

37  
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

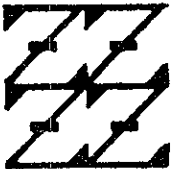
EFFECTOS DE LA ADMINISTRACION DE SULFATO  
DE ATROPINA EN EL DIA DEL DIESTRO 1, SOBRE  
LAS CONCENTRACIONES DE MONOAMINAS EN  
POA-AHA Y DE GONADOTROPINAS Y HORMONAS  
OVARICAS EN SANGRE

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :

**GERARDO VILLEGAS MORENO**

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES  
DE NUESTRA ESPECIE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA ESTHER CRUZ BELTRAN.

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

258079



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ ZARAGOZA “

EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SULFATO DE ATROPINA EN EL DÍA DEL DIESTRO 1,  
SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE MONOAMINAS EN POA-AHA Y DE GONADOTROPINAS  
Y HORMONAS OVÁRICAS EN SANGRE

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta: Gerardo Villegas Moreno

Directora de tesis: Dra. María Esther Cruz Beltrán

Esta tesis fue realizada en: Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Laboratorio de  
Neuroendocrinología

---

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA (proyectos: IN 208996,  
IN 208796) y del Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM

Dedicatorias:

A la memoria de mi abuela, Enedina Acevedo†

A mi abuelo, Cruz Moreno, por enseñarme a caminar por la vida

A mi madre, Maria de la Paz, quien ha sido y será siempre motivo de superación

A mis hermanos, Sergio Humberto y Hugo Rafael, porque siempre puedo contar con ellos

Agradecimientos:

Muy especialmente, a la Dra. María Esther Cruz Beltrán por su acertada dirección y ayuda brindada en la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado:

Dra. Maria Elena Ayala Escobar  
M en IBSH Angélica Flores Ramírez  
Dra. María Esther Cruz Beltrán  
Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano  
Biol. Alejandro Domínguez González

Por sus valiosas sugerencias e interés mostrado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá, por haber creado la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

A todos mis compañeros y amigos, de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por su amistad y apoyo brindado.

## INDICE

Contenido	página
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
2. Marco teórico.....	4
3. Ciclo estral.....	12
4. Sistema colinérgico en el sistema nervioso central.....	14
5. Planteamiento del problema.....	18
6. Hipótesis.....	19
7. Objetivo general.....	19
8. Objetivos particulares.....	19
9. Materiales y métodos.....	20
10. Resultados.....	23
11. Discusión de los resultados.....	37
12. Conclusiones.....	46
13. Bibliografía.....	47
14. Apéndice.....	60

## RESUMEN

El propósito de esta tesis fue estudiar si el papel estimulante del sistema colinérgico en la secreción de gonadotropinas y la ovulación, ocurre por intermedio del sistema monoaminérgico del área preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA), así como analizar los cambios en las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas, de  $17\beta$ -estradiol y de progesterona hasta el día de la ovulación, en animales con bloqueo del sistema colinérgico en el día del diestro-1.

Se utilizaron ratas hembras adultas, cíclicas, inyectadas a las 13:00 h del día del diestro-1 con solución salina (500  $\mu$ l) o sulfato de atropina (antagonista colinérgico) (100 mg/kg peso); sacrificadas en la mañana y en la tarde de cada día del ciclo estral, hasta el día de la ovulación.

La inyección de sulfato de atropina bloqueó la ovulación en el 100% de los animales sacrificados en la mañana del estro, en el 72% de los autopsiados en la tarde de este día y en el 43% de los sacrificados en la mañana del diestro-1.

Una hora después de haber inyectado el sulfato de atropina, aumentaron las concentraciones plasmáticas de  $17\beta$ -estradiol y progesterona, así como las actividades de las neuronas dopaminérgica y serotoninérgica de POA-AHA. En la mañana del segundo día de diestro, 22 h después de la inyección del fármaco, se observó un aumento en la actividad de la neurona dopaminérgica, seguido del retraso del "pico" preovulatorio de  $17\beta$ -estradiol hasta la tarde del estro.

En el grupo de animales inyectados con el fármaco, los "picos" preovulatorios de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), que normalmente suceden en la tarde del proestro, también fueron retrasados hasta la tarde del día del estro.

El bloqueo de los receptores muscarínicos por la inyección de sulfato de atropina en la tarde del diestro-1 estimula la secreción de  $17\beta$ -estradiol y de progesterona por el ovario, efectos

que parecen provocar el aumento de la actividad de la neurona dopaminérgica de POA-AHA veintiún horas después.

Este hecho podría ser la causa de que los animales tratados con el sulfato de atropina, ovulen alrededor de veinticuatro horas después de lo esperado; ya que los "picos" preovulatorios de estrógenos y de las gonadotropinas se presentan con un retraso de aproximadamente veinticuatro horas.

Estos resultados nos permiten sugerir que el papel estimulante del sistema colinérgico en la secreción de gonadotropinas y la ovulación, se realiza por intermedio del sistema dopaminérgico que se encuentra en POA-AHA.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las funciones del ovario están reguladas por “señales” neuroendócrinas que comunican al sistema nervioso central (áreas extrahipotalámicas e hipotalámicas), con la hipófisis, y ambas estructuras con la gónada. Estas “señales” ocurren en forma secuencial y de manera sincrónica, fenómeno que denominaremos “cascada” de eventos neuroendócrinos, cuyo resultado es la ovulación (30).

Las neuronas localizadas en la parte frontal del hipotálamo secretan un decapeptido llamado hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), la cual es liberada en los vasos sanguíneos del sistema porta hipofisiario que irriga a la hipófisis. En la adenohipófisis, la GnRH estimula la síntesis y la liberación de dos gonadotropinas: la hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) (30, 32, 78).

En los ovarios estas hormonas estimulan, por un lado, el crecimiento y la diferenciación de los folículos, además de la expulsión del ovocito (proceso conocido como ovulación) y por el otro, la producción de hormonas esteroides (estradiol, estrona y progesterona), las cuales estimulan o inhiben, dependiendo de la hora y día del ciclo estral, la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas (19, 32).

Además de las hormonas esteroides sexuales, la secreción de la GnRH es regulada por neurotransmisores clásicos, péptidos y aminoácidos entre otros. Uno de los sistemas de neurotransmisión que participa en este fenómeno de “cascada” es el sistema colinérgico. Desde la década de los cuarenta, Everett y colaboradores (26) mostraron el papel estimulante del sistema colinérgico en la ovulación. En la rata, el bloqueo de los receptores muscarínicos (por la inyección subcutánea de sulfato de atropina) en la tarde del día del diestro-1, retrasa la ovulación por veinticuatro horas (17).

Uno de los propósitos de esta tesis fue dar respuesta a la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las modificaciones en la concentración plasmática de gonadotropinas, estrógenos y progesterona

que ocurren después de la inyección del sulfato de atropina y que provocan que la ovulación se retrase por veinticuatro horas?

Desconocemos si el sistema colinérgico aferente a POA-AHA tiene conexión directa con la neurona GnRHérgica, por lo que el papel estimulante del sistema colinérgico podría tener una vinculación funcional con algunas de las neuronas del sistema monoaminérgico de POA-AHA que interactúan con la neurona GnRHérgica. Por tanto, el segundo propósito de este trabajo fue investigar, si el sistema colinérgico y el sistema monoaminérgico que se encuentran en POA-AHA, participan de manera conjunta en la regulación de secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 EL CONTROL NEUROENDÓCRINO DE LA OVULACIÓN

#### 2.1.1 La “Señal” Ovárica

Los ovarios están formados por los folículos (unidad anátomo-funcional de la gónada), los cuerpos lúteos y la glándula intersticial; sus funciones principales son la de liberar al ovocito I capaz de ser fecundado y secretar las hormonas sexuales que estimulan el crecimiento y la diferenciación de los órganos del aparato reproductor, así como la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas (19).

Para que un folículo sea considerado maduro, transcurren alrededor de 19 días desde que pasa del estado de “reposo” hasta que culmina en la ovulación. Durante su desarrollo atraviesa por las siguientes etapas: folículo primordial, folículo secundario, folículo terciario, folículo maduro o de De Graaf (19, 32, 41). El proceso de maduración del folículo es estimulado por las gonadotropinas, las hormonas esteroideas y factores de crecimiento (36, 89).

El folículo maduro está constituido por las siguientes estructuras: el ovocito (rodeado por la zona pelúcida), unido a la capa de células de la granulosa por el *cumulus oophorus*, el antro folicular, la membrana basal y por fuera de ella, las células de la teca interna y de la teca externa. Con base en la clasificación propuesta por Hirshfiel (41), el antro puede observarse desde la etapa de folículo secundario; en el antro se encuentran los nutrimentos y sustancias necesarias para el crecimiento y diferenciación del ovocito (36).

Cuando el folículo expulsa al ovocito al momento de la ovulación, el ovocito I se transforma en ovocito II por estímulo de la LH completándose la profase de la segunda división meiótica (51, 83). Si el ovocito no es fecundado, el folículo se transforma en el cuerpo lúteo, que es la principal fuente de progesterona. En la rata, el cuerpo lúteo permanece activo entre 12 y 14 días después de la ovulación (19, 32).

El último componente del ovario es la glándula intersticial, la cual se desarrolla a partir de las células de la teca interna de los folículos atrésicos y del estroma ovárico (19).

Las células de la teca interna sintetizan andrógenos a partir del colesterol obtenido en la dieta, por estímulo de la hormona luteinizante (LH), mientras que en las células de la granulosa, los andrógenos son aromatizados a estrógenos ( $17\beta$ -estradiol y estrona) por estímulo de la hormona folículo estimulante (FSH) al regular la actividad de la enzima aromatasa (19, 83).

En el antro del folículo preovulatorio o De Graff, las concentraciones de estrógenos son mayores que en la sangre, el paso de éstos hacia el torrente sanguíneo provoca que su concentración alcance un valor máximo fenómeno conocido como secreción preovulatoria o "pico" de estrógenos, evento al que se le ha denominado "señal" ovárica (30).

## 2.1.2 La "Señal" Hipotalámica

La "señal" ovárica generada por las hormonas esteroides estimula la secreción preovulatoria de la GnRH, péptido sintetizado por las neuronas GnRHérgicas. Estas neuronas se localizan en diferentes regiones del sistema nervioso central formando redes extensas y difusas. La red más importante por su participación directa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, está constituida por neuronas GnRHérgicas que forman un continuo desde la banda diagonal de Broca hasta el área septal (que incluye a los núcleos septal triangular y medial), el núcleo de la estria terminal y las áreas diencefálicas (que abarca a los núcleos periventricular, preóptico medial y lateral, hipotalámico anterior y la zona retroquiasmática). También forman parte de este continuo grupos de neuronas GnRHérgicas del hipotálamo lateral y del núcleo supraóptico. Las neuronas GnRHérgicas proyectan sus terminales nerviosas hacia la eminencia media por las rutas septo-preóptica-infundibular y septo-preóptica (78) (Figura 1).

En la rata, se ha mostrado que desde la mañana hasta el mediodía del proestro, la síntesis de la GnRH aumenta considerablemente en los núcleos hipotalámicos que se encuentran a lo largo de la vía preóptico-supraquiasmático-tuberoinfundibular y disminuye al momento en que ocurre la secreción preovulatoria de la LH (alrededor de las 15:00 h), debido a su liberación por las terminales GnRHérgicas que se localizan en la eminencia media (32).

La secreción de la GnRH es pulsátil, la amplitud y la frecuencia de los pulsos de secreción dependen del ambiente hormonal que rodea a las neuronas GnRHérgicas (8).

La síntesis y la liberación de la GnRH está modulada por las hormonas esteroides (estrógenos y progesterona), péptidos (neuropéptido Y [NPY], ácido gama amino butírico [GABA], sustancia P, péptido intestinal vasoactivo [VIP], opiáceos [endorfinas y encefalinas], colecistoquinina, angiotensina II, neurotensina, oxitocina [OT], histamina y galanina), neurotransmisores clásicos (adrenalina [A], noradrenalina [NA], dopamina [DA], serotonina [5-HT] y acetilcolina [ACh]) y por aminoácidos (glutamato, aspartato) (8, 11, 12, 32, 49).

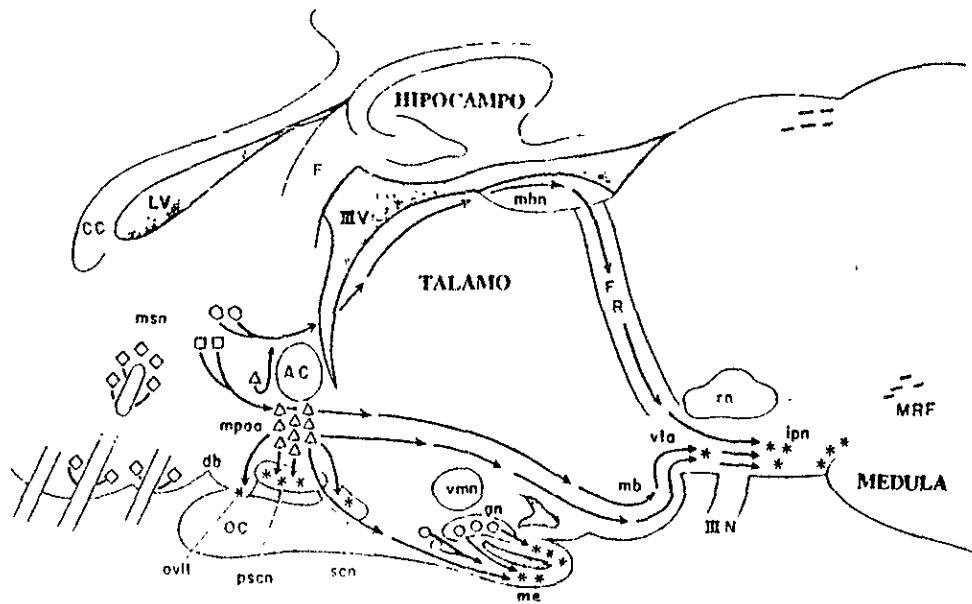


Figura 1: Localización de las neuronas GnRHérgicas y sus principales proyecciones. Corte sagital del cerebro de cuyo que muestra la localización de los diferentes grupos de neuronas GnRHérgicas (representadas por símbolos geométricos), la dirección de sus fibras (indicadas por flechas) y las terminales nerviosas (simbolizadas con asteriscos). AC: comisura anterior; an: núcleo arcuato; CC: cuerpo calloso; db: banda diagonal de Broca; F: Fornix; FR: fascículo retroflexo; ipn: núcleo interpeduncular; LV: ventrículo lateral; mb: cuerpos mamilares; me: eminencia media; mhn: habénula medial; mpoa: área preóptica medial; msn: septo medial; OC: quíasma óptico; ovlt: órgano vasculoso de la lámina terminal; psn: núcleo supraquiasmático preóptico; rn: núcleo rojo; scn: núcleo supraquiasmático; vmn: núcleo ventromedial; vta: área tegmental ventral; III V: tercer ventrículo; III N: nervio oculomotor (Tomado de 78).

En el hipotálamo los estrógenos estimulan la secreción de la GnRH; sin embargo, en la rata (76) y en la oveja (46) las neuronas GnRHérgicas del área preóptica no tienen receptores a estrógenos, por lo que se ha sugerido que los estrógenos regulan la actividad de las neuronas GnRHérgicas por medio de interneuronas que se localizan en dicha área (49).

Estudios *in vitro* utilizando el hipotálamo medio basal de ratas en proestro, muestran que la progesterona estimula la liberación de la GnRH por efectos directos sobre la membrana de la terminal GnRHérgica (23).

Se ha propuesto que la noradrenalina participa en la liberación de la GnRH y la secreción de las gonadotropinas. En el área preóptica-hipotalámica anterior no se ha descrito la existencia de somas noradrenérgicas sino sólo terminales. Las terminales noradrenérgicas que inervan POA-AHA, provienen casi exclusivamente de los cuerpos celulares A1 y A2 (14), localizados en la parte caudal del bulbo raquídeo (células A1) y en la parte caudal del núcleo del tracto solitario (células A2). Las fibras de estas neuronas se proyectan al hipotálamo por diferentes vías. La principal proyección hacia el hipotálamo es por la vía ventral (13).

En la rata durante el proestro, la tasa de recambio de noradrenalina aumenta en el área preóptica, el núcleo arcuato, el núcleo supraquiasmático y la eminencia media al tiempo que ocurre la secreción preovulatoria de LH, por lo que se le atribuye a la noradrenalina un papel estimulante en la regulación de secreción de esta hormona (32, 66).

