galamina (26 nmol) or 0.3 μ L of vehicle solution. The animals were sacrificed at 9:00 h from the predicted estrous and at the autopsy the number of oocytes released and the rate of ovulating animals (TAO) were quantified.

The microinjection of saline solution in the NSQ-I did not modify ovulation. The implantation of the guide cannula or the microinjection of saline solution in the NSQ-D did not change the rate of ovulating animals or the number of oocytes released.

In the estrous and proestrus stage, the mass of the uterus of the animals with saline microinjection in the left or right NSQ was smaller than that of the intact group.

Microinjection with galamine, in the NSQ-I at the stage of diestrus-1 resulted in a decrease in the number of oocytes released with respect to the control group (7.4 ± 2.5 vs. 14.7 ± 0.7). In the proestrus, blockade of the m_2 AChR receptors resulted in an increase in the number of oocytes released by the left ovary and both with respect to their vehicle group (8.3 ± 0.4 vs. 7.3 ± 1.3 ; 15.0 ± 0.4 vs. 12.3 ± 0.5 respectively).

The blockade of the m_2 AChR receptors in the NSQ-D in the proestrus resulted in the blockage of ovulation with respect to its vehicle group (TAO: 7/9 vs. 1/9). In the stage of diestrus-2, the animals presented the uterine uterus on the day of sacrifice compared to the control group (5/6 vs. 0/6).

In rats that do not ovulate, as a result of blocking the m_2 AChR in the NSQ-D at the stage of the proestrus, the injection of synthetic LHRH induced ovulation, so we suggest that the activation of the m_2 AChR of the NSQ-D is necessary for the generation of the increase in LHRH / LH.

Based on the results obtained in this study, we suggest that the m_2 AChR of the NSQ participate differentially on the neuroendocrine mechanisms that regulate the secretion of GnRH and ovulation, which varies depending on the NSQs studied and the stage of the estrous cycle.

Keywords: Cholinergic system, circadian regulation, gonadotropin releasing hormone, luteinizing hormone.

INTRODUCCIÓN

Regulación neuroendocrina de la ovulación

En los seres vivos, la reproducción es una función biológica fundamental en el mantenimiento de la especie.

El ovario está recubierto por un epitelio cúbico monoestratificado que recibe el nombre de epitelio germinal, que se apoya en una capa de tejido conjuntivo denominada túnica albugínea (Espey and Richards, 2006; Sherwood *et al.*, 2013).

El folículo ovárico es la unidad anátomo-funcional del ovario, a partir del cual se originan los tres compartimentos del ovario: el folicular, el luteal y el intersticial (Domínguez, 1991). Con base en el tamaño del ovocito, el número de capas celulares que forman parte de los folículos y la presencia y tamaño del antro, a los folículos se les clasifica en (**figura 1**) (Pedersen y Peters, 1968; Peters, 1969) :

- ❖ **Folículo primordial.** Están formados por un ovocito en profase I (paquiteno o diploteno) rodeado por una capa de células epiteliales planas denominadas células pre-granulosas foliculares que están rodeadas de una membrana basal (Bulun, 2011; Rajkovic *et al.*, 2006; Vantman y Vega, 2010).
- ❖ **Folículo en crecimiento.** La primera evidencia de que el folículo primordial inicia su crecimiento, es el cambio en la forma y tamaño de las células pre-granulosas, las cuales cambian de aplanadas a cúbicas (células de la granulosa), y el aumento en el tamaño del ovocito; al folículo se le denomina folículo primario (Costanzo, 2014; Pangas y Rajkovic, 2015; Sherwood *et al.*, 2013).

En el folículo secundario, la única capa de células de la granulosa prolifera formando varias capas (Sherwood *et al.*, 2013). Alrededor de la membrana basal se forma una capa de células somáticas conocida como teca (Pangas y Rajkovic, 2015).

Dependiendo de la especie en estudio, cuando las células de la granulosa forman de tres a cuatro capas, el complejo de ovocito y células de la granulosa que lo rodean (*cumulus oophorus*) forman una membrana intermedia denominada zona pelúcida (Sherwood *et al.*, 2013; Strauss and Williams, 2019). Las células del *cumulus oophorus* proporcionan un sistema de protección al ovocito y modifican las condiciones periovocíticas que favorecen la fertilización (Bulun, 2011).

Una vez que las células de la granulosa forman siete u ocho capas alrededor del ovocito, comienza a observarse la presencia del licor folicular (Domínguez, 1991). La acumulación del líquido folicular forma la cavidad antral, el cual aumenta de tamaño con el desarrollo del folículo (Palma, 2001; Pangas and Rajkovic, 2015). Dependiendo de su ubicación, en los folículos antrales se describen dos tipos de células de la granulosa: las murales, que están en contacto directo con la membrana basal y las antrales que se localizan rodeando a la cavidad antral; estas últimas proporcionan un mecanismo de transporte y un sistema de protección al ovocito desde su liberación del ovario hasta la fertilización (Richards *et al.*, 2015).

❖ **Folículo Antral.** Son estructuras endocrinas altamente diferenciadas, que se caracterizan por la formación de la cavidad antral (Pangas y Rajkovic, 2015). Conforme continúa el desarrollo folicular, las células de la teca proliferan y se diferencian en dos capas (Bulun, 2011; Pangas y Rajkovic, 2015; Ross *et al.*, 2011):

- La teca interna: se localiza en la periferia de la membrana basal y está formada por células secretoras, fibroblastos y fibras de colágeno; tiene una amplia red de capilares.
- La teca externa: es la capa más superficial del folículo. Está formada por fibroblastos, células musculares lisas y haces de fibras de colágeno. Está en contacto y se continúa con el estroma ovárico.

- ❖ **Folículo pre-ovulatorio.** Se denomina folículo preovulatorio a aquel folículo que alcanza un diámetro $\geq 500 \mu\text{m}$ y que puede liberar al ovocito si es estimulado por la hormona luteinizante (LH) (Domínguez, 1991; Fábregues y Balasch, 2009).

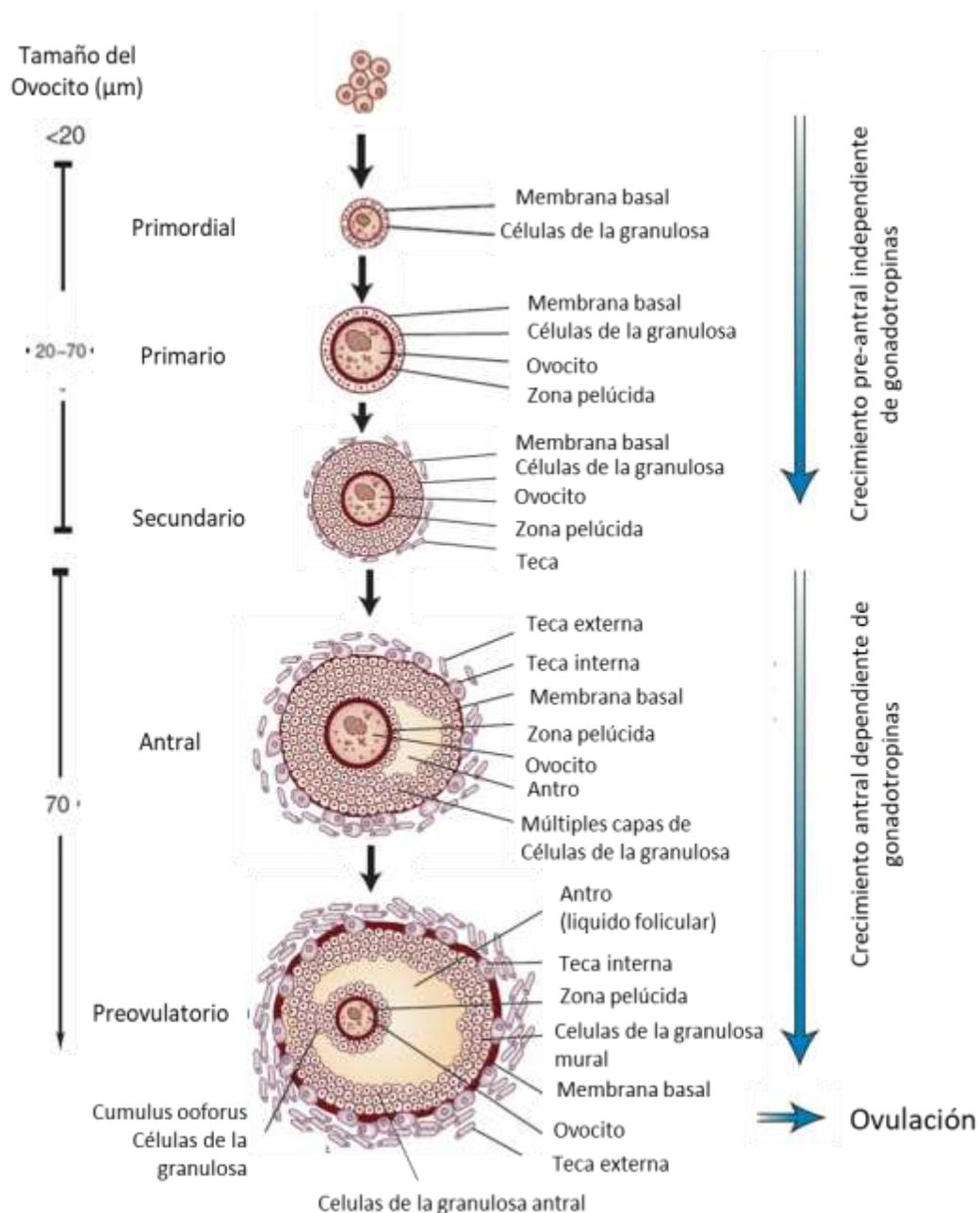


Figura 1. Clasificación de los folículos ováricos de ratón (modificada de Bulun, 2011; Rajkovic *et al.*, 2006).

La ovulación

La ovulación (**figura 2**) es uno de los dos procesos en que culmina el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos; el otro es la atresia folicular. La ovulación, definida como la salida de un ovocito del ovario en condiciones de ser fecundado, es un proceso fisiológico que ocurre durante una parte de la vida de un individuo (Domínguez, 1993, 1991).



Figura 2. Momento de la ovulación en la rata (Botella, 1995).

Previo a la ovulación, las células del *cumulus* se expanden, a este proceso se le conoce como mucificación (Richards *et al.*, 2015). El ovocito completa su meiosis I, libera su primer cuerpo polar y alcanza la metafase de la meiosis II, donde se detiene hasta ser fecundado (Pangas y Rajkovic, 2015; Russell y Robker, 2019).

Previo a la expulsión del ovocito, en la pared del folículo cercana a la túnica albugínea, se produce un proceso inflamatorio localizado, que libera proteasas que actúan sobre la matriz extracelular del epitelio superficial (Richards *et al.*, 2015). Esto resulta en la desaparición localizada de la membrana basal folicular, la separación de las uniones intercelulares de las células foliculares y la desintegración de la membrana basal del epitelio superficial del ovario (Domínguez, 1991).

Este proceso es regulado por señales provenientes del hipotálamo, la hipófisis, el ovario, las glándulas adrenales y por señales nerviosas que les llega vía los nervios vago, ovárico superior y del plexo ovárico (Casabiell, 2006; Domínguez y Cruz-Morales, 2012).

A partir de los resultados de diferentes autores (Gerendai y Halász, 2001, 1997), se propone que los mecanismos de regulación de las funciones del ovario derecho e izquierdo, son diferentes (asimétricos). Un ejemplo muy claro de esa asimetría ocurre en las mujeres ya que un mes ovulan del lado derecho y al otro del izquierdo (Jones, 1991). Estas asimetrías pueden ser morfológicas, bioquímicas, funcionales o patológicas (Gerendai y Halász, 1997).

En la rata, en condiciones no experimentales, el ovario izquierdo libera un mayor número de ovocitos que el derecho (Domínguez *et al.*, 2003). Domínguez y col. (1989) mostraron que las diferencias en la capacidad ovulatoria dependen parcialmente de la inervación (catecolaminérgica y vagal) que llega a los ovarios. Según Klein y Burden (1988), el ovario derecho, contiene una mayor proporción de fibras aferentes simpáticas que el izquierdo.

La hormona liberadora de gonadotropinas

En el hipotálamo se localizan neuronas que secretan a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH; por sus siglas en inglés) (McArdle y Roberson, 2015; Norris y Carr, 2013), antes conocida como hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) (Norris y Carr, 2013).

La GnRH es un decapeptido de 10 aminoácidos (**figura 3**), que en el plasma tiene una vida media de 3 a 4 minutos (min) (McCartney y Marshall, 2019; Norris y Carr, 2013).

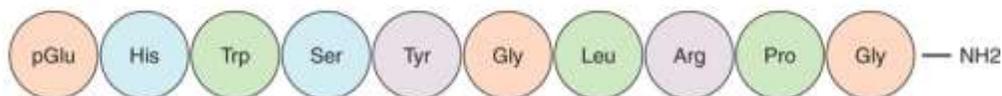


Figura 3. Esquema que muestra la composición de aminoácidos de la GnRH (Schorge, 2009).

Los aminoácidos de la GnRH están altamente conservados entre especies (McCartney y Marshall, 2019). En vertebrados se describe la existencia de 15 isoformas de GnRH. Basado en su análisis filogenético y genómico, las moléculas de GnRH se clasifican en cuatro grupos: GnRH1, GnRH2, GnRH3 y GnRH4 (Ando, 2016).

En los mamíferos se identifican dos tipos de GnRH's. El primero, la mGnRH, denominada actualmente **GnRH-I** (Ando, 2016), es sintetizada por una población de ~1000-2000 neuronas localizadas en el hipotálamo (Gore, 2002).

Los somas de las neuronas GnRHérgicas se localizan en el trayecto que se extiende desde los bulbos olfatorios, la banda diagonal de Broca (DBB), los núcleos del septo medial (MS), el *organum vasculosum* de la lámina terminal (OLVT), hasta el hipotálamo medio basal (MBH) (Herbison, 2015; Pak y Chung, 2011). En la rata, la mayor población de somas de neuronas GnRHérgicas se localiza en el área preóptica rostral (rPOA) y el área hipotalámica anterior (AHA) (**figura 4**) (Herbison, 2015).

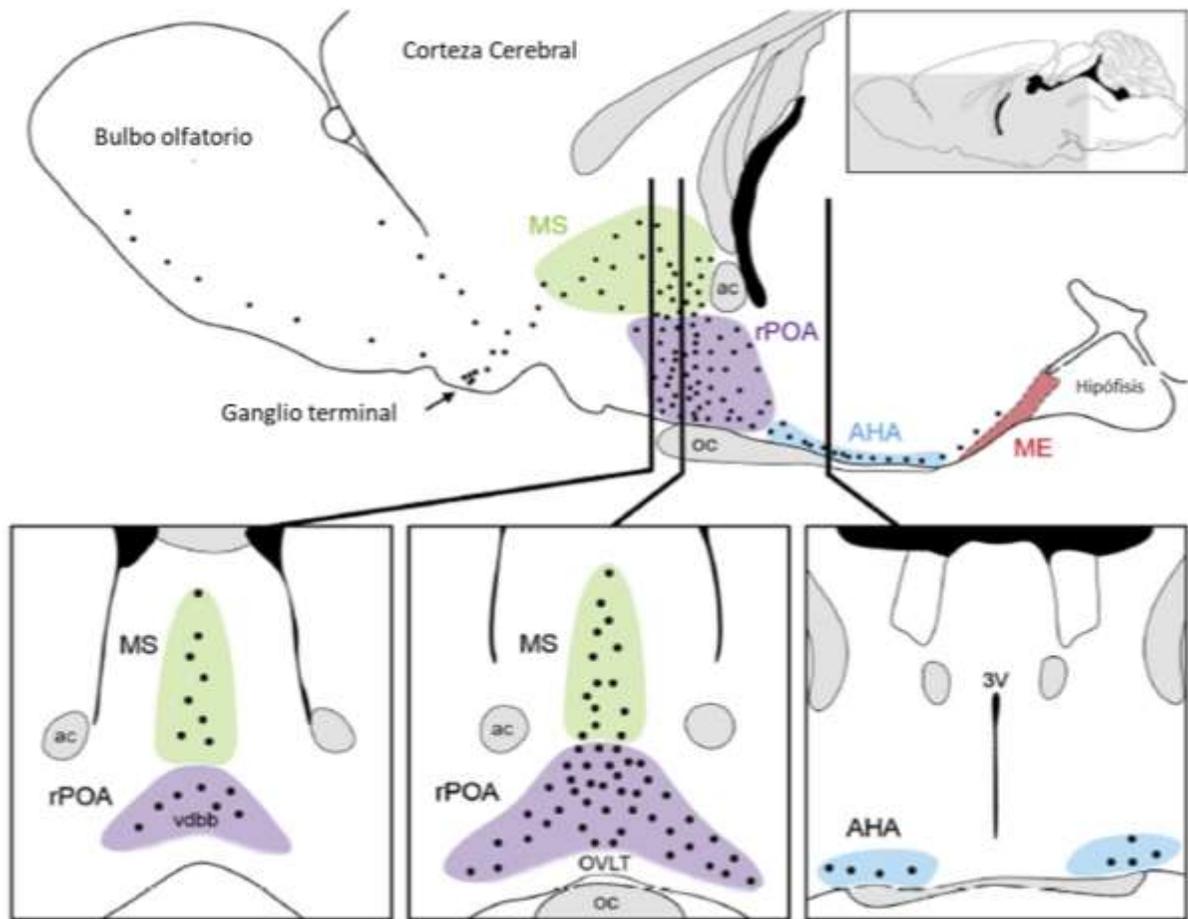


Figura 4. Distribución de las neuronas de GnRH en el cerebro de ratón. Las neuronas GnRH se extiende desde el bulbo olfatorio hasta la eminencia media (ME), la gran mayoría se localizan en el septo medial (MS), el área preóptica (POA) y en el área hipotalámica anterior (AHA). ac: comisura anterior; OVLT: *Organum vasculosum* de la lámina terminal; 3V: tercer ventrículo (Herbison, 2015).

Aproximadamente del 50 al 70% de los axones de las neuronas de GnRH-I llegan a la eminencia media, donde entran en contacto con el plexo capilar del sistema portal hipotalámico hipofisario (formado por capilares fenestrados), y liberan de manera pulsátil a la GnRH-I. Ésta es transportada en la sangre hasta llegar a la parte distal de la adenohipófisis (**figura 5**) (Gore, 2002; Herbison, 2015; Hoffmann y Mellon, 2018; Pak y Chung, 2011).

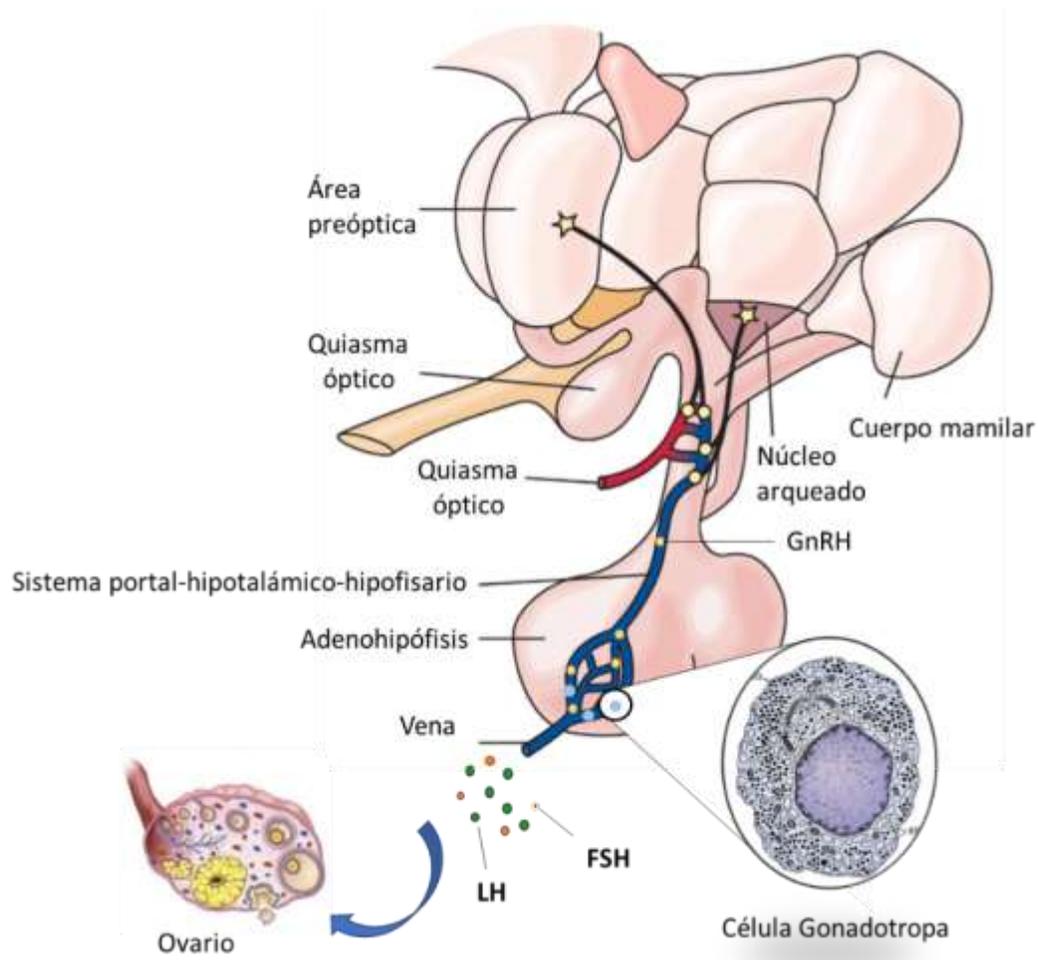


Figura 5. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (modificada de McCartney y Marshall, 2019; Norris y Carr, 2013).

En humanos, los somas de las neuronas que sintetizan **GnRH-II** se localizan en regiones extra hipotálamicas; específicamente en el cerebro medio (sustancia negra), el tálamo (núcleo subtalámico), el cerebro posterior (puente de Varolio, la médula espinal y el cerebelo) y en estructuras límbicas (el hipocampo y la amígdala) (Millar, 2003). A diferencia de las neuronas GnRH-I, las neuronas secretoras de la GnRH-II se originan de neuronas localizadas en el mesencéfalo y sus axones no son proyectados a la eminencia media. Diversos estudios han sugerido que esta GnRH participa en la regulación del comportamiento sexual (McCartney y Marshall, 2019; Norris y Carr, 2013).

Gonadotropinas

En la adenohipófisis se localizan células especializadas denominadas gonadotropos, las cuales secretan a la LH y la hormona estimulante del folículo (FSH), denominadas en conjunto como gonadotropinas (Halvorson y Chin, 2001; McCartney y Marshal Thompson y Kaiser, 2014). Se describen tres subtipos de células gonadotropas: un subtipo que secreta FSH, el segundo LH y el tercero ambas hormonas (Norris y Carr, 2013).

Los gonadotropos son células de forma ovalada e irregular, con un núcleo prominente (**figura 6a**) (Kaiser, 2017) y representan del 15 al 20 % todas las células de la adenohipófisis (Norris y Carr, 2013).

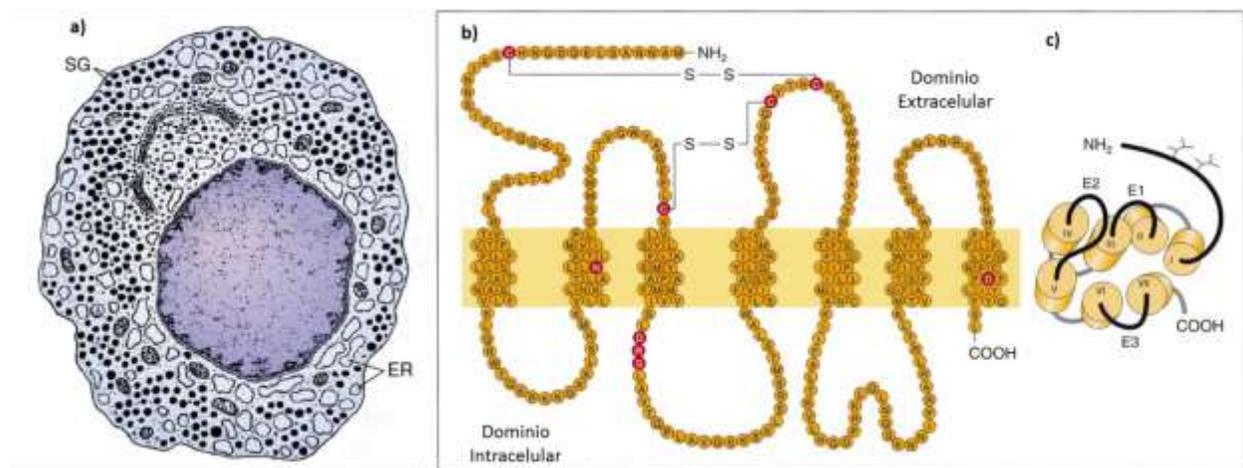


Figura 6. Gonadotropo y la estructura molecular del receptor de GnRH de la rata. A) Morfología de los gonadotropos que muestra la cantidad y tamaño de los gránulos densos observados al microscopio electrónico (tomado de Norris y Carr, 2013). B) Secuencia de aminoácidos del receptor de GnRH. Cada dominio transmembranal está representado por un cilindro que se encuentra inclinado dentro de la membrana. C) Representación tridimensional esquemática del receptor de GnRH de la rata (Anderson, 1996).

En los gonadotropos de los mamíferos, la molécula de GnRH-I se une a su receptor membranal de tipo 1 (GnRH-R) (Anderson, 1996; Clarke and Tilbrook, 2009a), que es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Thompson y Kaiser, 2014). En los mamíferos, el GnRH-R es único entre los GPCRs

debido a la ausencia de su extremo carboxilo terminal intracelular (**figura 6b**) (Navratil *et al.*, 2006).

La unión de la GnRH-I con su receptor (Halvorson y Chin, 2001), activa diferentes vías de señalización (proteína cinasa C, proteína cinasa activada por mitógenos, calmodulina, etc.) que pueden o no estar mediadas por proteínas G (Jennes *et al.*, 2017; McArdle y Roberson, 2015; Narayan *et al.*, 2019). La activación del GnRH-R se realiza por un mecanismo similar al de la Acetilcolina, como se describe en el tema del sistema colinérgico (**figura 7**).

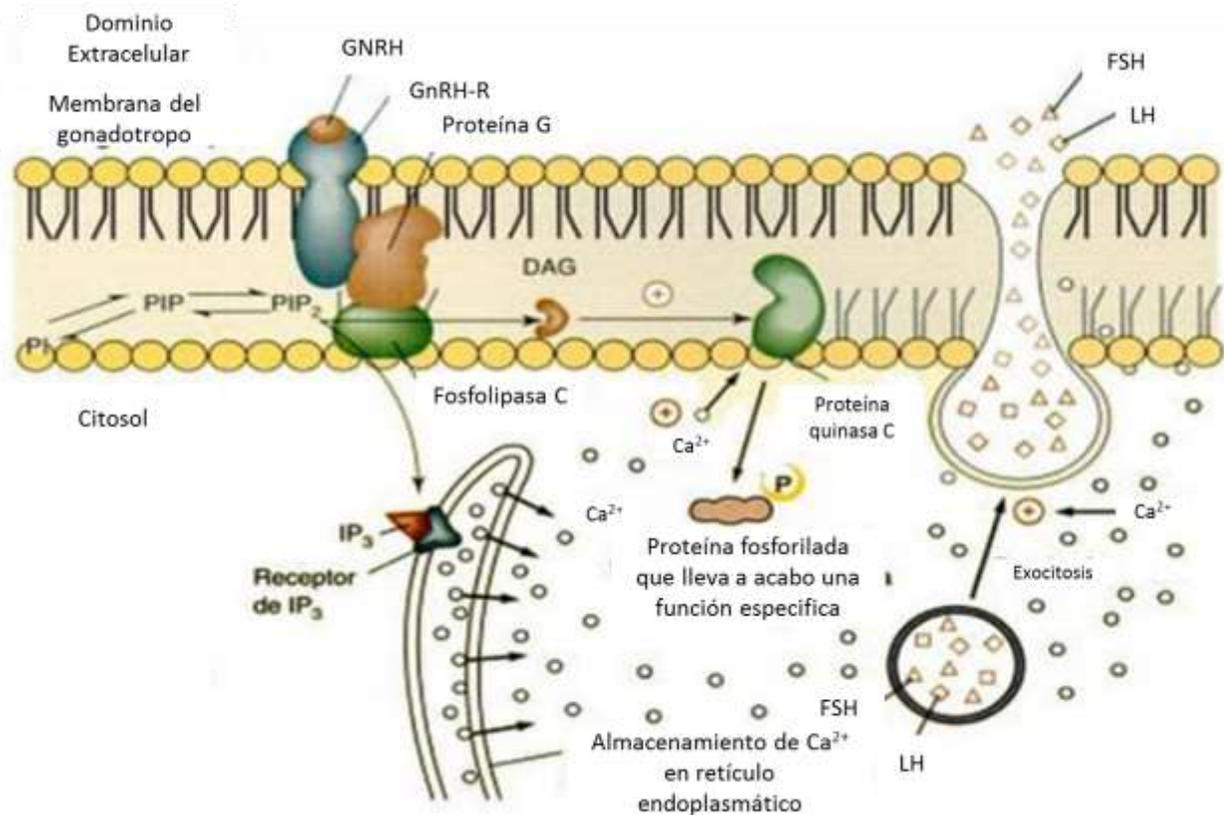


Figura 7. Mecanismos celulares propuestos de las respuestas del calcio inducidas por la activación del receptor de la GnRH en gonadotropos hipofisarios (Bousfield *et al.*, 2006; Devlin, 2008; Kaiser, 2017; Narayan *et al.*, 2019).

Los pulsos de secreción de GnRH regulan la transcripción de diversos genes que codifican a las subunidades que forman a las gonadotropinas. La subunidad α -glicoproteína (α -GSU), que es común para ambas gonadotropinas y que contiene 92

reducidos de aminoácidos (aa), y la subunidad β , distinta para cada gonadotropina, que les confiere especificidad: la LH β de 121 aa y la FSH β de 111 aa (**figura 8**) (Ascoli y Narayan, 2014; Kaiser, 2017; McArdle y Roberson, 2015; McCartney y Marshall, 2019).

Tabla. Estructuras de la hormona glicoproteína α , hormona luteinizante β y hormona estimulante del folículo β .

Subunidad	Gen Locus	Subunidad	No. De axones	Longitud de mRNA (kb)	No. De aminoácidos	No. de sitios de glicosilación
Común α	9p21.1-23	9.4	4	0.8	92	2 (n:52,78)
LH β	19q13.3	1.5	3	0.7	121	1 (N.30)
FSH β	11p13	3.9	3	1.8	117	2 (N:7,24)

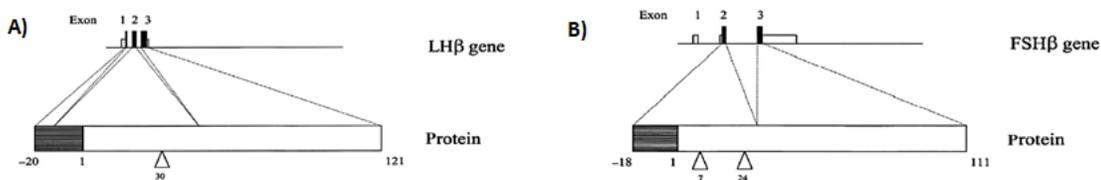


Figura 8. Estructura de las gonadotropinas (modificada de Kaiser, 2017).

La respuesta de los genes que codifican las subunidades de las gonadotropinas (α -GSU, LH β o FSH β) depende de la frecuencia de los pulsos de GnRH: los de alta frecuencia estimulan la secreción de la LH, mientras que los de baja frecuencia la de la FSH (Ascoli y Narayan, 2014; McArdle y Roberson, 2015; Narayan *et al.*, 2019).

En ambas gonadotropinas, las subunidades α -GSU, LH β o FSH β están glicosiladas en residuos específicos y forman heterodímeros lo cual es necesario para que la FSH o la LH se unan a su receptor (Kaiser, 2017).

La secreción de las gonadotropinas varía a lo largo del ciclo estral (McCartney y Marshall, 2019). Después de ser sintetizadas, ambas hormonas son liberadas a la circulación sistémica en el seno venoso dural, a través de la vena hipofisaria (**figura 5**) (Pak y Chung, 2011, 2011).

Una vez en la circulación general, las gonadotropinas llegan al ovario donde se unen a sus receptores membranales (Juárez y Miranda, 2016): los receptores de FSH (FSHR) se localizan en las células de la granulosa de los folículos (Bousfield *et*

al., 2006), mientras que la LH se une a sus receptores (LHR) localizados en las células de la teca interna, de la granulosa que han desarrollado receptores por estimulación de la FSH y a las células lúteas (Bousfield *et al.*, 2006).

Ambos receptores forman parte de las GPCRs (Narayan *et al.*, 2019), y están formados por tres dominios: un dominio extracelular grande (ECD) diferente dependiendo de la gonadotropina sintetizada por la célula, un dominio de 7 regiones transmembranales (7TMD) y un dominio intracelular (Narayan *et al.*, 2019). El ECD es quien reconoce a cada gonadotropina ya que está formado por regiones ricas en leucina (LLR) y sitios de glicosilación diferentes para cada receptor: 6 sitios en el LHR y 3 en el FSHR. Una vez activado el receptor a través el 7TMD, éste propaga los cambios conformacionales que son enviados al dominio intracelular, el cual activa a proteínas Gs (Narayan *et al.*, 2019).

