



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**LA ASIMETRÍA DEL SISTEMA COLINÉRGICO MUSCARÍNICO DE POA-AHA EN LA
REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN
¿DEPENDE DE LA INFORMACIÓN NEURAL QUE SE ORIGINA EN LOS OVARIOS?**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

FLORENCIA ADRIANA ESPINOSA VALDEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNAM

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

ENERO 2017.



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 AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**LA ASIMETRÍA DEL SISTEMA COLINÉRGICO MUSCARÍNICO DE POA-AHA EN LA
REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN
¿DEPENDE DE LA INFORMACIÓN NEURAL QUE SE ORIGINA EN LOS OVARIOS?**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

FLORENCIA ADRIANA ESPINOSA VALDEZ

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA UNAM

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

ENERO 2017.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna, **ESPINOSA VALDEZ FLORENCIA ADRIANA** con número de cuenta **97238357** con la tesis titulada **"LA ASIMETRÍA DEL SISTEMA COLINÉRGICO MUSCARÍNICO DE POA-AHA EN LA REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN ¿DEPENDE DE LA INFORMACIÓN NEURAL QUE SE ORIGINA EN LOS OVARIOS?"**, bajo la dirección del Tutor Principal: **DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN**.

Presidente: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA
Vocal: DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA
Secretario: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ
Suplente: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Suplente: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 05 de enero de 2017.



M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDÍ ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

*Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.
Área Biología Experimental*

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Neuroendocrinología de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.

Para la realización de esta tesis se contó con el siguiente apoyo financiero:

- Beca de Doctorado otorgada por CONACYT 29240
- Proyecto de investigación UNAM-DGAPA-PAPIIT No. 220014-3

A la Dra. María Esther Cruz Beltrán

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Agradecimientos

No importa de dónde vengas, son tus decisiones lo que determinan tu destino...

Agradezco a la Dra. María Esther Cruz Beltrán por todo su apoyo durante estos 4 años, gracias por abrirme las puertas de un mundo único. Gracias por enseñarme con su gran ejemplo el significado de ser todo un mujerón, que cuando se quiere se puede combinar a la perfección cada faceta de lo que significa ser profesionalista, madre, esposa y hija.

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá, no existen palabras suficientes en este u otro idioma que puedan expresar el inmenso agradecimiento, cariño y respeto que le profesó, sin embargo las tomaré prestadas de alguien más:

*Como el aroma de una noche celestial
como las manos de la fría ansiedad
eres tú, así es como eres tú...*

*Una palabra que aclama despertar
a quien adoras y a quien siempre seguirás
eres tú, así es como eres tú...*

*Un aléluya al sentir, al respirar
una caricia, es un bramido del mar
eres tú, así es como eres tú...*

*Eres silencio, eres calma en esta paz
eres infierno, eres tú la tempestad...*

*Como el aroma de una noche celestial
como las manos de la fría ansiedad
eres tú, así es como eres tú...*

*Eres mi angustia, mi principio, mi final
eres capullo que ha creado el bien y el mal
eres tú, así es como eres tú
eres tú, así es como eres tú...*

Dr. Roberto de usted aprendí la mayor lección que se ha tatuado a fuerza de su gran ejemplo en mi vida y cuyo precepto transcribo a continuación: “Aquel que desee convertirse en maestro del hombre, debe empezar por enseñarse así mismo antes de enseñar a los demás; y debe enseñar primero con el ejemplo antes de que lo haga verbalmente. Pues aquel que se enseña a sí mismo y rectifica sus propios procedimientos, merece más respeto y estimación que el que enseña y corrige a otros, eximiéndose a él mismo”. Por su infinito apoyo, por su increíble paciencia, por guiar mis pasos, porque sin vos yo no sería quién soy...eternas gracias...

Dr. Ignacio Camacho Arroyo, muchísimas gracias por todas sus observaciones en el enriquecimiento de este trabajo y de mi formación profesional.

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura, no tengo adjetivos para expresarle todo el reconocimiento que su persona me merece, de verdad gracias infinitas por todo su apoyo, paciencia, dedicación y enseñanzas.

Dra. Ana Lilia Cerda Molina, infinitas gracias por todo su apoyo.

Dra. María Elena Ayala, gracias por todas sus sugerencias y consejos durante mi trayectoria académica.

Mención aparte quiero agradecer a una increíble mujer que ha sido un gran ejemplo a seguir, gracias por todas sus enseñanzas de verdad mil gracias: Dra. Juana Monroy Moreno.

Maestra Angélica Flores Ramírez gracias por todo su apoyo.

A todo el personal de la Unidad de Posgrado tanto de la FES Zaragoza como de CU, en verdad gracias.

A los Doctores Román, Adriana y Elizabeth muchísimas gracias no solo por el cuidado de mis organismos sino también por su sincero afecto.

Quiero dar especiales gracias a aquellos seres imperecederos que desde la eternidad han cuidado mis pasos, han velado mis sueños, han llenado de bendiciones mi camino. Mi amor para ustedes por siempre, el tiempo para volver a reunirnos siempre será más corto...

A mis compañeros pasados y presentes gracias por hacer mi estancia doctoral una experiencia enriquecedora: Sandra (Sandungudunguirungui), Luisito, Dianita, Abby (Gaby Tae), mi "sobrina" Ingrid, Dr. Juan Antonio Díaz Ramos (gracias amigo por cada palabra de apoyo en momentos cruciales), Iván Mata, Noé Lagunas, Toñito, Dr. Fernando Cortés y en especial a mi compinche del mal Dr. David López Estrada no tengo más que palabras de agradecimiento para ti y tu señora madre Doña Elenita, por todos los momentos gratos de verdad a todos ustedes muchas gracias ♥ ♥ ♥

Dedicatorias

*No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,
sin haber sido feliz, sin haber aumentado tus sueños.
No te dejes vencer por el desaliento.
No permitas que nadie te quite el derecho a expresarte,
que es casi un deber.
No abandones las ansias de hacer de tu vida algo extraordinario.
No dejes de creer que las palabras y las poesías
sí pueden cambiar el mundo.
Pase lo que pase nuestra esencia está intacta.
Somos seres llenos de pasión.
La vida es desierto y oasis.
Nos derriba, nos lastima,
nos enseña,
nos convierte en protagonistas
de nuestra propia historia.
Aunque el viento sople en contra,
la poderosa obra continúa:
Tú puedes aportar una estrofa.
No dejes nunca de soñar,
porque en sueños es libre el hombre.
No caigas en el peor de los errores:
el silencio.
La mayoría vive en un silencio espantoso.
No te resignes.
Huye.
“Emito mis alaridos por los techos de este mundo”,
dice el poeta.
Valora la belleza de las cosas simples.
Se puede hacer bella poesía sobre pequeñas cosas,
pero no podemos remar en contra de nosotros mismos.
Eso transforma la vida en un infierno.*

*Disfruta del pánico que te provoca
tener la vida por delante.
Vívela intensamente,
sin mediocridad.
Piensa que en ti está el futuro
y encara la tarea con orgullo y sin miedo.
Aprende de quienes puedan enseñarte.
Las experiencias de quienes nos precedieron
de nuestros "poetas muertos",
te ayudan a caminar por la vida
La sociedad de hoy somos nosotros:
Los "poetas vivos".
No permitas que la vida te pase a ti sin que la vivas...*

Walt Whitman

Este trabajo no es solo para las personas que me han amado y apoyado durante este camino, no tienen idea de cuánto ha significado su soporte para mí; pero para aquellas personas negativas que dudaron de mí, para todos aquellos que me hicieron probar el infierno en vida y dijeron que no podía, que no lo haría, que no debía; su oposición me hizo más fuerte, me motivó, me convirtió en la guerrera que soy hoy en día, me hizo ser la incansable mujer que soy ahora, así que gracias...