La noradrenalina parece tener tanto un efecto inhibitorio como estimulante en la liberación pulsátil de la LH. En la rata ovariectomizada, la infusión de noradrenalina en el tercer ventrículo, inhibe la liberación pulsátil de LH (33, 34); en una rata cíclica en el día del proestro, la estimulación de los cuerpos noradrenérgicos localizados en el locus coeruleus tiene el mismo efecto (inhibe la liberación preovulatoria de la LH) (21). Dicho efecto inhibitorio parece llevarse a cabo por medio de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, ya que los efectos inhibitorios son bloqueados por la administración intraventricular de propanolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgicos) (7, 22).

Por el contrario, en el animal ovariectomizado tratado con estrógenos, la administración de noradrenalina o agonistas de los receptores  $\alpha$  estimulan la liberación pulsátil de GnRH y de LH, la administración de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos bloquean la secreción de LH (44).

En el animal ovariectomizado, se ha mostrado que la liberación de noradrenalina (utilizando la técnica de "push-pull canula") en el núcleo preóptico medial es pulsátil y no se ha observado correlación entre los pulsos de secreción de la noradrenalina y los pulsos de secreción de la LH (42).

Las neuronas dopaminérgicas que inervan a POA-AHA se localizan en la parte rostral del núcleo periventricular (células A12) (13, 14). Se ha sugerido que en el área preóptica existe contacto sináptico entre las neuronas GnRH y las dopaminérgicas (60). A pesar de esto, el papel de la dopamina en la regulación de secreción de la GnRH y de las gonadotropinas aún no es claro. En la rata durante la mañana del día del proestro, la administración de pimozide (antagonista dopaminérgico) reduce significativamente la secreción preovulatoria de la LH (9). En la eminencia media, la tasa de recambio de dopamina disminuye justo antes del "pico" preovulatorio de LH (20, 66). Resultados que llevan a pensar que durante la mañana del proestro, la dopamina tendría un papel estimulante de la liberación de la GnRH. Se ha sugerido que la liberación de la GnRH en el hipotálamo medio basal es estimulada por la dopamina (67). En animales ovariectomizados, este efecto estimulante de la dopamina sobre la liberación de GnRH no se observa hasta que al animal castrado se le administra  $17\beta$ -estradiol (23, 68).

Las terminales serotoninérgicas que inervan al hipotálamo provienen de los cuerpos neuronales localizados en los núcleos dorsal y medial del rafe (64, 80, 81). Al parecer, existen neuronas serotoninérgicas dentro del hipotálamo, ya que la deafferentación de estos núcleos no depleta en su totalidad la concentración de serotonina dentro del hipotálamo (63). Por medio de técnicas inmunocitoquímicas se ha mostrado una sobreposición entre neuronas GnRHérgicas y serotoninérgicas en la región septo-preóptica (43), en la eminencia media y en el órgano

vasculoso de la lámina terminal (55, 65). En el área preóptica se ha descrito la posibilidad de contacto sináptico entre las terminales serotoninérgicas y neuronas inmunoreactivas a GnRH (47).

Se ha sugerido que la información serotoninérgica que proviene del núcleo dorsal del rafe estimula la secreción preovulatoria de la LH en el día del proestro, mientras que la información que procede del núcleo medial del rafe la inhibe (49). La disminución en la síntesis de serotonina por la administración de p-cloro-fenil-alanina, bloquean la ovulación y el "pico" preovulatorio de LH que ocurre en el día del proestro (49).

Los péptidos opioides inhiben la secreción de las gonadotropinas (45), las neuronas que secretan péptidos opiáceos se localizan en regiones hipotalámicas cercanas a neuronas que captan estrógenos y a las neuronas GnRHérgicas. En la rata, la secreción de  $\beta$ -endorfinas hacia la sangre portal disminuye durante el proestro al momento que ocurre la liberación de la GnRH (8).

El ácido gama amino butírico (GABA) inhibe la secreción de GnRH y de gonadotropinas (49). Por medio de estudios inmunohistoquímicos se ha observado una interacción anatómica entre las terminales GABAérgicas y los somas GnRHérgicos en el área preóptica (8, 54). En ratas intactas (15) u ovariectomizadas (73), la actividad de las neuronas GABAérgicas del área preóptica y del hipotálamo medio basal disminuyen después del momento en que los estrógenos estimulan la secreción preovulatoria de la LH. Con base en estudios inmunohistoquímicos realizados en el área preóptica, se ha mostrado la existencia de contactos sinápticos entre las terminales de las neuronas noradrenérgicas y neuronas GABAérgicas; por lo que se ha propuesto que el papel de la neurona noradrenérgica sobre la secreción de la GnRH se realice por intermedio de neuronas GABAérgicas (49, 60). Dado que las neuronas GABAérgicas del área preóptica tienen receptores a estrógenos y no las GnRHérgicas, se ha propuesto que el papel inhibitorio de los estrógenos sobre la liberación de la GnRH es mediada por las neuronas GABAérgicas (49).

Algunos autores sugieren que la GnRH se autorregula de manera inhibitoria por un mecanismo denominado de asa corta ya que se han observado asociaciones sinápticas entre neuronas GnRHérgicas (8).



### 2.1.3 La "Señal" Hipofisiaria

La GnRH estimula la secreción de la LH y de la FSH (8, 30, 32). En la rata, la secreción preovulatoria de estas gonadotropinas ocurre en la tarde del proestro resultado de dos eventos:

1. El aumento en la frecuencia y la amplitud de los pulsos de secreción de las neuronas GnRHérgicas (resultado de la acción estimulante de los estrógenos), lo que provoca que la concentración de la GnRH en el sistema porta hipotalámico-hipofisiario se incremente y,
2. El aumento de la sensibilidad de los gonadotropos a la GnRH (llamado efecto de imprimación) (30).

Evidencias *in vivo* e *in vitro* muestran que la secreción de gonadotropinas y de hormonas ováricas sigue un patrón pulsátil y dicha secreción está asociada a las descargas de la GnRH hacia la sangre portal (84).

En la rata, la secreción de LH tiene un ritmo ultradiano; los pulsos de secreción ocurren cada 30 minutos aproximadamente (84). La frecuencia de los pulsos de secreción de la GnRH determina la síntesis de LH o de FSH ya que se ha mostrado en la rata macho, que la inyección intraventricular de GnRH cada ocho minutos estimula en la hipófisis la síntesis de la cadena  $\alpha$  de las gonadotropinas, la infusión de GnRH cada 30 minutos estimula la síntesis de la cadena  $\beta$  de la LH, mientras que la infusión del decapeptido cada 120 minutos resulta en la síntesis de la cadena  $\beta$  de la FSH (38).

En el hipotálamo existen dos zonas donde los estrógenos actúan regulando la secreción de la GnRH: el "centro tónico" (núcleos arcuato y ventromedial), donde los estrógenos inhiben la secreción de la GnRH, lo que se traduce en concentraciones plasmáticas basales de las gonadotropinas y el "centro fásico" (área preóptica y núcleo supraquiasmático), donde los estrógenos estimulan la secreción fásica de la GnRH, la que horas más tarde induce el "pico" preovulatorio de las gonadotropinas (4, 32).

Los estrógenos tienen un doble papel en la regulación de secreción de las gonadotropinas. Cuando su concentración plasmática es constante inhiben la secreción de GnRH, de FSH y de LH; en cambio, cuando sobre ese "tono estrogénico" se presenta un aumento brusco en la concentración plasmática de dicha hormona ("pico" preovulatorio), ésta actúa sobre la hipófisis estimulando en los gonadotropos la síntesis de receptores a la GnRH (10, 72). En la rata, este efecto se inicia a partir del medio día del diestro-2; en ratas ovariectomizadas, el implante de cápsulas de silástico con estrógenos induce 24 h más tarde la secreción pulsátil de LH (32).

En conjunto, estas evidencias señalan que la secreción preovulatoria de la LH durante la tarde del proestro, es el resultado del aumento en la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH, dada por los pulsos de estrógenos que ocurren desde la tarde del diestro-2 hasta la mañana del proestro (86, 87).

El "pico" de progesterona del día del proestro sensibiliza a la hipófisis a la GnRH; se ha sugerido que la relativa insensibilidad de la hipófisis al decapéptido durante los días del estro, diestro-1 y la mañana del diestro-2, es consecuencia de este "pico" de progesterona (32).

Estudios realizados en ratas intactas (86) han mostrado que los estrógenos modifican la frecuencia de los pulsos de secreción de la LH. En animales intactos (86) u ovariectomizados (53, 87) los estrógenos y la progesterona modifican la amplitud de los pulsos de secreción.

Se ha propuesto que la regulación de los pulsos de secreción de la LH por las hormonas esteroides se lleva a cabo en el hipotálamo, ya que el implante de estrógenos en el área preóptica-supraquiasmática, el núcleo del tracto diagonal y la banda diagonal de Broca disminuye la frecuencia de los pulsos de secreción de la LH; mientras que cuando el implante se realiza en el núcleo de la estría terminal, área preóptica, núcleo septal medial, área hipotalámica anterior o tercer ventrículo no tuvieron efectos en la secreción pulsátil de la LH (2).

### 3. CICLO ESTRAL

En la rata el proceso de ovulación ocurre cada cuatro días, período denominado ciclo estral. Los cambios en las concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroideas sexuales modifican la citología del epitelio vaginal. Con base en estos cambios citológicos el ciclo estral se ha dividido en cuatro fases: diestro-1 (también llamado metaestro), diestro-2, proestro y estro (58).

#### 3.1 Diestro-1

En el frotis vaginal predomina la presencia de leucocitos polimorfonucleares (58). Durante esta fase, la concentración plasmática de la LH, la FSH, los estrógenos y la progesterona son basales. En el ovario, se observan folículos en todas las etapas de crecimiento. Los cuerpos lúteos de formación reciente son la principal fuente de secreción de progesterona. En el caso de que el ovocito liberado en el ciclo anterior no haya sido fecundado, el cuerpo lúteo comienza a degenerar lentamente (19, 32).

#### 3.2 Diestro-2

En el frotis vaginal aún predominan los leucocitos, pero comienzan a presentarse algunas células nucleadas (58). Las concentraciones plasmáticas de estrógenos comienzan a aumentar en la tarde de este día, resultado de la estimulación de la enzima aromatasa por la FSH. También la FSH estimula la división mitótica de las células de la granulosa lo que se traduce en el crecimiento y diferenciación de los folículos que ovularán en ese ciclo. El cuerpo lúteo continúa en proceso de degeneración (19, 32).

### 3.3 Proestro

Es la etapa previa a la ovulación. En el epitelio vaginal se observan exclusivamente células nucleadas (58). En la mañana de este día, se alcanzan las máximas concentraciones plasmáticas de estrógenos del ciclo estral, las cuales estimulan indirectamente en el hipotálamo la secreción de la GnRH. Este evento estimula la secreción de la FSH y de la LH. En la tarde, se alcanzan las máximas concentraciones de las hormonas FSH y LH. El "pico" en la concentración plasmática de la LH, estimula en el ovario la síntesis del plasminógeno que inicia los mecanismos celulares que llevan al rompimiento de la pared del folículo para que el ovocito pueda ser expulsado horas más tarde. La glándula intersticial contribuye secretando progesterona la cual favorece la ovulación y la facilitación del comportamiento estral (19, 32).

### 3.4 Estro

En el epitelio vaginal sólo se observan células cornificadas (58). En la madrugada de este día ocurre la ovulación, por lo que en la mañana se observan en el ovario los cuerpos lúteos. La concentración plasmática de la LH y de los estrógenos disminuye a sus valores basales, excepto la de FSH; en la mañana de este día del ciclo ocurre un segundo "pico" en la concentración plasmática de FSH, cuyo papel es el de reclutar los folículos que ovularán en el ciclo siguiente. En caso de que el ovocito sea fecundado este ciclo se interrumpiría y en el frotis vaginal se observarían leucocitos polimorfonucleares característico de la etapa de diestro (19, 32).

## 4. SISTEMA COLINÉRGICO EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En el cerebro de la rata, por medio del empleo de técnicas de inmunocitoquímicas para la detección de la enzima que degrada a la acetilcolina (la acetilcolinoesterasa: AChE), se ha

sugerido la existencia de cinco grandes núcleos de neuronas colinérgicas, localizadas en el núcleo septal medial, el núcleo de la banda diagonal de Broca, el núcleo magnocelular del área preóptica, núcleos mamilares y el bulbo raquídeo (56). Algunas de estas neuronas colinérgicas proyectan sus terminales nerviosas hacia el hipotálamo y estructuras del sistema límbico, por medio de la vía tegmental dorsal; dichas fibras captan colinoacetiltransferasa y AChE y provienen del núcleo cuneiforme, situado en la parte dorso lateral de la formación reticulada mesencefálica (74).

En estudio realizado en ratas macho castradas, se observó un aumento en la actividad de la enzima que sintetiza a la acetilcolina, la colino-acetil-transferasa (CAT) y en la concentración de acetilcolina en la porción rostral del núcleo preóptico medial, el núcleo amigdaloides medial posterior y el área tegmental ventral, sistema de neuronas colinérgicas que estimulan la secreción de la LH (59).

Los receptores para la acetilcolina fueron descritos con base en la actividad farmacológica de dos alcaloides: la nicotina y la muscarina. Los receptores nicotínicos actúan por medio de canales iónicos (ionotrópicos), mientras que los receptores muscarínicos están acoplados al sistema de segundos mensajeros (metabotrópicos) (56, 77).

Se ha descrito la presencia de receptores muscarínicos y nicotínicos (57) en casi todo el hipotálamo, y se ha mostrado que la afinidad y el número de sitios de unión de los receptores muscarínicos en POA-AHA y en la adenohipófisis varía durante el ciclo estral de la rata (24). La estimulación de los receptores muscarínicos por la administración de pilocarpina o carbachol estimulan la división mitótica de los gonadotropos que sintetizan LH (62, 69).

Además, la concentración de acetilcolina en el área preóptica cambia durante el ciclo estral, lo que favorece la idea de que la participación del sistema colinérgico en la regulación de secreción de las gonadotropinas varía durante el ciclo estral (25).

#### 4.1 Papel del sistema colinérgico del área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) en la regulación de secreción de las gonadotropinas y la ovulación

A partir de estudios realizados en roedores se puede afirmar que el sistema colinérgico participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción preovulatoria de la LH durante el día del proestro. En la coneja, animal de ovulación refleja, la inyección de sulfato de atropina inmediatamente después del coito bloquea la ovulación; mientras que, en la rata, animal de ovulación espontánea, el mismo tratamiento en la tarde del proestro inhibe la ovulación en el día del estro (26).

La cantidad de sulfato de atropina necesaria para bloquear la ovulación en un ciclo estral varía desde 700 mg/kg en el día del proestro, 300 mg/kg en estro, y de 100 mg/kg en los días del diestro-1 y diestro-2. En los primeros días del ciclo estral, diestro-1 y diestro-2, la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación parece tener un ritmo circádico, ya que la inyección de la dosis efectiva (100 mg/kg) a las 09:00 h no afecta la ovulación, cuando es inyectada a las 13:00 h la bloquea y es inefectiva administrada a las 17:00 o 21:00 h (17).

Se ha mostrado que la inyección de pentobarbital sódico (anestésico central) a las 14:00 h del día del proestro, bloquea la ovulación esperada en la mañana del estro, lo que no sucede si el animal es inyectado a 16:00 h (27).

Al igual que el pentobarbital, la inyección de sulfato de atropina a las 14:00 h del proestro bloquea la ovulación, hecho que no ocurre si el animal es inyectado a las 16:00 h (26). Con base en estos resultados se planteó que en ratas con cuatro días de ciclo, es esencial un estímulo neurogénico que activa a la hipófisis entre las 14:00-16:00 h del día del proestro para que ocurra la secreción preovulatoria de la LH; tiempo que Everett y colaboradores (26, 27) denominaron como "período crítico".

El bloqueo del sistema colinérgico por la inyección de sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1, retrasa la ovulación hasta la mañana del diestro-1 del siguiente ciclo. En un grupo de animales sometidos al mismo tratamiento, la inyección de benzoato de estradiol (10 ng) a las 13:00 h del diestro-2 restablece la ovulación en la mañana del estró esperado, es decir, adelanta la ovulación en 24 horas (17). Estos resultados nos indicarían que el bloqueo del sistema colinérgico al mediodía del diestro-1 modifica la secreción de estrógenos; dicha alteración parecería ser consecuencia de modificaciones en la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas.