La activación de la proteína Gs, estimula la actividad de la adenilato ciclasa, la cual actúa sobre el ATP y produce adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Kaiser, 2017). El aumento del AMPC estimula a la proteína quinasa A (PKA), que a su vez fosforila a proteínas que regulan la transcripción de diversos genes (Hunzicker-Dunn y Mayo, 2015; Prasasya y Mayo, 2019; Richards, 2018; Russell y Robker, 2019), lo que resulta en la estimulación de la esteroidogénesis y la gametogénesis (Halvorson y Chin, 2001).

En las hembras, la FSH estimula el crecimiento, la maduración y la diferenciación de los folículos ováricos, la síntesis y activación de la aromatasa (P450aro) la cual convierte los andrógenos en estrógenos y la síntesis de receptores a estrógenos por la LH en células de la granulosa. La LH estimula principalmente la liberación del ovocito (ovulación), la síntesis de progesterona y andrógenos por las células secretoras de la teca interna, la síntesis de la P450aro en aquellas células de la granulosa que expresan receptores a LH y estimula la formación y funciones del cuerpo lúteo (Domínguez, 1991; Hunzicker-Dunn and Mayo, 2015; Norris y Carr, 2013; Pak y Chung, 2011).

Regulación de la secreción de GnRH

La secreción de GnRH en el plexo del sistema porta hipotálamo-hipofisario es pulsátil y por lo tanto también la secreción de las gonadotropinas. En los años 80, Knobil y col. (1988), mostraron que la estimulación pulsátil de GnRH en los gonadotropos estimula la secreción de LH y FSH, mientras que la infusión continua de GnRH no estimula la secreción de éstas (**figura 9**) (Kaiser, 2017).

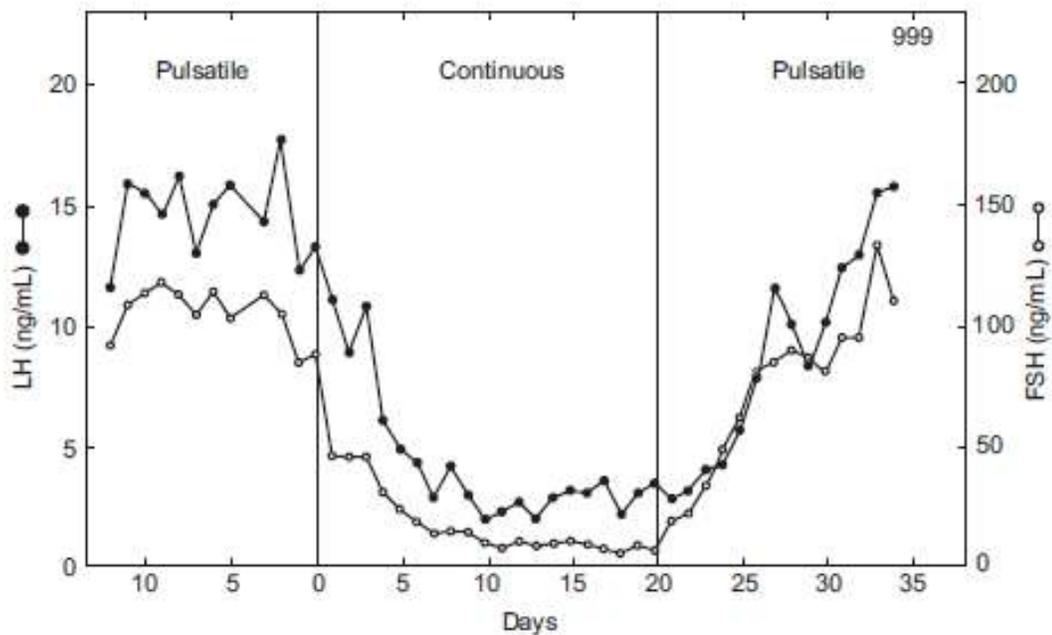


Figura 9. Experimento de Knobil donde se muestra que la administración pulsátil de GnRH estimula la secreción fisiológica de LH y FSH, mientras que la administración continua no lo hace (Kaiser, 2017).

La pulsatilidad (o actividad rítmica), es una propiedad intrínseca de la neurona de GnRH (Bulun, 2011). La liberación pulsátil de GnRH es estimulada por la actividad del llamado *generador de pulsos de GnRH*, localizado en el en el MBH, en particular en el núcleo arqueado (NA) (Herbison, 2008).

Los pulsos de secreción de GnRH, no solo influyen en la frecuencia de liberación de las gonadotropinas, sino que también modulan el grado de glicosilación de la molécula (Bulun, 2011).

Se describen dos tipos de secreción de GnRH: 1) la secreción basal o tónica de GnRH (pulsos de baja frecuencia), estimula la secreción de FSH lo cual ocurre durante la mayor parte del ciclo estral; y 2) la secreción fásica (pulsos de alta frecuencia), estimula el aumento de secreción de LH que induce la ovulación (Goodman *et al.*, 2014).

Los ritmos de secreción de las neuronas de GnRH son modulados por diversas hormonas y neurotransmisores que actúan de manera estimulante o inhibitoria (Bulun, 2011; Domínguez, 1997). En particular, la liberación de GnRH es regulada por las hormonas esteroides (Clarke y Tilbrook, 2009). Los estrógenos ejercen circuitos de retroalimentación estimulante o inhibitoria (Clarke y Tilbrook, 2009), que se explican por la unión del estradiol a su receptor alfa (ER- α) localizados en células secretoras de kisspeptina (Kp), la cual es codificada por el gen Kiss-1, del AVPV (estimulantes) o en células Kp localizadas en los núcleos *arcuatus* (ARC) (Herbison, 2008; Radovick *et al.*, 2012; Rønnekleiv *et al.*, 2010). Los axones de las neuronas Kp hacen sinapsis con el soma y las dendritas de las neuronas GnRHérgicas (Clarkson y Herbison, 2006). El aumento de las concentraciones de estrógenos estimula la expresión del gen Kiss-1 en el AVPV y al mismo tiempo lo disminuye en el ARC. En el ARC, las neuronas Kp co-expresan neuroquinina-B (NKB) y dinorfina y reciben el nombre de neuronas KDNy (Beymer *et al.*, 2016). Estas neuronas responden a la disminución de las concentraciones de estrógenos, lo que resulta en la disminución de la expresión del gen Kiss-1 (Tena-Sempere, 2014). La unión de la Kp con su receptor GPR54, estimula la secreción fásica de GnRH/LH (**figura 10**) (d'Anglemont y Colledge, 2010).

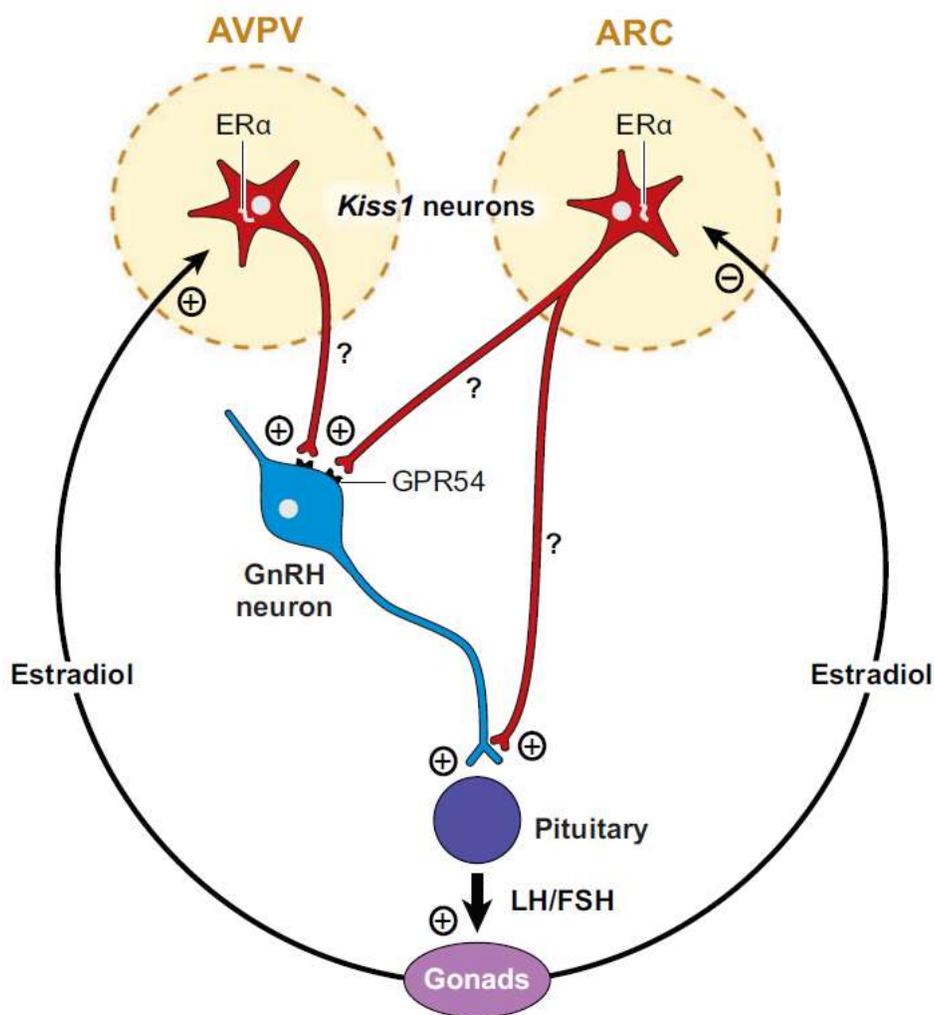


Figura 10. Modelo de la regulación de la secreción de GnRH en el hipotálamo por efectos del estradiol (Popa *et al.*, 2008).

Regulación circadiana de la ovulación

La ovulación es un proceso fisiológico periódico que es modulado por múltiples factores (Domínguez, 1991), debido a que las neuronas GnRHérgicas deben integrar una gran variedad de señales externas e internas para su correcto funcionamiento (Campbell, 2007).

Everett y Sawyer, en 1950, mostraron que el aumento de las concentraciones de LH en el día del proestro ocurre a una hora particular del día, a este momento se le denominó periodo crítico. En los roedores existe un mecanismo circadiano, una señal

que se repite aproximadamente cada 24 horas, la cual es efectiva para estimular la secreción de GnRH (Butler *et al.*, 2017)

Este mecanismo circadiano asegura que el inicio del aumento pre-ovulatorio de LH; y está coordinado con el comportamiento sexual del animal (Herbison, 2008). Por ello, Funabashi y col., (2002); Simonneaux y col., (2012) sugieren que la secreción preovulatoria de GnRH es regulada por dos señales: una señal neuronal que proviene del Núcleo Supraquiasmático (NSQ) que indica la hora del día y otra que indica el aumento preovulatorio de la concentración de estrógenos.

En los mamíferos, el NSQ es el principal marcapaso circadiano que controla los ritmos biológicos (Hastings *et al.*, 2005). Es una estructura bilateral formada por aproximadamente 10,000 neuronas y se localiza cerca de la línea media del cerebro; en la porción ventral del hipotálamo anterior y dorsal al quiasma óptico (Coomans *et al.*, 2015; Corona *et al.*, 2008). El NSQ, recibe información fótica por una vía monosináptica de la retina; el tracto retinohipotalámico (RHT) (Coomans *et al.*, 2015).

Varias funciones fisiológicas como la temperatura corporal, la presión arterial, el sueño y muchos parámetros endocrinos, se expresan en un patrón oscilatorio de 24 horas dirigidos por el NSQ (Gillette y Tischkau, 1999). En los mamíferos, el sistema circadiano es una colección jerárquica de relojes ubicados por todo el cuerpo. Algunos de dichos relojes son órganos endocrinos en los cuales su expresión regula la síntesis y secreción de hormonas a lo largo del día. Algunos ejemplos de estos relojes son: la glándula pineal, las glándulas adrenales y los ovarios, los cuales a su vez son coordinados por el NSQ (Evans, 2016).

Las neuronas que expresan el Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP), localizadas en la región ventromedial del NSQ, estimulan directamente la secreción de GnRH en POA, mientras que las neuronas que expresan Arginina Vasopresina (VP), localizadas en la región dorsomedial del NSQ, regulan la liberación de GnRH de manera indirecta a través de las neuronas de Kp del AVPV (**figura 11**) (Moore, 2013; Simonneaux *et al.*, 2012).

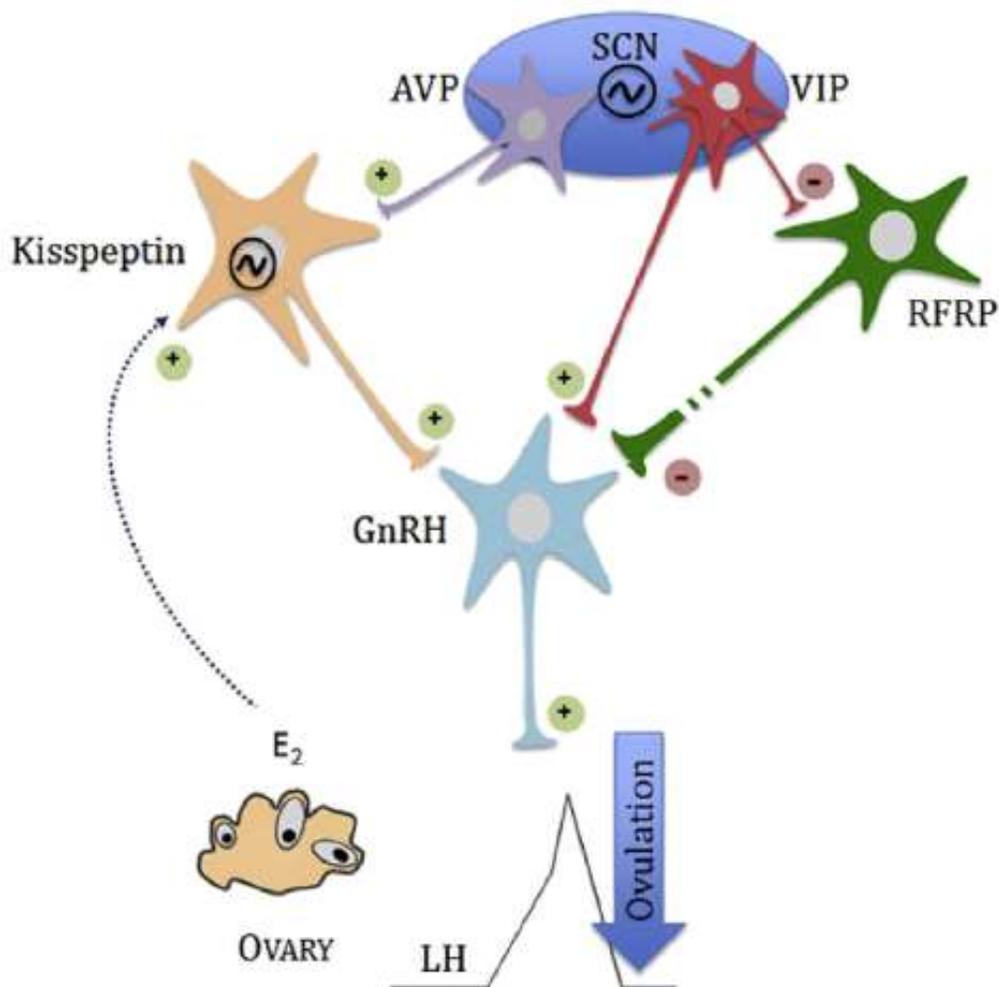


Figura 11. Representación esquemática de las señales circadianas y estrogénicas que controlan el pico preovulatorio de LH en las ratas hembra. RFRP: neuronas que sintetizan un neurotransmisor homólogo de la hormona inhibidora de gonadotropinas (Beymer *et al.*, 2016).

Sistema colinérgico central y periférico

Existen diversos neurotransmisores y neuropéptidos que participan en la secreción de gonadotropinas (Jennes *et al.*, 2017); entre ellos el sistema colinérgico.

El sistema nervioso es una red de comunicación formada por neuronas, que coordina y regula el medio interno del cuerpo y permite la interacción del organismo con su ambiente (Levy *et al.*, 2006).

Anatómicamente el sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC) formado por el encéfalo y la médula espinal; y sistema nervioso periférico (SNP), constituido por los nervios craneales, espinales y ganglios (simpáticos y parasimpáticos) (Coveñas y Sánchez, 2014; Waxman *et al.*, 2011).

La unidad anatómica y funcional del sistema nervioso es la neurona (Webb, 2017); una célula especializada en la recepción, procesamiento y transmisión de la información a otras neuronas o células efectoras (Crossman y Neary, 2011).

Las neuronas se comunican entre sí enviando información en forma de potenciales de acción; llamados “impulsos nerviosos” (Hall y Guyton, 2011). Los impulsos se transmiten por la sinapsis (lugares de transmisión del impulso) (Wilmore y Costill, 2010) y, dependiendo del mecanismo de transmisión entre las neuronas, la sinapsis se clasifican en eléctricas y químicas (Patel y Feucht, 2011).

En las sinapsis eléctricas, la transmisión de la información se hace por un intercambio iónico que pasan directamente de una neurona a otra modificando su potencial de membrana (Bustamante, 2007; Hill *et al.*, 2006). El flujo iónico es bidireccional (es decir, que el mensaje se transmite de la célula postsináptica a la sináptica y viceversa) y se realiza por intermedio de las uniones comunicantes (uniones gap) (Bustamante, 2007; Hill *et al.*, 2006; Levy *et al.*, 2006).

En las sinapsis químicas existen dos compartimientos denominados presinapsis localizada en la neurona activante o célula efectora y postsinapsis localizada en las membranas de ambos compartimientos. Están separadas por un espacio extracelular de 20 a 30 nm denominado hendidura sináptica (Costanzo, 2014; Purves *et al.*, 2016; Ross *et al.*, 2011). En la presinapsis se localizan los neurotransmisores (sustancias con las cuales se intercambia información neuronal durante la sinapsis) y en la postsinapsis se encuentran los receptores al neurotransmisor (Cardinali, 2007a; Córdova, 2003). Estas sinapsis son unidireccionales, es decir, que la información se transmite una sola dirección (Bustamante, 2007).

El SNC utiliza principalmente sinapsis químicas para la transmisión de la información (Webb, 2017). En función del neurotransmisor liberado en la sinapsis, en el sistema nervioso se reconocen diversos sistemas de neurotransmisión: monoaminérgico, colinérgico, peptidérgico, aminoacidérgico y otros como el óxido nítrico y la anandamida (Barrett y Ganong, 2015; Kolb y Whishaw, 2014; Miller y Yeh, 2017). El sistema colinérgico es aquel que utiliza a la Acetilcolina (ACh) como neurotransmisor principal (Page, 1998; Patel y Feucht, 2011).

En la sinapsis, la unión de la ACh a su receptor resulta en el inicio de un impulso nervioso por la despolarización de la sinapsis (efecto estimulante) o puede hiperpolarizar a la sinapsis y bloquear la progresión de un impulso (efecto inhibitorio). Que el resultado sea estimulante o inhibitorio depende del tipo de receptor al cual se une. La síntesis, el almacenamiento y la liberación de la ACh es similar en todas las neuronas del sistema nervioso (Westfall y Westfall, 2007).

En las neuronas, la ACh se sintetiza a partir de la colina y acetil Coenzima A (acetil-CoA) (Purves *et al.*, 2016), por acción de la acetilcolintransferasa (AChE), la cual transfiere un grupo acetilo del Acetil-CoA a la colina (**figura 12**) (Bylund, 2016; Heller Brown y Laiken, 2012). La AChE se sintetiza dentro del retículo endoplásmico rugoso en el soma de la neurona y se transporta a lo largo del axón hacia la terminal nerviosa (Hill *et al.*, 2006; Westfall y Westfall, 2011).

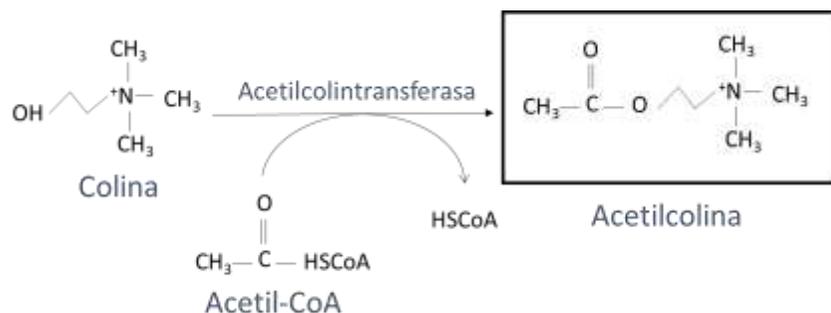


Figura 12. Biosíntesis de la acetilcolina (Delgado *et al.*, 2008).

La acetil-CoA se sintetiza en las mitocondrias de las terminales nerviosas (Hill *et al.*, 2006; Westfall y Westfall, 2011). Su síntesis se produce a partir de diversas rutas

metabólicas, como la β -oxidación de los ácidos grasos, la degradación de algunos aminoácidos y, principalmente, por la descarboxilación oxidativa del piruvato (Peretó *et al.*, 2007).

El piruvato, generado durante el glucólisis ingresa a la mitocondria por medio de una proteína de transporte, por acción de la enzima piruvato deshidrogenasa (Melo *et al.*, 2016) y forma la acetil-CoA (**figura 13**) (Pocock y Richards, 2005), que es trasladada al citoplasma (Fisher y Wonnacott, 2012).

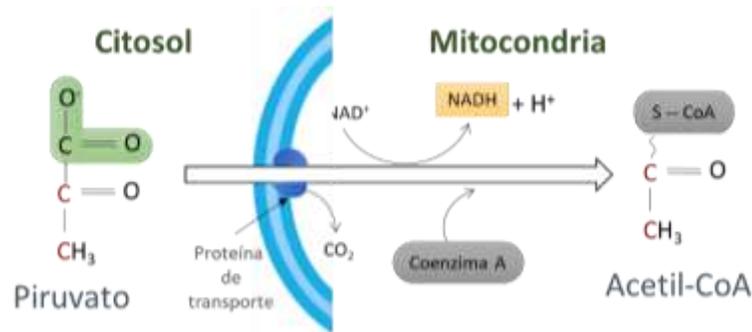


Figura 13. Biosíntesis de la Acetil-CoA (Campbell *et al.*, 2010).

Debido a que el sistema nervioso no sintetiza colina, ésta se adquiere de la dieta. La colina se forma a partir de la L-Serina que es descarboxilada por efectos de la serina descarboxilasa y forma una etanolamina la que posteriormente es metilada y da como resultado la formación de la colina (**figura 14**). Sin embargo, la principal fuente de colina es la derivada de la hidrólisis de la ACh (Fisher y Wonnacott, 2012; Velasco y Álvarez, 1988).

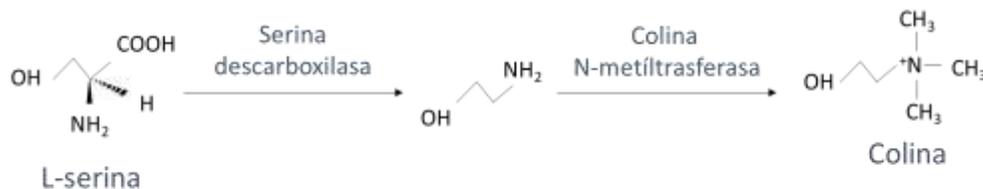


Figura 14. Biosíntesis de la colina (Delgado *et al.*, 2008).

La colina es transportada desde el espacio extracelular de la sinapsis hasta el citoplasma de la terminal nerviosa, mediante un transportador de colina (ChT), que

ingresa una molécula de colina y una de sodio (Na^+) (**figura 15**) (Barrett y Barman, 2012; Szabo *et al.*, 2009).

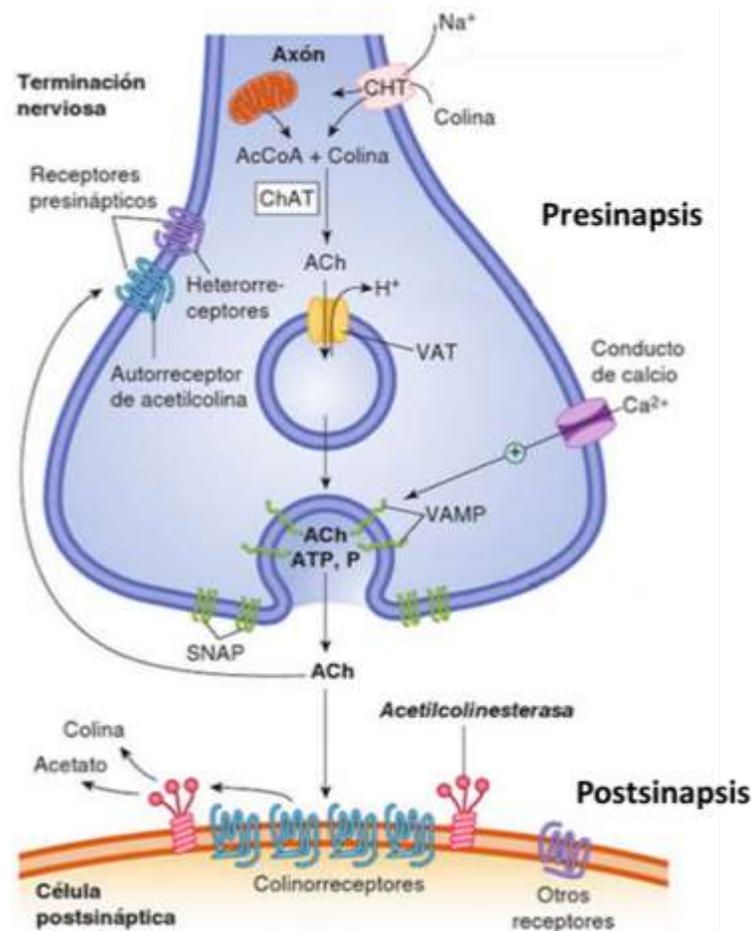


Figura 15. Cambios bioquímicos en la sinapsis colinérgica (Barrett y Ganong, 2015, 2010).

En el citoplasma de la terminal nerviosa, el transportador de ACh vesicular (VACHT) capta a la ACh recién sintetizada y la empaqueta en vesículas sinápticas. VACHT utiliza un gradiente electroquímico de protones para introducir a la ACh al interior del organelo (Westfall y Westfall, 2011, 2007).

En la neurona colinérgica, la ACh se almacena en vesículas localizadas en el compartimiento de la ACh movilizable, formado por las vesículas ubicadas en la terminal nerviosa cerca del sitio de liberación y el compartimiento de almacenamiento de ACh, formado por las vesículas fijadas en el citoesqueleto, es decir alejadas del sitio de liberación (Hill *et al.*, 2006).

En las sinapsis, la ACh es liberada por exocitosis (Voet y Voet, 2006); éste proceso es regulado en la mayoría de los casos por las proteínas transmembranales denominadas en conjunto como proteínas SNARE (o receptor de proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble) (Jeevendra, 2016).

Las SNARE se dividen en dos grupos: las proteínas de la membrana de la vesícula sináptica (R-SNARE; originalmente denominadas vSNARE) y las proteínas de la membrana plasmática (Q-SNARE; originalmente denominadas tSNARE) (**figura 16**) (Koolman y Röhme, 2004; Voet y Voet, 2006).

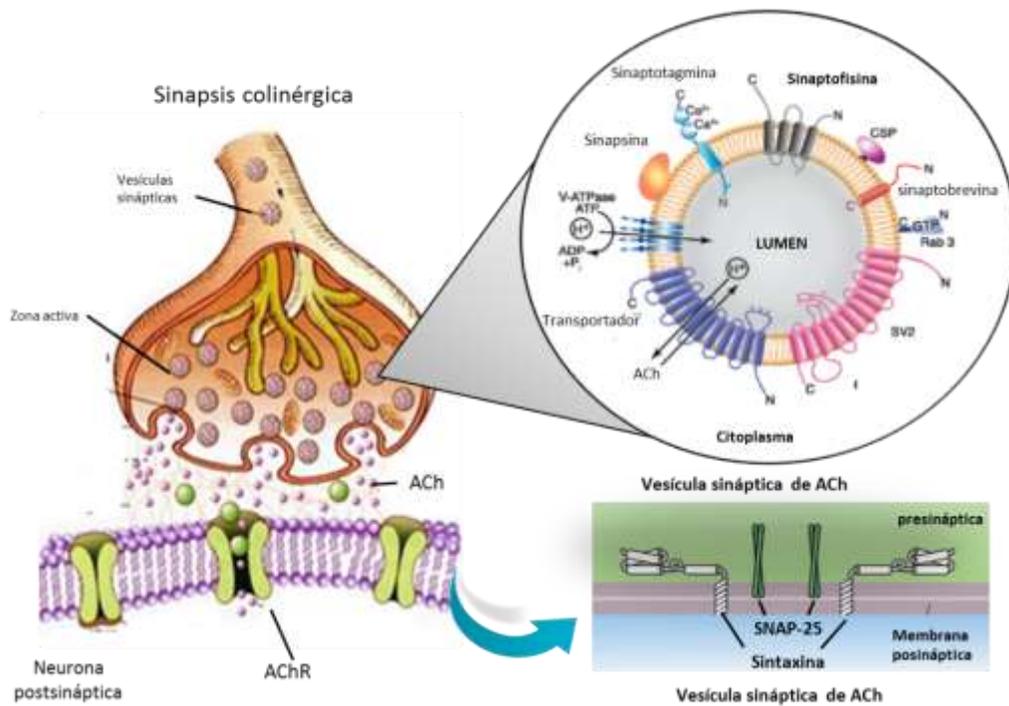


Figura 16. Proteínas SNARE involucradas en la sinapsis. A) Proteínas de la vesícula sináptica (R-SNARE). B) Proteínas de la membrana plasmática (Q-SNARE) (Katzung *et al.*, 2016; Zucker *et al.*, 2014).

Los R-SNARE son receptores que contienen residuos de arginina, e incluyen proteínas como la sinaptobrevina, mientras que los Q-SNARE contienen residuos de glicina y la forman proteínas como la sintaxina y la SANAP-25 (proteína asociada al sinaptosoma) (Goodman *et al.*, 2007; Voet y Voet, 2006).

Cuando un potencial de acción llega a la membrana de la neurona colinérgica, se activan canales de calcio dependientes de voltaje (fundamentalmente de los tipos N o P), lo que facilita la entrada de calcio (Ca^{2+}) al botón sináptico (Voet y Voet, 2006). El aumento del Ca^{2+} intracelular desencadena cambios en la forma de las proteínas lo que resulta en el traslado de vesículas de la región de reserva hacia el botón sináptico (Koolman y Röhm, 2004; Morales y Ivorra, 2005).

Una vez dentro de la terminal nerviosa, el Ca^{2+} se une a la sinaptotagmina, una proteína de membrana asociada a las vesículas (VAMP) de ACh (Sanabria-Castro *et al.*, 2017), la cual detecta el aumento de Ca^{2+} citosólico (Lodish, 2013) y en el citoplasma se forma el complejo Ca^{2+} -sinaptotagmina que favorece la unión de la sintaxina con la VAMP (Fox, 2014; Purves *et al.*, 2016; Sanabria-Castro *et al.*, 2017).

En la **figura 17** se muestra cómo se forma el poro de fusión de una vesícula y la membrana celular. En resumen, las vesículas colinérgicas se aproximan a la membrana celular por la formación del complejo SNARE, formado por un dominio α -helicoidal de la VAMP, dos dominios más largos α -helicoidales de la sintaxina y el dominio intracelular de la SNAP-25. Este complejo avanza del extremo N hacia el C y tiene un cambio conformacional de trans-SNARE a cis-SNARE, lo que resulta en la formación del poro de fusión (Schwartz y Merz, 2009; Zucker *et al.*, 2014).

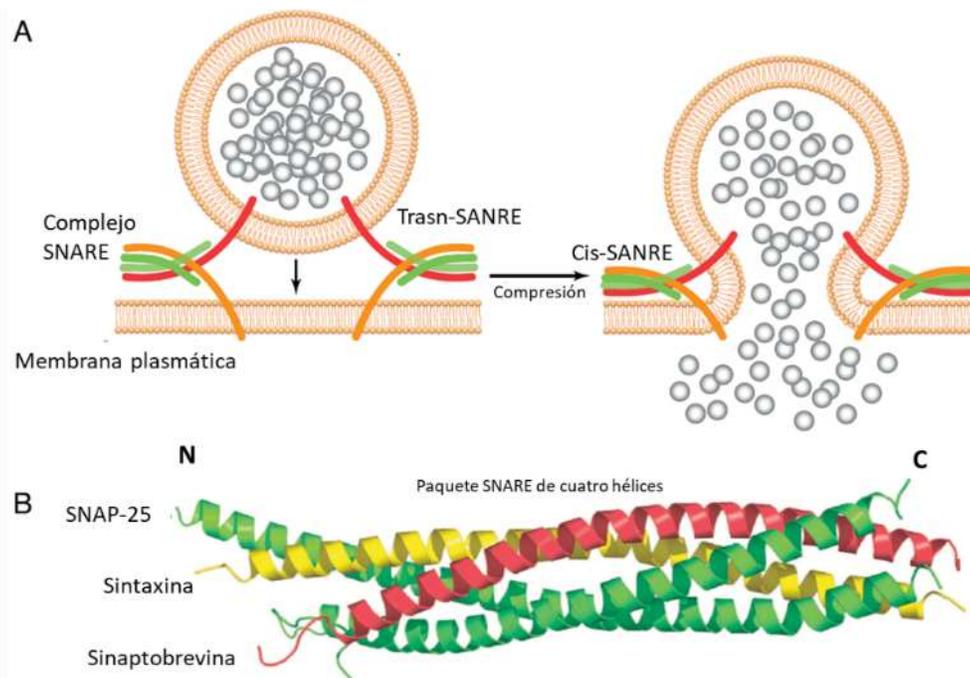


Figura 17. Mecanismo de fusión de la membrana vesicular y la plasmática durante la sinapsis. A) la fusión es impulsada por el complejo trans-SNARE el "cierre" de este complejo resulta en la fusión de las membranas. B) Representación estructural del complejo SANRE (Zucker *et al.*, 2014).