Organización del trabajo de investigación

La presentación escrita del trabajo de investigación se organizó en 2 capítulos, una discusión general, un modelo general, conclusiones y bibliografía.

Primer capítulo. Este capítulo está destinado a la investigación sobre la participación del sistema colinérgico muscarínico en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, las asimetrías hipotalámicas, la asimetría del sistema muscarínico y la función reguladora del ovario sobre el hipotálamo. Este capítulo incluye los antecedentes, el planteamiento del problema, la hipótesis, así como los objetivos propuestos para llevar a cabo la investigación. Al final del capítulo se presenta el artículo que se publicó como resultado de este primer objetivo.

Segundo capítulo. En este capítulo se muestran los manuscritos elaborados a partir de la investigación aprobada por el Comité Académico y que se desarrollaron durante las Actividades Académicas y de Investigación (I-VIII), bajo la supervisión del Comité Tutor.

Índice

<i>Resumen.....</i>	<i>1</i>
<i>Summary.....</i>	<i>2</i>
<i>Capítulo 1.....</i>	<i>4</i>
<i>Introducción.....</i>	<i>5</i>
<i>Antecedentes</i>	
<i>Participación del sistema colinérgico muscarínico en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....</i>	<i>7</i>
<i>Asimetrías hipotalámicas.....</i>	<i>8</i>
<i>Asimetría del sistema muscarínico.....</i>	<i>11</i>
<i>La función reguladora del ovario sobre el hipotálamo.....</i>	<i>14</i>
<i>Justificación.....</i>	<i>15</i>
<i>Hipótesis.....</i>	<i>16</i>
<i>Objetivo general.....</i>	<i>16</i>
<i>Objetivos particulares.....</i>	<i>16</i>
<i>Resultados.....</i>	<i>17</i>
<i>Discusión.....</i>	<i>28</i>
<i>Conclusiones.....</i>	<i>34</i>
<i>Anexos</i>	
<i>Modelos experimentales.....</i>	<i>35</i>

<i>Literatura citada</i>	39
<i>Capítulo 2</i>	46
<i>Papel de la inervación de la pared abdominal y el peritoneo en la regulación de la ovulación</i>	47
<i>Regulación de la síntesis y secreción de la GnRH y sus efectos sobre la ovulación</i>	61
<i>Asimetría hipotalámica y la regulación neuroendocrina de las glándulas endocrinas</i>	91
BIBLIOGRAFÍA	105

Resumen

En el día del diestro-2, el bloqueo prolongado (por medio de implantes de cristales de atropina) de los receptores muscarínicos (mAChR) del área preoptica hipotalámica anterior (POA-AHA) izquierda impide la ovulación. En el presente estudio se analizaron los efectos del bloqueo agudo de dichos receptores realizado a las 13:00 h del diestro-2, sobre la ovulación y algunos de los mecanismos neuroendocrinos que la regulan. Para ello, se analizaron: 1) los efectos sobre la ovulación del bloqueo de los mAChR de POA-AHA izquierda o derecha, por la micro-inyección de 62.5 ng o 6.25 µg de atropina. 2) El efecto de la ausencia de uno de los ovarios (ULO) sobre la ovulación y 3) el papel de los mAChR de uno y otro lado de POA-AHA en el animal con ULO. Con el fin de analizar cuál de las señales endócrinas fueron alteradas por los tratamientos experimentales y que resultaron en ausencia de la ovulación, ratas con dichos tratamientos fueron inyectadas con hormona liberadora de la hormona luteinizante sintética (LHRH) o con benzoato de estradiol (BE).

Los resultados obtenidos muestran que la atropina micro-inyectada en POA-AHA izquierda disminuyó la tasa de ovulación y la concentración de estradiol y LH en la tarde de proestro. La inyección de LHRH o EB reestableció la ovulación en estos animales.

La ULO izquierda o derecha resultó en la disminución de la tasa de ovulación y en un menor número de ovocitos liberados. La inyección de LHRH restauró la ovulación en ratas con ULO, sin embargo la inyección de BE solo estimuló la ovulación en animales con el ovario izquierdo *in situ*. La concentración de estradiol, FSH y LH en ratas con ULO izquierda fueron mayores que en animales con laparotomía unilateral.

En el grupo de animales con ULO y micro-inyectados con atropina en POA-AHA izquierda, la ovulación fue similar a la de las ratas con ULO. En cambio, la ovulación se bloqueó en el grupo de ratas con ULO y micro-inyección de ATR en POA-AHA derecha, efecto que fue revertido por la inyección de LHRH o BE.

En conjunto, los resultados confirmaron que a las 13:00 h del diestro-2, la activación de los mAChRs en el lado izquierdo de la POA-AHA es necesaria para la secreción preovulatoria de GnRH, LH y la ovulación. Además, que la estimulación de

estos receptores es un componente clave en la retroalimentación estimulante de los estrógenos, y que los ovarios regulan la actividad del sistema muscarínico de POA-AHA derecha, pero no la de POA-AHA izquierda.

Summary

On the diestrus-2 day, prolonged blockade of the muscarinic receptor (mAChR) of the left POA-AHA prevents ovulation. In the present study, we analyzed the effects of the acute blockade of these receptors performed at 13:00 h of diestrus-2, on ovulation and some of the neuroendocrine mechanisms that regulate it. For this, the effects of the blockade of left or right POA-AHA mAChR were analyzed by the microinjection of 62.5 ng or 6.25 µg of atropine on ovulation. The blocking of the POA-AHA left mAChR resulted in the lack of ovulation, effect that was not observed in the treatments on the right side. Injection of the gonadotropin-releasing hormone (LHRH) or estradiol benzoate (BE) stimulated ovulation in animals treated in POA-AHA left. Unilateral ovariectomy (ULO) at the same time reduced the number of ovulating animals. Injection of LHRH in animals with unilateral ovariectomy stimulated ovulation, whereas the injection of BE induced it only in the animals that maintained the left ovary. Unilateral ovariectomy in animals with blockage of the right POA-AHA mAChR resulted in the absence of ovulation. Taken together, the present results confirmed that at 13:00 h of diestrus-2 day, activation of mAChRs on the left side of the POA-AHA is required for the preovulatory secretion of GnRH and LH necessary for ovulation. Additionally, stimulation of these receptors is a key component of the stimulatory feedback of estrogens. We propose that the muscarinic system in the right POA-AHA participates in a feedback effect, by steroid hormones, on the preovulatory secretion of gonadotropins and ovulation.