La secreción de progesterona en la tarde del proestro contribuye, tanto al inicio como al término de la secreción preovulatoria de la LH. En ratas con ciclos estrales de 5 días de duración, se ha mostrado que la inyección de progesterona un día antes del proestro adelanta la secreción de la LH y la ovulación por 24 h y cuando la administración se realiza en la mañana del proestro puede adelantar la secreción de LH por algunas horas. Por el contrario, en ratas con ciclos estrales de 4 días de duración, la inyección de progesterona en el día del diestro-1 retrasa la ovulación por 24 h (28).

En ratas con retraso de la ovulación por 24 h, resultado de la administración de sulfato de atropina a las 13.00 h del diestro-1, la ovulación se puede adelantar o restablecer en el día del estró, cuando se inyecta progesterona en la tarde del diestro-2 (17).

Estudios *in vitro*, coincubando fragmentos de hipófisis e hipotálamo de rata, muestran que la acetilcolina estimula la liberación de la FSH y de la LH, efecto que es bloqueado por la administración de atropina (31, 79). Por el contrario, la liberación preovulatoria de la LH que ocurre en el día del proestro estaría regulada de manera inhibitoria por los receptores nicotínicos, ya que la administración de nicotina durante el "periodo crítico" del día del proestro, suspende la liberación de la LH, pero no la de la FSH. Bajo estas mismas condiciones experimentales, la administración de GnRH estimula la liberación de la LH pero no la de la FSH; resultados que llevaron a sugerir a los investigadores, que el sistema colinérgico regularía la secreción de dos tipos de GnRH, uno para la LH (LHRH) y otro para la FSH (FSHRH) (5).

Se ha planteado que los receptores muscarínicos inhiben la liberación de GnRH, ya que la adición de carbamilcolina (agonista muscarínico) al medio donde se incubaba la eminencia media de ratas sacrificadas en proestro, estro o diestro-1, incrementa la concentración de GnRH en el medio (50). Poco se conoce acerca de el papel de los receptores nicotínicos en la regulación de la secreción de GnRH y gonadotropinas; se ha planteado que la liberación preovulatoria de LH en el día del proestro es inhibida por la estimulación de los receptores nicotínicos, ya que la administración de tartrato de nicotina durante el "período crítico" de este día del ciclo, suspende la liberación de LH y no la de FSH (5).

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desconocemos si en POA-AHA existe una vinculación funcional entre el sistema colinérgico y el monoaminérgico como se ha observado en otras zonas del sistema nervioso central (70). Se ha mostrado que tanto el sistema colinérgico como el monoaminérgico participan en la regulación de secreción de las gonadotropinas durante el ciclo estral de la rata, pero se desconoce si esta regulación se realiza por medio de una vinculación funcional entre estos sistemas. Por otra parte, sabemos que el bloqueo del sistema colinérgico en el diestro-1 retrasa la ovulación hasta la mañana del diestro-1 del ciclo siguiente (17); sin embargo, se desconocen las modificaciones endócrinas que ocurren durante este tiempo.

Por tanto, en este trabajo se estudió la posible vinculación funcional entre el sistema colinérgico y el sistema monoaminérgico en los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación, analizando los efectos del bloqueo del sistema colinérgico por medio de la inyección subcutánea de sulfato de atropina a las 13:00 h del día del diestro-1, sobre la actividad neural monoaminérgica de POA-AHA, así como las concentraciones plasmáticas de LH, FSH, 17 $\beta$ -estradiol y progesterona, durante el ciclo hasta el día de la ovulación.



## 6 . HIPÓTESIS

En la rata, el retraso de la ovulación por 24 h, provocado por el bloqueo del sistema colinérgico a las 13:00 h del día del diestro-1, se debe a las modificaciones sobre la actividad de las neuronas monoaminérgicas de POA-AHA y sobre las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y hormonas ováricas.

## 7 . OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del bloqueo del sistema colinérgico de POA-AHA por medio de la inyección de sulfato de atropina a las 13:00 h del día del diestro-1, sobre la actividad neural del sistema monoaminérgico de POA-AHA, así como los cambios en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y de hormonas ováricas, que llevan al retraso de la ovulación.

## 8. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Estudiar la actividad neural monoaminérgica de POA-AHA (en ratas inyectadas con sulfato de atropina a las 13:00 h del día del diestro-1) en la mañana y en la tarde de los diferentes días del ciclo estral hasta el día de la ovulación.
- 2) Estudiar las modificaciones en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y hormonas ováricas, en ratas tratadas con sulfato de atropina a las 13:00 h del día del diestro-1, en la mañana y en la tarde de los diferentes días del ciclo estral hasta el día de la ovulación.

## 9 . MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso al alimento (Purina, S.A., México) y al agua. A todos los animales se les realizó el estudio del ciclo estral por medio de la toma diaria de frotis vaginales; sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración.

### 9 . 1 Sacrificio de animales

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación. Se colectó la sangre del tronco, la cual se dejó coagular a temperatura ambiente por 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. El suero fue separado y almacenado a -20°C para la posterior cuantificación de FSH, LH, 17 $\beta$ -estradiol y progesterona por medio de la técnica de radioinmunoensayo (RIA).

El cerebro fue disecado e inmediatamente congelado con nitrógeno líquido. Con un hipotalamómetro, se cortaron rebanadas coronales del cerebro de la rata con base en las coordenadas A-7190 a A-6360, según el atlas de König y Klippel (48) y con un sacabocados se disecó POA-AHA (véase apéndice). El tejido cerebral se almacenó a -70°C hasta la cuantificación de monoaminas y sus metabolitos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En los grupos de animales sacrificados a las 11:00 ó 17:00 h del día del estro esperado o a las 11:00 h del diestro-1 del ciclo siguiente, se disecaron las trompas para contar el número de ovocitos.

## 9.2 Grupos experimentales

A las 13:00 h del día del diestro-1, grupos de animales fueron inyectados con solución salina (500 µl de NaCl al 0.85%) o sulfato de atropina (100 mg/kg de peso) por vía subcutánea. Como grupos de comparación se utilizaron animales intactos sacrificados en las mismas horas que los grupos de animales tratados. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

Día del ciclo	Grupos experimentales y horas de sacrificio		
	intactos	solución salina	sulfato de atropina
diestro-1	13, 14 y 17	14 y 17	14 y 17
diestro-2	11 y 17	11 y 17	11 y 17
proestro	11 y 17	11 y 17	11 y 17
estro	11 y 17	11 y 17	11 y 17
diestro-1*	11	11	11

\* del ciclo siguiente

## 9.3 Cuantificación de monoaminas

La región de POA-AHA se pesó en una balanza de precisión al 0.1 mg, se suspendió en ácido perclórico ( $\text{HClO}_4 = 150 \mu\text{l}$ ) al 0.1 N frío, se homogeneizó por ultrasonido y se centrifugó a 12,500 r.p.m. durante 30 minutos a  $-4^\circ\text{C}$ ; 50 µl del sobrenadante se inyectaron al cromatógrafo de líquidos para cuantificar la concentración de noradrenalina, dopamina, serotonina y sus metabolitos como se describe en el apéndice. El metabolito cuantificado para noradrenalina fue el 4-hidroxi-3-metoxifeniletilenglicol (MHPG), para dopamina el 3,4-dihidroxiifenilacético (DOPAC) y para serotonina el 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) según la técnica propuesta por Hadfield y colaboradores (37).

Las actividades neurales noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica se calcularon conforme al criterio propuesto por Shannon (75) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad neuronal} = \frac{[\text{metabolito del neurotransmisor}]}{[\text{neurotransmisor}]}$$

#### 9.4 Cuantificación de hormonas

La cuantificación de FSH y LH se realizó por RIA; se utilizaron los anticuerpos rFSH-<sup>125</sup>I-RP2 para la cuantificación de FSH y rLH-<sup>125</sup>I-RP3 para el caso de la LH, por lo que los resultados se expresaron como ng por ml. de suero (ng/ml). Para la cuantificación de 17β-estradiol y progesterona se utilizó un estuche comercial de la marca *Coat-A-Count*, los cuales constan de tubos de polipropileno impregnados con anticuerpo de conejo, hormona marcada (Estradiol-<sup>125</sup>I para estrógenos y Progesterona-<sup>125</sup>I para progesterona) y 7 calibradores para realizar la curva patrón con las siguientes concentraciones: Progesterona: 0, 0.1, 0.5, 2, 10, 20 y 40 ng/ml; Estrógenos: 0.20, 50, 150, 500, 1800 y 3600 pg/ml. A cada tubo se le adicionaron 1 ml de la hormona marcada, posteriormente las muestras se agitaron durante 1 minuto y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación todos los tubos se decantaron y finalmente, las muestras se analizaron por un contador de centelleo (véase apéndice). Los resultados de la concentración de 17β-estradiol fue expresada en picogramos por ml. de suero (pg/ml) y la de progesterona en nonogramos por ml. de suero (ng/ml).

#### 9.5 Análisis Estadístico

Los datos de la actividad neural de monoaminas y de la concentración de hormonas se analizaron utilizando la prueba de Análisis de Varianza Múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey.

Los datos del número de ovocitos por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. La tasa de animales ovulantes por la prueba de la probabilidad exacta de Fisher. Dado que se compararon los resultados de dos grupos experimentales se utilizó la prueba de t-Student. Se aceptaron aquellas diferencias en las que la probabilidad fue  $\leq 0.05$

## 10 . RESULTADOS

### 10 . 1 Tasa de animales ovulantes

Todos los animales intactos sacrificados en la mañana del día del estro ovularon. Los sacrificados a las 17:00 h, en seis de siete se observaron ovocitos en las trompas, es decir, solamente ovularon el 85%. La administración de solución salina no modificó este parámetro (Tabla-1).

Por otro lado, sólo un animal ovuló de los ocho que fueron tratados con sulfato de atropina, sacrificados a las 11:00 h del estro, y en tres de once animales sacrificados a las 17:00 h de este mismo día se observaron ovocitos. En el grupo de animales tratados con el fármaco y sacrificados a las 11:00 h del diestro-1 del ciclo siguiente, cuatro de siete animales presentaban ovocitos en las trompas (Tabla 1).

### 10 . 2 Número de ovocitos liberados

El número promedio de ovocitos encontrados en las trompas de los animales intactos, sacrificados a las 17:00 h del estro, fue menor con respecto en los animales sacrificados a las 11:00 h ( $7.3 \pm 0.4$  vs.  $12.0 \pm 0.6$ ,  $p < 0.01$ ).

En los animales tratados con solución salina sacrificados a las 11:00 h del estro, el número promedio de ovocitos contados en la trompa fue menor con respecto al grupo de

animales intactos sacrificados a la misma hora y, semejante al grupo de animales intactos sacrificados a las 17:00 h. No se encontraron ovocitos en los animales intactos o tratados con solución salina, sacrificados a las 11:00 h del diestro-1.

En el grupo de animales tratado con sulfato de atropina y sacrificados a las 11:00 h del estro, el único animal que ovuló, liberó un ovocito. Los animales con este mismo tratamiento, sacrificados a las 17:00 h del estro y 11:00 h del diestro-1, tuvieron un número similar de ovocitos en la trompa uterina con respecto al grupo de animales intactos sacrificados en la mañana del estro (Tabla-1).

Tabla 1: Tasa de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales adultos sacrificados en el día del estro y en la mañana del diestro-1 del ciclo siguiente, después de ser tratados con solución salina o sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1.

Grupo			n	Tasa de Animales Ovulantes	Ovocitos Liberados
Estro	11:00 h	intactos	8	8/8	12.0 $\pm$ 0.597
		solución salina	8	6/8	7.50 $\pm$ 1.384 *
		atropina	8	1/8 †	1 ovocito
Estro	17:00 h	intactos	7	6/7	7.33 $\pm$ 0.421
		solución salina	8	6/8	6.66 $\pm$ 0.557
		atropina	11	3/11 †	11.33 $\pm$ 1.666 †
diestro-1	11:00 h	atropina	7	4/7	13.25 $\pm$ 1.974 †

\*  $p < 0.05$  vs grupo de animales intactos, sacrificados a la misma hora; †  $p < 0.05$  vs grupo con solución salina, sacrificado a la misma hora; ‡  $p < 0.05$  vs. grupo de animales con solución salina, sacrificados a las 11:00 ó 17:00 h del estro (prueba de Kruskal Wallis)

### 10.3 Cornificación vaginal

Los animales ovulantes de los grupos sin tratamiento o inyectados con solución salina (sacrificados en el día del estro esperado) presentaron cornificación vaginal.

En el grupo de animales tratados con sulfato de atropina (sacrificados a las 11:00 h del estro), tres de ocho presentaron células cornificadas en el frotis vaginal y sólo uno de ellos ovuló. De los animales sacrificados en la tarde del estro, tres de once presentaron estro vaginal y los ocho restantes tuvieron células nucleadas, características de un proestro; mientras que los sacrificados en la mañana del diestro-1, cuatro de siete presentaron cornificación vaginal, otro células nucleadas y los dos animales restantes tuvieron un frotis característico de diestro, por la presencia de leucocitos (Figura 2).

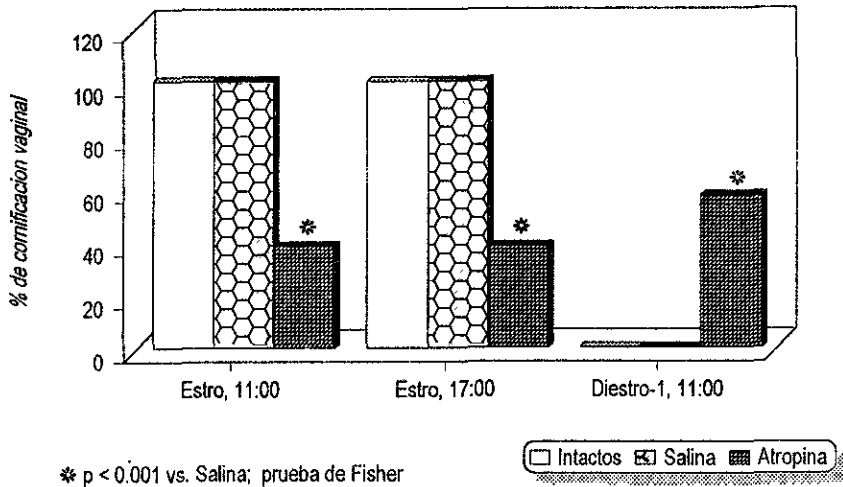


Figura 2: Porcentaje de cornificación vaginal en animales adultos intactos, tratados con solución salina o sulfato de atropina, sacrificados a las 11:00 o 17:00 h del estro esperado y a las 11:00 h del diestro-1 del ciclo siguiente.

#### 10 . 4 Variaciones de la concentración plasmática de 17β-estradiol y de progesterona durante el ciclo estral de la rata adulta

En el animal intacto, la concentración plasmática de 17β-estradiol es mínima en diestro-1, comienza a incrementarse en la mañana del diestro-2 y alcanza su máxima concentración plasmática en la mañana del proestro (11:00 h). La concentración plasmática de progesterona presenta dos “picos” durante el ciclo estral: uno ocurre en la tarde del diestro-1 (17:00 h) y el otro en la tarde del proestro (Figura 3).

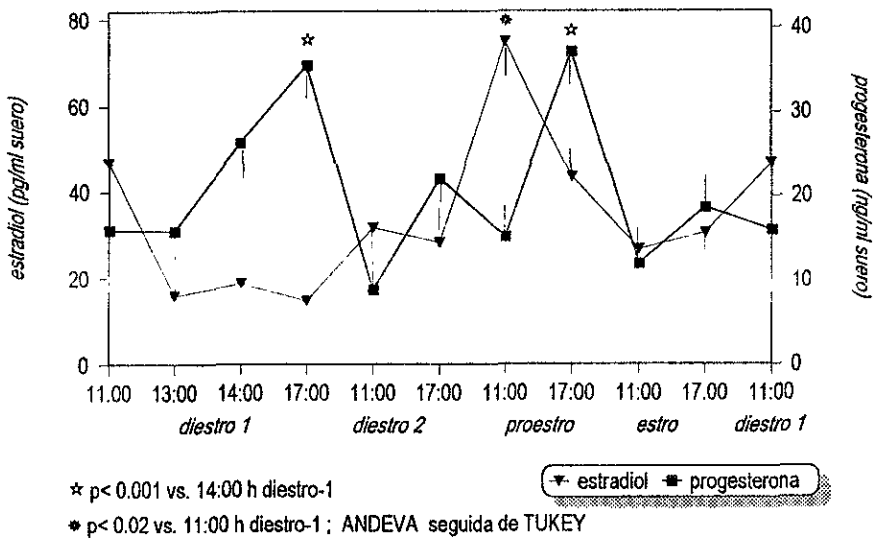


Figura 3: Media ± e.e.m. de la concentración plasmática de 17β-estradiol y de progesterona durante el ciclo estral de la rata adulta intacta.