Como resultado de dicho proceso, las vesículas de ACh se aproximan y fusionan con la membrana plasmática de la región terminal denominada zona activa (Morales y Ivorra, 2005). El área fusionada se abre, la ACh es liberada en paquetes multimoleculares denominados cuantos y difunde a través de la hendidura sináptica hacia la membrana postsináptica (Hill *et al.*, 2006).

En las sinapsis colinérgica, la ACh es hidrolizada por la enzima acetilcolinesterasa formando colina y acetato (**figura 18**) (Fisher y Wonnacott, 2012). La colina, producto del metabolismo de la ACh, es recapturada por la terminal nerviosa y reutilizada como precursor para la síntesis de ACh (**figura 15**) (Müller y Nisticó, 1989).

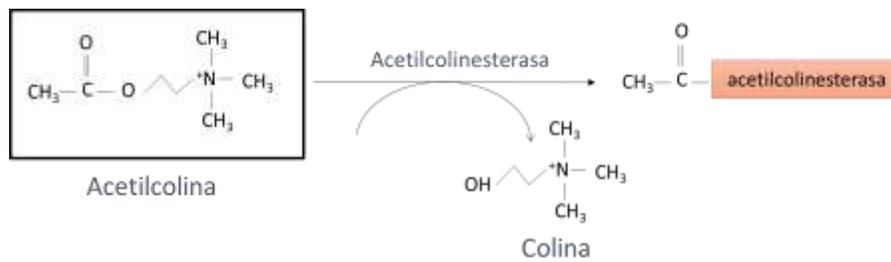


Figura 18. Metabolismo de la ACh (Delgado *et al.*, 2008).

Los somas de las neuronas colinérgicas del SNC se localizan en el núcleo medial septal, el núcleo tegmental pedúnculo-pontino, la banda diagonal de Broca, y, sobre todo, en el núcleo basal de Meynert. Sus terminales nerviosas se proyectan a diversas estructuras del SNC, el bulbo olfatorio, la corteza, la amígdala, el hipocampo, el tálamo y el hipotálamo (**Figura 19**) (Cardinali, 2007b; Cummings, 2000; Flores *et al.*, 2005; Wevers, 2011). En el hipotálamo, el área preóptica medial (mPOA), el NSQ y el ARC reciben inervación colinérgica (Hut y Van der Zee, 2011; Turi *et al.*, 2008).

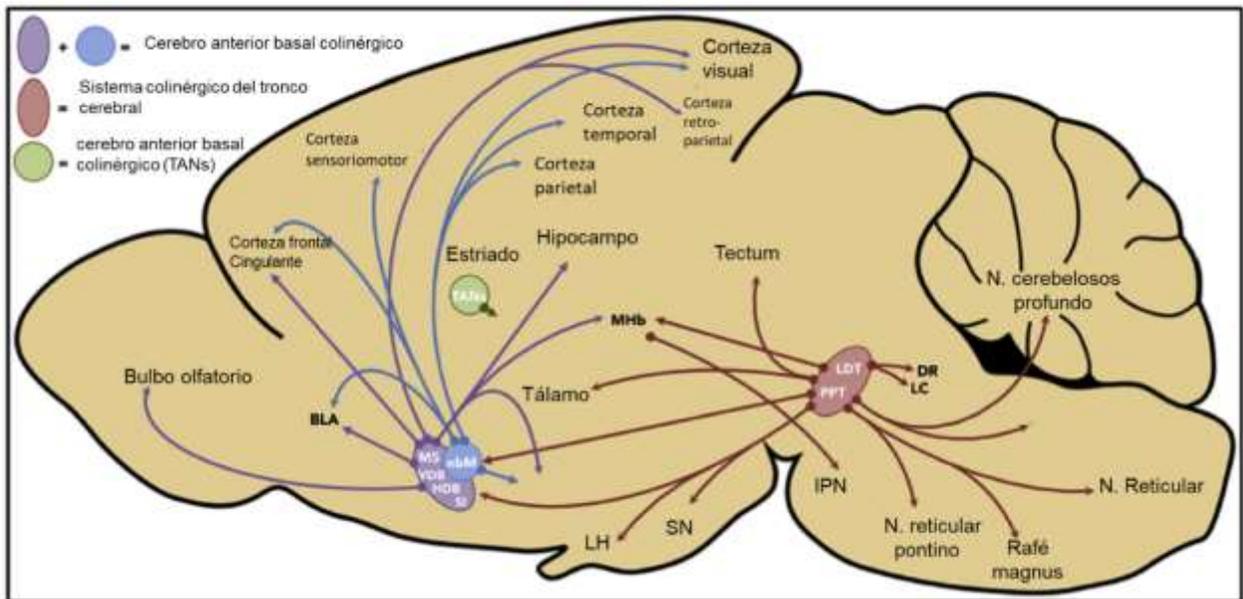


Figura 19. Esquema que muestra las proyecciones aferentes y eferentes de los principales n. colinérgicos en el SNC de los mamíferos. Abreviaturas: BLA: amígdala basolateral, DF: rafé dorsal, EC: corteza entorrinal, HDB: banda horizontal diagonal de Broca, IPN: n. interpeduncular, LC: locus coeruleus, LDT: n. tegmental laterodorsal, LH: hipotálamo lateral, MHb: habénula medial, ME: septum medial, nbM: n. basal de Meynert, PPT: n. tegmental pedunculo-pontino, SI: sustancia innominada, SN: sustancia negra, TANS: neuronas tónicamente activas (interneuronas colinérgicas del cuerpo estriado), VDB: banda vertical de la banda diagonal de Broca (Lebois *et al.*, 2018).

Receptores colinérgicos

Los efectos del sistema colinérgico se ejercen por la unión de la ACh con sus receptores colinérgicos (AChR) presentes en la membrana celular de otra neurona (postsináptica) o de una célula efectora (English y Jones, 2012).

Con base en sus propiedades farmacológicas, los AChR se clasifican en dos categorías: **nicotínicos (nAChRs)** y **muscarínicos (mAChRs)** (Salaices *et al.*, 2009; Heller y Laiken, 2012; Rang *et al.*, 2016).

Receptores nicotínicos (nAChR)

Los nAChR pertenecen a la familia de receptores acoplados a canales iónicos regulados por ligando (Westfall y Westfall, 2007). Estos receptores están formados por cinco subunidades (α , β , γ , δ y ϵ) que constituyen un canal que permite la entrada de cationes a la célula (**figura 20**) (Barrett y Barman, 2012; Naser y Kuner, 2018).

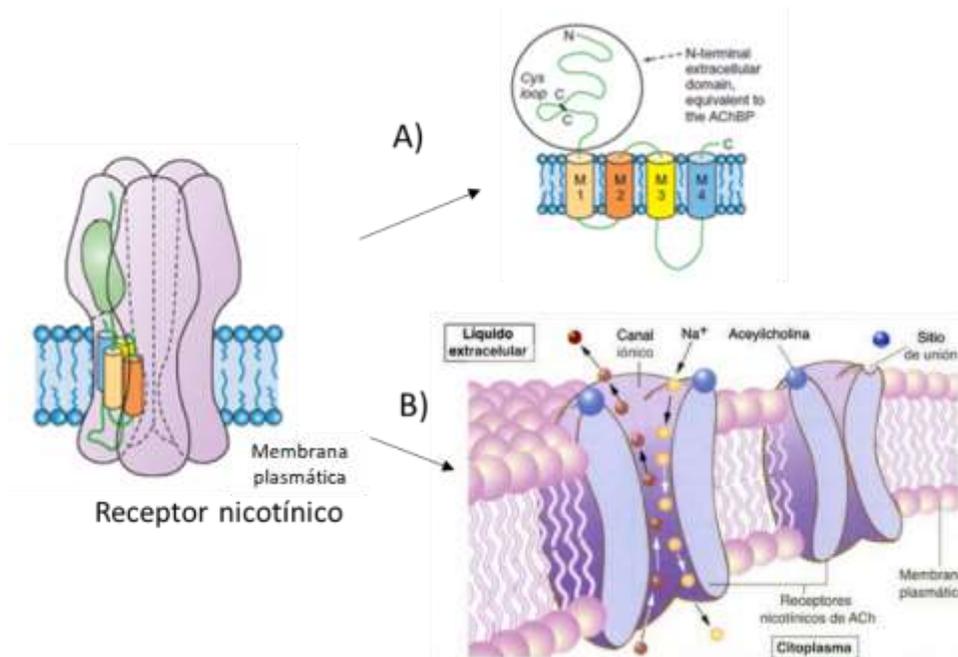


Figura 20. Esquema de un nAChR ensamblado A) características estructurales de los nAChR; los cuadros de colores representan los cuatro segmentos transmembrana, M1, M2, M3 y M4. B) La unión de una molécula ACh a cada uno de los dos sitios de unión de la subunidad α , cambia la conformación del receptor permitiendo los iones Na^+ y K^+ fluyan a través del canal (Fisher y Wonnacott, 2012; López y Fernández, 2008).

Cada subunidad posee cuatro segmentos transmembranales (TM1, TM2, TM3, TM4), en forma de α - hélice (**figura 20**). Los aminoácidos que constituyen la α hélice del segmento TM2 presentan propiedades anfipáticas y conforman el poro del receptor (Sanabria-Castro *et al.*, 2017).

La unión de la molécula de ACh a estos receptores desencadena un cambio conformacional que resulta en la apertura del canal, lo que permite el paso de cationes como el Na^+ , potasio (K^+), Ca^{2+} (**figura 20b**) (Barrett y Barman, 2012).

Los nAChR se localizan en el músculo esquelético, en los ganglios del SNP y en diversas regiones del SNC (Vázquez-Palacios y Bonilla-Jaime, 2004). Se dividen en receptores que median la activación neuromuscular (nAChR M) o la neuronal (nAChR N) en los ganglios autónomos y en el SNC (English y Jones, 2012; Heller y Laiken, 2012).

Se han identificado 10 tipos de subunidades alfa ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), mientras que para la subunidad β se distinguen cuatro ($\beta 1$ - $\beta 4$) (**cuadro 1**) (Taylor, 2012).

Cuadro 1. Subtipos de receptores nicotínicos en el músculo y en el sistema nervioso (Taylor, 2012).

	Composición			Formación
<i>Muscular</i>	$\alpha 1, \beta 1, \gamma, \delta, \epsilon$			$\alpha 2\beta\gamma\delta$ o $\alpha 2\beta\epsilon\delta$
	$\alpha 2$	$\alpha 6$	$\beta 2$	Varios ensamblajes pentaméricos de α y β o solo α
	$\alpha 3$	$\alpha 7$	$\beta 3$	
	$\alpha 4$		$\beta 4$	
<i>Neuronal</i>	$\alpha 2$	$\alpha 9$		
		$\alpha 10$		

El nAChR M están formados por subunidades α (dos), β , δ , γ o bien ϵ (una) (**cuadro 1**) (Barrett y Barman, 2012). Estas subunidades se unen y forman un complejo pentamérico. En el músculo embrionario o fetal, los receptores están formados por la subunidad γ , posteriormente en el músculo adulto esta subunidad es sustituida por la subunidad ϵ (Goodman *et al.*, 2007; Vázquez-Palacios y Bonilla-Jaime, 2004). Para

la activación de estos canales es necesaria la unión de dos moléculas de ACh en la subunidad α (**figura 21**) (Szabo *et al.*, 2009).

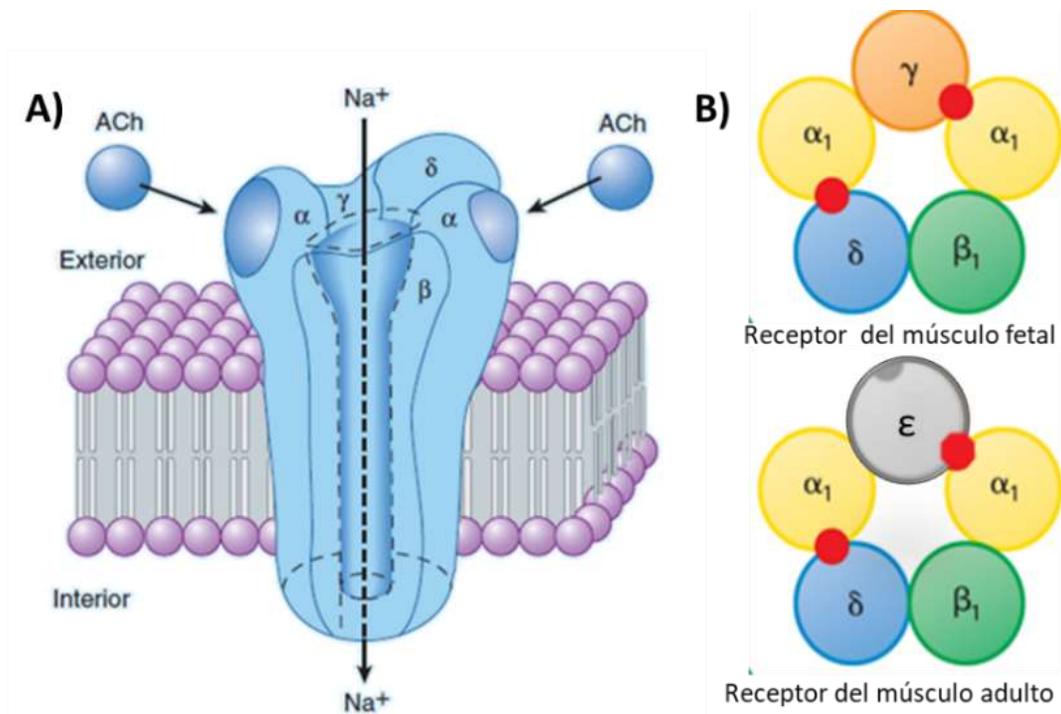


Figura 21. Estructura y disposición de las unidades del nAChR M. A) Vista longitudinal del receptor; las flechas indican los sitios de unión de la ACh en las subunidades α . B) Disposición de las subunidades del receptor nicotínico, en el adulto la subunidad γ es sustituida por la subunidad ϵ (modificada de Goodman *et al.*, 2007; Katzung *et al.*, 2016).

En cambio, los **nAChR N** solo están formados por subunidades α o α y β (Barrett y Barman, 2012). En el SNC solo se han identificado nueve tipos de subunidades α y tres β . Las subunidades α neuronal, excepto la α_5 , se combinan con sus subunidades β y forman heterómeros. Los receptores homoméricos funcionales están formados solo por subunidades α_7 (Taylor, 2012). La activación de los nAChR N heterómeros ocurre cuando dos moléculas de ACh se acoplan a sus sitios de unión localizados entre las subunidades α / β (**figura 22**).

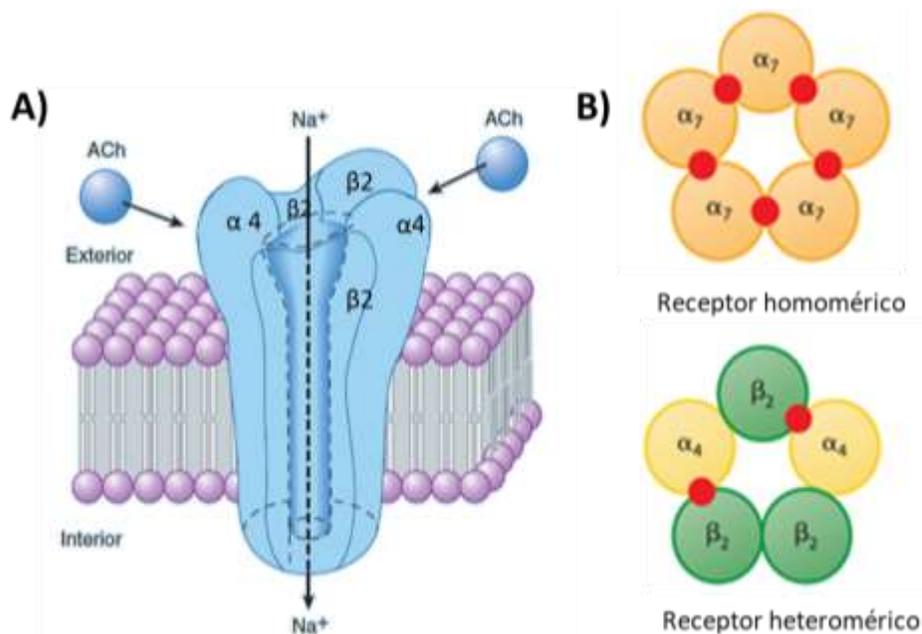


Figura 22. Estructura y disposición de las unidades del nAChR N. A) Vista longitudinal del receptor; las flechas indican los sitios de unión de la ACh en las subunidades α . B) Disposición de las subunidades del receptor nicotínico homomérico y heteromérico (Goodman *et al.*, 2007; Katzung *et al.*, 2016).

Receptores muscarínicos (mAChR)

Los mAChR pertenecen a la familia de GPCR, cuya estructura básica es un péptido que está formado por un 7TMD. En el sistema nervioso se expresan 5 subtipos de mAChR (M1, M2, M3, M4 y M5) (Abrams *et al.*, 2006; Lebois *et al.*, 2018; Mendoza, 2008a).

En función de sus características de acoplamiento a la proteína G y sus mecanismos efectores, los mAChR se subdividen en dos grupos: los que activan proteínas Gq/G11 y los que activan proteínas Gi/Go (**figura 23**) (Fisher y Wonnacott, 2012).

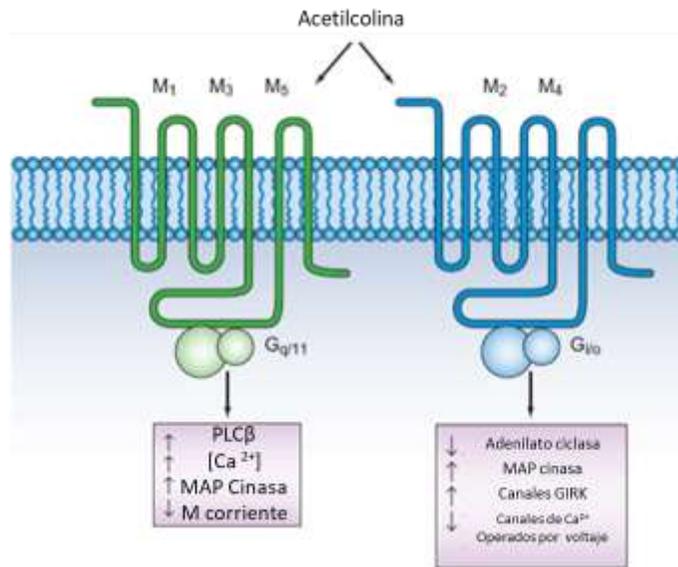


Figura 23. Subdivisión de los mAChR. Los receptores M1, M3 y M5 activan a proteínas Gq / G11, mientras que los M2 y M4 estimulan a proteínas Gi/Go (Fisher y Wonnacott, 2012).

La unión de la ACh a los receptores M1/M3/M5, produce un cambio conformacional que hace que la subunidad α_q active a la fosfolipasa C (PCL) localizada en la membrana, la cual hidroliza al Fosfatidilinositol-4,5-Difosfato (PIP₂), lo que da como resultado dos productos: el Diacilglicerol (DAG) y el Inositol-1,4,5-tri-fosfato (IP₃) (**Figura 24**) (Arce *et al.*, 2006; Mendoza, 2008b; Salaices *et al.*, 2009).

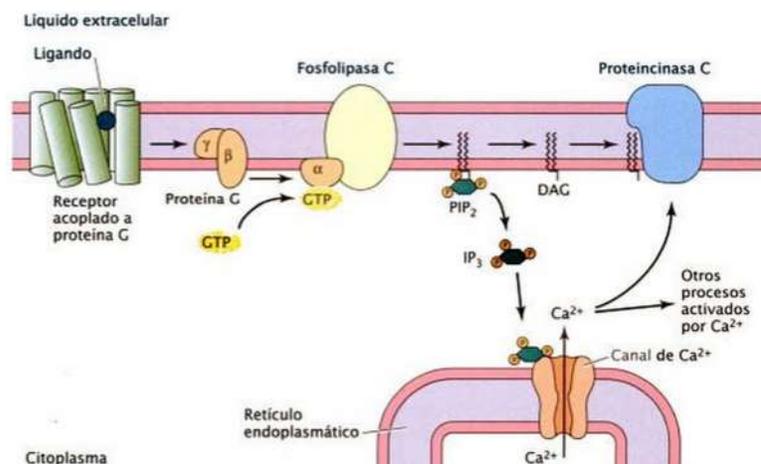


Figura 24. Esquema que explica el mecanismo de acción de la unión de la ACh a los receptores M1/M3/M5 (Hill *et al.*, 2006).

El IP₃ y el DAG actúan como segundos mensajeros en la movilización de Ca⁺². El IP₃ se une a sus receptores en el retículo endoplásmico rugoso y como resultado los receptores se abren y permiten la salida de Ca⁺² (Arce *et al.*, 2006; Jiménez y Merchant, 2003). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC), la cual fosforila a diversas proteínas en la membrana plasmática (Arce *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2006). Este proceso tiene como resultado el aumento del Ca⁺² citoplasmático que activa a diversas enzimas lo que desencadena diversas respuestas fisiológicas, que dependen de las células a las cuales se une la ACh (Mendoza, 2008b; Salaices *et al.*, 2009).

La unión de la ACh a los receptores M2 /M4 activa la unión de la GTP a la subunidad α_i, y como resultado de su disociación se inhibe la actividad de la adenilato-ciclasa y por tanto la activación de la PKA (cinasa dependiente de AMPc). Las subunidades βγ se unen y activan a canales de K⁺, lo cual resulta en la hiperpolarización de la membrana plasmática (**figura 25**) (English y Jones, 2012; Mendoza, 2008a).

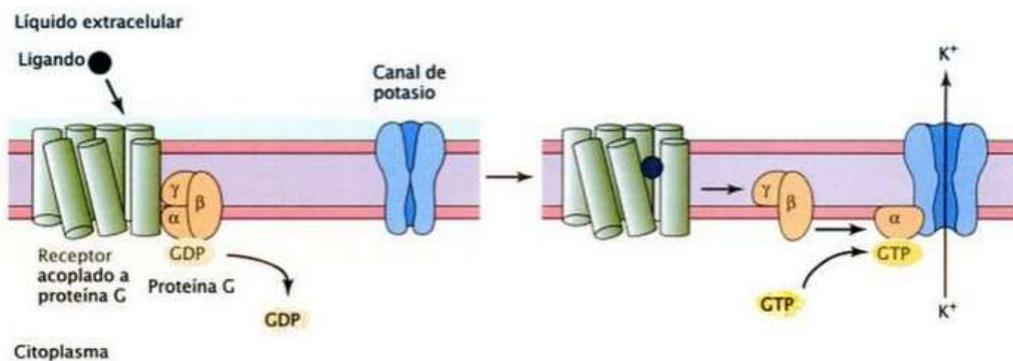


Figura 25. Mecanismo de acción de los receptores M4/M2 (tomado de(Hill *et al.*, 2006).

Los AChR M participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos, tanto en el SNC como en órganos inervados por el sistema nervioso parasimpático (**cuadro 2**) (Fernández, 2015).

Cuadro 2. Respuestas celulares a la unión de la ACh a los subtipos de mAChR (Abrams *et al.*, 2006; Aronstam y Patil, 2009; English y Jones, 2012; Goodman *et al.*, 2007; Haga, 2013; Kleinz y Spence, 2008; Langmead *et al.*, 2008; Lorenzo Fernández, 2015; Miller y Yeh, 2017).

mACh	Localización	Función	Agonistas	Antagonistas
<i>M1</i>	SNC: abundan en la corteza, hipocampo, cuerpo estriado, hipotálamo y cerebro medio Ganglios autonómicos Glándulas	Participan en mecanismos como el aprendizaje y la memoria Modulan la transmisión colinérgica. Disminución de la liberación de dopamina (DA) y mecanismos la locomoción Incremento de secreciones	ACh Carbacol Oxotremorina Cevimeline Xanomeline	Atropina Escopolamina Pirenzepina Telenzepina Toxinas del veneno de mamba
<i>M2</i>	Se expresa ampliamente en el SNC Corazón Músculo Terminaciones de nervios autonómicos	Modula la respuesta parasimpática del corazón y la liberación de neurotransmisores	ACh Carbacol Pilocarpina	Atropina Metocramina Galamina Himbacina
<i>M3</i>	SNC Músculo liso Glándulas exocrinas Corazón	Estimula la secreción de glándulas Inhibición de la liberación de DA Contracción muscular Síntesis de óxido nítrico Regulan la sudoración	ACh Carbacol Cevimeline, Pilocarpina	Atropina, 4-DAMP Solifenacina
<i>M4</i>	SNC: prosencéfalo	Inhibición de la liberación de neurotransmisores Estimula la liberación de DA Participan en mecanismos como la cognición	ACh Xanomeline	Atropina, Pirenzepina Tropicamida Himbacina
<i>M5</i>	Su expresión es restringida en SNC: hipotálamo, hipocampo y cerebro medio	Mediador de la dilatación de arterias y arteriolas Estimula la liberación de DA. Modula el tono vascular de los vasos sanguíneos del encéfalo.	ACh Sabcomeline	Atropina

LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS M2 (m₂AChR)

En el SNC, los m₂AChR se han mostrado en neuronas del hipocampo, la neocorteza (frontal, temporal, parietal y occipital), el tálamo, el cuerpo estriado, la médula espinal y el hipotálamo (Abrams *et al.*, 2006; Langmead *et al.*, 2008; Velayos, 2009, Lebois *et al.*, 2017).

En el hipocampo y la corteza cerebral del ratón, los m₂AChR son los principales autorreceptores muscarínicos inhibidores (Langmead *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2002). La estimulación de los m₂AChR localizados en la neurona presináptica disminuyen la liberación de ACh y en la postsináptica la de otros neurotransmisores (Miller y Yeh, 2017).

Los m₂AChR se localizan en las membranas de neuronas presinápticas colinérgicas y en neuronas no colinérgicas (Gregory *et al.*, 2007).

En el hipotálamo, los m₂AChR se localizan en AHA, el área hipotalámica dorsal (DHA), el núcleo dorsomedial (MDN), los núcleos mamilares, el núcleo hipotalámico posterior, los núcleos supra-mamilares, el núcleo supraóptico, el NSQ y el Núcleo Ventromedial (MVN) (Spencer *et al.*, 1986).

En el NSQ se expresan los cinco tipos de receptores muscarínicos, pero en el axón de las neuronas que forman este núcleo, solo se expresa en receptor m₂AChR (Hut y Van der Zee, 2011).

FÁRMACOS QUE BLOQUEAN O ESTIMULAN A LOS mAChR

Los fármacos colinérgicos, también llamados medicamentos colinomiméticos, son moléculas que tienen afinidad por el receptor de la ACh (Dowd, 2017). La potencia de estos fármacos depende de la capacidad que tienen para unirse a su receptor (afinidad) y su capacidad de producir cambios o modificaciones sobre el receptor (eficacia) (Repetto *et al.*, 2010). En particular, existen fármacos que estimulan (agonistas) o que bloquean (antagonistas) a los mAChR (Barahona y Olívos, 2015; Gómez, 2006; Montañez *et al.*, 2010).

Agonistas muscarínicos

Los agonistas de los mAChR se dividen en dos grupos: 1) ésteres de colina, que comprenden a la ACh y a otros ésteres sintéticos, y 2) los alcaloides colinomiméticos naturales (pilocarpina, muscarina) y sus derivados sintéticos (Goodman *et al.*, 2007).

✓ PILOCARPINA

Es un alcaloide ($C_{11}H_{16}N_2O_2$) (**figura 26**), extraído de arbustos tropicales pertenecientes al género *Pilocapus* (Goodman *et al.*, 2007). La pilocarpina fue aislada de esta planta en 1875 por el médico Coumtinghou (Shiroma y Costa, 2015). Se une a todos los mAChR, aunque con mayor afinidad a los m_3 AChR (Hancock, 2007). Es una amina terciaria, por lo que atraviesa la barrera hematoencefálica y se absorbe fácilmente tanto a nivel digestivo como parenteral (Hancock, 2007).

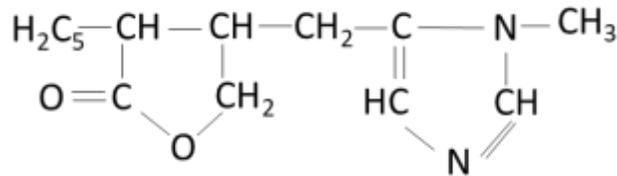


Figura 26. Fórmula química de la pilocarpina (Westfall y Westfall, 2011).

✓ MUSCARINA

Fue aislada por primera vez de la *Amanita muscaria* en 1968 por Oswald Schmiedeberg. Es un antagonista de los receptores muscarínicos y al ser una amina cuaternaria (**figura 27**), su absorción es menos eficiente en el tracto gastrointestinal que las aminas terciarias, y no cruza la barrera hematoencefálica (Hillier, 2007; Montañez *et al.*, 2010).

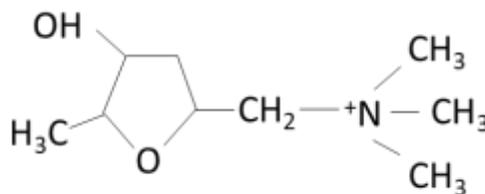


Figura 27. Formula química de la muscarina (Fisher y Wonnacott, 2012).

✓ CARBACOL

El carbacol, también conocido como carbamilcolina, actúa como agonista de los receptores colinérgicos (muscarínico y nicotínicos) (Shiroma y Costa, 2015). A diferencia de la ACh, el carbacol en soluciones acuosas es resistente a la hidrólisis producida por la colinesterasa, (Heller y Laiken, 2012). Es una amina cuaternaria (**figura 28**) que tiene carga positiva, por lo que no ingresa al SNC y es necesario inyectar el medicamento directamente en el tejido cerebral o en el líquido cefalorraquídeo (Hoover, 2016).

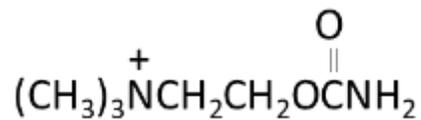


Figura 28. Fórmula química del carbacol (Westfall y Westfall, 2011).

Antagonistas muscarínicos

Los antagonistas muscarínicos son fármacos que bloquean competitivamente la unión de la acetilcolina con el mAChR (Rang *et al.*, 2016). Se clasifican según su origen en: alcaloides naturales (atropina y escopolamina), derivados semisintéticos (homatropina) y derivados sintéticos (pirenzepina, ipratropio) (Montañez *et al.*, 2010).

✓ ATROPINA

La atropina una amina terciaria de origen natural, extraída de la *Atropa belladonna* (Hillier, 2007). Es un antagonista competitivo de la ACh endógena, es decir, actúa de manera selectiva inhibiendo todos los mAChR como resultado de su alta afinidad (Barahona y Olívos, 2015).

Es un alcaloide natural con estructura de éster orgánico, el ácido trópico, y una base nitrogenada terciaria (la atropina) (**figura 29**) (Fernández, 2015). Su estructura no polar le permite atravesar la barrera hematoencefálica y la placentaria (Hillier, 2007; Mendoza, 2008). Este alcaloide tiene una semivida plasmática de dos horas y se elimina en su mayor parte por el riñón sin ser metabolizada (Barahona y Olívos, 2015).

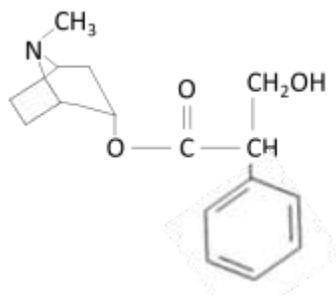


Figura 29. Fórmula química de la atropina (Fisher y Wonnacott, 2012).

✓ ESCOPOLAMINA

La escopolamina o L-hioscina, se obtiene por hidroxilación de la L-hiosciamina (López, 2017). Es un antagonista competitivo de la ACh y tiene la misma afinidad a todos los mAChR (Barahona y Olívos, 2015; Mendoza, 2008a). Es un alcaloide natural con estructura de éster orgánico, el ácido trópico, y una base nitrogenada terciaria; la escopolamina (**figura 30**) (Fernández, 2015).

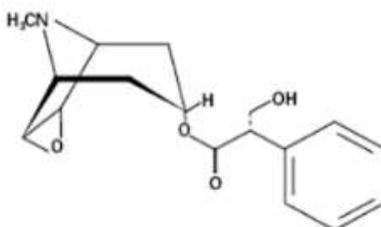


Figura 30. Fórmula química de la escopolamina (Fisher y Wonnacott, 2012).

Atraviesa la barrera hematoencefálica con más facilidad que la atropina y puede provocar alteraciones en el SNC, su semivida plasmática es de 2.5 horas y sus efectos dependen de la concentración en la que se encuentren en el organismo. Es metabolizada en el hígado y se elimina por el riñón (López, 2017).

Los derivados de la atropina de origen natural o sintético, presentan como principales inconvenientes su falta de selectividad, por lo que se buscan derivados que actúen de manera específica (Barahona y Olívos, 2015).