Capítulo 1

Introducción

El sistema colinérgico regula la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), la secreción de la hormona luteinizante (LH), de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la ovulación (Everett *et al.*, 1949, Sawyer *et al.*, 1949, Markee *et al.*, 1952, Libertum y McCann, 1973). El Implante intra-hipotalámico de atropina (ATR) resulta en la disminución del peso de los ovarios en los animales con ambas gónadas y en ratas con ovariectomía unilateral, previene la hipertrofia compensadora del ovario (COH) (Monti *et al.*, 1970, Sala *et al.*, 1971).

La regulación que ejerce el sistema colinérgico sobre la ovulación varía con la hora y el día del ciclo estral (Domínguez *et al.*, 1982). El bloqueo de los mAChR del POA-AHA afecta la ovulación, pero esto depende del lado de POA-AHA y del día del ciclo. En el día del estro el implante de atropina que bloquea la ovulación es el del lado derecho. En el día del diestro-1, tanto el colocado en el lado izquierdo como en el derecho la afectan. En diestro-2, el implante efectivo es el colocado en la porción izquierda de POA-AHA y en el día del proestro los implantes en uno u otro lado de POA-AHA no la modifican (Cruz *et al.*, 1989).

La falta de ovulación en animales con implante de atropina en POA-AHA derecha realizado en el estro se modifica cuando se elimina uno u otro ovario (ULO), ya que, al extirpar un u otro ovario en este día, el efecto por el implante de atropina se invierte, siendo ahora los animales con implante en el lado izquierdo los que no ovulan (Cruz *et al.*, 1992).

Esta falta de ovulación en animales con ULO y con implante de atropina en POA-AHA es explicado por las modificaciones en la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de LHRH sintético a las 14:00 horas de este día, induce la ovulación en ratas con implante de atropina que no habían ovulado, modificación que parece ser el resultado de una alteración en el efecto “feedback” estimulante de los estrógenos en POA-AHA derecha, ya que al reestablecer esta señal ovárica en la tarde del diestro-2 (por la inyección subcutánea de 10 µg benzoato de estradiol), no se induce la ovulación (Cruz *et al.*, 1992).

Cada ovario regula de manera asimétrica la concentración sérica de E₂, lo que sugiere que cada ovario secreta una cantidad diferente de esta hormona, ya que cuando se extirpa el ovario izquierdo, la concentración sérica de 17β-estradiol es semejante a un animal con ambos ovarios, mientras que cuando se extirpa el ovario derecho, la concentración de estradiol es menor (Cruz *et al.*, 2006).

Con la finalidad de estudiar si a las 13:00 h del diestro-2 la información neural proveniente de uno u otro ovario participa en la regulación que el sistema colinérgico de POA-AHA ejerce sobre la ovulación se analizaron:

- 1) Los efectos del bloqueo de los mAChR en el lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre la ovulación.
- 2) Los efectos de la ausencia de un ovario sobre la ovulación.
- 3) Los efectos de la ausencia de un ovario en animales con bloqueo unilateral de los mAChR de POA-AHA sobre la ovulación.
- 4) Los efectos del bloqueo unilateral de los mAChR de POA-AHA o de la ULO sobre la concentración sérica de estradiol, FSH y LH en el día del proestro esperado.
- 5) Con la finalidad de conocer si la falta de ovulación se debió a modificación de la secreción preovulatoria de la GnRH se analizó el efecto de la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH mediante la inyección subcutánea de 3.7 µg/kg de LHRH (Sigma Chemical Company St. Louis MO) sintética a las 14:00 h en el día del proestro esperado de los grupos con bloqueo de la ovulación.
- 6) Para conocer si la falta de ovulación se debió a la modificación de la secreción preovulatoria de estradiol; se analizó el efecto de la sensibilidad del hipotálamo a los estrógenos mediante la inyección subcutánea de 10 µg de benzoato de estradiol (Sigma Chemical Company St. Louis MO) a las 14:00 h del diestro-2 esperado de los grupos con bloqueo de la ovulación.

Antecedentes

Antecedentes

Participación del sistema colinérgico muscarínico en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario

Las neuronas colinérgicas se organizan principalmente como circuitos locales y neuronas de proyección (Herbison, 2015). En el cerebro anterior de la rata se han identificado dos vías colinérgicas principales. La vía tegmental dorsal que proviene de los somas colinérgicos del núcleo cuneiforme de la formación reticulada mesencefálica, cuyas fibras proyectan hacia el tectum, el área pretectal, los cuerpos geniculados, el tálamo y el sistema límbico. En la sustancia nigra y el núcleo tegmental ventral del cerebro medio existen neuronas colinérgicas cuyas proyecciones viajan a lo largo del haz tegmental ventral y atraviesan el hipotálamo y el subtálamo hasta llegar al tallo cerebral (Nisticó y Müller, 1989). En el núcleo submamilar del hipotálamo se encuentra un conglomerado denso de neuronas colinérgicas (Jacobowitz y Palkovits, 1974), mientras que en hipotálamo posterior y lateral existen células aisladas de este tipo, excepto en la parte rostral de este último (Müller, 1977). Dispersas en las áreas posterior y lateral del hipotálamo existen otras neuronas inmunoreactivas a la acetilcolinesterasa (AChE) (ir-AChE). El área preóptica lateral (POA_l) es rica en células ir-AChE y aquellas que se ubican en la porción dorsal de POA envían fibras hacia la amígdala, vía la estría terminal. En el hipotálamo dorsal se encuentran células AChE positivas, que se proyectan hacia el globo pálido y el núcleo reticular. Los núcleos supraquiasmático, periventricular y arcuato tienen pocas fibras AChE, mientras que algunas células de los núcleos mamilares, supraóptico y el paraventricular tienen una concentración moderada de la enzima, pero sus axones carecen de ella (Jacobowitz y Palkovits, 1974; Müller, 1977).

En el POA de ratas macho y hembra existen diferencias sexuales en el número de sitios de unión a agonistas muscarínicos, siendo mayor en los machos que en las

hembras. En ratas hembras cíclicas se observa que en el POA la población de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos es mayor en el día del proestro que en los demás días del ciclo estral (66 vs. 38%). La lesión del área preóptica medial (POA_m) y del área preóptica posterior (POA_p) provocada por la inyección de 6-hidroxidopamina produce un decremento del 60% del número total de mAChR en el hipotálamo, por lo que es posible pensar en la existencia de mAChR presinápticos ubicados en las terminales catecolaminérgicas del hipotálamo (Avisar *et al.*, 1981).

En el hipotálamo y la adenohipófisis de la rata, el E₂ y la P₄ disminuyen la proporción de sitios de unión de alta afinidad y la constante de disociación (evaluados por ensayos de competencia con H³-N-metil-4-piperidil bencilato, antagonista muscarínico tritiado de alta afinidad). A partir de estos resultados se sugirió que existe una vinculación entre el sistema colinérgico muscarínico y los mecanismos por los cuales los esteroides ováricos inducen la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis (Sokolovsky *et al.*, 1981).

Las primeras evidencias de la participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas fueron obtenidas por los experimentos de Everett *et al.*, (1949), Sawyer *et al.*, (1949) y Markee *et al.*, (1952) quienes describieron que el bloqueo de este sistema, por la inyección subcutánea de atropina, interrumpe la ovulación de la coneja (un animal de ovulación refleja) cuando se administra inmediatamente después del coito y en la rata (un animal de ovulación espontánea), se bloquea la ovulación cuando se inyecta en la mañana del proestro.