### 10.5 Variaciones de la concentración plasmática de la hormona foliculo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH) durante el ciclo estral de la rata adulta

En animales intactos las concentraciones plasmáticas de la FSH y la LH son bajas durante los días de estro, diestro-1 y diestro-2; a las 17:00 h del proestro se presentan las máximas concentraciones para ambas hormonas. La concentración plasmática de la LH retorna a sus valores bajos en la mañana del estro, en cambio la concentración plasmática de la FSH se mantiene alta hasta la mañana del diestro-1 (Figura 4).

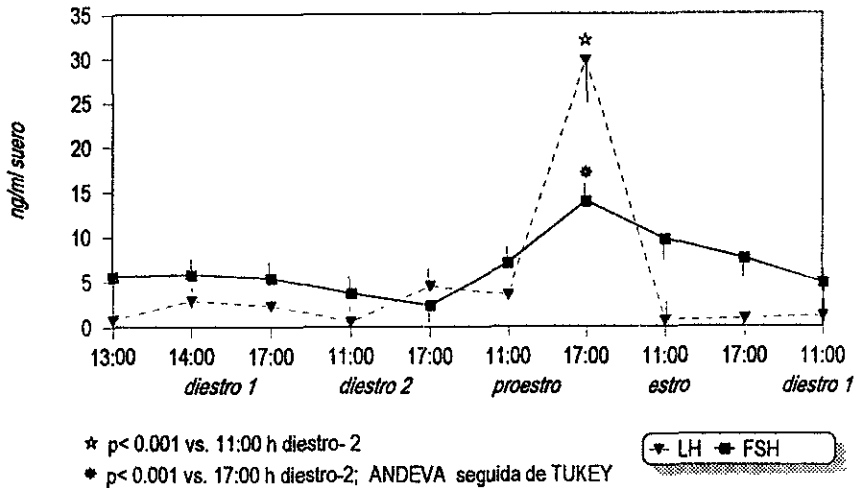


Figura 4: Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración plasmática de la hormona foliculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) durante el ciclo estral de la rata adulta intacta.

## 10 . 6 Efecto del bloqueo del sistema colinérgico por la inyección de sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1, sobre la concentraciones plasmáticas de gonadotropinas y hormonas ováricas

La inyección de solución salina no modificó la concentración plasmática de  $17\beta$ -estradiol, de progesterona y de la LH con respecto en los animales intactos; pero retrasó hasta la mañana del día del estro el "pico" de FSH que en el animal intacto ocurre en la tarde del proestro.

Una hora después de la inyección de sulfato de atropina, se incrementó la concentración plasmática de  $17\beta$ -estradiol (Figura 5) y de progesterona (Figura 6) y no se modificó la concentración plasmática de LH (Figura 7) y FSH (Figura 8) con respecto a los animales inyectados con solución salina. La inyección del fármaco bloqueó el "pico" de  $17\beta$ -estradiol que normalmente ocurre en la mañana del proestro y lo retrasó por 30 horas; es decir, éste se observó hasta la tarde del estro (Figura 5).

Por otro lado, la inyección de sulfato de atropina disminuyó la concentración plasmática de progesterona en la tarde del día diestro-2 y del proestro (Figura 6).

El "pico" en la concentración plasmática de la LH que normalmente ocurre en la tarde del proestro fue bloqueado y éste se retrasó por 24 horas; es decir, se presentó hasta la tarde del estro (Figura 7).

La inyección del sulfato de atropina bloqueó el "pico" en la concentración plasmática de la FSH y lo retrasó por 24 horas; es decir, éste se presentó hasta la tarde del estro, concentraciones que permanecen altas hasta la mañana del diestro-1 (Figura 8).

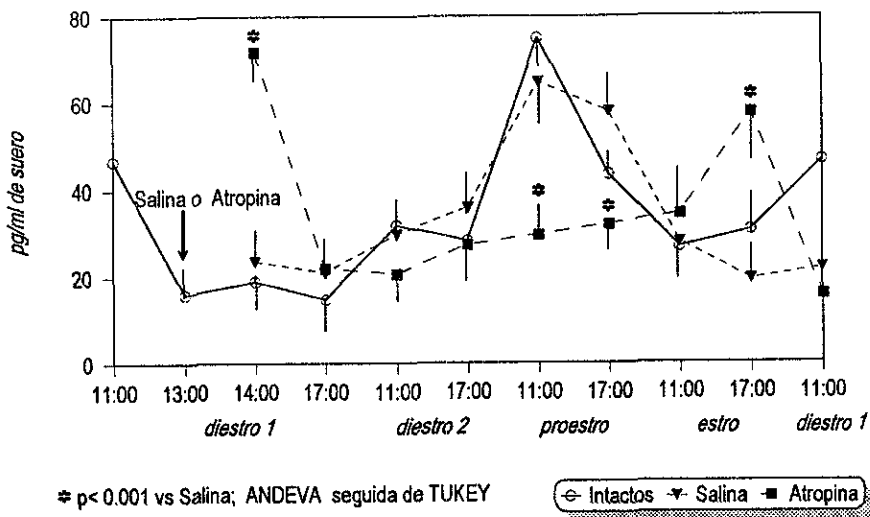


Figura 5: Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración plasmática de  $17\beta$ -estradiol de ratas adultas intactas, tratadas con solución salina o sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1.

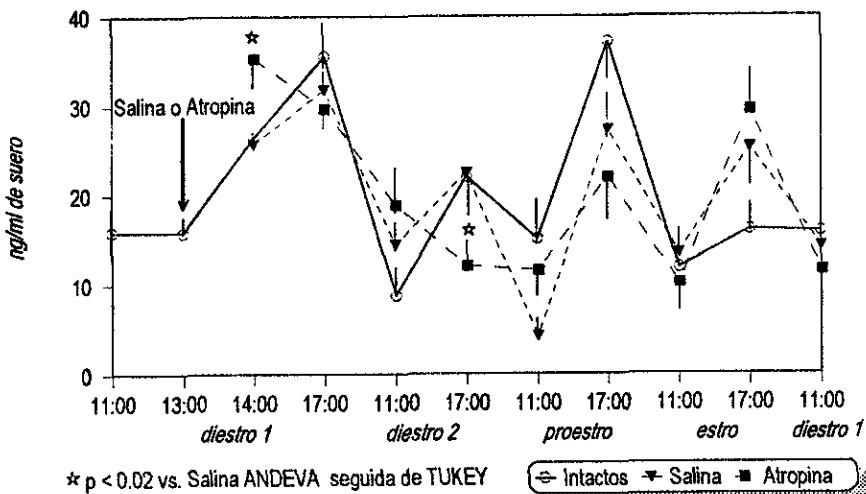


Figura 6: Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración plasmática de progesterona en animales adultos intactos, tratados con solución salina o sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1.

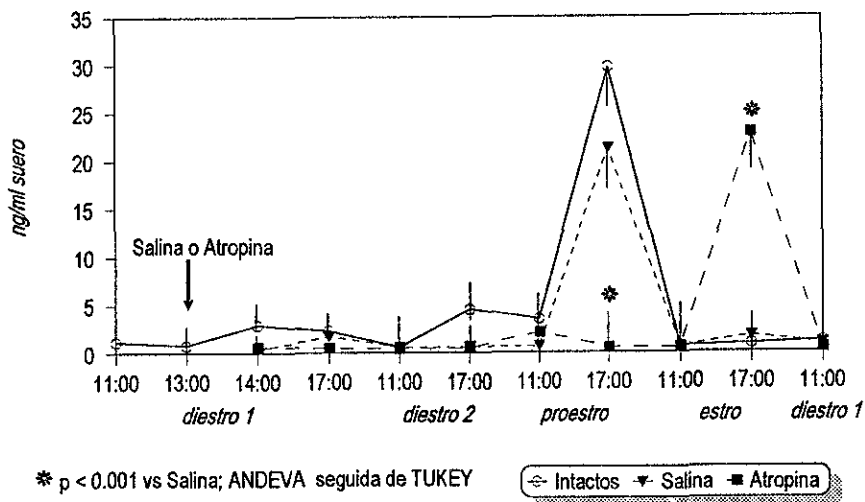


Figura 7: Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración plasmática de hormona luteinizante (LH) en animales adultos intactos, tratados con solución salina o sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1.

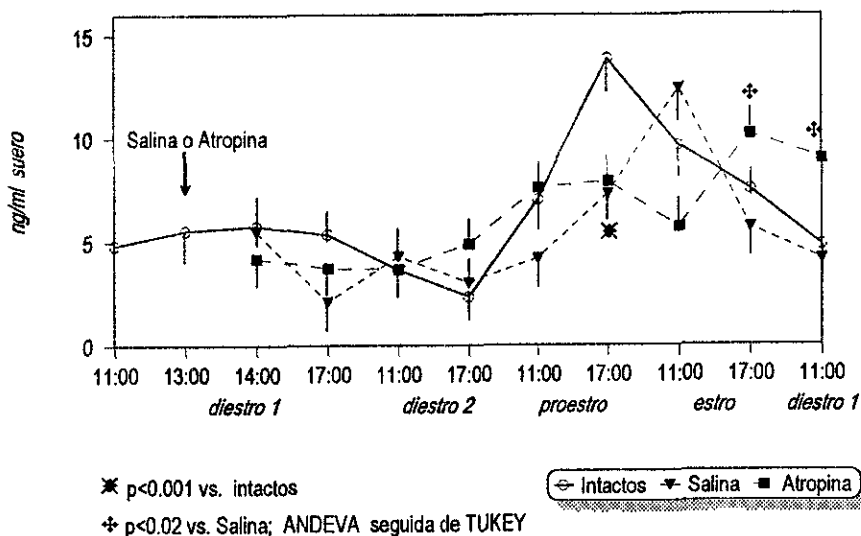


Figura 8: Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración plasmática de la hormona foliculo estimulante (FSH) en animales adultos intactos, tratados con solución salina o sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1.

## 10 . 7 Variaciones de la actividad neural monoaminérgica en POA-AHA durante el ciclo estral de la rata adulta intacta

La actividad neural noradrenérgica en POA-AHA es máxima en la tarde del diestro-2, disminuye hasta la tarde del proestro y permanece sin cambios durante los otros días del ciclo estral. La actividad neural dopaminérgica en POA-AHA es máxima a las 13:00 h del diestro-1 y es mínima a las 11:00 h del proestro. La actividad neural serotoninérgica en POA-AHA presenta dos máximos, uno se observa en la tarde del diestro-2 (17:00 h) y el otro, aunque de menor intensidad, en la tarde del proestro (Figura 9).

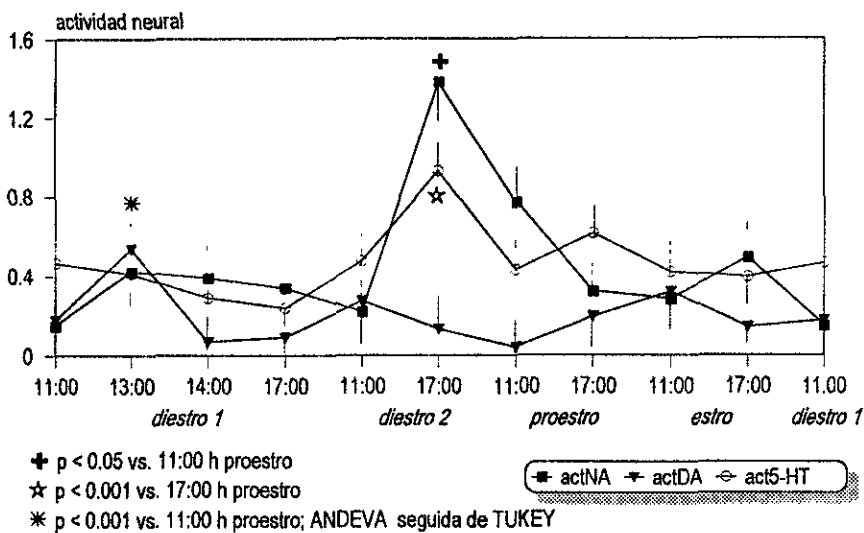


Figura 9: Variaciones de la actividad neural noradrenérgica (act NA), dopaminérgica (act DA) y serotoninérgica (act 5-HT) en POA-AHA, en la mañana y en la tarde de los diferentes días del ciclo estral.

10.8 Efecto del bloqueo del sistema colinérgico por la inyección de sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1, sobre la actividad neural monoaminérgica de POA-AHA durante el ciclo estral

La actividad neural noradrenérgica que se presenta en un animal intacto en la tarde del diestro-2 y en la mañana del proestro fue bloqueada tanto por la administración de solución salina como de sulfato de atropina (Figura 10).

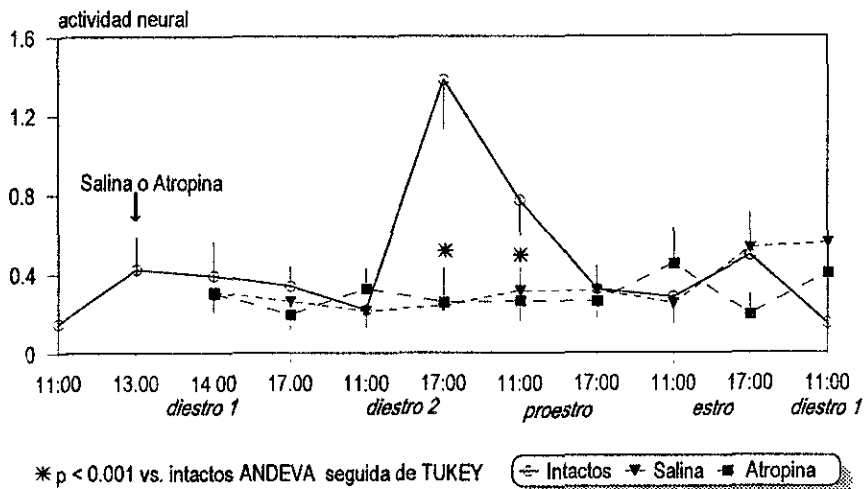


Figura 10: Variaciones en la actividad noradrenérgica en POA-AHA de animales intactos, tratados con solución salina o sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1.

La actividad neural dopaminérgica aumentó una hora después de inyectar la solución salina; después de esto, la actividad en los días subsecuentes fue semejante a la observada en el animal intacto, pero en la mañana del diestro-1 del ciclo siguiente se observó otro "pico" de actividad dopaminérgica.

Al igual que la inyección de solución salina, el sulfato de atropina incrementó la actividad neural dopaminérgica una hora después de haber sido administrado; veintiún horas después, la actividad neural dopaminérgica aumentó en la mañana del diestro-2.

El "pico" de actividad neural dopaminérgica observado en la mañana del diestro-1 del ciclo siguiente, en los animales tratados con solución salina, disminuyó en los inyectados con sulfato de atropina (Figura 11).

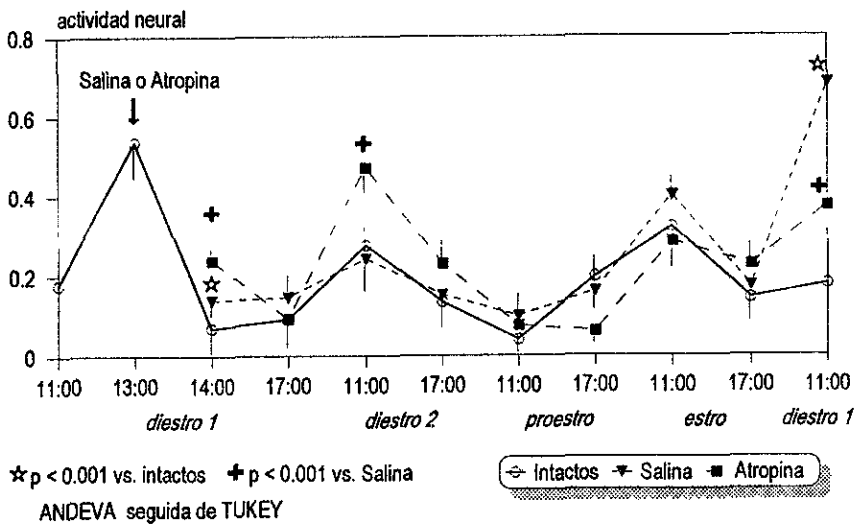


Figura 11: Variaciones en la actividad neural dopaminérgica en POA-AHA de animales intactos, tratados con solución salina o sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1.