✓ METOCTRAMINA

La metoctramina (MTC) (**figura 31**) es un antagonista selectivo de los mAChR (Clarke, 2007), aunque tiene mayor afinidad a los m₂AChRs (pK₈ 7,7) (Fernández, 2015).

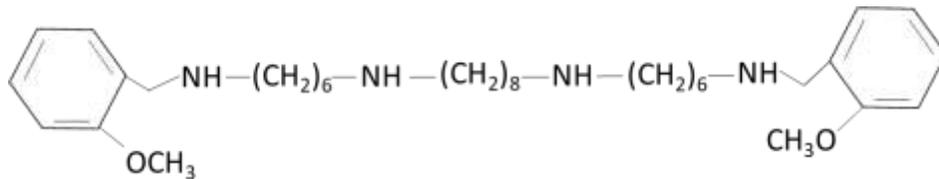


Figura 31. Fórmula química de la metoctramina (Fisher y Wonnacott, 2012).

✓ PIRENZEPINA (PZP)

Es un fármaco tricíclico (**Figura 32**), que tiene mayor afinidad a los m₁AChR (pK₈ 7,8-8,5) (Fernández, 2015; Goodman *et al.*, 2007).

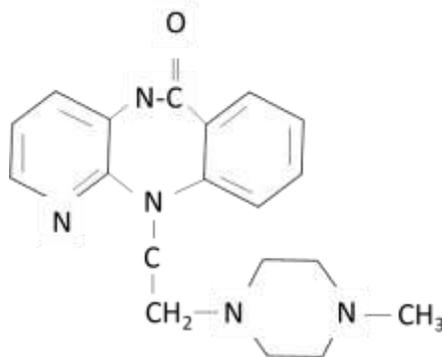


Figura 32. Fórmula química de la PZP (Fisher y Wonnacott, 2012).

Antagonistas Alostéricos

Debido a que los sitios de unión ortostéricos (sitio activo) de los cinco mAChR están altamente conservados, se ha desarrollado otro tipo de antagonistas selectivos que se unen a sitios alostéricos (**Figura 33**), que son más variables y que permiten conferir selectividad a un subtipo específico, lo que reducirá los efectos de los antagonistas muscarínicos.

Pertenece al grupo bencilisoquinolinio de relajantes musculares no despolarizantes y presenta propiedades vagolíticas y simpaticomiméticas (Defilló y Bernardo, 1984; Jewell, 2007).

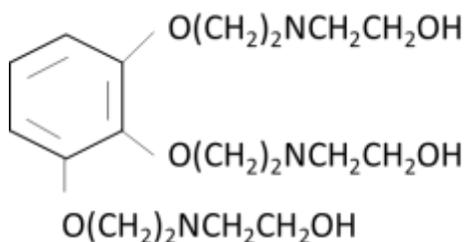


Figura 34. Fórmula química de la galamina (Gregory *et al.*, 2007).

Tiene efectos antimuscarínicos en muchos otros sitios y es utilizado para el estudio de los m_2AChR , actúa como bloqueador alostérico competitivo, aunque aún no está claro su mecanismo de acción (Richardson, 2012).

Los efectos de la galamina son rápidos (1-2 min) lo que dependen de la dosis, y su tiempo de acción es de 20 a 50 min (Jewell, 2007).

ANTECEDENTES

Participación del sistema muscarínico en el SNC y SNP sobre la regulación de la ovulación

Para el estudio de la participación del sistema muscarínico en la regulación de la ovulación se utilizan fármacos que bloquean o estimulan los receptores muscarínicos.

Everett y *col.* (1949, 1953), observaron que, en la rata adulta cíclica, el bloqueo del sistema colinérgico por la inyección subcutánea (s.c.) de sulfato de atropina entre las 13:00 y 15:00 h del día del proestro inhibe la ovulación (**Figura 35**).

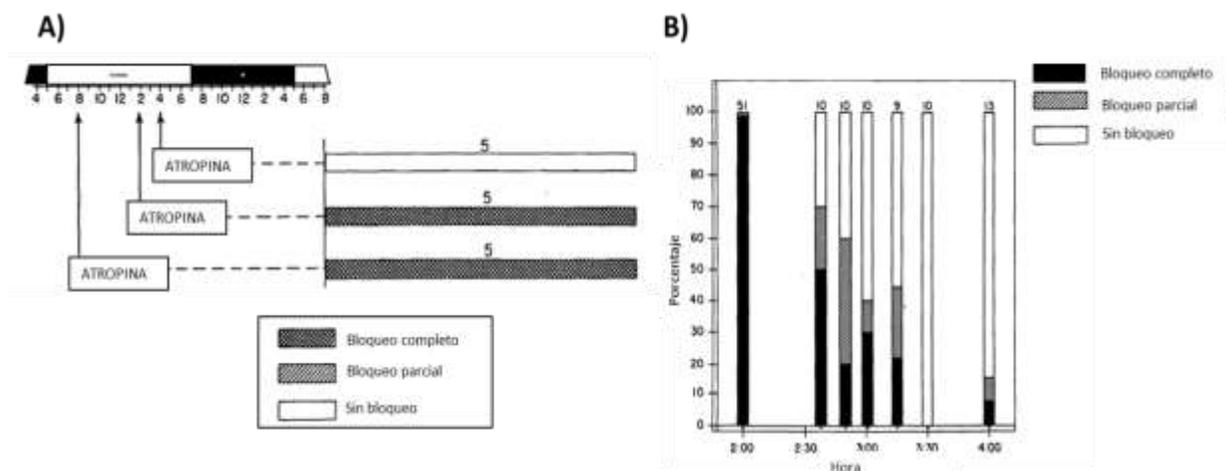


Figura 35. A) Representación gráfica del bloqueo de la ovulación después de la inyección de atropina a las 8:00, 14:00 o 16:00 horas del día de proestro en ratas cíclicas de 4 días (Everett *et al.*, 1949); **B)** Resultados de la inyección de atropina en diferentes horas (2:00 a 4:00 h) del proestro sobre la ovulación (Everett y Sawyer, 1953).

Estudios posteriores mostraron que los efectos del bloqueo del sistema colinérgico sobre la ovulación dependen del día del ciclo y de la hora en que se realizó el tratamiento, siendo el día del diestro-1 el más sensible del ciclo (**figura 36**) (Domínguez *et al.*, 1982; Zipitría *et al.*, 1980).

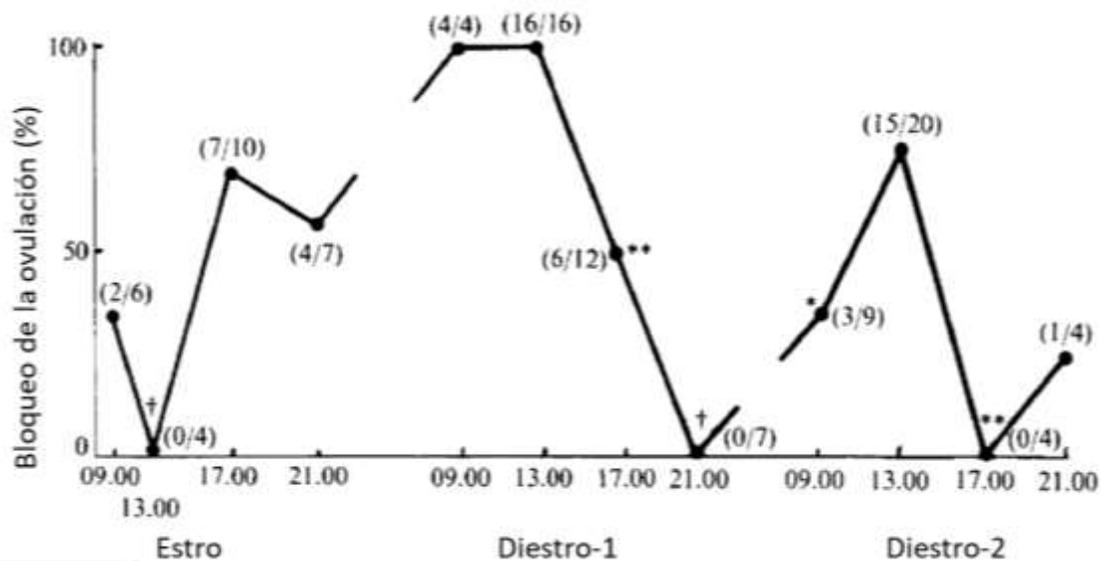


Figura 36. Porcentaje de bloqueo de la ovulación en ratas cíclicas de 4 días tratadas con 100 mg de atropina/kg de peso corporal en diversos momentos en los días de estró, diestro-1 y diestro-2. *p <0.05, ** p <0.01 en comparación con ratas tratadas a las 13:00 h del mismo día (prueba de ji cuadrada); † p <0.05 en comparación con ratas tratadas a las 17:00 h en el mismo día (probabilidad exacta de Fisher) (Domínguez *et al.*, 1982).

La inyección subcutánea de sulfato de atropina a las 12:00 h en diestro-1 o proestro resultó en la disminución de la concentración de estradiol (E₂) (**cuadro 3**). Con base en estos resultados, los autores sugieren que el sistema colinérgico a las 12:00 h participa en la regulación de la secreción de E₂, lo que depende de la etapa del ciclo estral (Cruz *et al.*, 2006).

Cuadro 3. Media ± E.E.M. de las concentraciones séricas de estradiol (pg/mL) en animales control o inyectados con la dosis efectiva de sulfato de atropina a las 12:00 h en diestro-1, diestro-2 o proestro y que fueron sacrificadas a las 14:00 h (Cruz *et al.*, 2006).

Grupo	N	Diestro-1	N	Diestro-2	N	Proestro
Control	17	55.3±8.0	20	61.7±4.9	12	158.4±10.8
Atropina	8	9.0±1.8*	8	67.5±2.7	7	51.7±9.8*

* p ≤ 0.005 vs. Grupo sin atropina (prueba t de Student).

Flores *et al* (2005, 2006), mostraron que la inyección subcutánea de sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-2 o proestro resultó en el aumento de las concentraciones séricas de progesterona (P₄) (**cuadro 4**), mientras que este mismo tratamiento en diestro-1 resultó en la disminución de las concentraciones de testosterona (T) (**cuadro 5**). Con base en estos resultados los autores sugieren que el sistema colinérgico participa de manera diferencial en la regulación de la secreción de T y P₄, lo cual depende de la etapa del ciclo estral que se estudia.

Cuadro 4. Media ± E.E.M. de las concentraciones séricas de progesterona (pg/mL) en animales control o inyectados con la dosis efectiva de sulfato de atropina a las 12:00 h en los días del diestro o proestro y que fueron sacrificadas a las 14:00 h (Flores *et al.*, 2005).

Grupo	N	Diestro-1	N	Diestro-2	N	Proestro
Control	18	21.8±1.1	20	8.9±1.1	15	8.1±1.1
Atropina	89	26.2±2.2	8	14.8±2.9	8	22.0±3.2*

* p ≤ 0.005 vs. Grupo sin atropina (prueba de t Student).

Cuadro 5. Media ± E.E.M. de las concentraciones séricas de testosterona (pg/mL) en animales control o inyectados con la dosis efectiva de sulfato de atropina a las 12:00 h en los días del diestro o proestro y que fueron sacrificadas a las 14:00 h (Flores *et al.*, 2006).

Grupo	N	Diestro-1	N	Diestro-2	N	Proestro
Control	7	6.3±2.7	11	35.6±6.9	13	52.3±10.2
Atropina	8	40.8±6.4*	8	20.3±3.4	8	89.4±16.0

* p ≤ 0.005 vs. Grupo sin atropina (prueba de t Student).

En ratas hembras cíclicas, la inyección subcutánea de la dosis efectiva de sulfato de atropina a las 13:00 h en todas las etapas del ciclo estral resultó en el bloqueo de la secreción de LH, sin modificar la secreción de FSH. El mismo tratamiento en estro o diestro-1 resultó en disminución de la secreción preovulatoria de E₂. A partir de estos resultados, los autores sugieren que la unión de la ACh con sus receptores regula de manera estimulante la secreción preovulatoria de LH y la de E₂ lo cual depende de la etapa del ciclo estral (Cruz *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2010).

La inyección de la dosis efectiva (la concentración mínima que produce un efecto determinado) de sulfato de atropina a las 13:00 h en la etapa de diestro-1 resultó en alteraciones en la secreción de 17 β -estradiol y el bloqueo de la liberación preovulatoria de la LH (**figura 37**) (Cruz *et al.*, 2001).

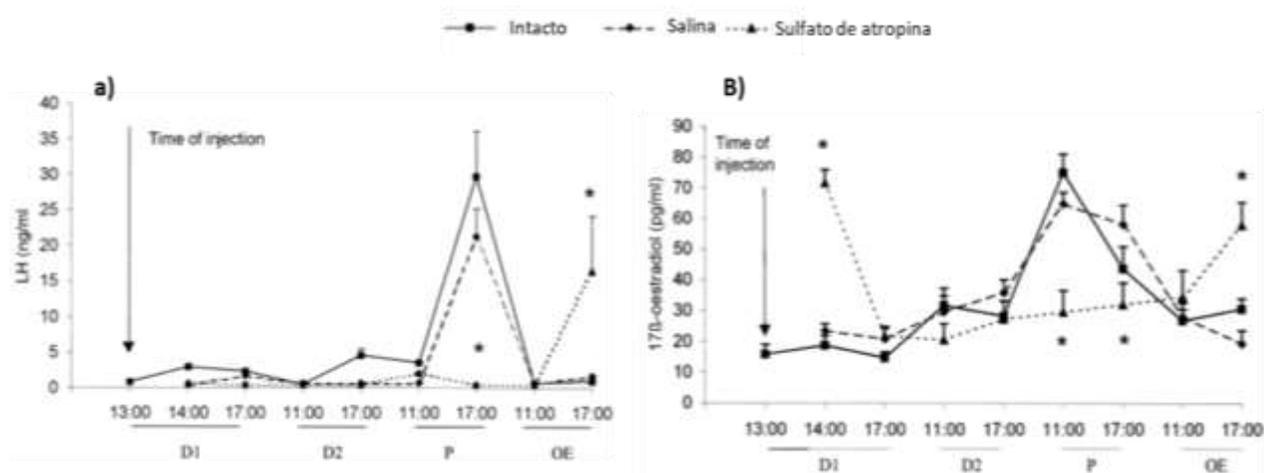


Figura 37. Concentraciones séricas de LH (A), 17 β -estradiol (B) de animales testigo e inyectados con la dosis efectiva de sulfato de atropina o solución salina en los diferentes días del ciclo estral y que fueron sacrificadas a las 13:00 h del proestro (Cruz *et al.*, 2001).

Participación del sistema muscarínico ovárico en la regulación de la ovulación

En la etapa de Proestro, la inyección de PZP en el ovario izquierdo a las 13:00 h, resultó en el bloqueo de la ovulación por ambos ovarios y la disminución en la concentración de LH, sin modificar las contracciones de P y E₂, mientras que el mismo tratamiento en el ovario derecho no modificó las funciones ováricas. Con base en estos resultados, los autores sugieren que en el proestro la estimulación de los receptores m₁AChR en los ovarios regula ovulación (Cruz *et al.*, 2015)

En ratas que no ovulan, resultado del bloqueo de los m₁AChR del ovario izquierdo en la etapa del proestro, la inyección de LHRH sintética indujo la ovulación, lo que sugiere que la activación de los m₁AChR en el ovario izquierdo resulta en la generación de la señal neuronal necesaria para la activación del pico de LHRH (Cruz *et al.*, 2015).

En la etapa de proestro, la inyección de la MTC en el ovario izquierdo resultó en un menor número de ovocitos liberados por el ovario tratado. Con base en estos resultados, se sugiere que en el proestro la activación de los m₂AChR del ovario izquierdo es indispensable para que se lleve a cabo la ovulación (Cruz *et al.*, 2019).

En la etapa de diestro-2, la inyección de PZP en el ovario izquierdo a las 13:00 h, resultó en el incremento de las concentraciones de P₄, E₂, 22 horas más tarde, mientras que el mismo tratamiento en el ovario derecho resultó en la disminución de la concentración de E₂. Los autores sugieren que en el diestro-2 la estimulación de los receptores m₁AChR en los ovarios regula la secreción de P₄ y E₂ (Cruz *et al.*, 2014).

Cruz *et al.*, en 2013, mostraron que el bloqueo de la ovulación por la inyección unilateral de MTC o PZP a las 13:00 h del diestro-2 en los ovarios, puede ser restaurado en el 85% de los animales por la inyección de LH-RH sintética. Con base en estos resultados los autores sugieren que en diestro-2 la activación de los

receptores m_1 AChR y m_2 AChR de los ovarios regula la secreción de la GnRH en el proestro, lo cual es necesaria para la ovulación.

Participación del sistema muscarínico de POA-AHA sobre la ovulación

El implante unilateral de cristales de atropina a las 13:00 h en el área preóptica e hipotalámica-anterior (POA-AHA) de ratas cíclicas en la etapa de diestro-1 resultó en el bloqueo de la ovulación. El mismo tratamiento realizado en diestro-2 impidió la ovulación solo cuando el implante se realizó en el lado izquierdo de POA-AHA. En la etapa de estro, el implante de atropina en POA-AHA derecha resultó en el bloqueo de la ovulación, mientras que del lado izquierdo no modificó la ovulación (**cuadro 6**). Con base en estos resultados, los autores sugieren que el sistema colinérgico participa de manera asimétrica en la regulación de la ovulación, lo que depende de la etapa del ciclo estral (Cruz *et al.*, 1989).

Cuadro 6. Tasa de animales ovulantes de animales con útero distendido de animales con implantes de atropina en POA-AHA izquierda o derecha a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral (a partir de los resultados de Cruz *et al.*, 1989).

Grupos	Lado	estro	diestro-1	diestro-2	proestro	Tasa de ovulación de todas las etapas
Control	Derecha		7/10			16/23
	Izquierda		9/13			
Atropina	Derecha	0/8	2/10*	5/7	7/7	13/32*
	Izquierda	8/8	1/9*	0/4 †	6/7	15/28

* $p < 0.05$ vs. el grupo control.

† $p < 0.01$ comparado con atropina a la derecha (prueba de chi-cuadrada).

Cruz y col., en 1992, mostraron que aquellos animales con implante de cristales de atropina a las 13:00 h del diestro-1 en POA-AHA izquierda, la inyección con benzoato de estradiol (BE) o gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) resultó en la inducción de la ovulación, mientras que en los animales con implante en POA-AHA

derecha estos tratamientos fueron ineficaces (**cuadro 7**). Con base en estos resultados los autores sugieren que el sistema colinérgico de POA-AHA participa de forma lateralizada sobre los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación, lo que varía a lo largo del ciclo estral de la rata.

Cuadro 7. Tasa de ovulación y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por ratas con implante unilateral de atropina en el POA-AHA (izquierda o derecha) realizada en diestro-1 y tratadas con PMSG a las 14:00 h del mismo día, o gonadotropina coriónica humana (hCG) o benzoato de estradiol (BE) a las 14:00 h en el día diestro-2. Sacrificadas en el día del estro esperado (Cruz *et al.*, 1992).

Grupos	Tasa de ovulación		Número de ovocitos liberados	
	POA-AHA derecha	POA-AHA izquierda	POA-AHA derecha	POA-AHA izquierda
Intacto	21/28		9.6 \pm 0.6	
Atropina	5/46*		7.4 \pm 2.2	
Atropina+hCG en D-2	2/15*		6,5	
Atropina+PMSG	0/3*	4/4†	-	10.5 \pm 1.5
Atropina+OB	0/8*	7/9 †	-	12.1 \pm 1.0

* $p < 0.05$ vs. el grupo control (prueba de chi-cuadrada); † $p < 0.05$ frente a la implantación del lado derecho (prueba de probabilidad exacta de Fisher). Las ratas tratadas con hCG en diestro-2 tenían un implante de atropina en el lado izquierdo (siete) o derecho (ocho) del hipotálamo.

El implante unilateral de pilocarpina en POA-AHA izquierda a las 13:00 h del estro, resultó en el bloqueo de la ovulación. En el proestro y diestro-1 se obtuvo el mismo resultado cuando se realizó el implante del lado derecho (**cuadro 8**). Con base en estos resultados los autores sugieren que la participación del sistema colinérgico sobre la regulación de la ovulación, es lateralizada y varía en función de la a etapa del ciclo estral (López *et al.*, 1997).

Cuadro 8. Frecuencia relativa de animales que ovularon con implante unilateral de colesterol o pilocarpina en POA-AHA izquierda o derecha a las 13:00 h en cada etapa del ciclo estral (López *et al.*, 1997).

Grupos	Lado	proestro	estro	diestro-1	diestro-2
Colesterol	Izquierda	6/6	5/5	5/5	4/5
	Derecha	5/5	5/5	5/5	4/5
Pilocarpina	Izquierda	10/12 ^b	0/5 ^{ab}	4/10 ^a	5/10
	Derecha	1/6 ^a	4/4	0/8 ^a	3/8

^a $p < 0.05$ vs. el grupo con implante de colesterol (probabilidad exacta de Fisher).

[†] $p < 0.01$ vs. el implante del lado derecho (probabilidad exacta de Fisher).

Estudios publicados por Cruz y col., en 2014, muestran que el bloqueo de la ovulación por implantes de atropina unilateral en PAO-AHA 13:00 h en diestro-1 o diestro-2 resulta en un menor número de folículos preovulatorios. Con base en estos resultados los autores sugirieron que el sistema colinérgico de POA-AHA participa de manera asimétrica en la regulación del crecimiento folicular.

La microinyección unilateral de una solución de atropina a las 13:00 h de diestro-2 en el POA-AHA derecha resultó en el aumento de las concentraciones de P₄, E₂ y T, sin modificar la ovulación. Sin embargo, este mismo tratamiento en el POA-AHA izquierda resultó en el bloqueo de la liberación preovulatoria de LH y de la ovulación. A partir de estos resultados el autor sugiere que en el día del diestro-2 el sistema colinérgico participa de manera asimétrica en los mecanismos que regulan la ovulación (García *et al.*, 2005; García, 2007).

La microinyección de atropina a las 13:00 h de diestro-2 en POA-AHA izquierda resultó en la disminución de la ovulación (**cuadro 9**), estos efectos fueron revertidos al 100% por la inyección de LHRH sintética o BE. Con base en estos resultados los autores confirmaron que a las 13:00 h en diestro-2 se requiere de la activación de los mAChR para que se lleve a cabo la ovulación y que la estimulación de estos receptores es indispensable en los mecanismos neuroendocrinos que participan en la retroalimentación estimulante de estrógenos (Espinoza-Valdez *et al.*, 2016).

Cuadro 9. Tasa de animales ovulantes, media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por ratas con implante unilateral de atropina en POA-AHA izquierda o derecha a las 13:00 h del diestro-2, y sacrificados en el estro previsto (Espinoza-Valdez *et al.*, 2016).

Grupo	Lado de POA-AHA	n	Tasa animales ovulantes	Ovocitos liberados	
				Ovario izquierdo	Ovario derecho
Intacto	-	10	10/10	7.1 \pm 0.5	5.4 \pm 0.3
Vehículo	Izquierda	9	9/9	6.1 \pm 0.9	4.2 \pm 1.0
	Derecha	9	9/9	6.5 \pm 0.2	4.8 \pm 0.3
Atropina	Izquierda	10	2/10 ^a	4,0**	3,3
	Derecha	10	10/10	3.1 \pm 0.3 ^b	1.7 \pm 0.2 ^b

^a $p \leq 0.005$ vs. vehículo izquierdo (prueba de probabilidad exacta de Fisher).

^b $p \leq 0.005$ vs. vehículo derecho (prueba de Kruskal Wallis, seguida de la prueba de Dunn).

** Representa el número de huevos arrojados por dos ratas ovulantes.

La microinyección de atropina a las 13:00 h en POA-AHA derecha en la etapa del estro resultó en la disminución de la concentración de E₂ y del porcentaje de animales ovulantes. Con base en estos resultados, el autor propone que a las 13:00 h del estro los mAChR del POA-AHA derecha son indispensables para los mecanismos neuroendocrinos que regulan las funciones ováricas (Santana, 2016).

Según González (2017), a las 11:00 h del proestro, el sistema colinérgico presente en POA-AHA derecho participa de manera estimulante en la regulación de la liberación de GnRH y, por ende, de la ovulación espontánea.

La microinyección de PZP en POA-AHA de 12:30 a 13:30 h en diestro-1 resultó en el aumento del porcentaje de animales ovulantes, mientras que en proestro inhibió la ovulación. Con base en estos resultados el autor sugiere que los m₁AChR del POA-AHA participan en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación de manera diferente a lo largo del ciclo estral (López, 2012).

López-Ramírez *et al.* (2017), mostraron que el bloqueo unilateral de los m₁AChR con PZP a las 13:00 h en POA-AHA en estro resultó en un menor porcentaje de animales que ovularon, independientemente del lado de la microinyección, mientras que en diestro-1 se obtuvo el efecto contrario, es decir, que el tratamiento resultó en

el aumento del número de animales ovulantes (**figura 38**). Con base en estos resultados los autores sugieren que en la etapa de estro se requiere de la activación de los m_1 AChR en POA-AHA izquierda y derecha para que se estimule la ovulación.

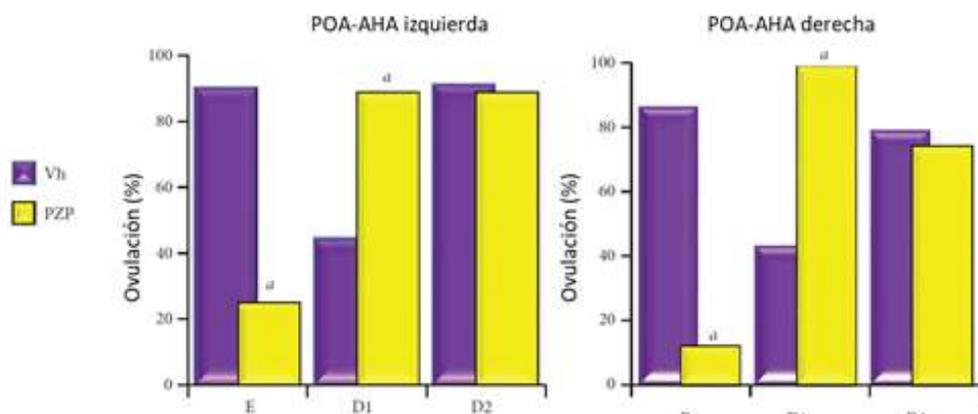


Figura 38. Porcentaje de ovulación de animales con microinyección de solución salina o PZP en POA-AHA izquierda o derecha a las 13:00 h a lo largo del ciclo estral.

^a $p < 0.05$ vs. con su respectivo grupo Vh (prueba de χ^2) (López-Ramírez *et al.*, 2017).

A las 13.00 h del diestro-2, el bloqueo unilateral de los m_2 AChR de POA-AHA por la microinyección de MTC disminuyó el porcentaje de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados (**figura 39**). Con base en estos resultados se sugirió que la unión de la ACh a los m_2 AChR presentes en POA-AHA participan de manera estimulante en la regulación de la ovulación espontánea y no tienen efectos asimétricos (López-Ramírez *et al.*, 2017).

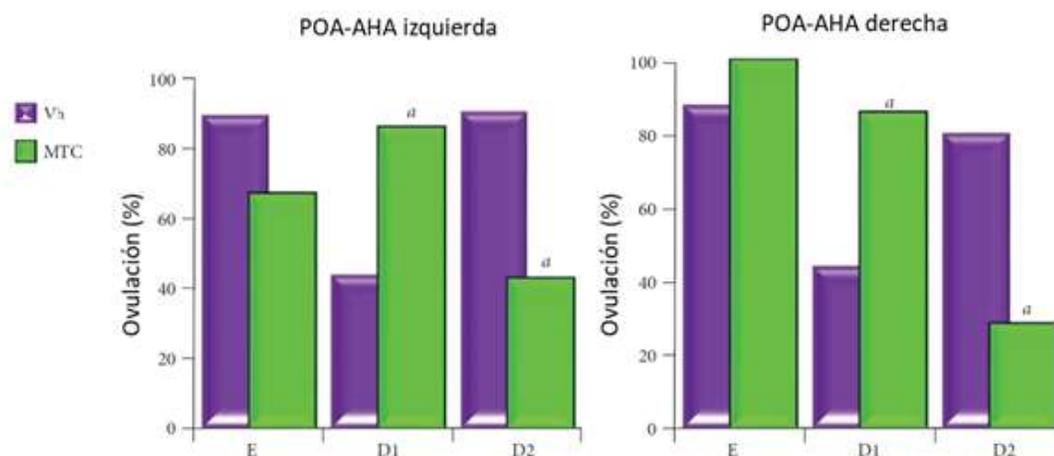


Figura 39. Porcentaje de ovulación de animales con microinyección de solución salina o MTC en POA-AHA izquierda o derecha a las 13:00 h a lo largo del ciclo estral.

^a $p < 0.05$ vs. con su respectivo grupo Vh (prueba de χ^2) (López-Ramírez *et al.*, 2017).

Participación del sistema muscarínico del núcleo supraquiasmático en la regulación de la ovulación

La microinyección bilateral de atropina a las 9:00 o 19:00 h del diestro-1 en los NSQ no modificó la ovulación, mientras que a las 9:00 h del proestro resultó en el bloqueo de la ovulación (**cuadro 10**). Los autores concluyen que la información colinérgica que llega a ambos lados del NSQ es necesaria para la secreción preovulatoria de LH para inducir la ovulación (Vieyra *et al.*, 2016).

Cuadro 10. Tasas de animales ovulantes y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por animales con microinyecciones de sol. Salina (vehículo) o de atropina en el NSQ-I o el NSQ-D a las 09:00 o 19:00 h durante diestro-1 o proestro (Vieyra *et al.*, 2016).

Grupos	n	Tasa de ovulación	Número de ovocitos	n	Tasa de ovulación	Número de ovocitos
9:00 h del diestro-1			19:00 h del diestro-1			
Vh NSQ-I	8	8/8	10.4 \pm 2.1	10	10/10	10.1 \pm 1.2
ATR NSQ-I	10	10/10	11.5 \pm 1.2	10	10/10	8.8 \pm 1.1
Vh NSQ-D	10	10/10	8.5 \pm 1.0	8	7/8	10.0 \pm 1.9
ATR NSQ-I	10	9/10	9.5 \pm 1.1	8	8/8	8.3 \pm 1.3
9:00 h del proestro			19:00 h del proestro			
Vh NSQ-I	10	10/10	8.5 \pm 1.0	8	7/8	10.0 \pm 1.9
ATR NSQ-I	14	8/14*	9.8 \pm 1.2	8	8/8	11.5 \pm 1.4
Vh NSQ-D	10	9/10	11.4 \pm 1.6	8	8/8	8.3 \pm 1.3
ATR NSQ-I	9	1/9 ^{**,**}	3 [*]	8	8/8	11.6 \pm 0.8

*p < 0,02 vs. el grupo respectivo tratado con Vh en el NSQ-I (prueba de probabilidad exacta de Fisher).

** p < p 0,001 vs. el grupo respectivo tratado con Vh en el NSQ-D (prueba de probabilidad exacta de Fisher)

*** p < 0.04 vs. ATR L-SCN (prueba de probabilidad exacta de Fisher)

Asimismo se mostró que el sistema colinérgico en el NSQ regula la secreción de hormonas esteroides (P₄ y E₂), lo cual varía en función de día del ciclo estral, la hora y del NSQ (Vieyra *et al.*, 2016).

Salinas *et al.* en 2016, mostraron que el bloqueo unilateral del sistema colinérgico del NSQ, por la microinyección de carbacol a las 9:00 h en el día del proestro, resultó

en la inhibición de la ovulación y la alteración en la secreción de las hormonas esteroides, por lo que los autores sugieren que dicho sistema es esencial para el mantenimiento de las funciones ováricas (Salinas *et al.*, 2016).

Vieyra *et al.* (2015), mostraron que la expresión de los m₁AChR en el NSQ cambia a lo largo del día, ya que a las 11:00 h a lo largo del ciclo estral se observan un mayor número de células que expresan m₁AChR en el NSQ izquierdo o derecho que a las 17:00 h.

La microinyección unilateral de PZP a las 9:00 h en proestro o diestro-1 resultó en el aumento del número de ovocitos liberados, mientras que en la etapa de diestro-2 lo disminuyó, lo cual sugiere a los autores que los m₁AChR participan de manera diferencial en el proceso ovulatorio (Javier *et al.*, 2018, 2016).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las neuronas GnRHérgicas reciben información proveniente del NSQ, que participa en la regulación de la liberación de la LH y FSH, las cuales regulan las funciones ováricas. El NSQ recibe fibras nerviosas de origen colinérgico las cuales liberan ACh la que participa en la regulación la actividad del NSQ.

La participación del sistema colinérgico del NSQ en la regulación secreción de GnRH y en consecuencia de las gonadotropinas, la ovulación y secreción de hormonas esteroides, es asimétrica y varía en función de la hora y la etapa del ciclo estral. Además, se ha mostrado que el m_2 AChR se encuentra presente en el NSQ y regula la liberación de neurotransmisores. El analizar la participación de los m_2 AChR del NSQ nos ayudará a aumentar nuestro conocimiento sobre los mecanismos que participan en la regulación de la ovulación y la secreción de hormonas esteroides ováricas.

JUSTIFICACIÓN

La ovulación, definida como la liberación de uno o varios ovocitos del(los) ovario(s) en condiciones de ser fecundado(s), es regulada por señales provenientes del hipotálamo, la hipófisis, el propio ovario, las glándulas adrenales, la tiroides y la inervación del ovario.