En la rata, la inyección subcutánea de sulfato de atropina (70 mg/100 g de peso) o su aplicación directa en el tercer ventrículo cerebral (250 µg), entre las 11:00 y 13:00 horas del proestro, bloquea la secreción de LH, FSH y prolactina (PRL). En estos animales, la inyección de GnRH sintética restablece la liberación de LH, por lo que se concluyó que sus efectos eran en el sistema nervioso central (SNC) y que el bloqueo de los receptores muscarínicos alteraba la secreción normal de la GnRH (Libertum y McCann, 1973). Los implantes intra-hipotálamicos de atropina resultan en la disminución del peso del ovario en animales con ambas gónadas y previene la

hipertrofia compensadora del ovario en ratas con ovariectomía unilateral (Monti *et al.*, 1970, Sala *et al.*, 1971).

Estudios *in vivo* muestran que en el POA de la rata hembra, el número de mAChR varía durante el ciclo estral. En la mañana del proestro se observa un aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad a agonistas muscarínicos (60%), comparado con lo observado en diestro-2 o en la tarde del proestro (35%). Los cambios significativos en los mAChR de POA coinciden con el llamado “periodo crítico”, caracterizado por altas concentraciones de estrógenos y gran números de receptores a estrógenos en el POA (Egozi y Sokolovsky, 1985). Durante el “periodo crítico” del día de proestro, la concentración de acetilcolina en POA cae y luego incrementa de un modo abrupto (Egozi *et al.*, 1986).

La sensibilidad del sistema colinérgico al sulfato de atropina varía durante el ciclo estral; la dosis necesaria para bloquear la ovulación en el 100% de animales tratados depende del día del ciclo estral y de la hora en que el fármaco se administra, siendo el diestro-1 el día más sensible, ya que se requiere la dosis menor (100mg/kg peso) (Domínguez *et al.*, 1982).

Asimetrías hipotalámicas

La existencia de asimétrica ha sido descrita en los distintos órganos pares, tales como la glándula tiroidea y paratiroidea, las adrenales, los riñones y las gónadas, incluso está presente en el hipotálamo (Gerendai, 1986).

El complejo POA-AHA regula de forma asimétrica la síntesis y secreción de gonadotropinas; así como la ovulación (Nance y Moger, 1982; Fukuda *et al.*, 1984; Nance *et al.*, 1984; Cruz *et al.*, 1989; Cruz *et al.*, 1990^a; Cruz *et al.*, 1990^b; Inase y Machida, 1992; Morán *et al.*, 1994; Sánchez *et al.*, 1994; Arteaga-López *et al.*, 2003). En la rata macho y hembra se ha descrito que la cantidad de GnRH en el hipotálamo medio basal (HMB) derecho es el doble que en el izquierdo (Gerendai *et al.*, 1978; Bakalkin *et al.*, 1984), la que aumenta de manera ipsilateral al ovario extirpado

(Gerendai *et al.*, 1978). A las 13:00 h del diestro-2 la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la GnRH en POA-AHA derecha es mayor que en la izquierda (Arteaga-López *et al.*, 2003). La expresión del ARNm del receptor a estrógenos alfa (RE α) es mayor en POA-AHA derecha a las 17:00 h del estro (Arteaga-López *et al.*, 2003); la cantidad de neuronas inmunoreactivas a GnRH (ir-GnRH) en el cerebro de ratón es mayor en la porción derecha que en la izquierda (Inase y Machida, 1992); la concentración de acetilcolina a las 13:00 h del diestro-1 y proestro es mayor en POA-AHA derecha (Cruz *et al.*, 1998). La cantidad de neuronas ir-RE α en la mañana del diestro-1 es mayor en POA-AHA derecha (Mendoza-Garcés *et al.*, 2007). En ratas hembras de cinco días de vida, hipotálamo anterior responde de manera asimétrica a las hormonas esteroides, ya que el implante de estradiol en POA o en el núcleo ventromedial derecho provoca masculinización cuando los animales llegan a la edad adulta (estas hembras prefieren sexualmente a otras hembras); en cambio, cuando el estradiol se implanta en el lado izquierdo, ocurre defeminización (los animales no tienen ciclos estrales) (Norden y Yahr, 1982).

El POA derecho parece jugar un papel preponderante en el proceso de hipertrofia compensadora del ovario, ya que en la rata ovariectomizada unilateralmente, la lesión de esta porción hipotalámica previene la hipertrofia compensadora del ovario remanente (HCO), en tanto que la lesión del lado izquierdo no la modifica (Fukuda *et al.*, 1984). La lesión unilateral de esta misma área del hipotálamo con ácido kaínico bloquea la HCO, solo si la lesión y la ovariectomía se realizan del mismo lado (Nance *et al.*, 1984 y 1988). La lesión electrolítica del 90% del hipotálamo anterior derecho o izquierdo, en la mañana del diestro-1 bloquea la ovulación, aún después de 42 días posteriores a la destrucción de una de las porciones (Cruz *et al.*, 1989).

Asimetría del sistema muscarínico

El sistema colinérgico de POA-AHA regula de manera asimétrica la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, como resultado de la actividad asimétrica intrínseca del

propio sistema. Durante el ciclo estral de la rata, en POA-AHA existe un ritmo colinérgico endógeno en la concentración de acetilcolina. En el diestro-1 se presentan las concentraciones máximas de acetilcolina y en diestro-2 las mínimas. En el diestro-1 y el proestro, se observaron diferencias asimétricas; es decir, el POA-AHA del lado derecho tiene más acetilcolina que el izquierdo (**Figura 1**) (Sánchez *et al.*, 1994).

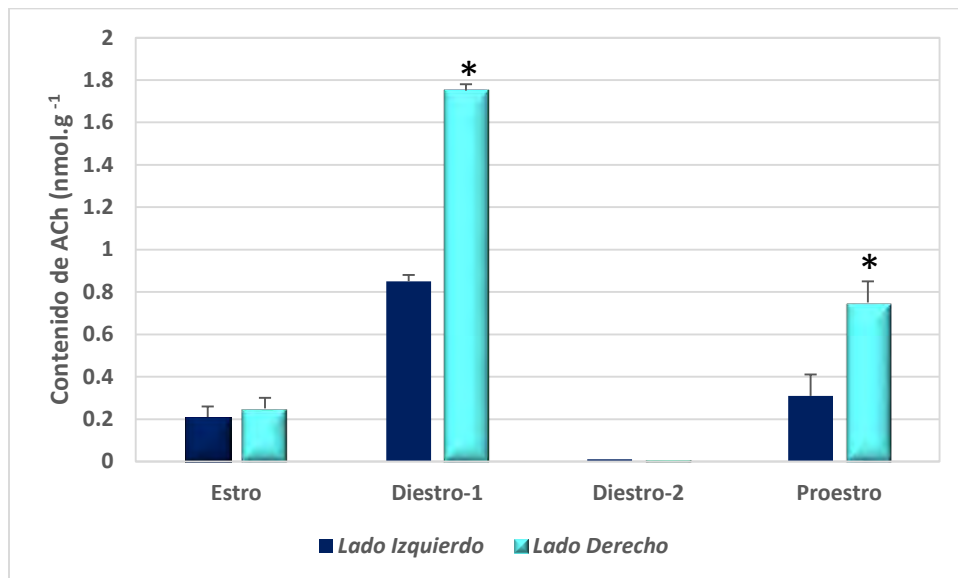


Fig. 1. Contenido de la acetilcolina en POA-AHA durante el ciclo estral; sus valores máximos se observan en el diestro-1 y sus mínimos en diestro-2. *,* p < 0.01 vs lado izquierdo, (Resultado graficado de Sánchez *et al.*, 1994).