La actividad de la neurona serotoninérgica aumentó cuatro horas después de inyectar solución salina y, el “pico” de actividad que ocurre en un animal intacto en la tarde del diestro-2, fue bloqueada por este mismo tratamiento.

La inyección de sulfato de atropina incrementó la actividad neural serotoninérgica una hora después de haber sido administrado; después de este efecto no se observaron modificaciones en la actividad de dicha neurona (Figura 12).

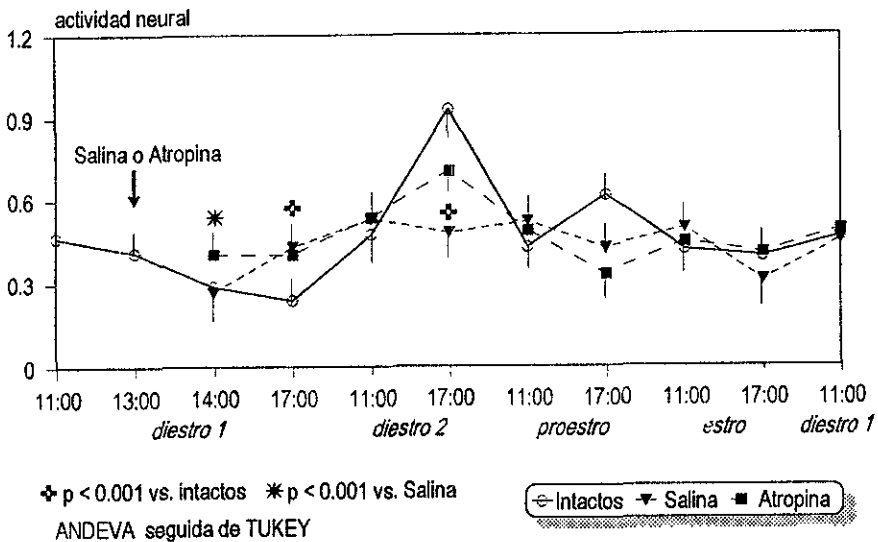


Figura 12: Variaciones de la actividad neural serotoninérgica en POA-AHA de animales intactos, tratados con solución salina o sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1.



10.9 Diferencias entre los animales ovulantes y no-ovulantes, con bloqueo del sistema colinérgico por la inyección de sulfato de atropina sacrificados a las 17:00 h del estro esperado

En los animales tratados con sulfato de atropina que no ovularon, las concentraciones plasmáticas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y de LH, así como la actividad neural dopaminérgica en POA-AHA fueron significativamente mayores con respecto a los animales que si lo hicieron; en cambio, la actividad neuronal noradrenérgica en POA-AHA fue menor (Tabla 2).

10.10 Diferencias entre los animales ovulantes y no-ovulantes, con bloqueo del sistema colinérgico por la inyección de sulfato de atropina sacrificados a las 11:00 h del diestro-1 del ciclo siguiente

En los animales que no ovularon en la mañana del diestro-1 del ciclo siguiente, que fueron inyectados con sulfato de atropina, la concentración de la progesterona fue mayor con respecto a los animales con el mismo tratamiento pero que ovularon (Tabla 3).

Tabla 2: Media  $\pm$  e.e.m. de las concentraciones plasmáticas de las hormonas foliculo estimulante (FSH), luteinizante (LH), 17 $\beta$ -estradiol y progesterona, así como de la actividad de las neuronas noradrenérgica (act NA), dopaminérgica (act DA) y serotoninérgica (act 5-HT) en el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) de animales ovulantes y no-ovulantes, que fueron tratados con sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1 y sacrificados a las 17:00 h del estro.

GRUPO	n	17 $\beta$ -estradiol	progesterona	LH	FSH	act NA	act DA	act 5-HT
OVULANTES	3	15.01 $\pm$ 3.47	10.2 $\pm$ 2.5	0.45 $\pm$ 0.11	6.2 $\pm$ 1.27	0.884 $\pm$ 0.008	0.025 $\pm$ 0.012	0.396 $\pm$ 0.03
NO OVULANTES	8	57.7 $\pm$ 7.51 *	29.5 $\pm$ 3.8 *	22.8 $\pm$ 8.72 *	10.2 $\pm$ 2.02	0.196 $\pm$ 0.03 *	0.225 $\pm$ 0.05 *	0.408 $\pm$ 0.02

\*  $p < 0.001$  vs. ovulantes (prueba t-Student)

Tabla 3: Media  $\pm$  e.e.m. de las concentraciones plasmáticas de las hormonas foliculo estimulante (FSH), luteinizante (LH), 17 $\beta$ -estradiol y progesterona, así como de la actividad de las neuronas noradrenérgica (act NA), dopaminérgica (act DA) y serotoninérgica (act 5-HT) en el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) de animales ovulantes y no-ovulantes, que fueron tratados con sulfato de atropina a las 13:00 h del diestro-1 y sacrificados a las 11:00 h del diestro-1 del ciclo siguiente.

GRUPO	n	17 $\beta$ -Estradiol	Progesterona	LH	FSH	act NA	act DA	act 5-HT
OVULANTES	4	10.3 $\pm$ 1.2	5.5 $\pm$ 0.8	0.40 $\pm$ 0.06	11.7 $\pm$ 2.7	0.46 $\pm$ 0.118	0.386 $\pm$ 0.08	0.519 $\pm$ 0.04
NO OVULANTES	3	18.92 $\pm$ 3.3	9.9 $\pm$ 0.2 ☆	0.49 $\pm$ 0.08	5.4 $\pm$ 2.1	0.33 $\pm$ 0.04	0.377 $\pm$ 0.09	0.453 $\pm$ 0.04

☆  $p < 0.001$  vs. ovulantes (prueba t-Student)

## 11 . DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de este estudio nos permiten sugerir que en POA-AHA el sistema colinérgico mantiene una vinculación funcional de tipo inhibitoria con el sistema dopaminérgico y el serotoninérgico; ya que el bloqueo de los receptores muscarínicos por la inyección de sulfato de atropina a las 13:00 h del día del diestro-1 incrementó la actividad de ambas neuronas. De manera similar, el sistema colinérgico regula la secreción de  $17\beta$ -estradiol y de progesterona por el ovario, ya que el bloqueo del sistema colinérgico a las 13:00 h del día del diestro-1 incrementó la concentración plasmática de estas hormonas una hora después de inyectar el sulfato de atropina.

El incremento en la actividad de la neurona dopaminérgica en POA-AHA en la mañana del diestro-2, en los animales tratados con sulfato de atropina, podría ser causado por el aumento en la concentración plasmática del  $17\beta$ -estradiol a la hora de haberse inyectado el fármaco. A su vez, este incremento en la actividad neural dopaminérgica en la mañana del diestro-2 parecería ser el responsable del bloqueo de los "picos" preovulatorios del  $17\beta$ -estradiol, FSH, LH y progesterona en el día del proestro y su retraso hasta el día del estro.

Con base en nuestros resultados sugerimos que en condiciones normales durante el día del diestro-1, la activación de la señal colinérgica tendría un papel de tipo inhibitorio sobre la secreción de  $17\beta$ -estradiol y de progesterona por el ovario y sobre la actividad de la neurona dopaminérgica en POA-AHA; ya que una hora después de inyectar el sulfato de atropina aumentaron las concentraciones plasmáticas de estas hormonas y la actividad neural dopaminérgica de POA-AHA.

En el ovario de la rata, la mayoría de la acetilcolinesterasa (enzima que degrada acetilcolina) se ha detectado en nervios adrenérgicos, ya que la simpatectomía del ovario con 6-hidroxitriptamina, elimina la mayoría de los nervios que captan acetilcolinesterasa (6). La vagotomía abdominal modifica el ciclo estral del ratón (40).

Dado que en la rata, los cambios citológicos del epitelio de la vagina dependen de las concentraciones plasmáticas de estrógenos (58), es posible pensar que el sistema colinérgico en el ovario regule la secreción de hormonas esteroides.

Se ha mostrado por medio de estudios *in vitro* con células de Leydig, que la administración de fármacos colinomiméticos (como la acetilcolina, el carbacol o la nicotina) disminuyen la secreción basal de testosterona o aquella inducida por hCG; la utilización de hexametonium (antagonista nicotínico) o de atropina reducen dicho efecto (29). Con base en los resultados antes citados (29) y los observados en esta tesis, se apoyaría la idea de que la innervación colinérgica de la gónada regularía de manera inhibitoria la secreción de las hormonas esteroides.

Dado que la actividad de la neurona dopaminérgica aumentó una hora después de inyectar el sulfato de atropina, podríamos sugerir que en POA-AHA existe una vinculación funcional entre las neuronas colinérgicas y las dopaminérgicas. En la rata macho se mostró que la inyección de tartrato de nicotina una hora antes del sacrificio, inhibe la tasa de recambio de noradrenalina y dopamina en la capa subependimial de la eminencia media, en la región periventricular posterior y anterior del hipotálamo, asociado a este efecto se observó aumento en la concentración plasmática de LH (3).

Específicamente para la región de POA-AHA no se ha mostrado la existencia de sinápsis entre neuronas colinérgicas y dopaminérgicas. Sin embargo, no se puede descartar esta hipótesis, ya que dicha vinculación ultraestructural se ha sugerido en el cuerpo estriado, al mostrar que la liberación tónica de acetilcolina en esta zona cerebral disminuye al estimular los receptores dopaminérgicos-D<sub>2</sub> en la sustancia nigra (19). Estudios *in vivo* indican que la liberación de dopamina en el estriado es estimulada por receptores muscarínicos-M1 localizados en la terminal dopaminérgica estriatal (52, 88).

Es posible que también exista una vinculación funcional entre el sistema colinérgico y el serotoninérgico en POA-AHA, ya que esta se ha descrito en la corteza (70). Sin embargo, el

aumento de la actividad neural serotoninérgica en POA-AHA una hora después de inyectar el sulfato de atropina en el día del diestro-1, no parecería estar relacionado con el bloqueo de la ovulación en el día del estro esperado, ya que pasado este efecto, la actividad de la neurona serotoninérgica es semejante a la del animal intacto o al inyectado con solución salina.

El aumento inmediato y transitorio de la actividad neural dopaminérgica por el bloqueo del sistema colinérgico en la tarde del diestro-1, parece estar relacionado con el retraso de la ovulación en el día del estro. Domínguez y colaboradores (18), mostraron que la inyección subcutánea de haloperidol (antagonista dopaminérgico) a las 13:00 h del día del diestro-1, bloquea la secreción preovulatoria de FSH y de LH en la tarde del proestro, así como la ovulación en el día del estro esperado.

El "pico" de la actividad neural dopaminérgica en POA-AHA que se observa en la mañana del diestro-2 de los animales con bloqueo del sistema colinérgico, podría explicarse por el incremento en la concentración plasmática de las hormonas esteroideas ( $17\beta$ -estradiol y progesterona), es decir, como un efecto estimulante de la actividad dopaminérgica en POA-AHA, al menos durante este día del ciclo estral (Figura 13); ya que los resultados de la literatura confirman que durante el día del proestro, la actividad neural dopaminérgica de POAm disminuye al tiempo en que ocurre el "pico" de estrógenos (49) o por el tratamiento con benzoato de estradiol en ratas ovariectomizadas (1, 39, 71).

Se ha sugerido que la falta de sensibilidad del hipotálamo al efecto inhibitorio de los estrógenos sobre la secreción de la LH (resultado del "pico" en la concentración plasmática de estrógenos), involucra la inhibición de la actividad neural dopaminérgica de POAm; ya que el implante de pimozide en esta zona hipotalámica de ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol, incrementa la concentración plasmática de la LH, mientras que el implante de apomorfina la disminuye (16). Resultados semejantes se observaron al perfundir fragmentos de hipotálamo medio basal e hipófisis de ratas hembras sacrificadas a las 08:00 h del día del diestro-1, con dopamina disminuye la concentración de LH en el líquido de perfusión; la adición

de haloperidol restablece la concentración de LH. Cuando sólo se colocan en el sistema fragmentos de hipotálamo medio basal y se adiciona dopamina al medio, disminuye la concentración de GnRH (82).

Los resultados de esta tesis muestran que en la rata hembra adulta, intacta y cíclica, la máxima actividad de la neurona dopaminérgica en POA-AHA durante el ciclo estral, se observa a las 13:00 h del día del diestro-1. Estos resultados llevan a pensar que el "pico" de actividad neural dopaminérgica que ocurre en POA-AHA a las 13:00 h del diestro-1, sería una de las señales hipotalámicas que inician la "cascada" de eventos neuroendócrinos que culminan con la ovulación en el día del estro, como se ha sugerido previamente (18).

Döcke y colaboradores (16) mostraron que el implante de apomorfina desde la mañana del diestro-1 hasta la mañana del diestro-2, en el área preóptica medial (POAm), retrasa la ovulación hasta por quince días, pero el número de ovocitos es normal. Con base en estos resultados, los autores sugieren que para que ocurra un desarrollo folicular normal, es necesario inhibir la actividad dopaminérgica de POAm. Esta sugerencia parecería contraponerse a la que surge de los resultados de esta tesis, sin embargo, es necesario considerar que en el experimento de Döcke y colaboradores (16), la señal dopaminérgica se mantiene por 24 h; en cambio, en condiciones naturales (animal intacto), sólo ocurre un pulso de actividad al medio día del diestro-1. Si se presenta otro "pico" de actividad neural dopaminérgica en el día del diestro-2 (como ocurre en los animales inyectados con sulfato de atropina), la ovulación se retrasa entre 14 y 24 h.

El aumento inmediato de la concentración plasmática de progesterona en los animales con bloqueo del sistema colinérgico en el día del diestro-1, podría ser otro de los factores responsables del desplazamiento (por veinticuatro horas) de la "cascada" de eventos neuroendócrinos que culminan con la ovulación en la mañana del diestro-1 del ciclo siguiente; ya que en ratas con ciclos de cuatro días de duración, la inyección subcutánea de progesterona

en el día del diestro-1 retrasa la ovulación por veinticuatro horas; es decir, los animales ovulan en la mañana del diestro-1 del ciclo siguiente (28).

En los animales tratados con sulfato de atropina, la presencia de células cornificadas en el frotis vaginal (típicas de un estro) esta retrasada; es decir, en el día del estro esperado el frotis vaginal corresponde al del proestro y el del día del diestro-1 del ciclo siguiente al del estro.

Otra aportación de este estudio es la referente a la actividad de la neurona noradrenérgica en POA-AHA durante el ciclo estral. En un animal intacto, la actividad neural noradrenérgica comienza a aumentar desde las 11:00 h del diestro-2, alcanza su valor máximo a las 17:00 h de este día, a partir de este momento dicha actividad comienza a disminuir y retorna a sus valores iniciales a las 17:00 h del proestro. Es importante señalar que la concentración plasmática de  $17\beta$ -estradiol comienza a aumentar a las 11:00 h del diestro-2, alcanza su máximo a las 11:00 h del proestro y retorna a sus concentraciones iniciales hasta la tarde de este día. Estos hechos favorecen la hipótesis de que los estrógenos estimulan la actividad de las neuronas noradrenérgicas, las que a su vez inducen la secreción de GnRH (49). La adición de estradiol al medio donde se incubaba el hipotálamo medio basal de ratas sacrificadas en diestro-2, provoca liberación de noradrenalina, dopamina, histamina y GnRH (61). En la rata ovariectomizada, la liberación basal de noradrenalina por el hipotálamo ventromedial, aumenta al inyectar a la rata benzoato de estradiol (85). En la rata, un estímulo estresante activa el eje hipófisis-adrenal, lo que resulta en el aumento de la concentración plasmática de corticosterona (35). Dado que no podemos descartar que exista una vinculación funcional entre las neuronas colinérgicas y las noradrenérgicas en POA-AHA, esta vinculación funcional durante el diestro-1 no parecería estar asociada a las señales hipotalámicas que desencadenan la "cascada" de eventos neuroendócrinos que culminan con la ovulación; ya que aún cuando con ambos tratamientos (inyección de solución salina o sulfato de atropina) el "pico" de actividad neural noradrenérgica de la tarde del diestro-2 fue inhibido, un grupo de animales si ovuló y el otro no. Es probable que este efecto inhibitorio se asocie al estrés, ya que

se ha mostrado que sinaptosomas del septum y estriado coincubadas con un glucocorticoide sintético, inhibe la tasa de recambio de noradrenalina (35).