En el POA-AHA se localizan los somas de las neuronas que sintetizan la GnRH. Esta área recibe información de tipo colinérgica, y diversos estudios han mostrado que el sistema colinérgico que llega a POA-AHA participa de manera asimétrica en la regulación de las funciones ováricas, la cual varía en función de la etapa del ciclo estral y de la hora del día.

A su vez, el POA-AHA envía y recibe proyecciones del NSQ, las cuales participan en la regulación de la secreción de la GnRH y por ende de la ovulación. El NSQ recibe información colinérgica, y se ha mostrado que expresa los 5 tipos de mAChR (M₁, M₂, M₃, M₄ y M₅). Diversos estudios muestran que el sistema colinérgico del NSQ regula la ovulación y la secreción de hormonas esteroides ováricas y que su participación varía en función de la etapa del ciclo estral. Sin embargo, no se ha esclarecido qué tipo de mAChR participa en dicha regulación, ya que la atropina (un bloqueador colinérgico) se une a todos los mAChRs (M₁-M₅).

Los m₂AChR tienen gran importancia funcional, ya que actúan como autorreceptores en el SNC y SNP, donde su estimulación modula la liberación de ACh. Por ello, en este estudio se analizará la participación de m₂AChR del NSQ izquierdo o derecho, sobre la regulación de la ovulación, por medio del uso de un bloqueador alostérico selectivo a los m₂AChR.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo es la participación de los m_2AChR del NSQ a lo largo del ciclo estral en la regulación de la ovulación?

HIPÓTESIS

El bloqueo unilateral de los m_2AChR en el NSQ resultará en alteraciones en la regulación de la ovulación, lo cual dependerá del NSQ tratado y de la etapa del ciclo estral en que se realice el bloqueo.

OBJETIVOS

❖ General

Analizar la participación de los m_2AChR del NSQ sobre la ovulación a lo largo del ciclo estral, por medio del uso de un bloqueador alostérico selectivo a los m_2AChR .

➤ Particulares

- 1) Analizar la participación de los m_2AChR del NSQ-D por la mañana en cada día del ciclo estral sobre la ovulación, el peso de los ovarios y el útero.
- 2) Analizar la participación de los m_2AChR del NSQ-I por la mañana en cada día del ciclo estral sobre la ovulación, el peso de los ovarios y el útero.
- 3) Estudiar los posibles mecanismos neuroendocrinos involucrados en la falta de secreción de las gonadotropinas, en aquellos animales que no ovulen como resultado del bloqueo de los m_2AChR del NSQ.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas, de tres meses de edad, de la cepa CIIZ-V con una masa corporal entre 230-250 g, mantenidas en condiciones controladas de iluminación con 14 h de luz y 10 h oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), temperatura constante (22 ± 2 °C) con libre acceso al agua y al alimento (Purina lab chow 5001).

Los animales fueron manejados siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-199) que especifica el cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Los animales se marcaron cuatro días antes de cumplir los 3 meses de edad. Con el fin de monitorear su ciclo estral se les realizó la toma diaria de frotis del epitelio vaginal, y sólo se utilizaron aquellos que presentaron al menos dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro.

IMPLANTACIÓN DE LA CÁNULA DIRECTRIZ

Al cumplir los tres meses de edad en el día del diestro-2, las hembras fueron anestesiadas con una inyección vía intraperitoneal (i.p.) de Ketamina/Xilacina (40 mg/Kg y 5 mg/Kg respectivamente), cuya dosis (0.25 mL por cada 250 g) se usó con base en el protocolo establecido por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Cornell.

Trascurridos cinco minutos después de la inyección del fármaco, se corroboró el grado de sensibilidad de los animales. Cuando se alcanzó el plano anestésico quirúrgico adecuado, los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico para animales pequeños, (David Kopf Instruments, Tujunga, CA., modelo 900), donde se les implantó una cánula directriz unilateral dirigida hacia el NSQ, siguiendo la metodología previamente establecida (**figura 40**) (Weick *et al.*, 1971).

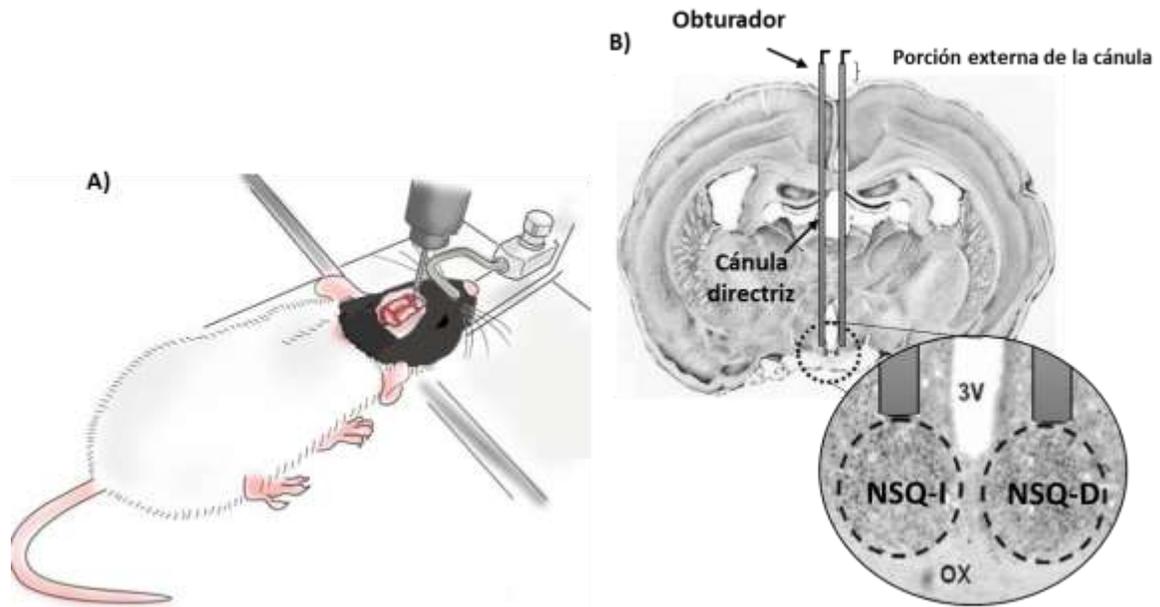


Figura 40. **A)** Representación esquemática de la colocación de un animal en el aparato estereotáxico y de la colocación de la cánula directriz por encima de ambos NSQ, **B)** utilizando coordenadas de Paxinos y Watson (modificada de Guadarrama-Ortiz *et al.*, 2014).

Para ello, a los animales se les rasuró el cuero cabelludo de la región dorsal de la cabeza con una rasuradora eléctrica. La piel de dicha región se limpió con yodopovidona jabonosa, yodopovidona jabonosa neutra y alcohol 70%. Se realizó una incisión de la piel y el músculo con un bisturí esterilizado por calor con ayuda de un esterilizador de perlas (Keller, Simon Keller AG.). Con base en las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson, (2007) (bregma= 0), con ayuda de una fresa odontológica, se realizó una perforación en el cráneo del animal (NSQ izquierdo (NSQ-I): Antero-Posterior (A-P)= -0.3, Medio-Lateral (M-L)=+0.3, Dorso-Ventral (D-V)=-8.9; NSQ derecho (NSQ-D): A-P=-0.3, M-L=-0.5, D-V=-8.9) e inmediatamente se insertó la cánula directriz de acero inoxidable (30Gx mm) ubicada justo por encima del NSQ correspondiente (**figura 41**).

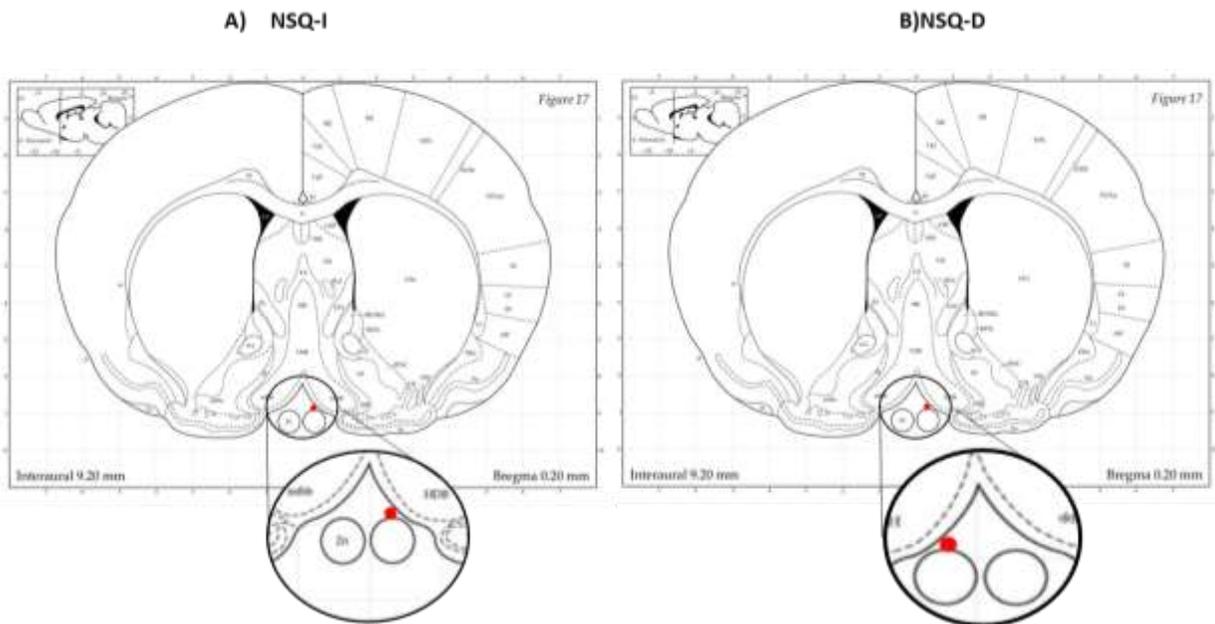


Figura 41. Diagrama representativo de cortes sagitales de cerebro que muestran la localización del NSQ-I (A) o del NSQ-D (B). El punto rojo indica el sitio donde llegó la cánula directriz (Paxinos y Watson, 2007).

Las cánulas directrices fueron fijadas permanentemente al cráneo usando acrílico dental (Nic Tone, mdc dental) anclado a cuatro tornillos de acero inoxidable sujetos al cráneo. Para evitar el bloqueo de las cánulas directrices se insertaron obturadores (27Gx13mm) que se extendieron 1 mm más allá de las cánulas, y permanecieron allí en todo momento, excepto durante las microinyecciones.

Todos los animales recibieron una inyección s.c. pre y post operatoria de 2 mg/Kg de meloxicam (antibiótico; Melodex, Aranda) y 5 mg/kg de enrofloxacin (Enroxil; Senosian). Se les aplicó una inyección i.p. de 0.1 ml de solución salina fisiológica estéril y tibia, para reemplazar la pérdida de líquidos. Para evitar la desecación de la superficie ocular, se aplicaron en cada ojo lagrimas artificiales de Hipermelosa al 5% (Sophia Labs, México).

Posterior a la operación se colocaron en un cojín térmico en jaulas individuales y fueron monitoreados hasta que se recuperaron de la anestesia y fueron capaces de moverse alrededor de la jaula.

MICROINYECCIÓN

Una vez finalizado el tratamiento postoperatorio, se continuó con la toma diaria de frotis vaginales, con el fin de conocer si la cirugía ocasionaba alguna alteración en su patrón de ciclicidad, y sólo se utilizaron animales que presentaron tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración.

Los grupos experimentales estuvieron conformados por 6-9 animales cada uno de ellos. A las 7:00 h, de cada una de las etapas de ciclo estral se les realizó una única microinyección en el NSQ-I o NSQ-D con:

- 1) 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ de vehículo (Vh) (Solución salina; NaCl al 0.9%, PiSA).
- 2) 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ de triyoduro de galamina (Sigma-Aldrich) disuelta en solución salina, con una concentración de 25 nmoL (Hayes *et al.*, 2008).

Para realizar la microinyección, se retiraron los obturadores de la cánula y se insertó una aguja de microinyección, que se conectó a una jeringa Hamilton de 20 μL , la que se colocó en una bomba de microinyección (KD Scientific Legato 100 series) con un tubo de Teflón (0.65 mm OD 9, 0.12 mm OI).

La administración de los tratamientos fue realizada a una la velocidad de 0.1 μL por minuto y se esperó un periodo de difusión posterior a la inyección de 1 min. Por último, se retiraron los microinyectores de la cánula y fueron remplazados con los obturadores.

En la figura 42 se muestra el esquema de tratamiento utilizado.

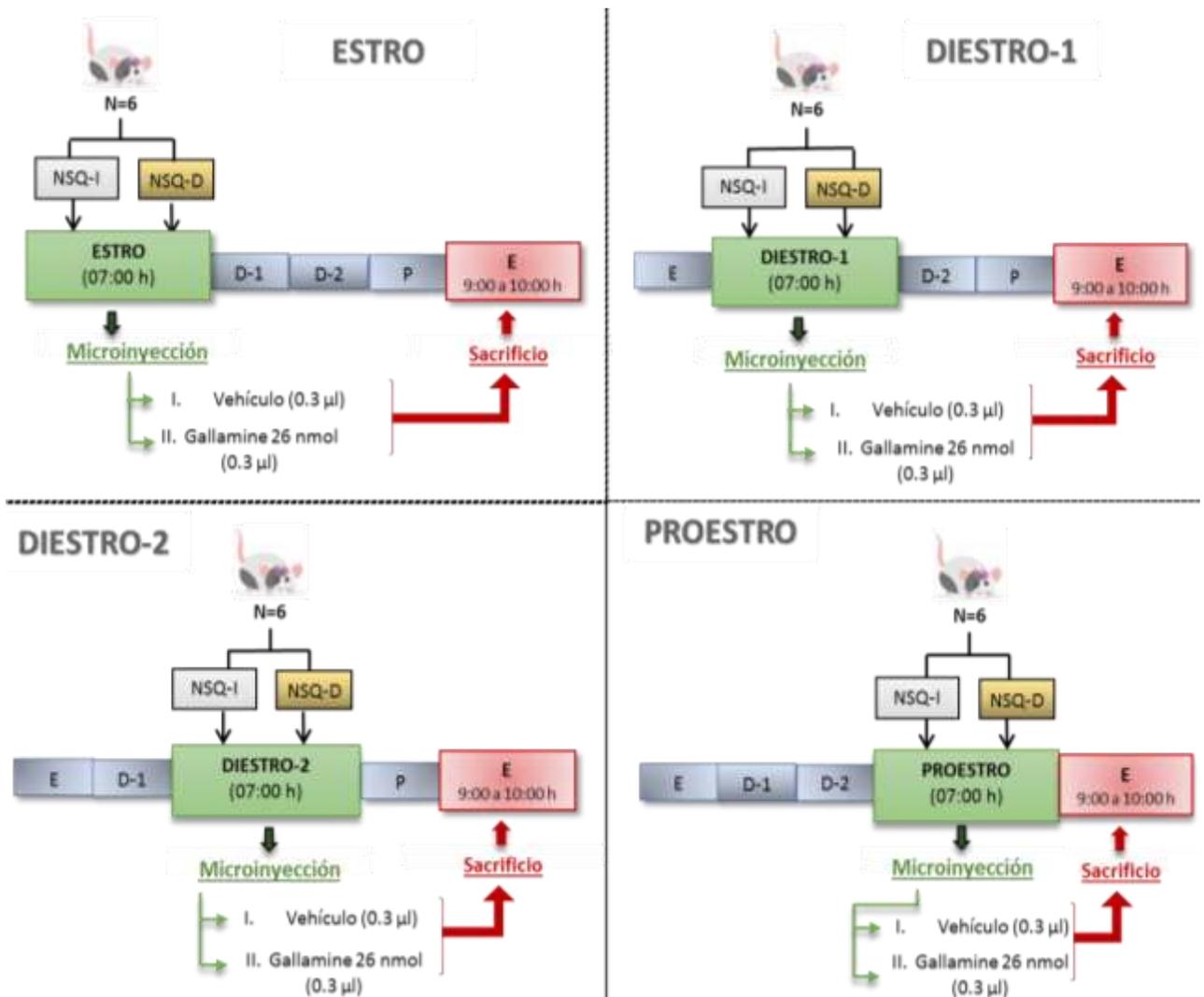


Figura 42. Diagrama representativo que muestra el tratamiento de los animales con microinyección unilateral en el NSQ a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y su posterior sacrificio en el día del estro esperado.

REPLAZO HORMONAL

El replazo hormonal se realizó en aquellos animales que no ovulen como resultado del bloqueo de los m_2 AChR del NSQ.

Replazo de la señal hipotalámica: Animales previamente microinyectados con galamina en el día y lado que impidió la ovulación, a las 14:00 h del día del proestro

esperado fueron inyectados con 3.7 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de LHRH sintética (Sigma Aldrich Co., USA) por vía subcutánea (s.c.) (Humphrey *et al.*, 1973).

SACRIFICIO

Después de realizar los tratamientos, los animales fueron retornados a sus jaulas. El día del estro predicho, los animales fueron pesados y sacrificados por sobredosis con pentobarbital sódico (6.3g/100mL; Pisabental, PiSA Agropecuaria S.A. de C.V. México) vía i.p. de 9:00 a 10:00 h. Siguiendo el protocolo establecido en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la FES Zaragoza, se disecaron los ovarios, las adrenales y el útero, y se pesaron en una balanza analítica con una precisión de 0.0001 g. Las masas de los órganos fueron expresadas en miligramos por cada 100 g de masa corporal (mg/100 g M.C.).

En los oviductos de los ovarios, se verificó la presencia de ovocitos, los que se contaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Stemi DV4, ZEISS). Esto fue corroborado mediante la tinción de los ovocitos con la técnica de hematoxilina-eosina, los cuales fueron contados con ayuda del microscopio óptico (OPTIPHOT-2, Nikon).

Los resultados del número de ovocitos se expresaron como el número de ovocitos totales (los liberados por el ovario izquierdo más los del ovario derecho). Con este resultado, se obtuvo la tasa de animales ovulantes (TAO) definida como: el número de animales que ovulan/número total de animales tratados, expresada en porcentaje.

Los resultados del número de ovocitos liberados y la masa de los órganos (miligramos por 100 gramos de masa corporal (mg/100 g M.C.) fueron expresados como la media más menos el error estándar de la media (Media \pm E.E.M.).

Los ovarios fueron fijados con una solución de Bouin, deshidratados e incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados de 10 μm , los cuales fueron teñidos mediante la técnica hematoxilina-eosina.

En la figura 43 se muestra una escala de tiempo de los días y tratamientos a los cuales fueron sometidos todos los animales en este experimento.

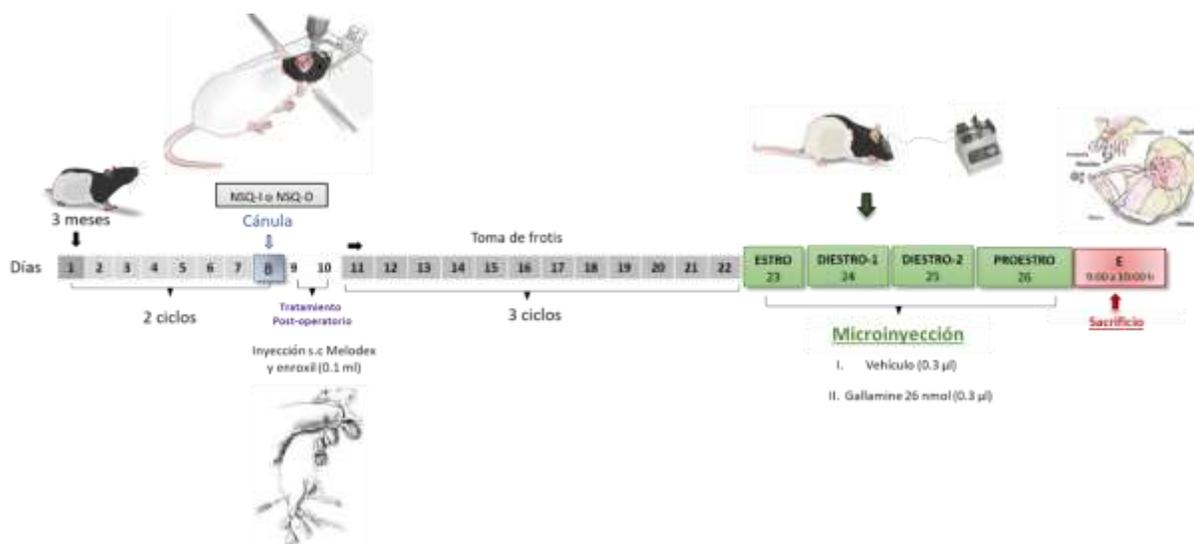


Figura 43. Diagrama representativo que muestra una línea del tiempo de todos de los animales utilizados en este experimento desde el día de su marcaje hasta su posterior sacrificio en el día del estro esperado.

CORROBORACIÓN DEL SITIO DE MICROINYECCIÓN

Los cerebros de las ratas tratadas fueron removidos y congelados. Para verificar la exactitud del sitio de microinyección se realizaron secciones coronales de 50 µm obtenidos en la región del NSQ con un Vibratomo (LEICA). Los cortes fueron montados en portaobjetos y examinados con el apoyo de un microscopio estereoscópico. Solo se utilizaron los datos de las ratas microinyectadas correctamente en el NSQ.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El número de ovocitos liberados se analizó mediante la prueba de Kruskal- Wallis, seguida de la prueba de Dunn. La tasa de animales ovulantes por la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Los resultados de la masa corporal, de los órganos y

las concentraciones hormonales se analizaron con la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey.

En todos los casos, se consideró significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad es menor o igual al 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico GraphPad InStat3 Software Inc. (San Diego, CA, EE.UU.).

RESULTADOS

Análisis histológico de los cortes de cerebro

En la **figura 44** se muestran los cortes de cerebro que muestran una correcta microinyección con solución salina o triyoduro de galamina (26nmol) en el NSQ-I o NSQ-D.

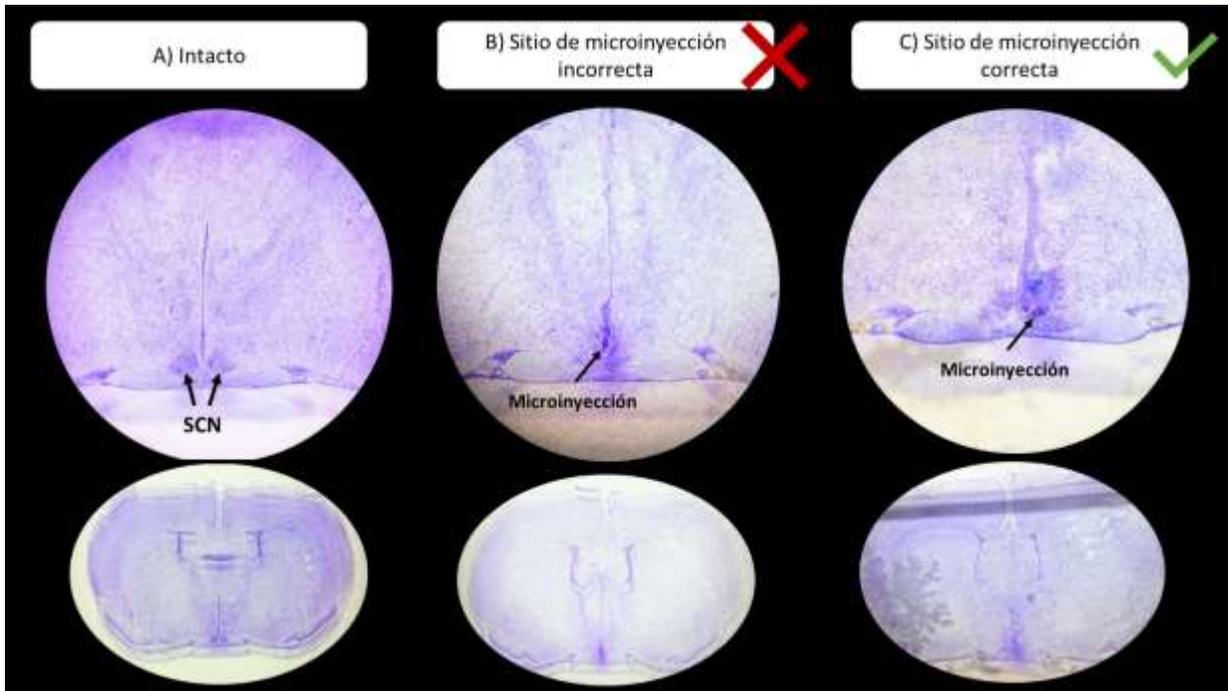


Figura 44. Fotografías de cortes de cerebro (50 μ m), que muestran el cerebro de A) un animal intacto, B) un animal con una errónea microinyección y C) un animal con una correcta microinyección el en NSQ.

Grupo testigo

Todos los animales intactos ovularon el día del estro predicho y liberaron 13.0 ± 0.5 ovocitos; el ovario izquierdo liberó un número de ovocitos similar al liberado por el ovario derecho (**grafica 1 y cuadro 11**). De igual forma, la masa de los ovarios y las adrenales del lado izquierdo fue semejante a la del lado derecho (**cuadro 12**).

Cuadro 11. Porcentaje de animales ovulantes (PAO) y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados de animales intactos sacrificados en el siguiente estro esperado.

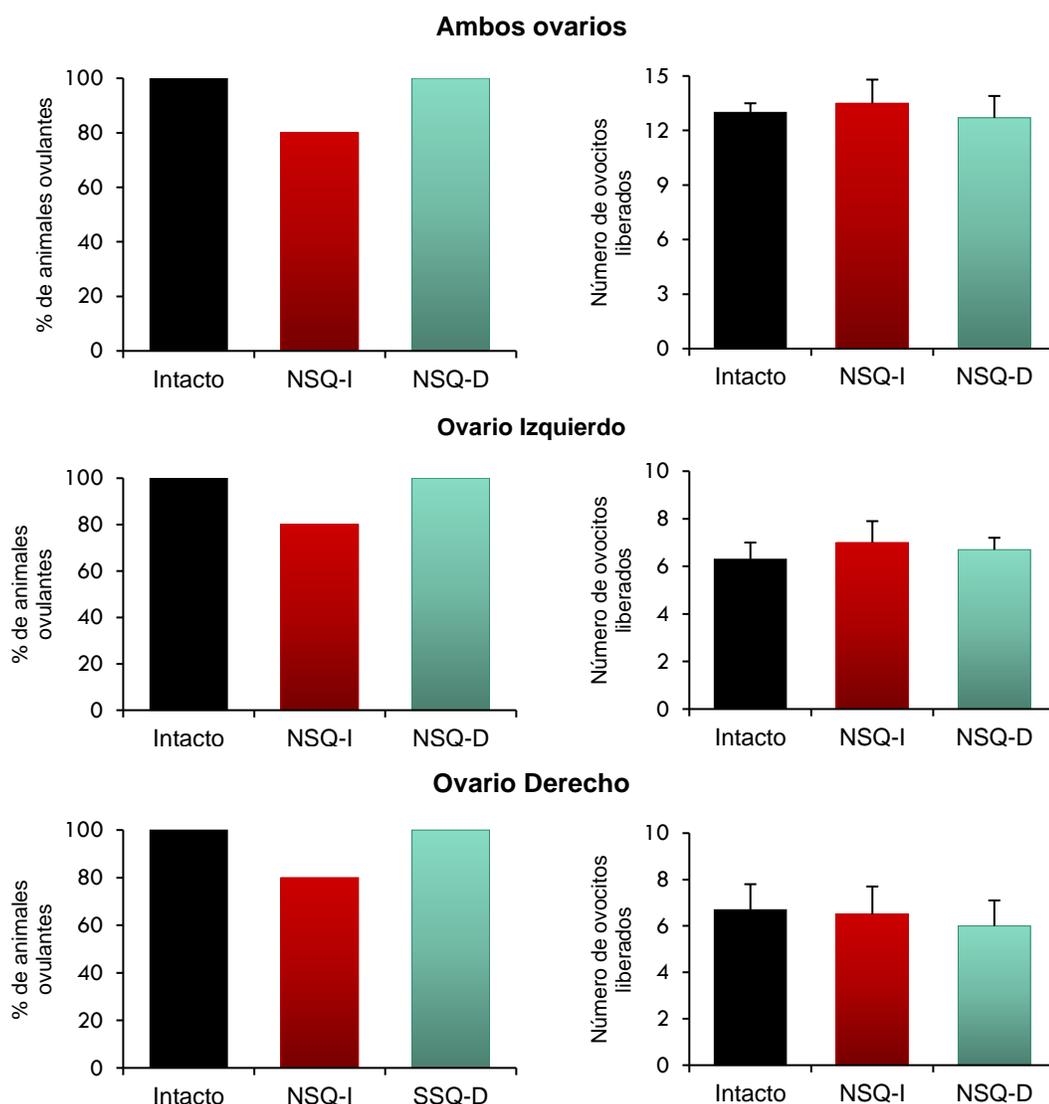
GRUPO	n	Ovario Izquierdo		Ovario Derecho		Ambos ovarios	
		PAO	No. de Ovocitos liberados	PAO	No. de Ovocitos liberados	PAO	No. de Ovocitos liberados
Intactos	6	100	6.3 ± 0.7	100	6.7 ± 1.1	100	13.0 ± 0.5

Cuadro 12. Media \pm E.E.M. de la masa de los órganos de animales intactos sacrificados de 9:00 a 10:00 h del estro esperado.

Grupo	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa de ovarios	Útero	Adrenal izquierda	Adrenal derecha	Masa adrenal
		mg/100g M.C.						
Intacto	6	11.0 ± 0.4	12.4 ± 0.8	23.4 ± 1.0	195.9 ± 7.3	13.0 ± 1.0	12.0 ± 0.6	25.0 ± 1.5

Inserción de la cánula directriz en el NSQ-I o NSQ-D

Los animales con implante unilateral en el NSQ izquierdo o derecho no mostraron alteraciones en la tasa de animales ovulantes, ni en el número de ovocitos liberados cuando es comparado con el del grupo de animales intactos (**gráfica 1**). Los animales con implante en el NSQ-D presentaron una menor masa adrenal con respecto al grupo intacto, mientras que los animales con implante en el NSQ-I presentaron una menor masa uterina (**cuadro 13**).



Gráfica 1. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, derecho o ambos ovarios de animales intactos (■) o con cánula unilateral en el NSQ-I (■) o NSQ-D (■) implantada en la etapa de diestro-2 y sacrificados el día del estro predicho.

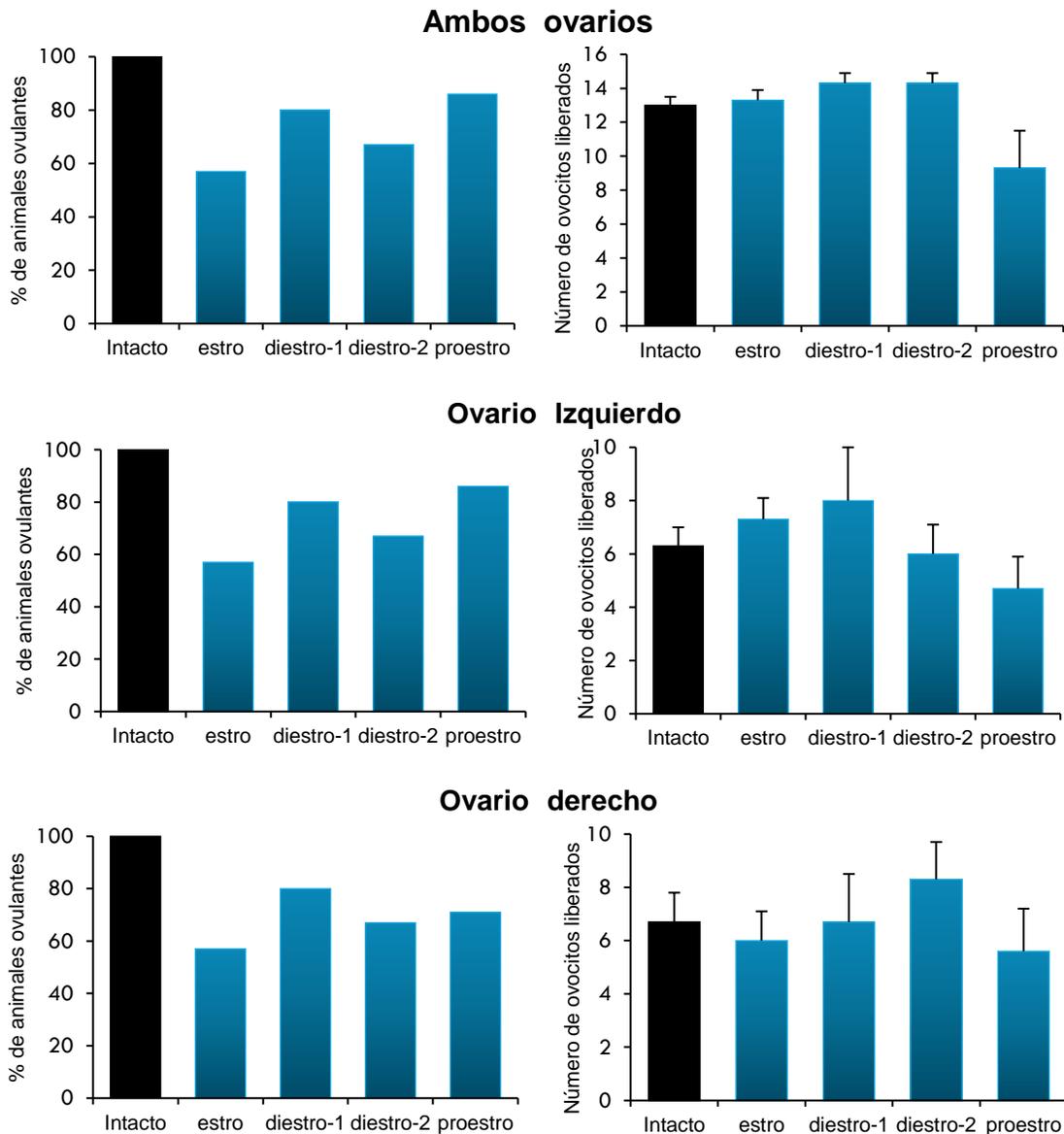
Cuadro 13. Media \pm E.E.M. de la masa de los órganos en animales intactos o con implante unilateral en el NSQ-D o NSQ-I en la etapa de diestro-2 y sacrificados el día del estro predicho.