La actividad de la colino-acetil-transferasa (CAT) (enzima que sintetiza la acetilcolina) en POA-AHA derecha varía durante el ciclo estral; sus valores máximos se observan en el estro y los mínimos en diestro-2. En cambio, la actividad de la CAT en POA-AHA izquierda no varía. Además, en estro, la actividad de esta enzima en POA-AHA derecha es mayor que en la izquierda, y en diestro 2 esta relación se invierte (Sánchez *et al.*, 1994).

La cantidad de sitios de unión (Bmax) para la [³H]-N-metil-escolamina en membranas de tejido de POA-AHA cambia durante el ciclo estral. La mayor cantidad se midió en el estro y la menor en el proestro. En los días del diestro-2 y del proestro, la Bmax del lado derecho fue menor que en el izquierdo, llegando a ser indetectables en el proestro (**Figura, 2**) (Sánchez *et al.*, 1994).

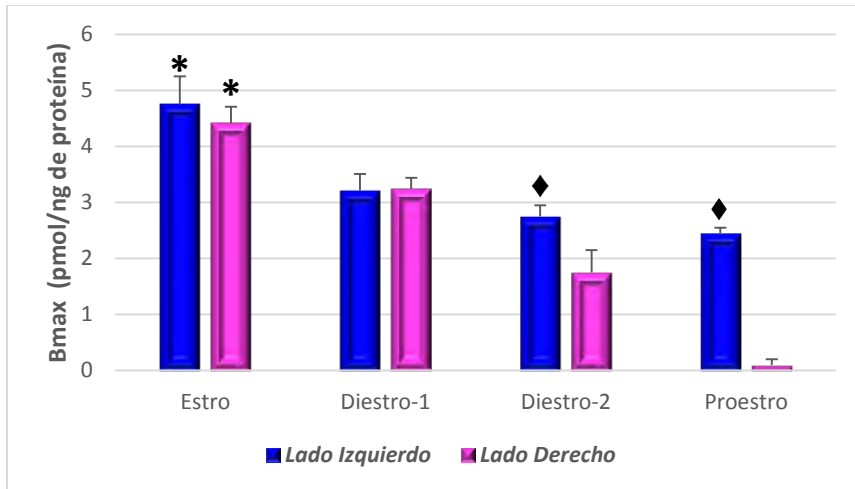


Fig. 2. La cantidad de sitios de unión (Bmax) para la H N-metil-escopolamina en membranas de tejido de POA-AHA durante el ciclo estral ♦ $p < 0.05$ vs lado derecho * $p < 0.05$ vs los otros días del ciclo (Datos graficados de Sánchez *et al.*, 1994).

El efecto regulador de los mAChR de POA-AHA en la ovulación cambia durante el ciclo estral (Cruz *et al.*, 1992), ya que el implante de atropina en la porción derecha de POA-AHA a las 13:00 h del día del estro bloquea la ovulación en el 100% de los animales, mientras que el implante del lado izquierdo no la interrumpe en ninguno de los animales tratados. En diestro-1 el fármaco implantado tanto en el lado izquierdo como en el derecho, resulta en el bloqueo de la ovulación de la mayoría de los animales. En diestro-2, solo los implantes del lado izquierdo la afectan y en el proestro ninguno de los implantes la modifican (**Figura, 3**) (Cruz *et al.*, 1992).

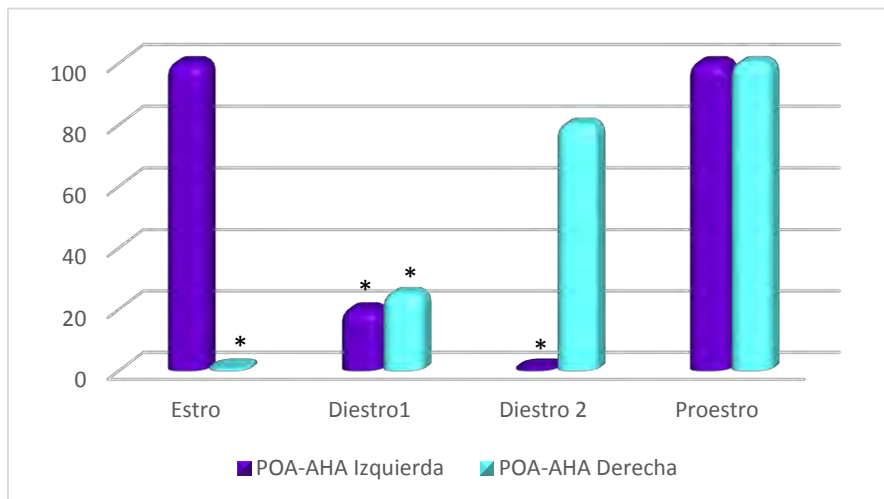


Fig. 3. Los receptores muscarínicos en POA-AHA regulan de forma asimétrica la ovulación. Esta asimetría cambia durante el ciclo estral * $p < 0.05$ vs colesterol del mismo lado (Datos graficados de Cruz *et al.*, 1992).

La estimulación del sistema colinérgico de POA-AHA, mediante los implantes de pilocarpina (agonista muscarínico), tiene un efecto opuesto al provocado por los implantes de atropina, de tal forma que en el día del estro, los implantes de pilocarpina en el lado izquierdo son los que provocan bloqueo de la ovulación y no los del lado derecho. En diestro-1, el 40% de los animales ovulan cuando el implante se coloca en el lado izquierdo, pero ninguno lo hace cuando se coloca del lado derecho; en diestro-2, los implantes de pilocarpina en el lado izquierdo o derecho bloquean la ovulación en el 38 y 50% de los animales y en el día del proestro los efectos son muy similares a los observados en el día del estro (López *et al.*, 1997).

La falta de ovulación en animales con implante de atropina o pilocarpina en POA-AHA resulta en modificaciones en la secreción fásica de la GnRH en la tarde del proestro, ya que la inyección subcutánea de LHRH sintético a las 14:00 horas de este día, induce la ovulación en las ratas con implante que no habían ovulado (Cruz *et al.*, 1992, López *et al.*, 1997).

Con base en estos resultados experimentales se sugirió que en el día del estro, la unión de la acetilcolina a los mAChR del lado derecho del POA-AHA estimula la secreción preovulatoria de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación. En cambio, la unión de la acetilcolina a los mAChR del lado izquierdo inhibe la secreción de GnRH, las gonadotropinas y la ovulación (Cruz *et al.*, 1992, López *et al.*, 1997).