En un estudio realizado por Domínguez y colaboradores (18), muestran que la inyección de propanolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) a las 13:00 h de cada uno de los días del ciclo estral no modifica la secreción preovulatoria de las gonadotropinas ni la ovulación. En cambio, la inyección de haloperidol bloqueó la secreción preovulatoria de FSH y de LH que ocurre en el proestro. Además, el haloperidol tiene sus mayores efectos sobre la ovulación en los animales tratados en el día del diestro-1. Estos resultados apoyan la idea de que el sistema neuronal dopaminérgico y no el sistema neuronal noradrenérgico estimularía la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

El hecho de que en la mañana del estro esperado los animales inyectados con solución salina ovularon un menor número de ovocitos que los animales intactos, podría ser resultado de que en estos animales, el "pico" de FSH no haya ocurrido en la tarde del proestro sino en la mañana del estro, por lo tanto, esta alteración en el tiempo de secreción y en concentración de la FSH y de la LH retrasaron el crecimiento folicular y el número de ovocitos liberados en estos animales.

El grupo de animales tratados con solución salina y sacrificados en la tarde del día del estro esperado ovularon un número similar de ovocitos que los animales intactos sacrificados a la misma hora. Sin embargo, a las 17:00 h de este día, en el grupo de animales intactos y el grupo de animales tratados con solución salina el número promedio de ovocitos liberados es menor con respecto al grupo de animales intactos sacrificados en la mañana del estro. Esta diferencia parece ser resultado del paso de los ovocitos hacia el útero y no debido a un retraso del crecimiento folicular, ya que no se observaron alteraciones hormonales en estos grupos experimentales.

Es importante hacer notar que al parecer existe variación individual en cuanto al tiempo de acción del fármaco sobre los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación;



ya que en el grupo de ratas tratadas con el sulfato de atropina sacrificadas en la tarde del estro esperado y que no ovularon, la concentración plasmática de la LH, de las hormonas ováricas y la actividad de las neuronas dopaminérgicas fue mayor con respecto a los animales ovulantes. Estos resultados nos permiten plantear que en los animales no ovulantes la secreción preovulatoria de  $17\beta$ -estradiol y de LH estaba ocurriendo al momento de su sacrificio, eventos que ocurren, respectivamente, en la mañana y en la tarde del día del proestro.

En cambio, en el grupo de ratas sacrificadas en la mañana del diestro-1 no se observaron diferencias en la concentración de las gonadotropinas, de  $17\beta$ -estradiol y en la actividad de las neuronas monoaminérgicas entre animales que no ovularon y aquellos que si lo hicieron, excepto en la concentración de progesterona, lo que lleva a pensar que en el grupo de animales que no ovularon lo hicieron quizá en la tarde del día anterior.

En un animal inyectado con sulfato de atropina en el día del diestro-1, la ovulación puede ocurrir desde la tarde del estro esperado a la mañana del diestro-1 del ciclo siguiente.

Finalmente, los resultados de esta tesis y los obtenidos por otros investigadores nos llevan a considerar que en el día del diestro-1, la terminal colinérgica aferente a POA-AHA regula de manera inhibitoria la actividad de la neurona dopaminérgica que se encuentran en dicha área. A su vez, la dopamina estimularía la secreción preovulatoria de las gonadotropinas y la ovulación (Figura 14). En el ovario, la inervación colinérgica regularía de forma inhibitoria la secreción de  $17\beta$ -estradiol y de progesterona.

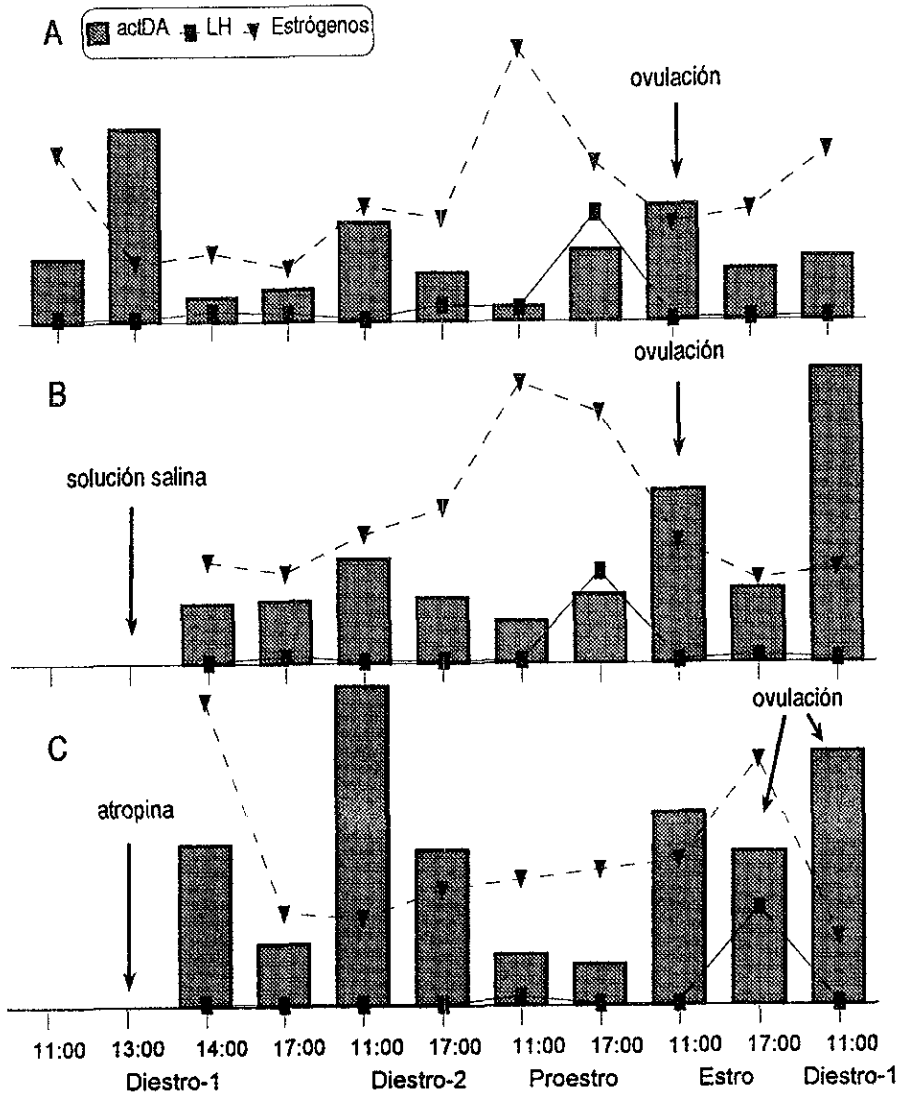


Figura 13: Representación de los eventos neuroendócrinos que participan en la regulación de la ovulación en el animal intacto (panel A) o en el inyectado con solución salina (panel B) o sulfato de atropina (panel C) a las 13:00 h del diestro 1.

Área preóptica-hipotalámica anterior  
POA-AHA

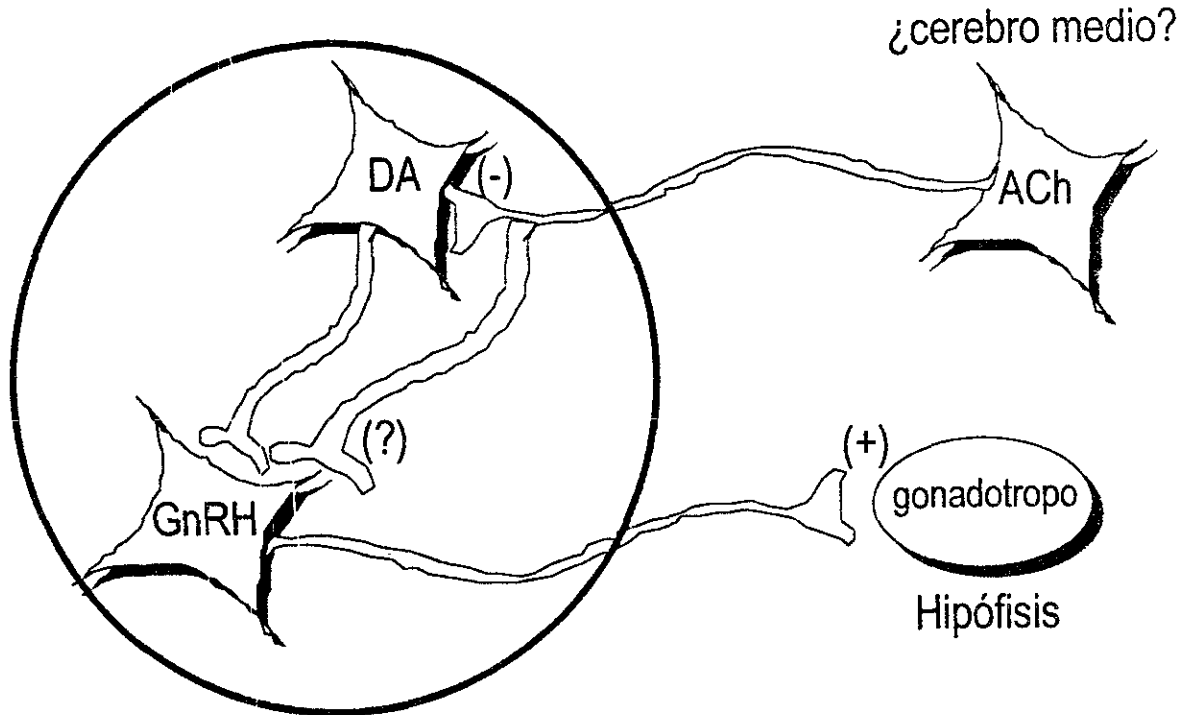


Figura 14: Modelo que plantea la posible vinculación funcional entre terminales de las neuronas colinérgicas y dopaminérgicas en POA-AHA durante el día del diestro-1. DA (neurona dopaminérgica), GnRH (neurona GnRHérgica), ACh (neurona colinérgica), (-) efecto inhibitorio, (+) efecto estimuladorio, (?) efecto desconocido.

## 12. CONCLUSIONES

El efecto inmediato del bloqueo de los receptores muscarínicos a las 13:00 h del día del diestro-1, incrementa la actividad de la neurona dopaminérgica en POA-AHA y la concentración plasmática de  $17\beta$ -estradiol y progesterona.

En un animal intacto en el día del diestro-1, los receptores muscarínicos regulan de manera inhibitoria la actividad de la neurona dopaminérgica de POA-AHA, así como la secreción de hormonas esteroides por el ovario.

El "pico" de actividad dopaminérgica en POA-AHA que ocurre en el animal intacto a las 13:00 h del día del diestro-1, parece ser una de las señales hipotalámicas que inician la "cascada" de eventos neuroendócrinos que culminan con la ovulación.

El retraso de la ovulación por 24 h en los animales con bloqueo del sistema colinérgico a las 13:00 h del día del diestro-1, resultar de los siguientes eventos que ocurren en la siguiente secuencia:

- incremento en la concentración plasmática de las hormonas esteroides en la tarde del diestro-1,
- aumento en la actividad neural dopaminérgica de POA-AHA en la mañana del diestro-2,
- desplazamiento del "pico" de  $17\beta$ -estradiol a la tarde del estro
- desplazamiento del "pico" de la FSH y la LH a la tarde del estro
- ovulación en la mañana del diestro-1 del ciclo siguiente.

Los eventos neuroendócrinos que culminan con la ovulación en los animales con bloqueo de los receptores muscarínicos están desfasados por veinticuatro horas.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. ADVIS JP, MCCANN SM Y NEGRO-VILAR A (1980) Evidence that catecholaminergic and peptidergic (luteinizing hormone-releasing hormone) neurons in suprachiasmatic-medial preoptic, medial basal hypothalamus and median eminence are involved in estrogen-negative feedback. *Endocrinology* 107: 892-901
2. AKEMA T, TADOKORO Y Y KIMURA F (1984) Regional specificity in the effect of estrogen implantation within the forebrain on the frequency of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 39: 517-523
3. ANDERSSON K, ENEROTH P Y AGNATI LF (1981) Nicotine-induced increases of noradrenaline turnover in discrete noradrenaline nerve terminal systems of the hypothalamus and the median eminence of the rat and their relationship to changes in the secretion of adenohipophyseal hormones. *Acta Physiol Scand* 113: 227-231
4. BARRACLOUGH CH A (1983) The role of catecholamines in the regulation of gonadotrophin secretion. *Acta Morph. Hung.* 31: 101-106
5. BLAKE CA (1974) Parallelism and divergence in luteinizing hormone and follicle stimulating hormone release in nicotine treated rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145: 716-720
6. BURDEN HW (1978) Ovarian Innervation. In: The vertebrate ovary. Comparative Biology. Jones RE, New York: Plenum Press, pp: 615-638

7. CACERES A Y TALEISNIK S (1980) Inhibition of secretion of luteinizing hormone induced by electrochemical stimulation of the anterior cingulate cortex mediated by a beta-adrenergic mechanism. *J Endocrinol* 87: 419-429
8. CHARLI JL, PONCE G Y JOSEPH-BRAVO P (1991) Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRHérgicas hipotalámicas. Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción Coordinador: Roberto Domínguez Casalá Editorial: Miguel Angel Porrúa México pp: 57-72
9. CHOUDHURY S, SHARPE R Y BROWN P (1974) The effect of pimozide, a dopamine antagonist, on pituitary gonadotrophic function in the rat. *J Reprod Fertil* 39: 275-283
10. CLAYTON RN Y CATT K (1981) Gonadotrophin-releasing hormone receptors: characterization physiological regulation and relationship to reproductive function. *Endocrinol. Rev.* 2: 186-206
11. CROWLEY WR Y KALRA SP (1989) Regulation of preovulatory luteinizing hormone secretion by ovarian hormone-monoamine-neuro-peptide interactions in the rat. En: Neural Control of Reproductive Function Edits: Lakoski JM, Pérez-Polo JR y Rassin DK, Alan R Liss Incorporation, New York, pp: 79-93
12. CRUZ ME (1991) Asimetría hipotalámica en los mecanismos que regulan la función del ovario. Estudio experimental en la rata adulta. Tesis de Doctorado en Biología de la Reproducción Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza" UNAM, México D.F., pp: 105

13. DALHSTROM A Y FUXE K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system: 1. Demonstration of monoamine in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand [Suppl]* 232: 1-55
14. DAY T, BLEESING W Y WILLOUGHBY J (1980) Noradrenergic and dopaminergic projections to the medial preoptic area of the rat: a combined horseradish peroxidase/catecholamine fluorescence study. *Brain Res* 193: 543-548
15. DEMLING J, FUCHS E, BAUMERT M Y WUTTE W (1985) Preoptic catecholamine, GABA, and glutamate release in ovariectomized and ovariectomized estrogen primed rats utilizing a pushpull cannula technique. *Neuroendocrinology* 41: 212-218
16. DÖCKE F, ROHDE W, OELSSNER W, SCHLEUSSNER E, GUTENSCHWAGER I Y DÖRNER G (1987) Influence of the medial preoptic dopaminergic activity on the efficiency of the negative estrogen feedback in prepuberal and cyclic female rats. *Neuroendocrinology* 46: 445-452
17. DOMINGUEZ R., RIBONI L., ZIPITRIA D Y REVILLA R (1982) Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat? *J. Endocrinol* 95: 175-180
18. DOMÍNGUEZ R, GAITÁN CM, MÉNDEZ SA Y ULLOA-AGUIRRE A (1987) Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *J. Endocrinol* 113: 37-44

19. DOMÍNGUEZ R, CHÁVEZ R Y CRUZ ME (1991) La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción Coordinador: Roberto Domínguez Casalá Editorial: Miguel Angel Porrúa México pp: 161-192
20. DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ A, DAMIAN P, TOMASSI C, LOYO R Y CRUZ ME (1996) Activity of the monoaminergic neurons in the preoptic-anterior hypothalamic area during the proestrus day of the rat, and its relationship with LH, estradiol and progesterone serum levels. *29<sup>th</sup> Annual Meeting Society for the Study of Reproduction*, Ontario Canadá, Poster 388
21. DOTTI C Y TALEISNIK S (1982) Inhibition of the release of LH and ovulation by activation of the noradrenergic system. Effect of interrupting the ascending pathways. *Brain Res* 249: 281-290
22. DOTTI C Y TALEISNIK S (1984) Beta-adrenergic receptors in the premammillary nucleus mediate the inhibition of release evoked by locus coeruleus stimulation. *Neuroendocrinology* 38: 6-11
23. DROUVA SB, LAPANTE E Y KORDON C (1983) Effects of ovarian steroids on *in vitro* release of LHRH from mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 37: 336-341
24. EGOZI Y, AVISSAR S Y SOKOLOVSKY M (1982) Muscarinic mechanisms and sex hormone secretion in rat adenohypophysis and preoptic area. *Neuroendocrinology* 35: 93-97
25. EGOZI Y, KLOOG Y Y SOKOLOVSKY M (1986) Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrous cycle. *Brain Research* 383: 313-313