Grupo	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa de ovarios	Útero	Adrenal izquierda	Adrenal derecha	Masa adrenal
		mg/100g M.C.						
Intacto	6	11.0 \pm 0.4	12.4 \pm 0.8	23.4 \pm 1.0	195.9 \pm 7.3	13.0 \pm 1.0	12.0 \pm 0.6	25.0 \pm 1.5
Cánula NSQ-I	5	14.1 \pm 1.3	12.4 \pm 1.6	26.5 \pm 2.5	155.1 \pm 8.7*	13.4 \pm 0.9	11.9 \pm 0.6	25.4 \pm 1.3
Cánula NSQ-D	6	15.7 \pm 4.1	14.5 \pm 3.1	30.2 \pm 7.1	178.7 \pm 10.6	10.4 \pm 0.8	10.6 \pm 0.6	21.0 \pm 1.0*

* $p < 0.05$ vs. Grupo intacto (prueba de "t" de Student).

Microinyección de solución salina en el NSQ-I

La microinyección del vehículo en el NSQ-I en la etapa de estro o proestro no resultó en alteraciones significativas en el porcentaje de animales ovulantes ni en el número de ovocitos liberados con respecto al del grupo intacto (gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, derecho o ambos ovarios de animales intactos (■) o microinyectados del vehículo en el NSQ-I (■) a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho.

En la etapa de estro o proestro, la microinyección de solución salina en el NSQ-I resultó en una menor masa del útero con respecto al grupo de animales intactos (**cuadro 14**).

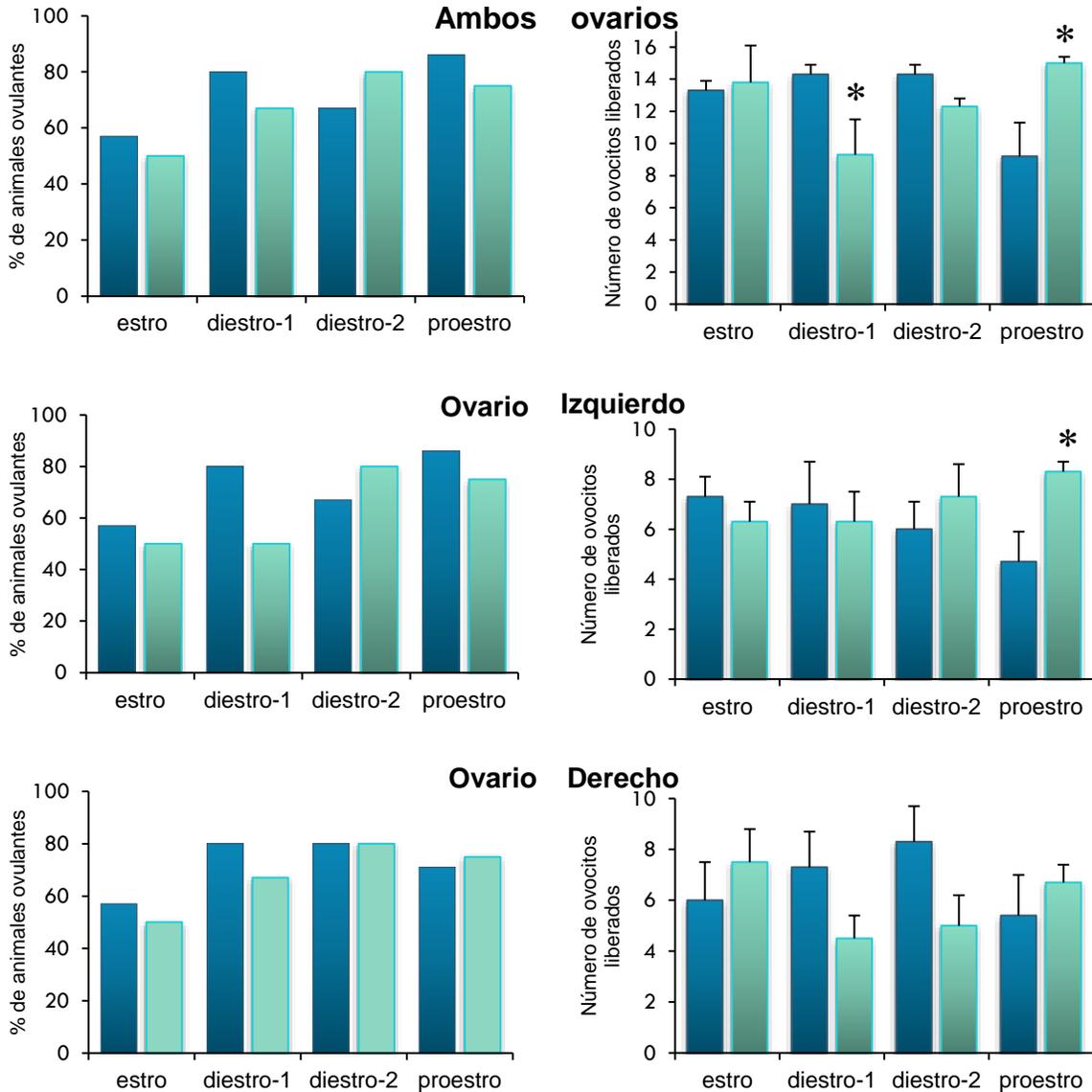
Cuadro 14. Media \pm E.E.M. de la masa de los órganos de animales intactos o con microinyección del vehículo en el NSQ-I a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho.

Grupo	Etapa	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa de ovarios	Útero	Adrenal izquierda	Adrenal derecha	Masa adrenal
Intacto	E	6	11.0 \pm 0.4	12.4 \pm 0.8	23.4 \pm 1.0	195.9 \pm 7.3	13.0 \pm 1.0	12.0 \pm 0.6	25.0 \pm 1.5
Vehículo	E	7	12.8 \pm 0.5	11.7 \pm 0.5	24.3 \pm 0.6	158.0\pm8.5*	12.4 \pm 0.6	11.8 \pm 0.6	24.2 \pm 1.2
	D1	5	13.0 \pm 1.9	10.2 \pm 0.4	23.2 \pm 2.0	180.7 \pm 9.9	12.3 \pm 0.8	11.6 \pm 0.5	23.8 \pm 1.1
	D2	6	11.1 \pm 0.6	12.8 \pm 0.4	23.9 \pm 0.9	165.7 \pm 18.9	11.7 \pm 0.6	11.1 \pm 0.4	22.8 \pm 0.9
	P	7	12.1 \pm 0.7	12.3 \pm 0.5	24.5 \pm 0.6	158.7\pm7.2*	13.0 \pm 1.1	12.0 \pm 0.4	24.9 \pm 1.3

*p<0.05 vs. Grupo intacto (prueba de "t" de Student). E: estro, D1: diestro-1, D2: diestro-2, P: proestro

Bloqueo de los m₂AChR del NSQ-I por la microinyección de galamina

El bloqueo de los m₂AChR, por la microinyección con galamina, en el NSQ-I a las 7:00 h en la etapa de proestro resultó en un mayor número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo con respecto a su grupo control (**gráfica 3**).



Gráfica 3. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, derecho o ambos ovarios de animales con microinyección de vehículo (■) o triyoduro de galamina (26 nmol/L) (■) en el NSQ-I a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho.

En la etapa de diestro-1, los animales con el bloqueo de los m₂AChR presentaron una menor masa adrenal con respecto a su grupo vehículo (**cuadro 15**). Todos los animales con microinyección de galamina en el NSQ-I presentaron útero normal y carnificación vaginal al momento del sacrificio (**cuadro 16**).

Cuadro 15. Media ± E.E.M. de la de los órganos de animales con microinyección de vehículo o triyoduro de galamina (26 nmol) en el NSQ-I a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho.

Grupo	Etapa	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa de ovarios	Útero	Adrenal izquierda	Adrenal derecha	Masa adrenal
Vehículo	estro	7	12.8±0.5	11.7±0.5	24.3±0.6	158.0±8.5	12.4±0.6	11.8±0.6	24.2±1.2
Galamina		8	14.6±1.0	13.4±0.9	28.0±1.8	160.5±10.8	12.6±0.3	12.1±0.3	24.7±0.6
Vehículo	diestro-1	5	13.0±1.9	10.2±0.4	23.2±2.0	180.7±9.9	12.3±0.8	11.6±0.5	23.8±1.1
Galamina		6	13.5±0.8	12.1±1.4	25.7±2.0	173.0±10.8	10.9±0.5	10.1±0.4*	21.0±0.8
Vehículo	diestro-2	6	11.1±0.6	12.8±0.4	23.9±0.9	165.7±18.9	11.7±0.6	11.1±0.4	22.8±0.9
Galamina		6	12.6±1.2	12.2±1.5	24.7±2.5	191.1±23.0	12.6±0.5	11.3±0.9	23.8±10.0
Vehículo	proestro	7	12.1±0.7	12.3±0.5	24.5±0.6	158.7±7.2	13.0±1.1	12.0±0.4	24.9±1.3
Galamina		8	12.5±0.8	11.4±0.6	23.9±0.8	165.0±9.0	13.1±0.7	12.3±0.6	25.6±1.2

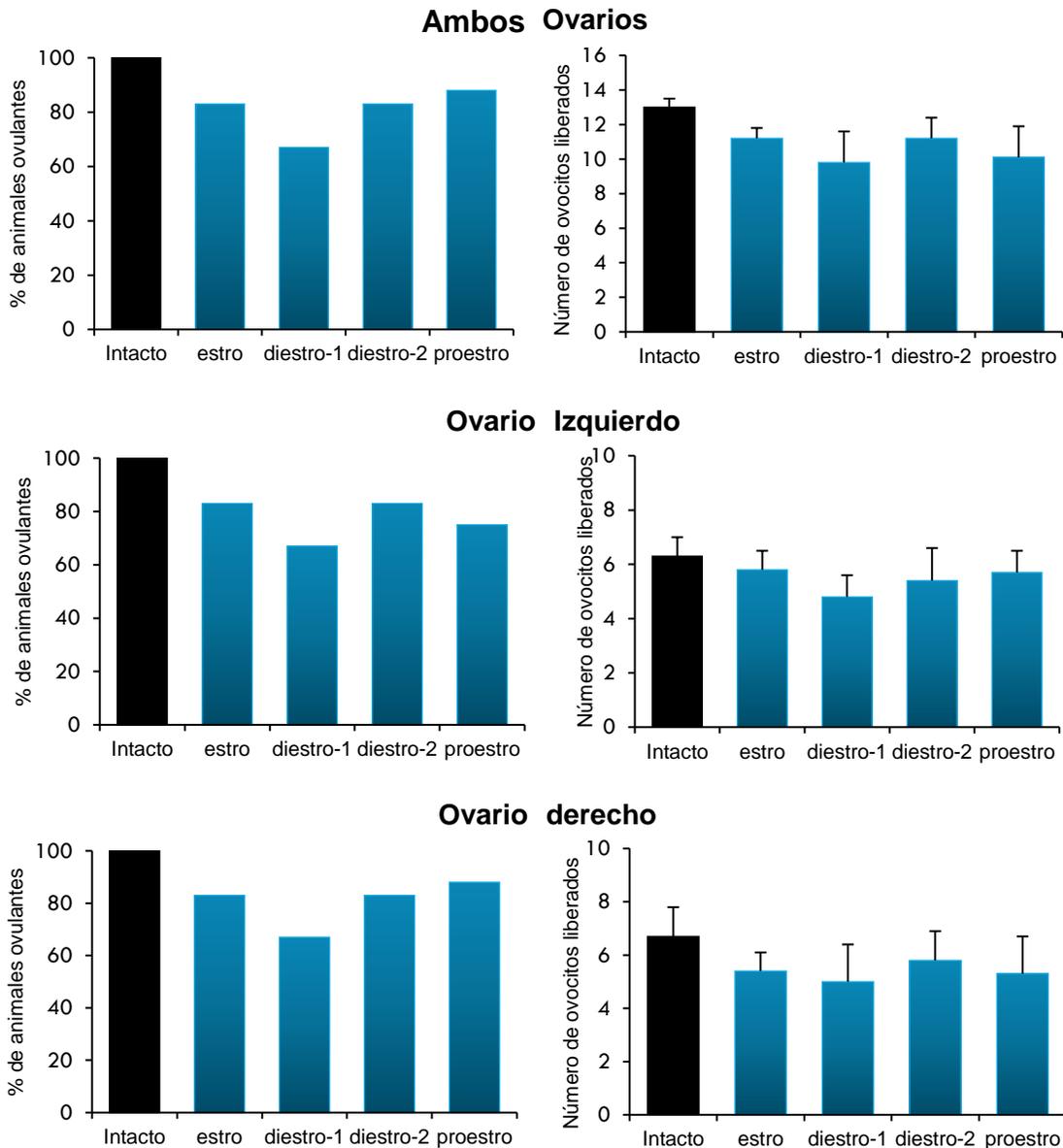
*p<0.05 vs. Vh; (prueba de "t" de Student). Vehículo solución salina Vh).

Cuadro 16. Presencia de útero balonado y cornificación vaginal en animales con microinyección de vehículo o triyoduro de galamina (26 nmol) en el NSQ-I las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho.

GRUPO	Etapa	ÚTERO BALONADO	CORNIFICACIÓN VAGINAL
Vehículo	estro	0/7	7/7
Galamina		0/8	8/8
Vehículo	diestro-1	0/5	5/5
Galamina		0/6	6/6
Vehículo	diestro-2	2/6	6/6
Galamina		5/6	5/6
Vehículo	proestro	0/7	7/7
Galamina		1/8	8/8

Microinyección de solución salina en el NSQ-D

La microinyección de solución salina en el NSQ-D durante el ciclo estral no modificó el porcentaje de animales ovulantes ni en el número de ovocitos liberados con respecto a grupo de animales intactos (**gráfica 4**).



Gráfica 4. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, derecho o ambos ovarios de animales intactos (■) o microinyectados con de vehículo en el NSQ-D (■) a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho.

En la etapa de estro y proestro, la masa del útero de los animales con microinyección de solución salina en el NSQ-D fue menor que la del grupo intacto (**cuadro 17**).

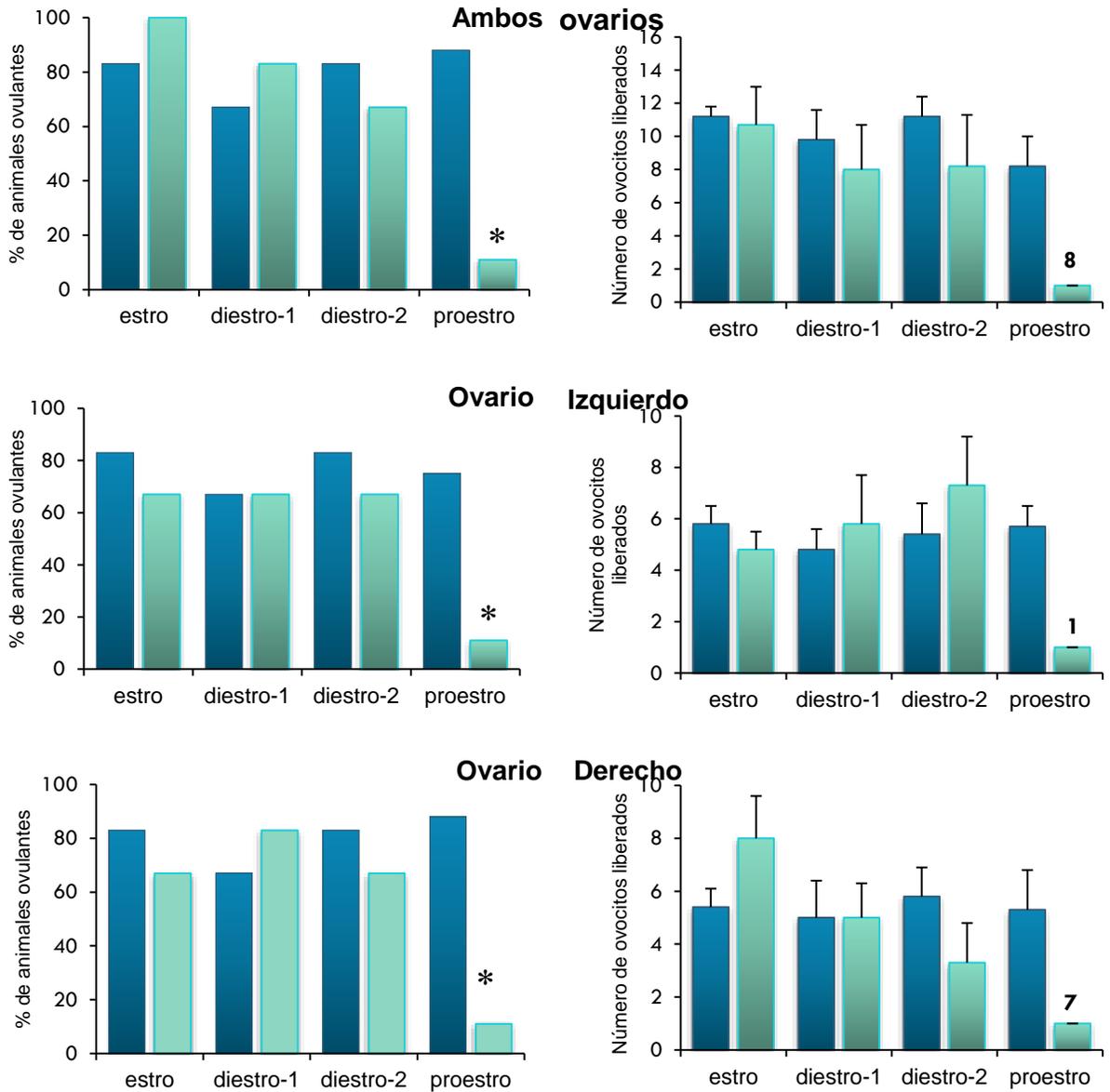
Cuadro 17. Media \pm E.E.M. de la masa corporal y la de los órganos de animales intactos o con microinyección de vehículo en el NSQ-D a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho.

Grupo	Etapa	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa de ovarios	Útero	Adrenal izquierda	Adrenal derecha	Masa adrenal
Intacto	E	6	11.0 \pm 0.4	12.4 \pm 0.8	23.4 \pm 1.0	195.9 \pm 7.3	13.0 \pm 1.0	12.0 \pm 0.6	25.0 \pm 1.5
Vehículo	E	6	12.0 \pm 0.5	11.2 \pm 0.6	23.2 \pm 0.9	163.9 \pm 8.1*	12.6 \pm 0.8	11.7 \pm 0.7	24.3 \pm 1.5
	D1	6	11.5 \pm 0.4	11.1 \pm 0.7	22.6 \pm 0.8	188.1 \pm 6.7	12.7 \pm 0.9	11.5 \pm 0.7	24.2 \pm 1.6
	D2	6	12.1 \pm 0.9	13.2 \pm 1.2	25.3 \pm 1.7	170.9 \pm 7.1	14.3 \pm 1.9	13.2 \pm 1.0	27.5 \pm 2.7
	P	9	12.7 \pm 0.6	11.6 \pm 0.5	24.3 \pm 1.0	159.0 \pm 11.1*	11.6 \pm 0.8	10.4 \pm 0.7	22.0 \pm 1.4

* $p < 0.05$ vs. Grupo intacto (prueba de "t" de Student). E: estro, D1: diestro-1, D2: diestro-2, P: proestro.

Bloqueo de los m₂AChR del NSQ-D por la microinyección de galamina

El bloqueo de los receptores m₂AChR, por la microinyección con galamina, en el NSQ-D a las 7:00 h del proestro resultó en el bloqueo de la ovulación con respecto a su grupo control, independientemente del ovario analizado (**gráfica 5**).



Gráfica 5. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, derecho o ambos ovarios de animales con microinyección de vehículo (■) o triyoduro de galamina (26 nmol/L) (■) en el NSQ-D a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho. * $p < 0.05$ vs. Grupo vehículo (prueba de probabilidad exacta de Fisher). La cifra localizada encima de las columnas indica el número de ovocitos liberados por aquel animal que si ovulo.

La microinyección de galamina en el NSQ-D a lo largo del ciclo estral no modificó la masa de órganos (**cuadro 18**). En la etapa de diestro-2, los animales con microinyección de galamina en el NSQ-D presentaron el útero valonado el día del sacrificio (**cuadro 19**).

Cuadro 18. Media \pm E.E.M. de la masa de los órganos de animales con microinyección de vehículo o triyoduro de galamina (26 nmol) en el NSQ-D a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho.

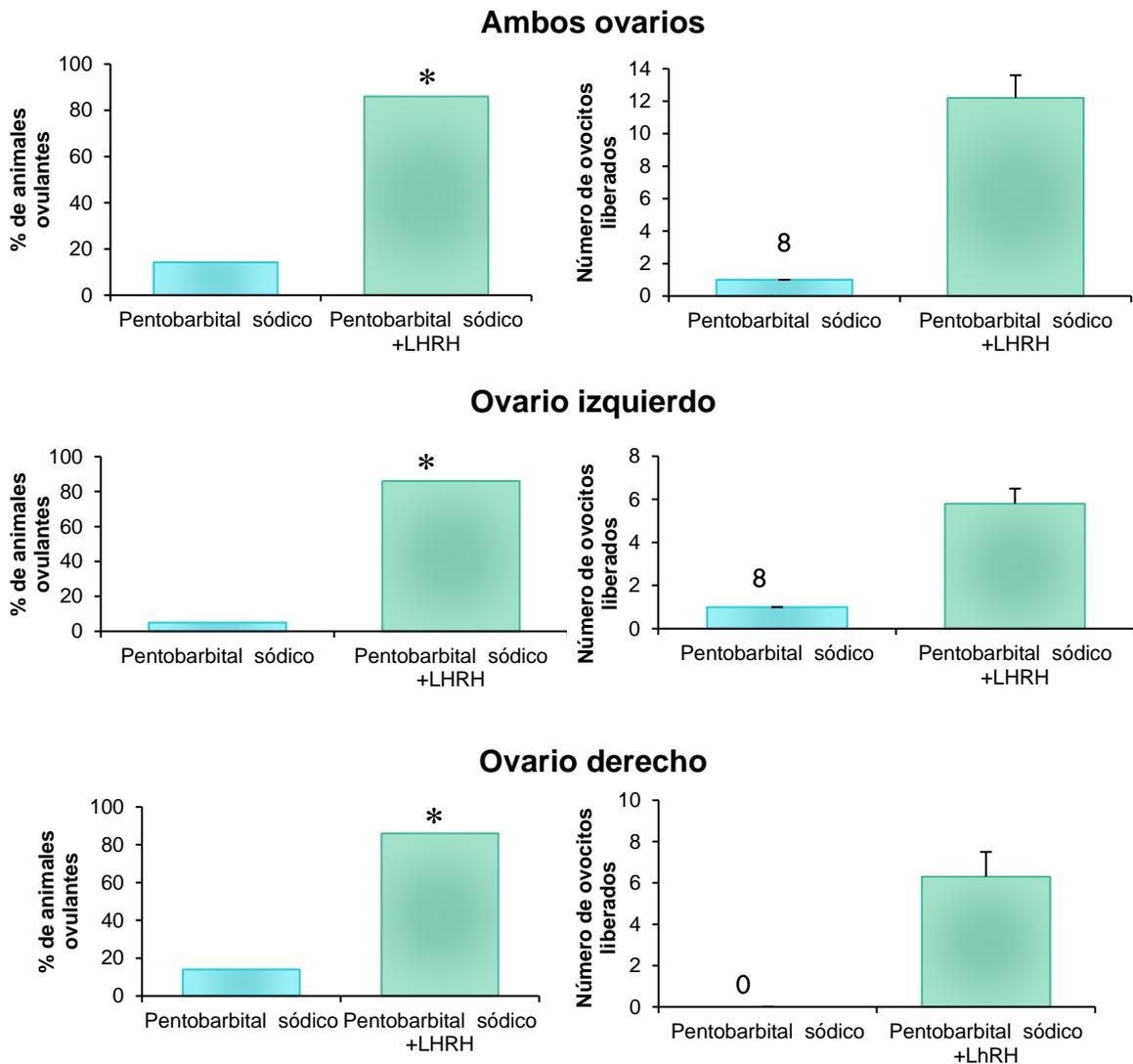
Grupo	Etapa	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa de ovarios	Útero	Adrenal izquierda	Adrenal derecha	Masa adrenal
Vehículo	estro	6	12.0 \pm 0.5	11.2 \pm 0.6	23.2 \pm 0.9	163.9 \pm 8.1	12.6 \pm 0.8	11.7 \pm 0.7	24.3 \pm 1.5
Galamina		6	13.4 \pm 2.5	13.5 \pm 1.9	26.9 \pm 4.3	150.0 \pm 7.9	12.0 \pm 0.3	10.8 \pm 0.4	22.8 \pm 0.6
Vehículo	diestro-1	6	11.5 \pm 0.4	11.1 \pm 0.7	22.6 \pm 0.8	188.1 \pm 6.7	12.7 \pm 0.9	11.5 \pm 0.7	24.2 \pm 1.6
Galamina		6	12.4 \pm 0.3	13.8 \pm 0.7	26.2 \pm 0.6	180.4 \pm 11.9	11.1 \pm 0.6	10.5 \pm 0.6	21.2 \pm 0.9
Vehículo	diestro-2	6	12.1 \pm 0.9	13.2 \pm 1.2	25.3 \pm 1.7	170.9 \pm 7.1	14.3 \pm 1.9	13.2 \pm 1.0	27.5 \pm 2.7
Galamina		6	11.8 \pm 0.8	14.4 \pm 0.7	26.1 \pm 1.3	169.3 \pm 7.3	13.0 \pm 0.8	12.9 \pm 0.3	25.9 \pm 1.0
Vehículo	proestro	9	12.7 \pm 0.6	11.6 \pm 0.5	24.3 \pm 1.0	159.0 \pm 11.1	11.6 \pm 0.8	10.4 \pm 0.7	22.0 \pm 1.4
Galamina		9	12.2 \pm 0.8	11.9 \pm 1.0	24.1 \pm 1.4	135.0 \pm 10.1	10.5 \pm 0.5	10.0 \pm 0.5	20.5 \pm 1.0

Cuadro 19. Presencia de útero balonado de animales con microinyección de vehículo o triyoduro de galamina (26 nmol) en el NSQ-D a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral y sacrificados el día del estro predicho. * $p < 0.05$ vs. Grupo vehículo (prueba de probabilidad exacta de Fisher).

GRUPO	Etapa	ÚTERO BALONADO	CORNIFICACIÓN VAGINAL
Vehículo	estro	0/6	6/6
Galamina		1/6	6/6
Vehículo	diestro-1	0/6	6/6
Galamina		0/6	6/6
Vehículo	diestro-2	0/6	6/6
Galamina		5/6*	6/6
Vehículo	proestro	2/9	8/9
Galamina		0/9	9/9

Efecto del bloqueo de la ovulación

Se decidió replicar el experimento de Everett y Sawyer (1949), con el fin de asegurar que la dosis de 3.7 µg/Kg de LHRH era efectiva para revertir los efectos del bloqueo de pentobarbital sódico (30 mg/Kg). Los resultados muestran el mismo bloqueo de la ovulación reportado por Everett y Sawyer, el cual fue revertido en su totalidad por la inyección s.c. de LHRH (Sigma Aldrich) (**gráfica 6**).



Gráfica 6. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, derecho o ambos ovarios de animales con bloqueo de la ovulación por la inyección s.c. de pentobarbital sódico a una hora crítica (13:00 h) en el día del proestro o animales con bloqueo de la ovulación por la inyección de pentobarbital sódico seguido de la inyección s.c. de LHRH a las 14:00 h del mismo día. Todos los animales fueron sacrificados después del tratamiento, sacrificados el día del estro predicho. * $p < 0.05$ vs. Grupo con inyección de pentobarbital sódico (probabilidad exacta de Fisher). La cifra localizada encima de las columnas indica el número de ovocitos liberados por aquel animal que si ovulo.

Los animales con inyección de LHRH presentaron un aumento en la masa de ambas adrenales con respecto a su grupo (**cuadro 20**).

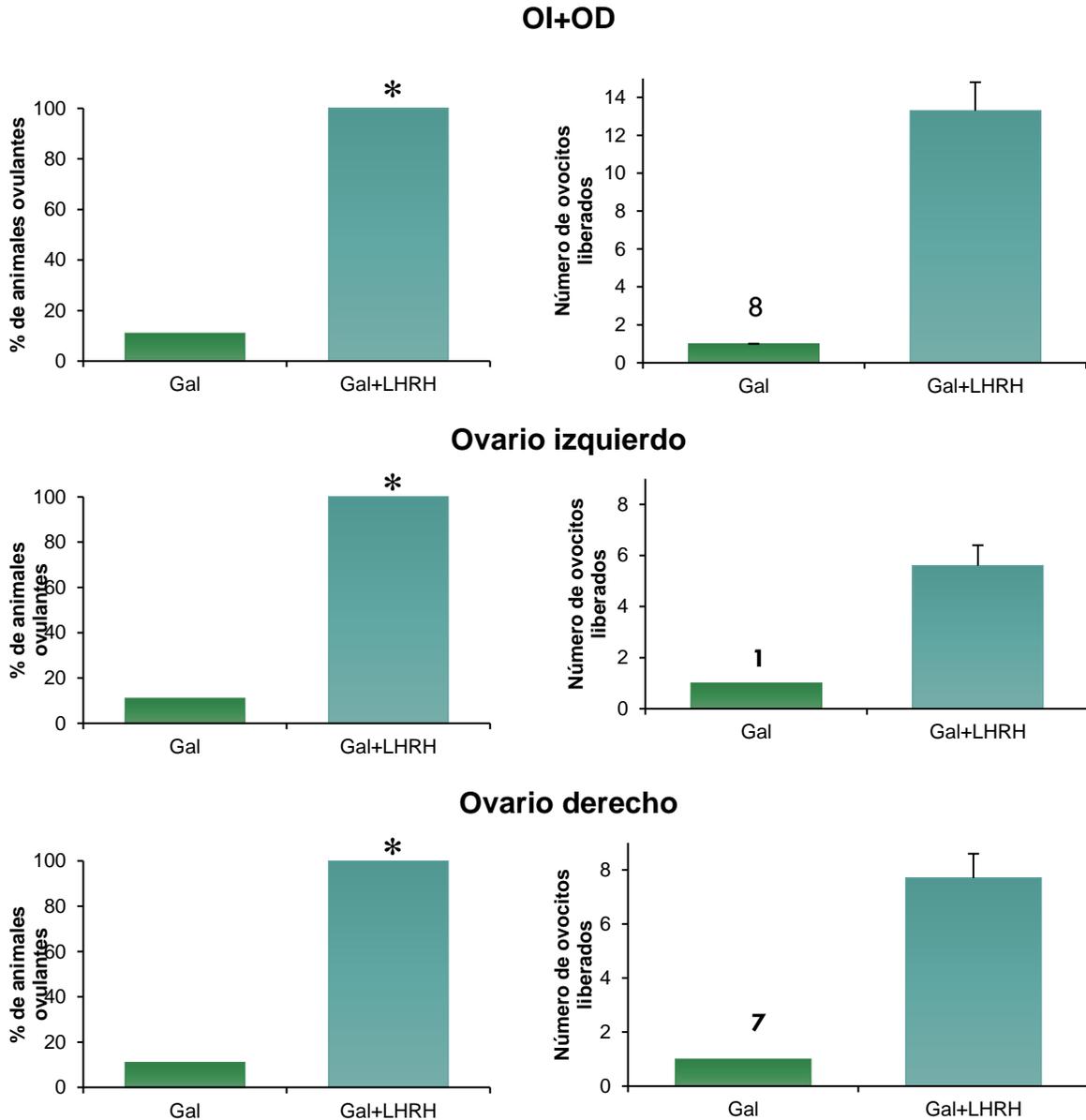
Cuadro 20. Media \pm E.E.M. de la masa de los órganos en animales con inyección i.p. de Pentobarbital sódico a las 13:00 h en la etapa del proestro y de animales con inyección de pentobarbital sódico seguido de una inyección s.c. de LHRH sintética (Sigma) a las 14:00 del mismo día. Todos los animales fueron sacrificados el día del estro predicho.

Grupo	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa de ovarios	Útero	Adrenal izquierda	Adrenal derecha	Masa adrenal
		mg/100g M.C.						
Pento-B	7	12.1 \pm 2.3	12.6 \pm 2.2	24.7 \pm 4.4	149.2 \pm 6.6	11.1 \pm 0.6	9.8 \pm 0.4	20.8 \pm 0.8
Pento-B+LHRH	7	12.6 \pm 0.4	13.3 \pm 0.7	25.8 \pm 1.0	143.1 \pm 7.5	13.4 \pm 0.4*	12.7 \pm 0.6*	26.1 \pm 0.8*

*p<0.05 vs. Grupo anestesiado con pentobarbital sódico (prueba de "t" de Student).