En el POA-AHA el sistema colinérgico regula el efecto estimulante de los estrógenos en forma asimétrica, ya que la inyección de BE a ratas con implante de atropina en POA-AHA derecha realizado en el día del estro o del diestro-1 no reduce la ovulación, pero sí en ratas con implante en el lado izquierdo en el diestro-2. La falta de un efecto estimulante de BE en ratas tratadas con atropina en el lado derecho de POA-AHA es el resultado de la alteración en la expresión del ARNm del RE α , ya que en el día del estro o del diestro-1, la inyección subcutánea de sulfato de atropina disminuye a valores no detectables el ARNm para este receptor, incluso una hora después de la inyección del fármaco. Cuando el bloqueo del sistema muscarínico se

lleva a cabo a las 09:00 horas del diestro-2 se observa un efecto semejante al de las ratas inyectadas con atropina al medio día, es decir, en la ausencia del ARNm para el RE α del lado izquierdo de POA-AHA. Estos resultados fueron explicados por los autores como la posibilidad de la inhibición de la expresión del gen o del aumento en la traducción del mensajero en la proteína (Arteaga-López *et al.*, 2003; García, 2007).

La función reguladora del ovario sobre el hipotálamo

El papel regulador del ovario sobre el hipotálamo se mostró al cuantificar el contenido de GnRH en el hipotálamo medio basal del mismo lado en que se extirpaba uno de los ovarios: en ratas con extirpación del ovario derecho aumentó la cantidad del decapeptido del lado derecho del hipotálamo (haciendo más marcada la asimetría hipotalámica del contenido de GnRH), mientras que al extirpar el ovario izquierdo aumentó el contenido de la neuro-hormona del lado izquierdo del hipotálamo (anulando así la asimetría) (Gerendai *et al.*, 1978).

En la mañana del proestro, la inyección de xilocaína en el ovario izquierdo de una rata a la que se le extirpa el ovario derecho, provoca el bloqueo la ovulación. En cambio, si la xilocaína se inyecta en el ovario derecho de animales con ovariectomía izquierda, todos los animales ovulan. La inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) restablece la ovulación en ratas con xilocaína en el ovario izquierdo (Domínguez *et al.*, 1998).

El papel asimétrico de la acetilcolina del POA-AHA se invierte al extirpar una gónada, ya que al contrario de lo que ocurre en la rata con ambos ovarios, en el día del estro, la extirpación de un ovario provoca que el bloqueo de los mAChR del lado izquierdo del POA-AHA interrumpa la ovulación, mientras que la desactivación de los receptores del lado derecho no la afectan (Cruz *et al.*, 1992). En ambos modelos experimentales (ratas con una o ambas gónadas), la inyección de GnRH o de la gonadotropina coriónica humana (hCG) a las 13:00 horas del día del proestro esperado induce la ovulación. Sin embargo, la inyección de BE la induce únicamente en los

animales implantados con atropina en el lado izquierdo de POA-AHA (Cruz *et al.*, 1992).

La existencia de una comunicación neural entre el ovario y el cerebro se mostró mediante la inyección del virus de la pseudorrabia. La inyección de éste en el ovario izquierdo o derecho, fue identificado en el puente ventrolateral, los núcleos gigantocelular, para-gigantocelular, el núcleo del tracto solitario, el núcleo dorsal vagal, el grupo de células A1 y A5, el núcleo del rafé caudal, el núcleo hipotalámico paraventricular y el hipotálamo lateral. La marca en estas zonas del cerebro fue mayor cuando se inoculó en el ovario izquierdo, lo que demuestra la asimetría anatómica de la conexión neural del ovario y el cerebro (Gerendai *et al.*, 2005, Tóth *et al.*, 2007).

Otra evidencia que apoya la hipótesis de una comunicación neuroendocrina entre el ovario y el hipotálamo es que el bloqueo de los mAChR del tipo 1 (m1AChR) del ovario izquierdo, a las 13:00 h del día del proestro, inhiben la secreción preovulatoria de la GnRH y la ovulación; efecto que disminuye por la sección del nervio vago (Cruz *et al.*, 2015), lo que manifiesta la comunicación multisináptica entre este ovario y el hipotálamo (Tóth *et al.*, 2007).

Justificación.

Con base en todos estos resultados, se sugirió que la falta de información tanto neural como endócrina, provocada por la extirpación de un ovario, modificaba la sensibilidad de ambos lados del POA-AHA a los efectos estimulantes y lateralizados del sistema colinérgico y de los estrógenos sobre la liberación preovulatoria de las gonadotropinas y la ovulación.

Por lo que en esta tesis se analizaron los efectos de la extirpación del ovario izquierdo o derecho sobre el efecto asimétrico y estimulante, que en un animal con ambas gónadas, ejerce la acetilcolina de POA-AHA sobre la ovulación.

Hipótesis.

Dado que en el día del estro la función asimétrica de POA-AHA es regulada por las gónadas y que el sistema colinérgico muscarínico de ésta región estimula la secreción de la GnRH y la ovulación, entonces en el día del diestro-2, la extirpación de un ovario modificará la asimetría funcional que ejerce la acetilcolina sobre la ovulación, lo que dependerá de la gónada extirpada y del lado de POA-AHA estudiado.

Objetivo general.

Estudiar en el día del diestro-2, los efectos de la ausencia de la señal neuroendocrina de uno de los ovarios sobre el papel estimulante de la acetilcolina del lado izquierdo o derecho de POA-AHA sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.

Objetivos particulares:

- 1.- Analizar a las 13:00 h del diestro-2, los efectos de micro-inyectar atropina en las porciones izquierda o derecha de POA-AHA sobre la ovulación espontánea de la rata.
- 2 y 4. Estudiar cuál de las señales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario son alteradas en los animales que no ovulen como resultado de la extirpación de un ovario y la micro-inyección unilateral de atropina en diestro-2.
- 3 y 5. Estudiar a las 13:00 h del diestro-2, los efectos de extirpar el ovario izquierdo o el derecho sobre el papel asimétrico que ejercen los receptores muscarínicos de POA-AHA sobre la ovulación.
- 6.- Analizar cuál de las señales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario son alteradas en los animales que no ovulen como resultado de la extirpación de uno de los ovarios y el bloqueo de los receptores muscarínicos del POA-AHA.

Resultados

The participation of the muscarinic receptors in the preoptic-anterior hypothalamic areas in the regulation of ovulation depends on the ovary. Adriana Espinosa-Valdez, Angélica Flores, Isabel Arrieta-Cruz, Mario Cárdenas, Roberto Chavira, Roberto Domínguez and María Esther Cruz. *Reproductive Biology and Endocrinology* (2016) 14:75

RESEARCH

Open Access



The participation of the muscarinic receptors in the preoptic-anterior hypothalamic areas in the regulation of ovulation depends on the ovary

Adriana Espinosa-Valdez¹, Angélica Flores¹, Isabel Arrieta-Cruz², Mario Cárdenas³, Roberto Chavira³, Roberto Domínguez¹ and María Esther Cruz^{1*}

Abstract

Background: Muscarinic receptors (mAChRs) of the preoptic and anterior hypothalamus areas (POA-AHA) regulate ovulation in an asymmetric manner during the estrous cycle. The aims of the present study were to analyze the effects of a temporal blockade of mAChRs on either side of the POA-AHA performed in diestrus-2 rats on ovulation, the levels of estradiol, follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) and the mechanisms involved in changes in ovulation.