26. EVERETT JW, SAWYER CH Y MARKEE JE (1949) A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 44: 234-239
27. EVERETT JW Y SAWYER CH (1950) A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbital sedation. *Endocrinology* 47: 198-218
28. EVERETT JW (1948) Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 43: 389-405
29. FAVARETTO AL, VALENCA MM, PICANCO-DINIZ DL Y ANTUNES-RODRIGUES JA (1993) Inhibitory role of cholinergic agonists on testosterone secretion by purified rat Leydig cells. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* 101; 6: 333-335
30. FINK G (1988) Gonadotropin secretion and its control. Physiology of Reproduction capitulo 32, Edits: E Knobil y J Neill, Raven Press, Ltd Nueva York, pp: 1349-1377
31. FIORINDO RP Y MARTINI L (1975) Evidence for cholinergic component in the neuroendocrine control of luteinizing hormone (LH) secretion. *Neuroendocrinology* 18: 322-332
32. FREEMAN ME (1994) The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. Physiology of Reproduction capitulo 46, Edit: E. Knobil y J. Neill. Raven Press, Ltd. Nueva York, pp: 613-658
33. GALLO RV Y DROUVA SV (1979) Effect of intra-ventricular infusion of catecholamines on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized, steroid-primed rats. *Neuroendocrinology* 29: 149-162

34. GALLO RV (1984) Further studies on norepinephrine-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 39: 120-125
35. GILAD GM, RABEY JM Y GILAD VH (1987) Presynaptic effects of glucocorticoids on dopaminergic and cholinergic synaptosomes. Implications for rapid endocrine-neural interactions in stress. *Life Sciences* 40: 2401-2408
36. GREENWALD GS Y ROY SK (1994) Follicular development and its control. Physiology of Reproduction capitulo 12, Edits: E Knobil y J Neill, Raven Press, Ltd Nueva York, pp: 629-724
37. HADFIELD HG, CRANE ME, NUGET EA, MILIO C Y NARASHIMASCHARI N (1985) Determination of 13 catecholamines, indolamines, metabolites and precursors in less than 20 minutes during a simple HPLC run. *J Liq Chrom* 8: 89-2697
38. HAISENLEDER DJ, DALKIN AC, ORTOLANO GA, MARSHALL JC Y SHUPNIK MA (1991) A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency *in vivo*. *Endocrinology* 128: 509-517
39. HEIMKE C, FROHNE D, BRUDER D Y GHRAF R (1983) Effects of oestradiol benzoate and progesterone on luteinizing hormone release and catecholamine turnover in the preoptic-hypothalamic brain area of ovariectomized rats. *J Endocr* 97: 437-445
40. HILL RT (1962) Paradoxical effects of ovarian secretions. In: The Ovary, vol. 2, Zuckerman S, New York: Academic Press, pp: 231-261

41. HIRSHFIELD AK Y MIDGLEY AR (1978) Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod* 19: 597-605
42. JARRY H, SPRENGER M Y WUTTKE W (1986) Rates of release of GABA and catecholamines in the mediobasal hypothalamus of ovariectomized and ovariectomized estrogen-treated rats: Correlation with blood prolactin levels. *Neuroendocrinology* 44: 422-428
43. JENNES L, BECKMAN WC, STUMP WE Y GRZANNA R (1982) Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. *Exp Brain Res* 46: 331-338
44. KALRA SP Y MCCANN SM (1974) Effects of drugs modifying catecholamine synthesis on plasma LH and ovulation in the rat. *Neuroendocrinology* 15: 79-91
45. KALRA SP Y KALRA PS (1984) Opioid-adrenergic steroid connection in regulation of LH secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 39:45-48
46. KARSCH FJ Y LEHMAN MN (1988) Do gonadotropin releasing hormone (GnRH) or dopaminergic neurons in the sheep contain estradiol receptors? *Soc Neurosci Abstr* 14: 1609
47. KISS J Y HALASZ B (1985) Demonstration of serotonergic axons terminating hormone-releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography. *Neuroscience* 14: 69
48. KÖNING JFR Y KLIPPEL RA (1963) The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain system. Edit: Williams and Wilkins Co., Baltimore, E.U.A.

- 49.KORDON C, DROUVA SV, MARTINEZ DE LA ESCALERA G Y WEINER RI (1994) Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. Physiology of Reproduction capítulo 27, Ed. E. Knobil y J. Neill Raven Press, Ltd. Nueva York, pp: 1621-1682
- 50.KOREN D, EGOZI Y Y SOKOLOVSKY M (1992) Muscarinic involvement in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat. *Molecular and Cellular Endocrinology* 90: 87-93
- 51.LANGMAN J (1976) Gametogenesis. Embriología Médica capítulo 1; 3° edición, Editorial Interamericana, México pp: 3-17
- 52.LEHMANN J Y LANGER SZ (1983) The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals? *Neuroscience* 10: 1105-1120
- 53.LEIPHEIMER RE, BONA-GALLO A Y GALLO RV (1984) The influence of progesterone and estradiol on the acute changes in pulsatile luteinizing hormone release induced by ovariectomy on diestrous day 1 in the rat. *Endocrinol* 114: 1605-1612
- 54.LERANTH CS, MACLUSKY NJ, SAKAMOTO H, SHANABROUGH M Y NAFTOLIN F (1985) Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology* 40: 536-539
- 55.MAZZUCA M (1977) Immunocytochemical and ultrastructural identification of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-containing neurons in the vascular organ of the lamina terminalis (OVLT) of the squirrel monkey. *Neurosci Lett* 5:123-127

- 56.MCGEER PL, ECCLES JC Y MCGEER EG (1987) Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain. 2° edn. NewYork: Plenum Press.
- 57.MICHELS KM, MEEKER RB Y HAYWARD JN (1986) Differential distribution of muscarinic cholinergic and putative nicotinic cholinergic receptors within the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Neuroendocrinology* 44: 498-507
- 58.MONTES GS Y LUQUE EH (1988) Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat* 133: 192-199
- 59.MUTH EA, CROWLEY WR Y JACOBOWITZ DM (1980) Effect of gonadal hormones on luteinizing hormone in plasma and on choline acetyltransferasa activity and acetylcholine levels in discrete nuclei of the rat brain. *Neuroendocrinology* 30: 329-336
- 60.NAFTOLIN F, LERANTH C Y MACHUSKY N (1986) Norepinephrine and dopamine innervation of medial preoptic area (MPO) LHRH and GABA neurons in the rat. *Soc Neurosci Abstr* 12: 1-152
- 61.OHTSUKA S, NISHIZAKI T, TASAKA K, MIYAKE A, TANIZAWA O, YAMATODANI A Y WADA H (1989) Estrogen stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat hypothalamus independently through catecholamine and histamine *in vitro*. *Acta Endocrinologica* 120: 644-648
- 62.PAWLIKOWSKI M, STEPIÉN H, WOLANIUK A Y KUNERT-RADEK J (1978) Influence of cholinergic receptors blockade and stimulation on the anterior pituitary mitotic activity. *Neuroendocrinology* 26: 85-92

63. PALKOVITS M (1979) Effect of surgical deafferentation on the transmitter and hormone content of the hypothalamus. *Neuroendocrinology* 29: 140-148
64. PARENT A, DESCARRIES L Y BEAUDET A (1981) Organization of ascending serotonin systems in the adult rat brain. A radioautographic study after intraventricular administration of [3H]S-hydroxytryptamine. *Neuroscience* 6: 15-138
65. PELLETIER G, LECLERC R Y DUBE D (1976) Immunocytochemical localization of hypothalamic hormones. *J Histochem Cytochem* 24: 864-871
66. RANCE N, WISE PM, SELMANOFF MK Y BARRACLOUGH CA (1981) Catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated with changes in median eminence luteinizing hormone-releasing and serum gonadotropins on proestrus and diestrus 1. *Endocrinology* 108: 1795-1802
67. ROSTZJEN WH, CHARLI JL, PATTOU E, EPELBAUM J Y KORDON C (1976) *In vitro* release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) from rat mediobasal hypothalamus: effects of potassium, calcium and dopamine. *Endocrinology* 99: 1663-1666
68. ROTSZTJEN WH, CHARLI JL, PATTOU E Y KORDON C (1977) Stimulation by dopamine of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) release from mediobasal hypothalamus in rats. *Endocrinology* 101: 1475-1483
69. RUÍZ DE GALARRETA CM, FANJUL LF Y MEITES J (1981) Influence of cholinergic and anticholinergic drugs on plasma luteinizing hormone and prolactin levels in male and female rats. *P.S.E.B.M.* 168: 185-195

- 70.SAMOCHOCKI M Y STROSZNAJDER J (1995) The negative coupling between serotonin and muscarinic receptor(s) for arachidonic acid and inositol phosphates release in brain cortex synaptoneuroosomes. Effect of aging. *Neurochem Int* 26: 571-578
- 71.SANHERA MK, GRADY S, SMITH W, WOODWARD DJ Y PORTER JC (1991) Incerthypothalamic A13 dopamine neurons: Effect of gonadal steroids on tyrosine hydroxylase. *Neuroendocrinology* 53: 268-275
- 72.SAVOY-MOORE RT, SCHWARTZ NB, DUNCAN JA Y MARSHALL JC (1980) Pituitary gonadotrophin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* 209: 942
- 73.SELTZER AM Y DONOSO AO (1992) Restraining action of GABA on estradiol-induce LH surge in the rat: GABA activity in brain nuclei and effects of GABA mimetics in the medial preoptic nucleus. *Neuroendocrinology* 55: 28-34
- 74.SEMBA K Y FIBIGIER HC (1989) Organization of central cholinergic system. *Progress in Brain Research* 79: 37-63
- 75.SHANNON NJ, GUNNET JW Y MOORE KE (1986) A comparison of biochemical indices of 5-Hydroxitriptamine neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *J Neurochemistry* 47: 958-965
- 76.SHIVERS BD, HARLAN RE, MORELL JI Y PFAFF DW (1983) Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304: 345-347

77. SIEGEL GJ, AGRANOFF BW, WAYNE RA Y MOLINOFF PB (1994) Basic Neurochemistry. 5° edn. New York: Raven Press; 1080 p.
78. SILVERMAN AJ (1988) The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry. Physiology of Reproduction capítulo 27 Edits: E. Knobil y J. Neill Raven Press, Ltd. Nueva York, pp: 1711-1746
79. SIMONOVIC I, MOTTA M Y MARTINI L (1974) Acetylcholine and the release of the follicle-stimulating hormone-releasing factor. *Endocrinology* 95: 1373-1379
80. STEINBUSCH HWM (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6: 557-618
81. STEINBUSCH HWM (1984) Serotonin-immunoreactive neurons and their projections in the CNS. In: Bjorklund A, Hökfelt T & Kuhar MJ eds. Handbook of chemical neuroanatomy, vol 3: Classical transmitters and transmitters receptors in the CNS Part 11. Amsterdam: Elsevier, 68-125
82. TASAKA K, MIYAKE A, SAKUMOTO T Y AONO T (1985) Dopamine decreases release of luteinizing hormone releasing hormone from superfused rat mediobasal hypothalamus. *J. Endocrinol Invest* 8: 373-376
83. TSAFRIRI A Y ADASHI EY (1994) Local Nonsteroidal Regulators of Ovarian Function. Physiology of Reproduction capítulo 15, Edits: E Knobil y J Neill, Raven Press, Ltd Nueva York, pp: 817-860

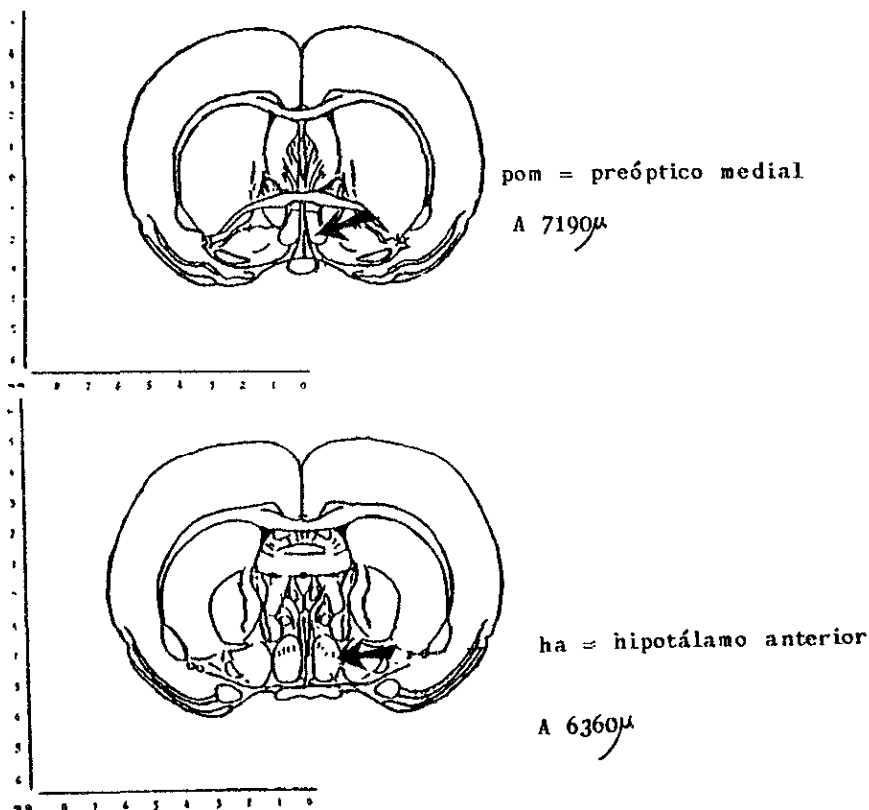


84. TUREK FRED W Y VAN CAUTER E (1994) Rhythms in reproduction. Physiology of Reproduction capítulo 43, Edits: E Knobil y J Neill, Raven Press, Ltd Nueva York, pp: 487-540
85. VATHY I Y ETGEN AM (1988) Ovarian steroids and hypothalamic norepinephrine release: studies using *in vivo* brain microdialysis. *Life Sciences* 43: 1493-1499
86. WEICK RF, SMITH ER, DOMÍNGUEZ R, DARIWAL A. Y DAVIDSON J (1971) Mechanisms of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. *Endocrinology* 88: 293-301
87. WEICK RF Y NOH KA (1984) Inhibitory effects of estrogen and progesterone on several parameters of pulsatile LH release in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 38: 351-356
88. XU M, YAMAMOTO T Y KATO T (1990) *In Vivo* striatal dopamine release by M1 muscarinic receptors is induced by activation of protein kinase C. *Journal of Neurochemistry* 54: 1917-1919
89. ZELEZNIK AJ Y FAIRCHILD DB (1994) Control of Follicular Development, Corpus Luteum Function, and the Recognition of Pregnancy in Higher Primates. Physiology of Reproduction capítulo 49, Edits: E Knobil y J Neill, Raven Press, Ltd Nueva York, pp: 751-782

## 14 . APÉNDICE

### 14 . 1 Obtención de muestras de tejido cerebral

El cerebro fue disecado y colocado en solución salina helada (0°C) e inmediatamente después congelado con nitrógeno líquido. Con un hipotalamómetro, se cortaron rebanadas coronales que abarcaron a POA-AHA considerando las coordenadas A-7190 a A-6360 según el atlas de cerebro de rata de König y Klippel (48) y con un sacabocados se extrajo el área de estudio (Esquema A).



Esquema A: Localización del área preóptica-hipotalámica anterior (señalado por flechas) en un corte coronal del cerebro de rata (Tomado de König y Klippel, [48]).

## 14 . 2 Cuantificación de monoaminas

### 14 . 2 . 1 Preparación de las muestras

El tejido cerebral fue pesado en una balanza electrónica con una precisión de 0.1 mg, dentro de un tubo eppendorf de 0.5 ml y posteriormente suspendidas en 150  $\mu$ l de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4=0.1$  N). El tejido cerebral fue homogenizado por sonicación en frío durante 5 segundos y se centrifugó a 12,500 r.p.m. a  $-4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Del sobrenadante se tomaron 50  $\mu$ l para su análisis al cromatógrafo de líquidos.