Remplazo de la señal hipotalámica

El remplazo hormonal con LHRH, que se realizó en aquellos animales que no ovularon como resultado del bloqueo de los m₂AChR del NSQ-D en el proestro (gráfica 7).



Gráfica 7. Remplazo de la señal hipotalámica. Porcentaje de animales y media \pm E.E.M. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, derecho o ambos ovarios de animales con microinyección de galamina trietiodida (26nmol) en el NSQ-D a las 7:00 h en la etapa de proestro y de animales microinyectados con galamina seguido por la inyección con 3.7 μ g/Kg por peso corporal de LHRH sintética a 14:00 h del mismo día (Gal+LHRH). * $p < 0.05$ vs. Grupo microinyección de galamina (probabilidad exacta de Fisher). La cifra localizada encima de las columnas indica el número de ovocitos liberados por aquel animal que si ovulo.

Los animales con microinyección de Galamina en el NSQ-D a las 13.00 h de la etapa del proestro, seguida de la inyección s.c. de LHRH a las 14.00 h, no presentaron alteraciones en la masa de sus órganos con respecto a su grupo control (animales con bloqueo de los m₂AChR) (**cuadro 21**).

Cuadro 21. Media \pm E.E.M. de la masa de los órganos en animales con de animales con microinyección de galamina trietiodida (26nmol) en el NSQ-D a las 7:00 h en la etapa de proestro y de animales microinyectados con galamina seguido por la inyección con 3.7 μ g/Kg por peso corporal de LHRH sintética a 14:00 h del mismo día.

Grupo	n	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa de ovarios	Útero	Adrenal izquierda	Adrenal derecha	Masa adrenal
		mg/100g M.C.						
Galamina	9	12.2 \pm 0.8	11.9 \pm 1.0	24.1 \pm 1.4	135.0 \pm 10.1	10.5 \pm 0.5	10.0 \pm 0.5	20.5 \pm 1.0
Galamina + LHRH	7	12.1 \pm 0.5	13.7 \pm 1.0	25.8 \pm 1.5	157.7 \pm 14.8	10.6 \pm 1.6	10.8 \pm 0.8	21.4 \pm 2.2

DISCUSION DE RESULTADOS

Los resultados del presente estudio muestran que la participación de los m_2 AChR de los núcleos supraquiasmáticos en la regulación de la ovulación depende del NSQ estudiado y la etapa del ciclo estral.

Dado que la microinyección unilateral de solución salina en cada etapa del ciclo estral no afectó los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación, las diferencias en la tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados por animales con bloqueo unilateral de los m_2 AChR del NSQ, lo podemos atribuir a la falta de unión de la ACh a dichos receptores.

DIESTRO-1

A partir de resultados de diferentes autores (Domínguez y Smith, 1974, 1971; Everett y Sawyer, 1950; Okamoto *et al.*, 1972), se propone que existe una señal neural de tipo circádico, la cual ocurre en cada etapa del ciclo estral, y es indispensable para que los animales ovulen.

Domínguez y col. (1982), mostraron que el sistema colinérgico participa en la regulación de la ovulación, lo cual depende de la hora del día y de la etapa del ciclo estral, siendo diestro-1 la etapa más sensible al bloqueo. Javier y col. (2016 y 2018), mostraron que en los días de diestro los m_1 AChR del NSQ participan de manera diferencial en la regulación del proceso ovulatorio, ya que la microinyección de PZP en la etapa del diestro-1 resultó en el incremento del número de ovocitos liberados, mientras que el mismo tratamiento realizado en la etapa de diestro-2 lo disminuyó. Con base en los resultados de Domínguez y col. (1982), Javier y col. (2018, 2016) y de nuestros resultados, sugerimos que la señal colinérgica que llega al NSQ-I se genera también en la etapa del diestro-1.

Cruz y col. (2014), mostraron que los mAChR del POA-AHA, participan en la regulación de las funciones de los folículos ováricos dado que, en el presente estudio, el bloqueo de los m_2 AChR del NSQ-I en la etapa del diestro-1, resultó en la disminución del número de ovocitos liberados, sugerimos que en diestro-1 la falta de estimulación de estos receptores altera los mecanismos de regulación del crecimiento y la maduración folicular.

La GnRH es secretada de manera pulsátil al sistema portal hipofisario (Kaiser, 2017), la frecuencia de estos pulsos regulan de manera diferente la secreción de LH y FSH (Burger, 2004; Kaiser *et al.*, 1997).

Durante los días de diestro la GnRH se secreta de manera tónica, es decir a una velocidad baja (Domanski *et al.*, 1980). La secreción de pulsos de GnRH de baja frecuencia estimula la expresión y el aumento de ARNm de la subunidad FSH- β (Dalkin *et al.*, 1989; Kaiser *et al.*, 1997) y según Thompson y Kaiser (2014), la transcripción de la subunidad FSH- β es el paso limitante de la síntesis de la FSH.

Las subunidades individuales no poseen actividad biológica por lo que la formación del heterodímero es esencial para conferir la bioactividad hormonal (Gharib *et al.*, 1990). En la hipófisis, la producción de la subunidad β es relativamente más baja que la subunidad α (Halvorson y Chin, 2001). Las subunidades FSH- α libres están presentes en la circulación, pero rara vez se encuentran libres las subunidades FSH- β (Kaiser, 2017).

La expresión de FSH en respuesta a los cambios de frecuencia de la GnRH resultan en variaciones en el número de receptores de GnRH que se expresan en la membrana del gonadotropo (Bédécarrats y Kaiser, 2003). Durante el diestro el contenido de FSH en la adenohipófisis aumenta (Ortolano *et al.*, 1988). La FSH, estimula el crecimiento folicular, la secreción de estrógenos y estimula la síntesis de los LHR en las células de la granulosa (Domínguez y Cruz-Morales, 2012). Se ha mostrado que la falta de secreción de FSH durante el inicio de la fase folicular retrasa el crecimiento de los folículos (Kaiser, 2017). Con base en esta información,

sugerimos que la disminución observada en aquellos animales con bloqueo de los m₂AChRs, puede deberse a una alteración en la secreción pulsátil de GnRH, que produjo una alteración en la secreción de gonadotropinas, en particular de la FSH lo cual redujo el número de ovocitos liberados.

DIESTRO-2

Los resultados del presente estudio muestran que el bloqueo de los m₂AchR presentes en el NSQ-D en la etapa del diestro-2 no afecta los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación. No obstante, dichos animales presentaron el útero distendido, por lo cual sugerimos que falta de activación de los m₂AchR del NSQ-D en la etapa de Diestro-2 altera el proceso de reabsorción de líquido luminal uterino, quizás por alguna modificación en la secreción de progesterona.

El bloqueo de los mAChR en cada etapa del ciclo estral por la inyección sistémica de atropina (Domínguez *et al.*, 1982), o por el implante unilateral de atropina en el hipotálamo anterior (Cruz *et al.*, 1989), resultó en la presencia del útero distendido lo que depende de la etapa del ciclo estral, siendo diestro-2 la etapa con mayor incidencia.

A lo largo del ciclo estral, las hormonas esteroides proporcionan un ambiente hormonal adecuado para el mantenimiento y la proliferación del endometrio uterino (Binder *et al.*, 2015; Cunha *et al.*, 2004). La distensión uterina observada durante el proestro (Long y Evans, 1922), es resultado de la acumulación de sustancias nutritivas y agua dentro de la luz uterina (Clemetson *et al.*, 1977). La acumulación del líquido luminal modifica los cuernos uterinos y estimula en el aumento de tamaño y espesor del epitelio uterino (De la Cruz, 1998), proceso que es estimulado por el estradiol (Clemetson *et al.*, 1977). Horas después del inicio del estro, la progesterona estimula la reabsorción del líquido luminal, lo cual facilita la reducción del volumen de la cavidad uterina (Clemetson *et al.*, 1977; Feder, 1981; Salleh *et al.*, 2005).

A partir de esta información y de los resultados publicados por diversos autores (Domínguez *et al.* 1982, Cruz *et al.* 1989), sugerimos que la presencia del útero

distendido en aquellos animales con bloqueo de los m₂AChR presentes en el NSQ-D en la etapa del diestro-2, fue resultado de la modificación de la secreción de P, lo cual afectaría la reabsorción del líquido luminal, el cual se acumularía en el interior del útero y resultaría en su distensión.

PROESTRO

El bloqueo unilateral de los mAChR en el día del proestro por la microinyección de atropina en el NSQ izquierdo o derecho (Vieyra et al., 2016), o la interrupción de la comunicación nerviosa entre los NSQs y el hipotálamo (Silva et al., 2019) impiden la ovulación, lo cual nos sugiere que en los NSQs se originan señales nerviosas que participan en la regulación de la ovulación por parte del hipotálamo.

En el presente estudio, el bloqueo unilateral de los m₂AChR de los NSQs en la etapa del proestro, afectó la ovulación de manera asimétrica, ya que el bloqueo de los receptores presentes en el NSQ-D impide la ovulación, mientras que en el NSQ-I resultó en el aumento del número de ovocitos liberados. Con base en estos resultados, sugerimos que la información colinérgica que llega a cada NSQ participa de manera diferencial en la regulación de la ovulación: la estimulación de los receptores m₂AChR del NSQ-D es necesaria para que se produzca la ovulación, mientras que los receptores m₂AChR del NSQ-I de participarían de manera inhibitoria en la maduración final de los folículos preovulatorios.

La primera asimetría que se mostró en el hipotálamo fue la propuesta por Gerendai y col. (1978), al mostrar que en las ratas hembra el hipotálamo medial basal derecho contiene una mayor cantidad de GnRH que la mitad izquierda. Arteaga-López y col. (2003), mostraron que existe una mayor expresión del RNAm de la GnRH del lado derecho POA-AHA que el izquierdo. A partir de diversos estudios, se ha mostrado la existencia de asimetrías funcionales entre el lado izquierdo y derecho del hipotálamo, y el efecto que tienen en los ovarios a través de la hipófisis o de vías neurales directas provenientes del SNC (Cruz *et al.* 1990, 2001;

Cruz, Flores, y Domínguez 2014; Gerendai *et al.* 1978; Gerendai y Halász 2001; Sánchez y Domínguez 1995).

Cruz y col. (1989), mostraron que la unión de la ACh a los mAChR localizados en POA-AHA participan de manera asimétrica en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación, la cual depende de la etapa del ciclo estral, ya que en la etapa del estro el implante de atropina en POA-AHA derecha resultó en el bloqueo de la ovulación, mientras que en la etapa de diestro-2 el bloqueo de la ovulación se obtuvo solo cuando el implante se colocó en el lado izquierdo de POA-AHA.

El bloqueo de los mAChR por el implante de pilocarpina en POA-AHA, mostró que en la etapa del proestro el bloqueo de dichos receptores en POA-AHA derecha bloqueó la ovulación, mientras que del lado izquierdo no la modificó (López *et al.*, 1997).

La diferencia de los resultados en estos estudios (Cruz *et al.*, 1989; López *et al.*, 1997) se puede deber a la afinidad que poseen estos antagonistas a su receptores, la atropina se une a los cinco tipos de mAChR mientras que la PZP tiene una mayor afinidad por los m₁AChR y m₄AChR (Mendoza, 2008a).

Cruz y col. (2014), mostraron que los animales que no ovularon como resultado del bloqueo de los mAChR en POA-AHA por el implante de atropina, presentaban alteraciones el desarrollo y la atresia folicular.

Aunque dentro del NSQ no se localizan somas de neuronas colinérgicas (Van den Pol y Tsujimoto, 1985), ambos núcleos reciben inervación colinérgica de magnitud similar (Bina *et al.*, 1993). Van der Zee y col. (1991), mostraron que las neuronas del NSQ expresan los cinco tipos de mAChR, los cuales se distribuyen en todo el núcleo, aunque no existen asimetrías en la cantidad de fibras colinérgicas que llega a ambos NSQs, no se ha aclarado si existe alguna una diferencia en la cantidad de m₂AChR que expresan ambos núcleos. Con base en estos resultados y en lo que obtuvimos en este estudio, sugerimos que la asimetría funcional que observamos en la etapa de

proestro, puede deberse a que existe alguna asimetría en la densidad (cantidad) de m_2 AChR que se expresan en ambos núcleos.

También es posible que el bloqueo de la ovulación por la microinyección de galamina en el NSQ-D sea efecto de la sensibilidad que posee este lado, ya que la sensibilidad a la retroalimentación hormonal es mayor en el lado derecho del hipotálamo que en el izquierdo (Harris *et al.*, 1996).

La ACh es uno de los principales neurotransmisores que participan en la regulación de la actividad del NSQ. Las fibras colinérgicas hacen sinapsis de manera axodendrítica y axosomática en el NSQ (Kiss y Halász, 1996). La ACh participa en la regulación de los ritmos circadianos dentro del NSQ, modulando la información fótica que llega al núcleo (Reghunandanan *et al.*, 1993; Reghunandanan y Reghunandanan, 2006).

Yang y col. (2010), mostraron que el sistema colinérgico regula la excitabilidad de las neuronas del NSQ, mientras que Hut y Van der Zee (2011), mostraron que los efectos de la ACh dentro del NSQ, dependen de la densidad y localización anatómica de los mAChR en las neuronas de este núcleo.

Con base en esta información, sugerimos que el bloqueo de los m_2 AChR del NSQ-D impide que se genere la señal circadiana, la cual estimula a diversas áreas relacionadas con la regulación de la ovulación y altera la secreción pulsátil de la GnRH, y como resultado no se produce la secreción preovulatoria de la LH.

La ovulación depende de la actividad coordinada y la sincronización de múltiples tejidos neuroendocrinos (Sellix, 2015). Este proceso es estimulado por la acción de la LH, la cual al unirse a su receptor activa distintas cascadas de señalización (Marshall, 2004).

La secreción de la GnRH está regulada por información nerviosa que llega de manera directa o indirecta del NSQ (de la Iglesia y Schwartz, 2006; Klein y Burden, 1988; Robertson *et al.*, 2009) y según Williams III y Kriegsfeld (2012), en cada día del ciclo estral el NSQ envía señales que estimulan el eje reproductivo.

La LH se secreta de manera pulsátil, como resultado de la liberación pulsátil de la GnRH (Levine, 2015). Durante la tarde del proestro, las concentraciones de LH comienza a aumentar (entre las 14:00 y 15:00 horas) y alcanza su máxima concentración de las 17:00 a las 19:00 horas (Smith *et al.*, 1975).

Está rápida “oleada” estimula la ovulación (Freeman, 2006). La amplitud y frecuencia de los pulsos de secreción de GnRH determinan la secreción de las gonadotropinas (Melmed *et al.*, 2011). La secreción de LH es favorecida por pulsos de frecuencia rápida (>1 pulso por hora) (Tsutsumi y Webster, 2009); en la rata estos pulsos ocurren en intervalos aproximados de 30 min (Maffucci y Gore, 2009).

En los mamíferos, el aumento preovulatorio de LH que ocurre en la tarde del proestro es estimulado por una señal proveniente el NSQ en respuesta a una señal que indica el aumento de las concentraciones de los estrógenos (Simonneaux *et al.*, 2012; Williams III y Kriegsfeld, 2012).

El NSQ presenta conexiones neurales monosinápticas con neuronas del AHA, el POA y el AVPV (Van der Beek *et al.*, 1997). En el NSQ, las terminales nerviosas de neuronas VIPérgicas hacen sinapsis con neuronas GnRHérgicas ubicadas en el POA, mientras que las neuronas AVP hacen sinapsis con neuronas de kisspeptina (Kp) ubicadas en el AVPV (Putteeraj *et al.*, 2016).

Se ha sugerido que las neuronas de Kp del AVPV integran las señales (circadiana y estrogénica) indispensables para el aumento preovulatorio de LH, ya que estas neuronas presentan un patrón de activación que coincide con el aumento de GnRH/LH (Williams III y Kriegsfeld, 2012; Williams *et al.*, 2011).

Ramírez y col. (2017), mostraron que durante el proestro las funciones ováricas son reguladas por señales multisinápticas provenientes del NSQ, y el nervio ovárico superior podía ser parte de la vía de comunicación entre el NSQ y los ovarios.

Bloqueo de la Ovulación PROESTRO + remplazo LHRH

Dado que en ratas que no ovulan por el bloqueo de los m_2 AChR en el NSQ-D en la etapa del proestro y que la inyección de LHRH sintética indujo la ovulación, sugerimos que la unión de la ACh a los m_2 AChR del NSQ-D en la a etapa del proestro estimula los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de GnRH.

Cruz y col. (2001), mostraron que la falta de ovulación en animales con implante unilateral de atropina en el POA-AHA se debe modificaciones en la secreción fásica de GnRH en la tarde del proestro y que el bloqueo del sistema colinérgico sistémico inhibe la secreción preovulatoria de LH.

Según Clarke y Tilbrook (2009), hay una relación directa entre la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de GnRH y los de LH, mientras que Vieyra y col. (2016), mostraron que a las 9:00 h del día proestro los m AChR del NSQ regulan de manera estimulante la secreción de la LH y la ovulación.

Con base en lo anterior, y de los resultados obtenidos en este estudio, sugerimos que la activación de los m_2 AChR del NSQ-D regulan de manera estimulante la generación de una señal neuronal necesaria para estimular la liberación de GnRH, la cual a su vez estimula la secreción preovulatoria de LH y la ovulación.

CONCLUSIONES

El implante unilateral de la cánula directriz en el NSQ-D en la etapa del diestro-2 no modificó el ciclo estral, la tasa de animales ovulantes, ni el número de ovocitos liberados en el día del estro.

La microinyección de solución salina en el NSQ-I o NSQ-D a las 7:00 h en cada etapa del ciclo estral no modificó la ovulación, aunque el tratamiento en la etapa del estro o proestro resultó en una menor masa del útero.

En la etapa del diestro-1, los m_2 AChR del NSQ-I participan de manera estimulante sobre los mecanismos neuroendocrinos que regulan el número de ovocitos liberados.

Los animales con bloqueo de los m_2 AChR del NSQ-D en la etapa de diestro-2, presentaron útero distendido el día del sacrificio, lo que nos permite sugerir que los m_2 AChR del NSQ-D participan en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el proceso de reabsorción del líquido luminal uterino y la distensión del útero.

Dado que el bloqueo de los m_2 AChR presentes en el NSQ-I en la etapa del proestro resultó en un mayor número de ovocitos liberados por animal ovulante, mientras que en el NSQ-D el mismo tratamiento resultó en la falta de ovulación, sugerimos que los m_2 AChR del NSQ participan de manera asimétrica en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación.

En la etapa del proestro, la inyección s.c. de LHRH restauró la ovulación de aquellos animales con bloqueo de los m_2 AChR del NSQ-D, lo cual sugerimos que la activación de estos receptores en el NSQ-D es imprescindible para la generación de una señal neuronal necesaria para la liberación de la GnRH.

REFERENCIAS

- Abrams, P., Andersson, K.-E., Buccafusco, J.J., Chapple, C., Groat, W.C., Fryer, A.D., Kay, G., Laties, A., Nathanson, N.M., Pasricha, P.J., Wein, A.J., 2006. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br. J. Pharmacol.* 148, 565–578. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706780>
- Anderson, L., 1996. Intracellular mechanisms triggering gonadotrophin secretion. *Rev. Reprod.* 1, 193–202. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0010193>
- Ando, H., 2016. Gonadotropin-Releasing Hormone, in: *Handbook of Hormones*. Elsevier, pp. 31-e3-6. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00003-9>
- Arce, V.M., Catalina, P.F., Mallo, F., Santiago de Compostela, Universidade, Vigo, Universidade, 2006. *Endocrinología*. Universidade. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico ; Universidade de Vigo, Santiago de Compostela]; [Vigo.
- Aronstam, R.S., Patil, P., 2009. Muscarinic Receptors: Autonomic Neurons, in: *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier, pp. 1141–1149. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00692-6>
- Arteaga-López, P.R., Domínguez, R., Cerbón, M.A., Mendoza-Rodríguez, C.A., Cruz, M.E., 2003. Differential mRNA Expression of Alpha and Beta Estrogen Receptor Isoforms and GnRH in the Left and Right Side of the Preoptic and Anterior Hypothalamic Area During the Estrous Cycle of the Rat. *Endocrine* 21, 251–260. <https://doi.org/10.1385/ENDO:21:3:251>
- Ascoli, M., Narayan, P., 2014. The Gonadotropin Hormones and Their Receptors*, in: *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*. Elsevier, pp. 27-44.e8. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2758-2.00002-0>
- Barahona, M., Olivos, 2015. Sistema nervioso autónomo: fármacos antagonistas muscarínicos, in: *Introducción. Historia de la farmacología*. Pamamericana, Madrid, pp. 133–144.
- Barrett, K., Barman, S., 2012. Neurotransmisores y neuromoduladores, in: *Ganong Fisiología Médica*. Mc Graw Hill, México, pp. 135–154.
- Barrett, K.E., Ganong, W.F., 2015. *Ganong fisiología médica*. McGraw Hill Interamericana, México.
- Barrett, K.E., Ganong, W.F., 2010. *Ganong fisiología médica*. McGraw Hill Interamericana, México.
- Bédécarrats, G.Y., Kaiser, U.B., 2003. Differential Regulation of Gonadotropin Subunit Gene Promoter Activity by Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in Perfused LβT2 Cells: Role of GnRH Receptor Concentration. *Endocrinology* 144, 1802–1811. <https://doi.org/10.1210/en.2002-221140>
- Beymer, M., Henningsen, J., Bahougne, T., Simonneaux, V., 2016. The role of kisspeptin and RFRP in the circadian control of female reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 438, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.026>
- Bina, K.G., Rusak, B., Semba, K., 1993. Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *J. Comp. Neurol.* 335, 295–307. <https://doi.org/10.1002/cne.903350212>
- Binder, A.K., Winuthayanon, W., Hewitt, S.C., Couse, J.F., Korach, K.S., 2015. Steroid Receptors in the Uterus and Ovary, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 1099–1193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00025-9>
- Botella, J., 1995. Los mecanismos de la ovulación., in: *El Ovario: Fisiología y Patología*. Díaz y Santos, España, pp. 141–162.
- Bousfield, G., Jia, L., Ward, D., 2006. Gonadotropins Chemistry and Biosynthesis, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 1581–1634. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50035-X>
- Bulun, S.E., 2011. Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis, in: *Williams Textbook of Endocrinology*. Elsevier, pp. 581–660. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0324-5.00017-1>

- Burger, L.L., 2004. Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 559–584. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01600>
- Bustamante, E., 2007. El sistema nervioso: desde las neuronas hasta el cerebro humano. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Butler, M.P., Karatsoreos, I., Kriegsfeld, L.J., Silver, R., 2017. Circadian Regulation of Endocrine Functions, in: *Hormones, Brain and Behavior*. Elsevier, pp. 345–369. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00012-2>
- Bylund, D.B., 2016. Acetylcholine, in: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.98842-1>
- Campbell, N.A., Urry, L., Reece, J.B., 2010. *Biología. Médica Panamericana*, Madrid.
- Campbell, R.E., 2007. Defining the Gonadotrophin-Releasing Hormone Neuronal Network: Transgenic Approaches to Understanding Neurocircuitry. *J. Neuroendocrinol.* 19, 561–573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01561.x>
- Cardinali, D.P., 2007a. *Neurociencia aplicada: sus fundamentos*. Médica Panamericana, Madrid.
- Cardinali, D.P., 2007b. Las bases de la emocionalidad ; regulación neural de las funciones vegetativas, in: *Neurociencia aplicada: sus fundamentos*. Médica Panamericana, Buenos Aires; Madrid, pp. 295–404.
- Casabiell, X., 2006. Eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, in: . . *Endocrinología*. Universidad de Santiago de Compostela, España, pp. 95–101.
- Clark, A.L., Mitchelson, F., 1976. The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptor. *Br. J. Pharmacol.* 58, 323–331. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1976.tb07708.x>
- Clarke, I.J., Tilbrook, A.J., 2009a. Gonadotropin, Neural and Hormonal Control, in: *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier, pp. 959–965. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01165-7>
- Clarke, I.J., Tilbrook, A.J., 2009b. Gonadotropin, Neural and Hormonal Control, in: *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier, pp. 959–965. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01165-7>
- Clarke, Z., 2007. Methoctramine, in: *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, pp. 1–3. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62150-6>
- Clarkson, J., Herbison, A.E., 2006. Postnatal Development of Kisspeptin Neurons in Mouse Hypothalamus; Sexual Dimorphism and Projections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology* 147, 5817–5825. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0787>
- Clemetson, C.A.B., Verma, U.L., De Carlo, S.J., 1977. Secretion and reabsorption of uterine luminal fluid in rats. *Reproduction* 49, 183–187. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0490183>
- Coomans, C.P., Ramkisoensing, A., Meijer, J.H., 2015. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Front. Neuroendocrinol.* 37, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.002>
- Córdova, A., 2003. *Fisiología Dinámica*. Masson, España.
- Corona, A., Zavaleta, Y., Caba, M., 2008. Vías de sincronización Fóptica y fisiología del núcleo supraquiasmático, in: *Bases celulares y moleculares de los ritmos biológicos. : Universidad Veracruzana : Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas*, Xalapa, Ver.
- Costanzo, L.S., 2014. *Fisiología*. Elsevier Health Sciences Spain, London.
- Coveñas, R., Sánchez, M.L., 2014. *Neuropéptidos: y eso para qué sirve?*
- Crossman, A.R., Neary, D., 2011. *Neuroanatomía: texto y atlas en color*. Elsevier Masson, Barcelona, etc.
- Cruz, M.E., Castro, J., Domínguez, R., 1992. A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J. Endocrinol.* 133, 205–210.
- Cruz, M.E., Flores, A., Alvarado, B.E., Hernández, C.G., Zárata, A., Chavira, R., Cárdenas, M., Arrieta-Cruz, I., Gutiérrez-Juárez, R., 2015. Ovulation requires the activation on proestrus of M₁ muscarinic receptors in the left ovary. *Endocrine* 49, 809–819. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0524-3>
- Cruz, M.E., Flores, A., Domínguez, R., 2014. The cholinergic system of the preoptic-anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way. *Endocrine* 47, 913–922. <https://doi.org/10.1007/s12020-014-0266-2>
- Cruz, M.E., Flores, A., Domínguez, R., 2009. Los receptores muscarínicos del area preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) regulan de manera asimétrica el feedback estimulante de los estrogénos sobre la ovulación. *Biol. Res., LII reunión anual de la sociedad de biología de Chile* 42, R-191.

- Cruz, M.E., Flores, A., Palafox, M.T., Meléndez, G., Rodríguez, J.O., Chavira, R., Domínguez, R., 2006. The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 4, 43. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-43>
- Cruz, M.E., Jaramillo, L.P., Domínguez, R., 1989. Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J. Endocrinol.* 123, 437–439.
- Cruz, M.E., Morán, JoséL., Jaramillo, L.P., Domínguez, R., 1990. Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 24, 739–742. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90132-J](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90132-J)
- Cruz, M.E., Villegas, G., Domínguez-González, A., Chavira, R., Domínguez, R., 2001. Ovulation delay induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior-hypothalamic area of the rat. *Brain Res. Bull.* 54, 339–344.
- Cummings, J.L., 2000. Cholinesterase Inhibitors: A New Class of Psychotropic Compounds. *Am. J. Psychiatry* 157, 4–15. <https://doi.org/10.1176/ajp.157.1.4>
- Cunha, G.R., Cooke, P.S., Kurita, T., 2004. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 417–434. <https://doi.org/10.1679/aohc.67.417>
- d'Anglemont, X., Colledge, W.H., 2010. The Role of Kisspeptin Signaling in Reproduction. *Physiology* 25, 207–217. <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2010>
- Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Ellis, T.R., Marshall, J.C., 1989. The Frequency of Gonadotropin-Releasing-Hormone Stimulation Differentially Regulates Gonadotropin Subunit Messenger Ribonucleic Acid Expression*. *Endocrinology* 125, 917–923. <https://doi.org/10.1210/endo-125-2-917>
- De la Cruz, R., 1998. Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. *Rev. Enseñ. Univ.* 545–554.
- de la Iglesia, H.O., Schwartz, W.J., 2006. Minireview: Timely Ovulation: Circadian Regulation of the Female Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis. *Endocrinology* 147, 1148–1153. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1311>
- Defilló, Bernardo, 1984. *Farmacología médica*. Instituto Tecnológico de Santo Domingo, Santo Domingo, R.D.
- Delgado, A., Minguillón Llombart, C., Joglar Tamargo, J., 2008. *Introducción a la química terapéutica*. Díaz de Santos, Madrid.
- Devlin, T.M., 2008. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. Reverté, Barcelona, etc.
- Domanski, E., Przekop, F., Polkowska, J., 1980. Hypothalamic centres involved in the control of gonadotrophin secretion. *Reproduction* 58, 493–499. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0580493>
- Domínguez, R., 1997. Endocrinología de las gónadas, in: *Actualización En Fisiología*. Presented at the Curso Internacional Pre-congreso, SMCF y PUIS-UNAM, México, pp. 271–279.
- Domínguez, R., 1993. Las secreciones periódicas y la regulación de la ovulación, in: *Comunicación neuroendocrina. Bases celulares y moleculares*. pp. 251–257.
- Domínguez, R., 1991. La regulación del crecimiento y desarrollo del folículo ovárico, in: *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. Porrúa, México, D.F., pp. 163–188.
- Domínguez, R., Cruz, M.E., Chavez, R., 1989. Differences in the Ovulatory Ability Between the Right and Left Ovary Are Related to Ovarian Innervation, in: Hirshfield, A.N. (Ed.), *Growth Factors and the Ovary*. Springer US, Boston, MA, pp. 321–325. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5688-2_39
- Domínguez, R., Cruz-Morales, S., 2012. The Ovarian Innervation Participates in the Regulation of Ovarian Functions. *Endocrinol. Metab. Syndr.* 01. <https://doi.org/10.4172/2161-1017.S4-001>
- Domínguez, R., Morales, L., Cruz, M., 2003. Ovarian Asymmetry. *Annu. Rev. Biomed. Sci.* 5, 95–104. <https://doi.org/10.5016/1806-8774.2003v5p95>
- 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? *J. Endocrinol.* 95, 175–180. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0950175>
- Domínguez, R., Smith, E.R., 1974. Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology* 14, 212–223.
- Domínguez, R., Smith, E.R., 1971. Evidence for a daily neural event affecting ovulation in the rat. Presented at the Federación de Sociedades Americanas de Biología Experimental.

- Dowd, F.J., Abel, P.W., 2017. Pharmacodynamics, in: *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*. Elsevier, pp. 2–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39307-2.00001-1>
- English, B.A., Jones, C.K., 2012. Cholinergic Neurotransmission, in: *Primer on the Autonomic Nervous System*. Elsevier, pp. 71–74. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00014-7>
- Espey, L., Richards, J., 2006. Ovulation, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 425–474. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50016-6>
- Evans, J.A., 2016. Collective timekeeping among cells of the master circadian clock. *J. Endocrinol.* 230, R27–R49. <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0054>
- Everett, J.W., Sawyer, C.H., 1953. Estimated duration of the spontaneous activation which causes release of ovulating hormone from the rat hypophysis. *Endocrinology* 52, 83–92. <https://doi.org/10.1210/endo-52-1-83>
- Everett, J.W., Sawyer, C.H., 1950. A 24-HOUR PERIODICITY IN THE “LH-RELEASE APPARATUS” OF FEMALE RATS, DISCLOSED BY BARBITURATE SEDATION ¹. *Endocrinology* 47, 198–218. <https://doi.org/10.1210/endo-47-3-198>
- Everett, J.W., Sawyer, C.H., Markee, J.E., 1949. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 44, 234–250. <https://doi.org/10.1210/endo-44-3-234>
- Fábregues, F., Balasch, J., 2009. Foliculogénesis: papel de la FSH y LH, in: *Fundamentos de reproducción. Médica Panamericana*, Madrid, pp. 23–28.
- Feder, H.H., 1981. Estrous Cyclicity in Mammals, in: Adler, N.T. (Ed.), *Neuroendocrinology of Reproduction*. Springer US, Boston, MA, pp. 279–348. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3881-9_10
- Fernández, P., 2015. Velázquez, farmacología básica y clínica. Panamericana, Madrid.
- Fisher, S.K., Wonnacott, S., 2012. Acetylcholine, in: *Basic Neurochemistry*. Elsevier, pp. 258–282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00013-4>
- Flores, A., Meléndez, G., Palafox, M.T., Rodríguez, J.O., Barco, A.I., Chavira, R., Domínguez, R., Cruz, M.E., 2005. The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine* 28, 145–151.
- Flores, A., Rodríguez, J., Palafox, M., Meléndez, G., Barco, A., Chavira, R., Cruz, M.E., Domínguez, R., 2006. The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system. *Reprod Biol Endocrino* 4, 10. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-11>
- Fox, S.I., 2014. *Human physiology*. McGraw-Hill, México.
- Freeman, M., 2006. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 2327–2388. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50048-8>
- Funabashi, T., Mitsushima, D., Nakamura, T.J., Uemura, T., Hirahara, F., Shinohara, K., Suyama, K., Kimura, F., 2002. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator in female rats, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 165–173. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)41091-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)41091-6)
- García, J., 2007. Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos de las porciones izquierda o derecha de POA-AHA realizado en el día del diestro-2, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata (Tesis para obtener el título de Biólogo). UNAM, FES Zaragoza.
- Gerendai, I., Halász, B., 2001. Asymmetry of the Neuroendocrine System. *Physiology* 16, 92–95. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2001.16.2.92>
- Gerendai, I., Halász, B., 1997. Neuroendocrine Asymmetry. *Front. Neuroendocrinol.* 18, 354–381. <https://doi.org/10.1006/frne.1997.0154>
- Gerendai, I., Rotsztein, W., Marchetti, B., Kordon, C., Scapagnini, U., 1978. Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neurosci. Lett.* 9, 333–336. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(78\)90204-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(78)90204-5)
- Gharib, S.D., Wierman, M.E., Shupnik, M.A., Chin, W.W., 1990. Molecular Biology of the Pituitary Gonadotropins. *Endocr. Rev.* 11, 177–199. <https://doi.org/10.1210/edrv-11-1-177>
- Gillette, M.U., Tischkau, S.A., 1999. Suprachiasmatic nucleus: the brain's circadian clock. *Recent Prog. Horm. Res.* 54, 33–58; discussion 58–59.
- Goodman, A., Blengio, J.R., Rivera, B., 2007. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill, Interamericana, México D.F. (México).