Methods: Cyclic rats on diestrus-2 day were anesthetized and randomly assigned to the following groups: 1) microinjection of 1 μ l of saline or atropine solution (62.5 ng) in the left or right POA-AHA; 2) removal (unilateral ovariectomy, ULO) of the left (L-ULO) or right (R-ULO) ovary, and 3) rats microinjected with atropine into the left or right POA-AHA plus L-ULO or R-ULO. The ovulation rate and the number of ova shed were measured during the predicted estrus, as well as the levels of estradiol, FSH and LH during the predicted proestrus and the effects of injecting synthetic LH-releasing hormone (LHRH) or estradiol benzoate (EB).

Results: Atropine in the left POA-AHA decreased both the ovulation rate and estradiol and LH levels on the afternoon of proestrus, also LHRH or EB injection restored ovulation. L- or R-ULO resulted in a lower ovulation rate and smaller number of ova shed, and only injection of LHRH restored ovulation. EB injection at diestrus-2 restored ovulation in animals with L-ULO only. The levels of estradiol, FSH and LH in rats with L-ULO were higher than in animals with unilateral laparotomy. In the group microinjected with atropine in the left POA-AHA, ovulation was similar to that in ULO rats. In contrast, atropine in the right POA-AHA of ULO rats blocked ovulation, an action that was restored by either LHRH or EB injection.

Conclusions: These results indicated that the removal of a single ovary at noon on diestrus-2 day perturbed the neuronal pathways regulating LH secretion, which was mediated by the muscarinic system connecting the right POA-AHA and the ovaries.

Keywords: Unilateral ovariectomy, Ovulation, Diestrus-2, Muscarinic receptors, Atropine, POA-AHA, Estradiol, Gonadotropins

* Correspondence: mecblay@yahoo.com.mx

¹Biology of Reproduction Research Unit, Laboratory of Neuroendocrinology, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, AP 9-020, CP 15000 Mexico City, Mexico



Full list of author information is available at the end of the article © The Author(s). 2016 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

The preovulatory period of the estrous cycle is characterized by the rapid growth of ovarian follicles and the increased secretion of estradiol (E₂). Plasma levels of E₂ are low on estrus day, increasing its levels from the afternoon of diestrus-1 day until the morning of diestrus-2 day, reaching the highest levels between morning and noon on the proestrus day [1]. Ovarian E₂ secreted on diestrus-2 day is required to activate the LH surge on proestrus day, since the injection of estrogen antagonists [2] or estradiol anti-serum [3] or ovariectomy [4] during diestrus-2 day block the preovulatory LH surge.

The LH surge is the result of an increase in the frequency and amplitude of pulses of secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the POA-AHA, in response to activation of several molecules present in the neural network GnRH [5], such as neurons that synthesize acetylcholine (ACh). Importantly, ACh regulates the secretion of GnRH, LH, and FSH as well as stimulates the weight of ovaries, the ovarian compensatory hypertrophy in ULO of the rats [6-9]. Interestingly, the participation of the muscarinic cholinergic system is relevant to the regulation of ovulation which varies throughout the estrous cycle and has a circadian rhythm [10].

The continuous blockade of mAChRs by implants of atropine crystals on either side of the POA-AHA blocked ovulation depending on the day of the estrous cycle [6]. Similar effects were observed when pilocarpine, a specific agonist of mAChRs, was administered in the POA-AHA [11]. Previous studies performed by our group showed that ULO rats with implants of atropine in the left POA-AHA during the estrus day did not ovulate, while the majority of rats with implants in the right POA-AHA did. Furthermore, the injection of EB restored ovulation in animals with atropine implants in the left POA-AHA [12]. These observations suggested that the cholinergic muscarinic system in the POA-AHA exerted an asymmetric regulating action on spontaneous ovulation through the modulation of GnRH secretion.

The aim of the present study was to examine whether or not the muscarinic system in the POA-AHA participates in regulating ovulation on a permanent or temporary manner. To answer this, we analyzed the effects of ULO on spontaneous ovulation in rats microinjected with atropine into the POA-AHA.

Methods

Animals

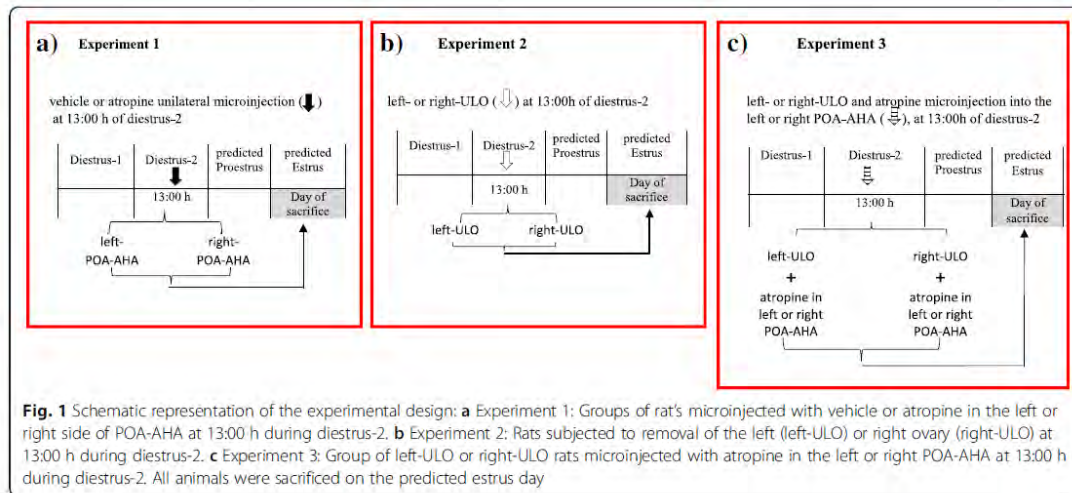
The study was carried out in 3-4 month old female virgin rats (195-225 g), of the CIIZ-V strain, from our own production stock. The animals were kept under controlled light (05:00-19:00 h) and temperature (22 ± 2 °C) conditions, with free access to tap water and a standard rodent diet (Harlan, SA, Mexico City, Mexico). Estrous cycles were monitored by examining daily vaginal smears, and only animals with at least two consecutive estrous cycles of 4 days each were used in the experiments. All treatments were performed from 12:30 to 13:30 h on diestrus-2 day. After surgery (described below), each animal was placed in a cage with sawdust, warmed with an incandescent lamp until they awoke. After the treatments, vaginal smears were obtained again at 24 h after abdominal or brain surgery. Lastly, the animals were sacrificed at 10:00 h on the predicted estrus.

To investigate if the muscarinic system of the POA-AHA is involved in regulating ovulation on a transient or more long-term manner, we designed three different sets of experiments as follows: 1) microinjection of atropine into the left or right POA-AHA; 2) left or right ULO; and 3) left or right ULO, followed of blockade of the mAChRs in the left or right POA-AHA (Fig. 1). Additionally, to investigate the mechanisms affected by blocking mAChRs at 14.00 h of the predicted proestrus day, groups of animals microinjected with atropine in left POA-AHA, left or right ULO or left or right ULO followed by blockade of the mAChRs in the left or right POA-AHA were injected with synthetic LH-releasing hormone (LHRH)-Gly-OH or with estradiol benzoate (EB). Finally, the levels of estradiol, FSH and LH were measured in the morning and afternoon of expected proestrus of animals microinjected with atropine in the left or right POA-AHA or with left or right ULO.