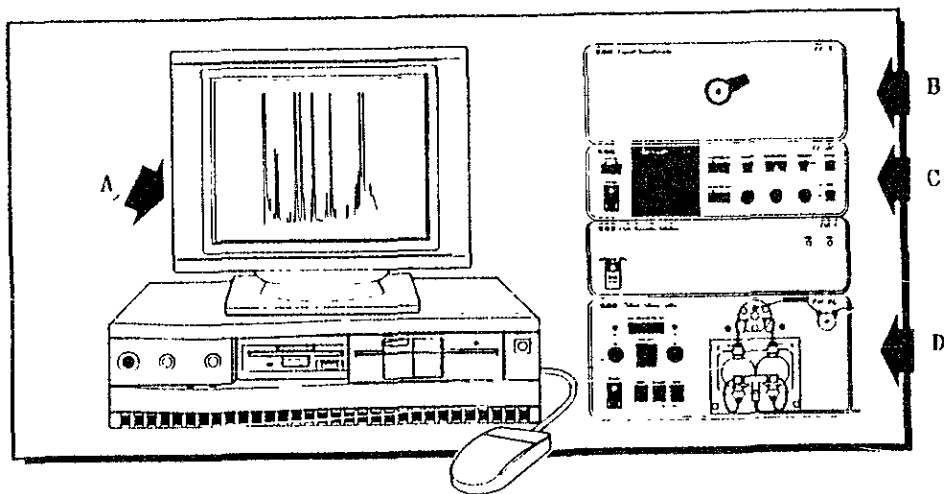
### 14 . 2 . 2 Fase móvil

Se empleó agua altamente purificada ( $> 10$  M $\Omega$ , con un equipo Millipore RG) para elaborar un buffer de citratos (Citrato de sodio, Merck-México) 0.1 M pH=3 al que se le adicionó 200 mg/lit de ácido sulfónico 1-octano sal ácido (SOS) usado como detergente. Una vez preparado el buffer, fue filtrado a vacío a través de una membrana con tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m (Millipore Bedford, MA; USA). Posteriormente la solución fue gasificada con helio y finalmente se degaseada a vacío durante 30 minutos. Se le adicionaron las siguientes cantidades de los solventes orgánicos: acetonitrilo (ACN= 20 ml), tetrahidrofurano (THF= 15 ml). La fase fue bombeada al sistema de HPLC con un flujo de 1.2 ml/min.

### 14 . 2 . 3 Equipo HPLC

Se empleó un equipo Perkin-Elmer el cual contó con una bomba isocrática digital (L-250 modelo Perkin-Elmer), un detector amperométrico (modelo L4-C4, Bioanalytical System-BAS Inc) acoplado

a un electrodo electroquímico denominado electrodo de trabajo, hecho de carbón vidriado al que se le aplicó un potencial de 0.85 V contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl, siendo la ganancia del detector de 5.0 nA. Se utilizó una columna C-18 de 250 mm de largo por 4.6 mm de diámetro (Perkin-Elmer) con partículas "Pecosil" de relleno de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las muestras se introdujeron en el inyector (Rheodyne modelo 7125) con un loop de 20  $\mu\text{l}$ . Los datos fueron procesados por un integrador (modelo 1020, Perkin-Elmer) (Esquema B).



Esquema B: Cromatógrafo de líquidos empleado en este estudio. (A) Integrador, (B) Inyector, (C) Detector y (D) Bomba.

#### 14 . 2 . 4 Preparación de estándares

Solución A<sup>1</sup>: se pesaron entre 3 y 5 mg de los siguientes fármacos: NA ((-)-Arterenol base libre), MHPG (4-hidroxy-3-metoxifenil glycol), DA (3-hidroxy tiramine hydrochloride), DOPAC (3,4-dihidroxy-phenilacetic acid), 5-HT (5-hidroxytryptamine) y 5-HIAA (5-hidroxyindole-3-acetic acid), los que fueron diluidos por separado en ácido perclórico 0.1 N en el doble de volumen. Solución B: se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de cada uno de los estándares y se aforaron en 10 ml de ácido perclórico<sup>2</sup>. Solución C: se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de la solución B y se llevaron a 1200  $\mu\text{l}$  (estándar de 2 ng). Solución D: se tomaron 500  $\mu\text{l}$  de la solución C y se llevaron a 1000  $\mu\text{l}$  (estándar de 1 ng). Solución E: se tomaron 250  $\mu\text{l}$  de solución C y se llevaron a 1000  $\mu\text{l}$  (estándar de 0.5 ng) (Esquema C).

#### 14 . 2 . 5 Calibración del equipo

El integrador fue calibrado por el método externo, usando tres concentraciones diferentes (2, 1 y 0.5 ng). El factor de correlación fue aproximadamente de 0.9995 para cada uno de los compuestos. La sensibilidad del aparato para cada estándar fue 0.05 ng (Esquema D).

#### 14 . 2 . 6 Factor de dilución

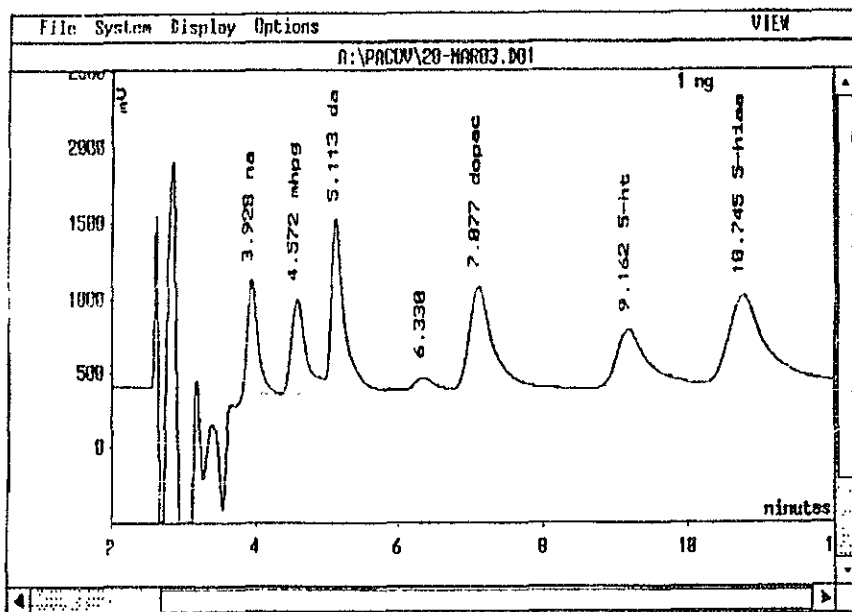
La concentración tisular de los neurotransmisores y sus metabolitos se calcularon multiplicando el valor obtenido directamente del cromatograma por el volumen total en que se diluyó la muestra (150  $\mu\text{l}$ ), el resultado se dividió entre el volumen de la inyección (20  $\mu\text{l}$ ) y por último, se dividió

---

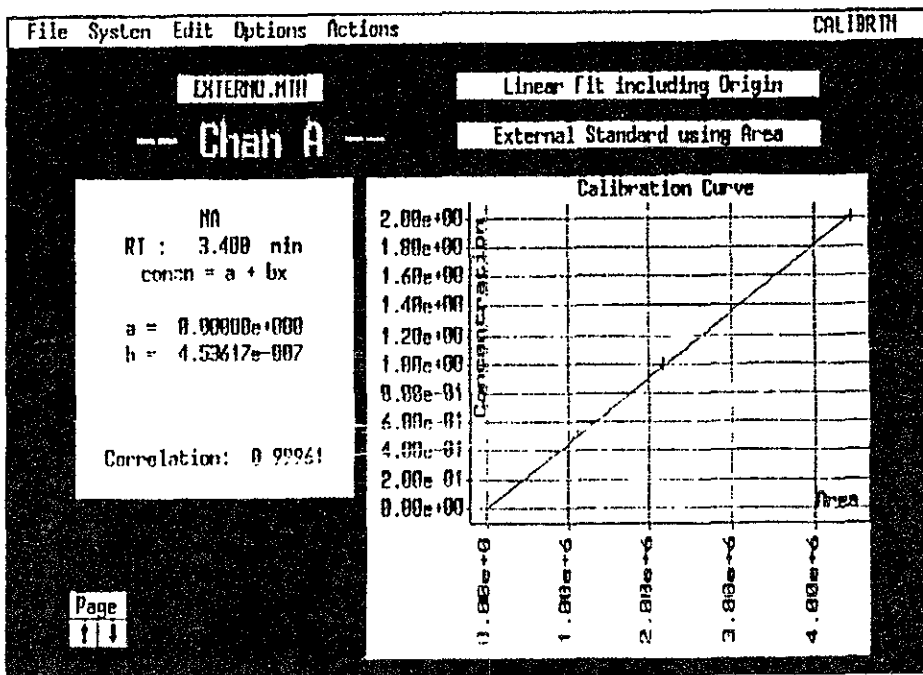
<sup>1</sup> La solución A o solución madre se prepara mensualmente y se mantiene a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

<sup>2</sup> La solución B se prepara en el día en el que se cuantifican por HPLC las monoaminas y sus metabolitos de un lote de muestras.

entre el peso de la muestra. La concentración para cada neurotransmisor y cada metabolito se expresó en ng/mg de tejido.



Esquema C: Cromatograma de un estándar con una concentración de 1 ng, donde aparecen los tiempos de retención para cada neurotransmisor y cada metabolito.



Esquema D: Curva de calibración del método estándar externo, utilizando una regresión lineal que muestra los tres puntos de concentración diferente (0.5, 1 y 2 ng) para el neurotransmisor noradrenalina.

### 14 . 3 Cuantificación de las hormonas FSH, LH, estrógenos y progesterona

#### 14 . 3 . 1 Toma de muestras

Del suero obtenido de la sangre de cada animal, se tomaron 100  $\mu$ l y se colocaron en el tubo donde se realizó el análisis.

#### 14 . 3 . 2 Anticuerpos

El anticuerpo que se empleó en el análisis de hormonas hipofisarias y esteroides es obtenido del suero de conejo, del tipo RP2.

#### 14 . 3 . 3 Hormonas Marcadas

Las hormonas FSH, LH, estradiol y progesterona fueron marcadas con el radioisótopo <sup>125</sup>I.

#### 14 . 3 . 4 Preparacion de muestras

A 100  $\mu$ l de suero (por duplicado para cada animal), se le añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpo de suero de borrego para FSH y para LH; se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas; se adicionaron 100  $\mu$ l del segundo anticuerpo obtenido del suero normal de conejo y se agitaron 1 minuto. A continuación todos los tubos fueron centrifugados a 3000 r.p.m. a -4°C, decantados y secados hasta medio tubo. Finalmente las muestras se analizaron en el contador de centelleo.



### 14 . 3 . 5 Preparación de estándares

⇒ FSH (rFSH-RP2) y LH (rLH-RP2):

solución A= rFSH ó rLH - RP2 en una concentración de 100 ng/1000  $\mu$ l.

solución B= 100  $\mu$ l de solución A + 900  $\mu$ l PBS-GEL<sup>3</sup> dando una concentración de 10 ng/1000  $\mu$ l

Curva patrón para FSH: A=0.1, B=0.25, C=0.5, D=1, E=2, F=4, G=6 y H=8 ng.

Curva patrón para LH: A=0.05, B=0.1, C=0.25, D=0.5, E=1, F=2, G=4 y H=6.

⇒ Estradiol y Progesterona:

El estuche comercial que se utilizó en ambos análisis contiene 7 calibradores con diferente concentración: Progesterona: calibrador A=0, B=0.1, C=0.5, D=2, E=10, F=20 y G=40 ng/ml.

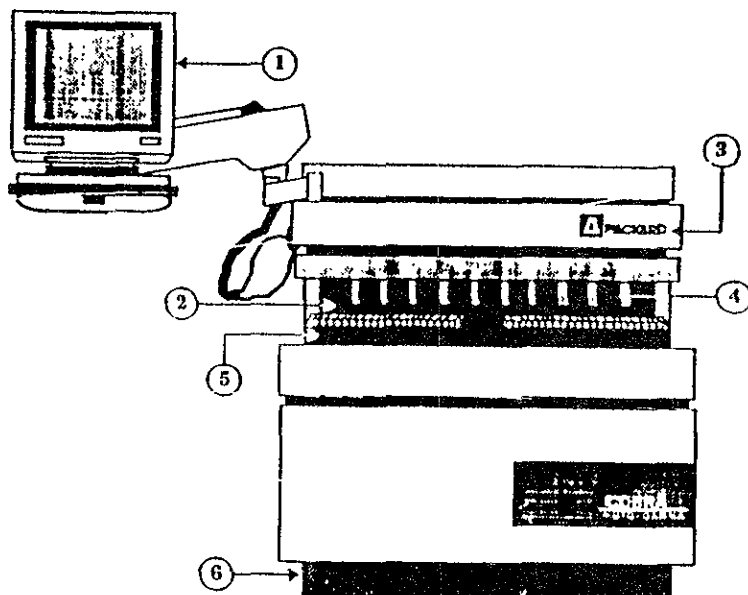
Estrógenos: calibrador A=0, B=20, C=50, D=150, E=500, F=1800 y G=2600 pg/ml.

### 14 . 3 . 6 Equipo de Centelleo

Packard modelo Cobra Auto-Gamma 5005, con un detector de 1.5 pulgadas que consta de talio activado y cristales de sodio yodado. Cada cristal está acoplado ópticamente a un tubo fotomúltiple (5 pozos de conteo). El intervalo de energía para el radioisótopo <sup>125</sup>I es de 15-75 keV, la eficiencia es del 74%,1 resolución mayor del 34% y "background" mayor de 30 cuentas por minuto (CPM) (Esquema E).

---

<sup>3</sup> Gel + buffer de fosfatos (medio de sostén).

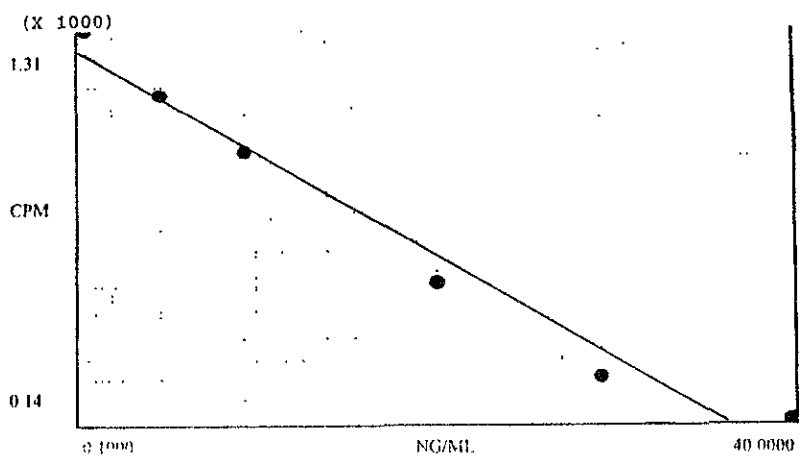


Esquema E: Contador de centelleo líquido empleado en este estudio. (1) Integrador y monitor, (2) Pozos de detección, (3) Localización de los detectores, (4) Ducto hacia los pozos, (5) Riel del cassette y (6) Conexión para la impresora.

#### 14.3.7 Calibración del equipo

Se utilizó una curva de calibración semilogarítmica con un factor de correlación de 0.995. La sensibilidad del equipo fue de 2 pg. El resultado obtenido de las lecturas en cuentas por minuto (CPM) de cada muestra fueron recalculados y expresados en ng/ml para la FSH, LH y progesterona. Para el caso del estradiol las concentraciones obtenidas en el suero se expresaron en pg/ml (Esquema F).

27 Jan 97 09:96 Packard Instrument Company  
 Protocol # : 3 P4  
 WARNING: CURRENT CURVE FAILS TEMPLATE CRITERIA  
 Assay Type : RIA CPM BOUND



STD #	CPM	DEFINED DOSE	% B/F	CALC. DOSE	% DIFF
2	13112	0.10000		0.16587	65.87
3	10590	0.50000		0.34182	-31.64
4	6694	2.00000		0.31494	-34.25
5	3141	10.00000		9.02056	-9.79
6	2200	20.00000		21.00455	5.02
7	1432	40.00000		56.63426	41.59

Curve fit LOGIT Transform LOG Transform Y LOGIT  
 Corr Coef 0.9870 Slope -1.0541  
 Det Limit 0.1000 Para Coef 0.9757  
 % NSB/Total %Ref/Total 39.310  
 ED20 1.3271 ED50 OFF CURVE ED80 OFF CURVE  
 %Digma Std. 2.4311  
 Intercept -1.2567

Esquema F: Curva de calibración para progesterona donde se muestran las lecturas en cuentas por minuto (CPM) de las concentraciones de cada uno de los calibradores.