- Goodman, R.L., Coolen, L.M., Lehman, M.N., 2014. Unraveling the Mechanism of Action of the GnRH Pulse Generator, in: *Cellular Endocrinology in Health and Disease*. Elsevier, pp. 133–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408134-5.00009-3>
- Gore, A.C., 2002. *GnRH: The Master Molecule of Reproduction*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3565-9>
- Gregory, K., Sexton, P., Christopoulos, A., 2007. Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Curr. Neuropharmacol.* 5, 157–167. <https://doi.org/10.2174/157015907781695946>
- Guadarrama-Ortiz, P., Ramírez-Aguilar, R., Madrid-Sánchez, A., Castillo-Rangel, C., Carrasco-Alcántara, D., Aguilar-Roblero, R., 2014. Controladores del Tiempo y el Envejecimiento: Núcleo Supraquiasmático y Glándula Pineal. *Int. J. Morphol.* 32, 409–414. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022014000200004>
- Haga, T., 2013. Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 89, 226–256. <https://doi.org/10.2183/pjab.89.226>
- Hall, J.E., Guyton, A.C., 2011. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA.
- Halvorson, L., Chin, W., 2001. Hormonas gonadotróficas: Biosíntesis , secreción, receptores y acción, in: *Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Médica Panamericana, Buenos Aires, Arg., pp. 86-.
- Hancock, J., 2007. Pilocarpine, in: *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.62420-1>
- Harris, J.A., Guglielmotti, V., Bentivoglio, M., 1996. Diencephalic Asymmetries. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20, 637–643. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0149-7634(95)00077-1)
- Hastings, M.H., Reddy, A.B., McMahon, D.G., Maywood, E.S., 2005. Analysis of circadian mechanisms in the suprachiasmatic nucleus by transgenesis and biolistic transfection. *Methods Enzymol.* 393, 579–592.
- Hayes, J., Li, S., Anwyl, R., Rowan, M.J., 2008. A role for protein kinase A and protein kinase M ζ in muscarinic acetylcholine receptor-initiated persistent synaptic enhancement in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 151, 604–612. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.016>
- Heller, B., Laiken, N., 2012. Acetylcholine and Muscarinic Receptors, in: *Primer on the Autonomic Nervous System*. Elsevier, pp. 75–78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00015-9>
- Herbison, A., 2008. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: The case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res. Rev.* 57, 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.05.006>
- Herbison, A.E., 2015. Physiology of the adult Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network., in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press, Amsterdam, pp. 339–467.
- Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M., 2006. *Fisiología animal*. Médica Panamericana, Madrid.
- Hillier, K., 2007. Atropine, in: *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier, pp. 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61267-X>
- Hoffmann, H., Mellon, P., 2018. Regulation of GnRH Gene Expression, in: *The GnRH Neuron and Its Control*. Wiley, Hoboken, NJ.
- Hoover, D.B., 2016. Carbachol, in: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99370-X>
- Humphrey, R.R., Dermody, W.C., Brink, H.O., Bousley, F.G., Schottin, N.H., Sakowski, R., Vaitkus, J.W., Veloso, H.T., Reel, J.R., 1973. Induction of Luteinizing Hormone (LH) Release and Ovulation in Rats, Hamsters, and Rabbits by Synthetic Luteinizing Hormone—Releasing Factor (LRF). *Endocrinology* 92, 1515–1526. <https://doi.org/10.1210/endo-92-5-1515>
- Hunzicker-Dunn, M., Mayo, K., 2015. Gonadotropin Signaling in the Ovary, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 895–945. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00020-X>
- Hut, R.A., Van der Zee, E.A., 2011. The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. *Behav. Brain Res.* 221, 466–480.
- Javier, C., Cortéz, G., Silva, C., Flores, A., Domínguez, R., 2018. Participación de los receptores muscarínicos-1 del núcleo supraquiasmático en la regulación de la ovulación. Presented at the Asociación de investigación en biología de la reproducción., Gda., Jalisco.

- Javier, C., Cortéz, G., Silva, C., Flores, A., Domínguez, R., 2016. Effects of blocking suprachiasmatic nucleus M1 receptors on the ovulation of the female rat. Presented at the Federation of Latin American Neuroscience Societies, Buenos Aires, Arg.
- Jeevendra, J.A., 2016. Fisiología y farmacología neuromusculares, in: Miller - Anestesia. Elsevier, España, pp. 423–443.
- Jennes, L., Ulloa-Aguirre, A., Janovick, J.A., Conn, P.M., 2017. The Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Receptor, in: Hormones, Brain and Behavior. Elsevier, pp. 363–378. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00060-2>
- Jewell, R., 2007. Gallamine, in: XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier, pp. 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61803-3>
- Jiménez, L.F., Merchant, H., 2003. Biología celular y molecular. Pearson Educación : Prentice Hall, México.
- Jones, R.E., 1991. Human reproductive biology. Academic Press, San Diego.
- Juárez, R., Miranda, A., 2016. El reloj circadiano ovárico: un secundero en la fisiología de la reproducción. *Entreciencias* 4, 147–163.
- Kaiser, U.B., 2017. Gonadotrophin Hormones, in: The Pituitary. Elsevier, pp. 203–250. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804169-7.00007-6>
- Kaiser, U.B., Jakubowiak, A., Steinberger, A., Chin, W.W., 1997. Differential Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Pulse Frequency on Gonadotropin Subunit and GnRH Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels *in Vitro*¹. *Endocrinology* 138, 1224–1231. <https://doi.org/10.1210/endo.138.3.4968>
- Katzung, B.G., Masters, S.B., Trevor, A.J., Arias Rebatet, G., 2016. Farmacología básica y clínica.
- Kiss, J., Halász, B., 1996. Synaptic contacts between cholinergic afferents and suprachiasmatic neurons of the rat. *Neuroreport* 7, 1961–1964.
- Klein, C.M., Burden, H.W., 1988. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci. Lett.* 85, 217–222. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90354-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90354-0)
- Kleinz, M.J., Spence, I., 2008. The pharmacology of the autonomic nervous system, in: Small Animal Clinical Pharmacology. Elsevier, pp. 59–82. <https://doi.org/10.1016/B978-070202858-8.50006-3>
- Knobil, E., 1988. The hypothalamic gonadotrophic hormone releasing hormone (GnRH) pulse generator in the rhesus monkey and its neuroendocrine control. *Hum. Reprod.* 3, 29–31. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136647>
- Kolb, B., Whishaw, I.Q., 2014. Neuropsicología humana. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- Koolman, J., Röhm, K.-H., 2004. Bioquímica: texto y atlas. Medica panamericana, España.
- Langmead, C.J., Watson, J., Reavill, C., 2008. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol. Ther.* 117, 232–243. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.009>
- Lebois, E.P., Thorn, C., Edgerton, J.R., Popielek, M., Xi, S., 2018. Muscarinic receptor subtype distribution in the central nervous system and relevance to aging and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* 136, 362–373. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.018>
- Levine, J.E., 2015. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat, in: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, pp. 1199–1257. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00026-0>
- Levy, M.N., Berne, R.M., Koeppen, B.M., Stanton, B.A., 2006. Berne y Levy fisiología. Elsevier, Madrid, España.
- Lodish, H., 2013. Biología celular y molecular. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Long, J.A., Evans, H., 1922. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena, *Memoirs of the University of California*. Berkeley: University of California Press, USA.
- López, E., Cruz, M.E., Domínguez, R., 1997. Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the adult rat. *Arch. Med. Res.* 28, 343–348.
- López, J., Fernández, A., 2008. Fisiología del ejercicio.
- López, J.A., 2017. Los alucinógenos. CSIC : Catarata, Madrid.
- López-Ramírez, Y.L., López-Ramírez, K., Arrieta-Cruz, I., Flores, A., Mendoza-Garcés, L., Librado-Osorio, R.A., Gutiérrez-Juárez, R., Domínguez, R., Cruz, M.E., 2017. Muscarinic Receptors Types 1 and 2 in the

- Preoptic-Anterior Hypothalamic Areas Regulate Ovulation Unequally in the Rat Oestrous Cycle. *Int. J. Endocrinol.* 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/4357080>
- Maffucci, J.A., Gore, A.C., 2009. Chapter 2 Hypothalamic Neural Systems Controlling the Female Reproductive Life Cycle, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 69–127. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)02002-9](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)02002-9)
- Marshall, G.R., 2004. LH (Luteinizing Hormone), in: *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Elsevier, pp. 171–177. <https://doi.org/10.1016/B0-12-475570-4/00816-7>
- McArdle, C.A., Roberson, M.S., 2015. Gonadotropes and Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 335–397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00010-7>
- McCartney, C.R., Marshall, J.C., 2019. Neuroendocrinology of Reproduction, in: *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*. Elsevier, pp. 3-26.e8. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2758-2.00001-9>
- Melmed, S., Kleinberg, D., Ho, K., 2011. Pituitary Physiology and Diagnostic Evaluation, in: *Williams Textbook of Endocrinology*. Elsevier, pp. 175–228. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0324-5.00008-0>
- Melo, V., Cuamatzi Tapia, Ó., Chávez Villasana, A., 2016. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Reverté, México D. F.
- Mendoza, N., 2008a. *Farmacología médica*. Medica Panamericana, México.
- Mendoza, N., 2008b. Aspectos generales de la neurotransmisión en el SNC, in: *Farmacología Médica*. México, pp. 260–278.
- Miller, S.L., Yeh, H.H., 2017. Neurotransmitters and Neurotransmission in the Developing and Adult Nervous System, in: *Conn's Translational Neuroscience*. Elsevier, pp. 49–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802381-5.00004-X>
- Montañez, E., Estévez, B., Payá, B., Molina, P., 2010. *Anticolinérgicos*, in: *Farmacología en enfermería*. Elsevier, Madrid.
- Moore, R.Y., 2013. The Suprachiasmatic Nucleus and the Circadian Timing System, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396971-2.00001-4>
- Morales, A., Ivorra, I., 2005. Unión neuromuscular, in: *Bases de La Fisiología*. Editorial Tébar, Madrid.
- Narayan, P., Ulloa-Aguirre, A., Dias, J. (Eds.), 2019. Gonadotropin Hormones and Their Receptors, in: *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. Elsevier, Philadelphia, PA, pp. 25–57.
- Naser, P.V., Kuner, R., 2018. Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. *Neuroscience* 387, 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.08.049>
- Navratil, A.M., Farmerie, T.A., Bogerd, J., Nett, T.M., Clay, C.M., 2006. Differential Impact of Intracellular Carboxyl Terminal Domains on Lipid Raft Localization of the Murine Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. *Biol. Reprod.* 74, 788–797. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.048157>
- Norris, D.O., Carr, J.A., 2013. Organization of the Mammalian Hypothalamus–Pituitary Axes, in: *Vertebrate Endocrinology*. Elsevier, pp. 93–150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394815-1.00004-5>
- Okamoto, M.T., Nobunaga, T., Suzuki, Y., 1972. Delay in Ovulation with Pentobarbital Anesthesia Applied at Various Stages of the 4-Day Cyclic Rat. *Endocrinol. Jpn.* 19, 11–17. <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.19.11>
- Ortolano, G., Haisenleder, D., Dalkin, A., Iliff-Sizemore, S., Landefeld, T., Maurer, R., Marshall, J., 1988. FOLLICLE-STIMULATING HORMONE BETA SUBUNIT MESSENGER RIBONUCLEIC ACID CONCENTRATIONS DURING THE RAT ESTROUS CYCLE. *Endocrinology* 123, 2946–2948. <https://doi.org/10.1210/endo-123-6-2946>
- Page, C.P., 1998. *Farmacología integrada*. Harcourt Brace, Madrid.
- Pak, T.R., Chung, W.C.J., 2011. Neuroendocrine Control of Gonadotropins in Mammals, in: *Hormones and Reproduction of Vertebrates*. Elsevier, pp. 25–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374928-4.10002-1>
- Palma, G.A., 2001. *Biología de la reproducción*. INTA, Argentina.
- Pangas, S.A., Rajkovic, A., 2015. Follicular Development, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 947–995. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00021-1>

- Patel, D.R., Feucht, C., 2011. Basic Concepts of Neurotransmission. *Pediatr. Clin. North Am.* 58, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2010.11.004>
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. ed. Academic Press/Elsevier, Amsterdam ; Boston.
- Pedersen, T., Peters, H., 1968. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 17, 555–557.
- Peretó, J.G., Sendra, R., Pamblanco, M., Bañó, C., 2007. *Fundamentos de bioquímica*.
- Peters, H., 1969. The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 62, 98–116.
- Pocock, G., Richards, C.D., 2005. *Fisiología humana: la base de la medicina*. Masson, Barcelona.
- Popa, S.M., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2008. The Role of Kisspeptins and GPR54 in the Neuroendocrine Regulation of Reproduction. *Annu. Rev. Physiol.* 70, 213–238. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100540>
- Prasasya, R.D., Mayo, K.E., 2019. Regulation of Follicle Formation and Development by Ovarian Signaling Pathways, in: *The Ovary*. Elsevier, pp. 23–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00002-9>
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.-S., White, L.E., Mooney, R.D., Platt, M.L., 2016. *Neurociencia*.
- Putteeraj, M., Soga, T., Ubuka, T., Parhar, I.S., 2016. A “Timed” Kiss Is Essential for Reproduction: Lessons from Mammalian Studies. *Front. Endocrinol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00121>
- Radovick, S., Levine, J.E., Wolfe, A., 2012. Estrogenic Regulation of the GnRH Neuron. *Front. Endocrinol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00052>
- Rajkovic, A., Pangas, S., Matzuk, M., 2006. Follicular Development Mouse, Sheep, and Human Models, in: *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 383–423. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50015-4>
- Ramírez, D.A., Vieyra, E., González, A.I., Morán, C., Domínguez, R., Morales-Ledesma, L., 2017. Both the Suprachiasmatic Nucleus and the Superior Ovarian Nerve Contribute to the Processes of Ovulation and Steroid Hormone Secretion on Proestrus. *Reprod. Sci.* 24, 844–855. <https://doi.org/10.1177/1933719116670307>
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2016. *Rang and Dale’s pharmacology*, Eighth edition. ed. Elsevier, Churchill Livingstone, Edinburgh?
- Reghunandan, V., Reghunandan, R., 2006. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *J. Circadian Rhythms* 4, 2. <https://doi.org/10.1186/1740-3391-4-2>
- Reghunandan, V., Reghunandan, R., Singh, P.I., 1993. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nucleus: Role in the regulation of circadian rhythms. *Prog. Neurobiol.* 41, 647–655. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(93\)90029-R](https://doi.org/10.1016/0301-0082(93)90029-R)
- Repetto, M., Repetto, G., E-libro, C., 2010. *Toxicología fundamental* (4a. ed.). Ediciones Díaz de Santos, España.
- Richards, J.S., 2018. Ovulation, in: *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier, pp. 92–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64630-5>
- Richards, J.S., Liu, Z., Shimada, M., 2015. Ovulation, in: *Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 997–1021. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00022-3>
- Richardson, 2012. *Activation to acquisition: functional aspects of the basal forebrain cholinergic system*. Birkhauser, Place of publication not identified.
- Robertson, J.L., Clifton, D.K., de la Iglesia, H.O., Steiner, R.A., Kauffman, A.S., 2009. Circadian Regulation of Kiss1 Neurons: Implications for Timing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone/Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology* 150, 3664–3671. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0247>
- Rønnekleiv, O.K., Bosch, M.A., Zhang, C., 2010. Regulation of endogenous conductances in GnRH neurons by estrogens. *Brain Res.* 1364, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.096>
- Ross, M.H., Pawlina, W., Negrete, J., 2011. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aries, Madrid.

- Russell, D.L., Robker, R.L., 2019. Ovulation: The Coordination of Intrafollicular Networks to Ensure Oocyte Release, in: *The Ovary*. Elsevier, pp. 217–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00014-5>
- Salaices, M., Alonso, M., Hernanz, R., 2009. Introducción a la farmacología del sistema nervioso autónomo, in: *Sistema Nervioso Periférico*. Panamericana, España, pp. 97–120.
- Salinas, I., Vieyra, E., Morán, C., Dominguez, R., Morales, L., 2016. El sistema colinérgico del núcleo supraquiasmático participa de manera estimulante en la ovulación espontánea. *XLI Reunión Anual AIBIR*.
- Salleh, N., Baines, D.L., Naftalin, R.J., Milligan, S.R., 2005. The Hormonal Control of Uterine Luminal Fluid Secretion and Absorption. *J. Membr. Biol.* 206, 17–28. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0770-7>
- Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., Monge-Bonilla, C., 2017. Neurotransmisión Colinérgica Central: Aspectos Moleculares. *Rev. Mex. Neurocienc.* 18, 76–87.
- Sanchez, M.A., Dominguez, R., 1995. Differential effects of unilateral lesions in the medial amygdala on spontaneous and induced ovulation. *Brain Res. Bull.* 38, 313–317. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(95\)00094-U](https://doi.org/10.1016/0361-9230(95)00094-U)
- Santana, A., 2016. Participación de los ovarios en los efectos asimétricos de la acetilcolina en POA-AHA sobre la ovulación de la rata adulta (Tesis para obtener el título de Biólogo). UNAM, FES Zaragoza.
- Schorge, J.O., 2009. *Williams Ginecología*. McGraw-Hill Interamericana, México, D.F.
- Schwartz, M.L., Merz, A.J., 2009. Capture and release of partially zipped trans-SNARE complexes on intact organelles. *J. Cell Biol.* 185, 535–549. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811082>
- Sellix, M.T., 2015. Circadian Clock Function in the Mammalian Ovary. *J. Biol. Rhythms* 30, 7–19. <https://doi.org/10.1177/0748730414554222>
- Sherwood, L., Klandorf, H., Yancey, P.H., 2013. *Animal physiology: from genes to organisms*, 2nd edition. ed. Brooks/Cole, Belmont, CA.
- Shiroma, L.O., Costa, V.P., 2015. Parasympathomimetics, in: *Glaucoma*. Elsevier, pp. 577–582. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5193-7.00056-X>
- Silva, C., Cortés, G.D., Javier, C.Y., Flores, A., Domínguez, R., 2019. "A neural circadian signal essential for ovulation is generated in the suprachiasmatic nucleus during each stage of the estrous cycle". *Exp. Physiol.* EP087942. <https://doi.org/10.1113/EP087942>
- Simonneaux, V., Bur, I., Ancel, C., Ansel, L., Klosen, P., 2012. A kiss for daily and seasonal reproduction, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 423–437. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00024-1>
- Smith, M.S., Freeman, M.E., Neill, J.D., 1975. The Control of Progesterone Secretion During the Estrous Cycle and Early Pseudopregnancy in the Rat: Prolactin, Gonadotropin and Steroid Levels Associated with Rescue of the Corpus Luteum of Pseudopregnancy ¹ ². *Endocrinology* 96, 219–226. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-219>
- Strauss, J.F., Williams, C. (Eds.), 2019. *Ovarian Life Cycle*, in: *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. Elsevier, Philadelphia, PA.
- Szabo, S., Gould, T., Manji, H., 2009. Neurotransmisores, receptores y transducción de señales y segundos mensajeros en los trastornos psiquiátricos, in: *Tratado de psicofarmacología*. Elsevier, España.
- Taylor, P., 2012. Nicotinic Receptors, in: *Primer on the Autonomic Nervous System*. Elsevier, pp. 79–82. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00016-0>
- Tena-Sempere, M., 2014. Control of the GnRH Pulse Generator, in: *Cellular Endocrinology in Health and Disease*. Elsevier, pp. 311–323. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408134-5.00019-6>
- Thompson, I.R., Kaiser, U.B., 2014. GnRH pulse frequency-dependent differential regulation of LH and FSH gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 385, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.012>
- Tsutsumi, R., Webster, N.J.G., 2009. GnRH Pulsatility, the Pituitary Response and Reproductive Dysfunction. *Endocr. J.* 56, 729–737. <https://doi.org/10.1507/endocrj.K09E-185>
- Turi, G.F., Liposits, Z., Hrabovszky, E., 2008. Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *Neurochem. Int.* 52, 723–728. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.09.001>
- van den Pol, A.N., Tsujimoto, K.L., 1985. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: Immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15, 1049–1086. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(85\)90254-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(85)90254-4)

- Van der Beek, E.M., Horvath, T.L., Wiegant, V.M., Van den Hurk, R., Buijs, R.M., 1997. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J. Comp. Neurol.* 384, 569–579. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970811\)384:4<569::aid-cne6>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970811)384:4<569::aid-cne6>3.0.co;2-0)
- van der Zee, E.A., Streefland, C., Strosberg, A.D., Schroder, H., Luiten, P.G.M., 1991. Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors in cholinceptive neurons of the suprachiasmatic region in young and aged rats. *Brain Res.* 542, 348–352.
- Vantman, B., Vega, B., 2010. Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Rev. Médica Clínica Las Condes* 21, 348–362. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70545-9](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70545-9)
- Vázquez-Palacios, G., Bonilla-Jaime, H., 2004. Nicotine acetylcholine receptors and neuropsychiatric disorders. *Rev. Neurol.* 39, 1146–1160.
- Velasco, A., Álvarez, F., 1988. Compendio de psiconeurofarmacología. Díaz de Santos, Madrid.
- Velayos, J., 2009. Medicina del sueño. Enfoque multidisciplinario. Panamericana, España.
- Vieyra, E., Ramírez, D.A., Lagunas, N., Cárdenas, M., Chavira, R., Damián-Matsumura, P., Trujillo, A., Domínguez, R., Morales-Ledesma, L., 2016. Unilaterally blocking the muscarinic receptors in the suprachiasmatic nucleus in proestrus rats prevents pre-ovulatory LH secretion and ovulation. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 14. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0168-7>
- Voet, D., Voet, J.G., 2006. Bioquímica. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires; Madrid.
- Waxman, S.G., Olivares Bari, S.M., Padilla Sierra, G.E., 2011. Neuroanatomía clínica. McGrawHill, México [etc.
- Webb, W.G., 2017. Neuronal Function in the Nervous System, in: *Neurology for the Speech-Language Pathologist*. Elsevier, pp. 74–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-10027-4.00004-X>
- Weick, R.F., Smith, E.R., Domínguez, R., Dhariwal, A.P.S., Davidson, J.M., 1971. Mechanism of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. *Endocrinology* 88, 293–301.
- Westfall, T., Westfall, D., 2011. Neurotransmisión. Sistemas nerviosos autónomo y motor somático., in: Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill, Interamericana, México D.F. (México).
- Westfall, T., Westfall, D., 2007. Neurotransmisión. Sistemas nerviosos autónomo y motor somático., in: Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill, Interamericana, México D.F. (México), pp. 137-.
- Wevers, A., 2011. Localisation of pre- and postsynaptic cholinergic markers in the human brain. *Behav. Brain Res.* 221, 341–355. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.02.025>
- Williams III, W.P., Kriegsfeld, L.J., 2012. Circadian Control of Neuroendocrine Circuits Regulating Female Reproductive Function. *Front. Endocrinol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00060>
- Williams, W.P., Jarjisian, S.G., Mikkelsen, J.D., Kriegsfeld, L.J., 2011. Circadian Control of Kisspeptin and a Gated GnRH Response Mediate the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology* 152, 595–606. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0943>
- Wilmore, J.H., Costill, D.L., 2010. Fisiología del esfuerzo y del deporte. Paidotribo, Badalona.
- Yang, J.-J., Wang, Y.-T., Cheng, P.-C., Kuo, Y.-J., Huang, R.-C., 2010. Cholinergic Modulation of Neuronal Excitability in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *J. Neurophysiol.* 103, 1397–1409. <https://doi.org/10.1152/jn.00877.2009>
- Zhang, W., Basile, A.S., Gomeza, J., Volpicelli, L.A., Levey, A.I., Wess, J., 2002. Characterization of central inhibitory muscarinic autoreceptors by the use of muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1709–1717.
- Zipitúa, D., Riboni, L., Domínguez, R., 1980. Bloqueo de la ovulación provocado por la administración de atropina en diferentes etapas del ciclo estral de la rata.
- Zucker, R.S., Kullmann, D.M., Kaeser, P.S., 2014. Release of Neurotransmitters, in: *From Molecules to Networks*. Elsevier, pp. 443–488. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397179-1.00015-4>



XLIV

≡ REUNIÓN ANUAL AIBIR ≡

ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN



Hotel Misión de los Ángeles
Oaxaca, Oax.

26-29 Mayo del 2019



20.- EFECTO DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS M2 DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO DERECHO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN. Gutiérrez Estrada MI^{1,2}, Silva Méndez CC², Cruz Beltrán ME³, Flores Ramírez A⁴, Jiménez Anguiano A^{1,5}, Domínguez Casala R^{1,2}. ¹Maestría en Biología de la Reproducción Animal CBS, UAM. ²Laboratorio de Cronobiología de la Reproducción, ³Neuroendocrinología y ⁴Biología del Desarrollo de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES Zaragoza, UNAM. ⁵Área de Neurociencias, Depto. de Biología de la Reproducción, UAM-Iztapalapa.

La ovulación es un proceso regulado por señales neuroendocrinas entre las que participa el sistema muscarínico. El núcleo supraquiasmático (SCN) recibe inervación colinérgica y regula la secreción de la hormona luteinizante (LH). El bloqueo del sistema colinérgico mediante la inyección subcutánea de sulfato de atropina a las 8:00, 13:00 o 14:00 horas del proestro bloquea la ovulación. La microinyección unilateral de atropina en el SCN a las 9:00 horas del proestro, resultó en el bloqueo de la liberación de LH y de la ovulación. La falta de ovulación en respuesta al bloqueo de los receptores M1 del SCN varía durante el ciclo estral. En este estudio se analizaron los efectos del bloqueo de los receptores M2 del SCN en la etapa del diestro-2 y proestro sobre la ovulación. Se utilizaron ratas hembras, adultas y cíclicas de la cepa CIIZ-V mantenidas en un fotoperiodo $LD=14:10$ con agua y alimento *ad libitum*. Se les insertó una cánula guía dirigida hacia el SCN-D (derecho). Después de su recuperación y de presentar tres ciclos estrales consecutivos de 4 días, a las 07:00 horas del diestro-2 o del proestro, fueron microinyectadas con una solución de trietioduro de galamina disuelta en 0.3 μ L de solución salina, a una concentración de 26 nmol o con solución vehículo. Los animales fueron sacrificados a las 09.00 horas del estro predicho. En la autopsia se cuantificó el número de ovocitos liberados y la tasa de animales ovulantes (TAO). La inserción de la cánula o la microinyección del vehículo no modificaron la TAO, ni el número de ovocitos liberados. La microinyección de galamina en el diestro-2 no modificó la tasa ovulatoria con respecto al grupo vehículo (3/5 vs. 5/6, $p=0.5455$), mientras que el tratamiento en proestro resultó en el bloqueo de la ovulación (2/9 vs. 6/8, $p<0.05$). Con base en los resultados sugerimos que a las 7:00 horas del día del proestro, se requiere de la unión de la acetilcolina a los receptores M2 del SCN-D para que se produzca la ovulación.

Financiado por CONACyT 236908

Categoría del primer autor: M

LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN A.C.



**OTORGA LA PRESENTE
CONSTANCIA A**

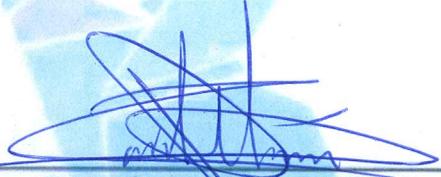
Mónica Ingrid Gutiérrez Estrada

Por la presentación del trabajo en cartel:

**EFFECTO DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS M2 DEL NÚCLEO
SUPRAQUIASMÁTICO DERECHO SOBRE LA REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN
durante la XLIV Reunión Anual del AIBIR que se llevó a cabo del
26-29 de mayo del 2019. Oaxaca, Oax.**



**Dra. Angélica Trujillo Hernández
PRESIDENTE**



**Dra. Carolina Morán Raya
SECRETARIA**



LXII CONGRESO NACIONAL
DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO

QUERÉTARO 2019 DEL 11 AL 15
DE AGOSTO



TEMAS

- Biofísica
- Biología Celular y Bioquímica
Cardiovascular y Sistema Muscular
- Desarrollo
- Endocrinología y Homeostasis
- Farmacología
- Genómica
- Inmunología y Hematología
- Métodos, técnicas e instrumentación
- Morfología
- Neurociencias
- Nutrición, metabolismo y obesidad
- Sueño y Ritmos Biológicos
- Patología Humana



COMITÉ ORGANIZADOR/
MESA DIRECTIVA:

DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
Presidente
DR. DANIEL ORTUÑO SAHAGÚN
Vicepresidente
DRA. MA. DEL CARMEN CORTÉS SÁNCHEZ
Secretaria
DRA. CONSUELO MORGADO-VALLE
Tesorera

Informes e inscripciones:

www.smcf.org.mx

Dudas y aclaraciones:

smcf.congreso@gmail.com

Fecha límite para la recepción de trabajos

Con cuota de descuento: al 30 de abril de 2019

Con cuota extemporánea: del 1° al 15 de mayo de 2019

SEDES:

Universidad Autónoma de Querétaro

Cerro de las Campanas,
Centro Universitario
76010 Santiago de Querétaro, Qro.

Hotel Fiesta Inn

Querétaro

Av. 5 de Febrero No 108
Col. Niños Héroes
76010 Querétaro, Qro.





CMa-90

¿Los receptores muscarínicos M2 del núcleo supraquiasmático participan en la regulación de la ovulación?

Gutiérrez Estrada Mónica Ingrid^{1,2,4} (estudiante de posgrado), Flores Ramírez Angélica², Cruz Beltrán María Esther³, Silva Méndez Carlos Camilo⁴, Jiménez Anguiano Anabel^{1,5}, Domínguez Casalá Roberto^{2,4}.

¹Maestría en Biología de la Reproducción Animal CBS, UAM.

²Laboratorio de Biología del Desarrollo,

³Neuroendocrinología y

⁴Cronobiología de la Reproducción y de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. FES Zaragoza, UNAM.

⁵Área de Neurociencias, Depto. de Biología de la Reproducción, UAM-Iztapalapa.

El núcleo supraquiasmático (SCN) regula la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la ovulación. La inervación colinérgica que recibe el SCN participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación. Los efectos de la inyección de sulfato de atropina sobre la ovulación varían en función del ciclo estral y de la hora del día. A las 9:00 horas del proestro la microinyección unilateral de atropina en el SCN bloqueó la liberación de LH y la ovulación. En este estudio, se analizó los efectos del bloqueo de los receptores M2 del SCN-D en la etapa del estro y diestro-1 sobre la ovulación. Se utilizaron ratas hembras, adultas y cíclicas de la cepa CIIZ-V mantenidas en un fotoperiodo LD=14:10 con agua y alimento *ad libitum*. Se les insertó una cánula guía dirigida hacia el SCN-D (derecho). Después de su recuperación y de presentar tres ciclos estrales consecutivos de 4 días, a las 07:00 horas del estro o del diestro-1, fueron microinyectadas con una solución de *trietioduro de galamina* (26 nmoL) disuelta en 0.3 µL de solución salina o con solución vehículo. Los animales fueron sacrificados a las 09.00 horas del estro esperado. En la autopsia se cuantificó el número de ovocitos liberados y la tasa de animales ovulantes (TAO). La inserción de la cánula o la microinyección del vehículo no modificaron los parámetros analizados. La microinyección de *galamina* en la etapa de estro o diestro-1 no modificaron ni la TAO, ni el número de ovocitos liberados con respecto al grupo vehículo. Con base en los resultados se sugiere que a las 7:00 horas en las primeras etapas del ciclo estral, los receptores M2 del SCN-D no participan en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación a diferencia de lo que sucede en el proestro. Financiado por CONACyT 236908



LXII CONGRESO NACIONAL
SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C



OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

Mónica I. Gutiérrez Estrada

QUIEN ASISTIÓ Y PRESENTÓ EL TRABAJO:

¿Los receptores muscarínicos M2 del núcleo supraquiasmático
participan en la regulación de la ovulación?

POR:

Gutiérrez Estrada Mónica Ingrid, Flores Ramírez Angélica, Cruz Beltrán María Esther,
Silva Méndez Carlos Camilo, Jiménez Anguiano Anabel, Domínguez Casalá Roberto

En la modalidad de cartel durante el LXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana
de Ciencias Fisiológicas, A. C. del 11 al 15 de agosto del 2019 en la Ciudad de Querétaro, Qro.

Dr. Benjamín Florán Garduño
Presidente de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Rectora de la Universidad Autónoma de Querétaro