Experiment 1. Effects of the transient blockade of mAChRs in the left or right POA-AHA on spontaneous ovulation (Fig. 1A)

To investigate the effects of unilateral transient blockade of mAChRs in the POA-AHA on ovulation, microinjections of atropine (a competitive and reversible antagonist of five mAChRs (m1-m5) [7, 13] were performed in the left or right POA-AHA of rats. The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (30 mg/kg; Anestosal, Smith-Kline Norden of México City, Mexico) and placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). An incision in the skin of the dorsal region of the head was made subsequently the left or right side of the skull was exposed and drilled with a stainless steel 1 mm diameter drill. Next, a 29-gauge stainless steel needle was inserted into the left or right POA-AHA. The location of the POA-AHA was determined according to the coordinates (AP 0.650 mm ± 0.06 mm lateral, vertical 0.86 mm) from the König and Klippel Atlas

[14]. The microinjection needle was connected through a piece of Teflon tubing (OD 0.65 mm 0.12 mm OI 9; Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN, USA) to a 20- μ l Hamilton syringe mounted on a pump microinjector (CMA/100, BAS, Stockholm, Sweden). Rats were randomly assigned to different groups ($n = 8-10$ animals per group) and microinjected as follows: 1) vehicle: saline solution 1 μ l; 2) atropine, 62.5 ng/ μ l (Sigma-Aldrich, Mexico); and 3) intact: cyclically untreated rats. The dose of atropine was selected based on previous studies in our laboratory [6, 12]. All test solutions were injected at a rate of 1 μ l/min.



Experiment 2. Effects of left or right ULO on spontaneous ovulation (Fig. 1b)

To evaluate the role of each ovary in the physiological mechanisms regulating spontaneous ovulation at 13:00 h of diestrus-2 day, the rats were anesthetized and were randomly assigned to one of the experimental groups described below.

Intact Group: Cyclical rats without treatment, sacrificed at 10:00 h of estrus day.

Unilateral Laparotomy: A unilateral incision was made 1 cm below the last rib, throughout the skin, muscle and peritoneum. The ovaries were left untouched. At the end of the surgical procedure, the wound was sealed.

Unilateral Ovariectomy (ULO): A unilateral incision was made below the last rib, throughout the skin, muscle and peritoneum, and the left or right ovary was carefully removed. The wound was subsequently sealed.

Experiment 3. Effects of the transient unilateral blockade of the mAChRs in the POA-AHA region in ULO rats on spontaneous ovulation (Fig. 1c)

To test our hypothesis that the ovary is critical in controlling spontaneous ovulation mediated by the muscarinic system in the hypothalamus, we combined L- or R-ULO with microinjections of atropine in the left or right POA-AHA. The rats were treated as described in experiments 1 and 2. The abdominal and brain surgeries were performed back to back on the same day.

Postmortem procedures

On the day of expected estrus (46 h after ULO), the rats were sacrificed by decapitation [15], the oviducts were dissected and the number of ova shed was counted using a dissecting microscope (Olympus SZ51-LGB, Tokyo, Japan). Next, the ovaries were removed, dissected and weighed on a precision balance (Mettler, AT-261, Switzerland). The brain was also rapidly dissected and fixed in paraformaldehyde solution (4 % v/v). The ovulation rate (number of animals that ovulated/total number of treated rats) was expressed as the percentage of rats that ovulated.

Hormonal replacement with LHRH or EB in non-ovulating rats

A separate group of animals that received micro-injections of atropine in the left POA-AHA were also injected subcutaneously (sc) with 3.7 μ g/kg of LHRH (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) at 14:00 h of predicted proestrus day as described [16], or with 10 μ g of EB (Sigma Chemical Co.) at 14:00 h on diestrus-2 day as described [17]. All animals were sacrificed on the morning of predicted estrus.

Measurement of serum hormone levels

A different group animals treated as described above (experiment 1 or 2) was sacrificed at 11:00 or 17:00 h of the expected proestrus day to measure the levels of E₂, FSH and LH. E₂ was measured using enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits (AccuBind, Monobind Inc., Lake To-est, CA, USA), the assay sensitivity was 6.5 pg/ml.

The levels of FSH and LH were measured by radioimmunoassay (RIA) methods with specific reagents and protocols from the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) distributed by Dr. A. F. Parlow: LH (NIDDK-HLR-I 125-S-11) and FSH (NIDDK-recombinant FSH-I125-I-9). The intra-assay and inter-assay coefficients of variation for LH and FSH were 12.1 and 14.6%, respectively and the sensitivity of the assays for both hormones was 0.1 ng/ml.

Brain histological procedures

To verify the accuracy of the microinjection site, 100- μ m sections of the POA-AHA region were obtained with a vibratome (Technical Products International Inc, St. Louis, MO, USA). The sections were mounted on slides and immediately examined under a stereoscopic microscope. Only results from rats with verified microinjection into the POA-AHA [18].

Statistical analyses

All statistical analyses were performed with GraphPad InStat3 Software, Inc. (San Diego, CA, USA). Ovulation rate results were analyzed using Fisher's exact probability test or the Chi-square test. Data on the number of ova shed were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Data on ovarian weight and estradiol, FSH and LH levels were subjected to multivariate analysis of variance (MANOVA) followed by Turkey's test. All values were expressed as the mean \pm S.E.M. A probability value (p) \leq 0.05 % was considered statistically significant.

Results

Effects of transient blockade of mAChR in the left or right POA-AHA on spontaneous ovulation

The ovulation rate, number of ova shed and ovarian weight were similar in the vehicle and the intact group. The ovulation rate was lower in animals with atropine injected in the left POA-AHA than in the vehicle group, and it did not change when atropine was injected in the right side. The number of ova shed by animals with atropine injected into the right POA-AHA was lower than in the vehicle group (Table 1). No differences in ovarian weight between groups were observed. Rats with atropine in the left POA-AHA ovulated 48 h after the predicted estrus day (8/8 vs. 2/10, $p < 0.001$).

Ovulation was induced in 100 % of animals microinjected with atropine in the left POA-AHA that later received injections of synthetic LHRH (atropine + LHRH 5/5 vs. atropine 2/8, $p < 0.0210$, Fisher's exact test). A similar result was obtained when EB was injected (atropine + EB 5/5 vs. atropine 2/8, $p \leq 0.0216$).

Table 1 Ovulation in rats with unilateral atropine microinjection into POA-AHA performed at 13:00 h of diestrus-2 day

Group	Side of POA-AHA	n	Ovulation rate*	Ova shed	
				Left ovary	Right ovary
Intact	–	10	10/10	7.1 \pm 0.5	5.4 \pm 0.3
Vehicle	Left	9	9/9	6.1 \pm 0.9	4.2 \pm 1.0
	Right	9	9/9	6.5 \pm 0.2	4.8 \pm 0.3
Atropine	Left	10	2/10 ^a	4, 0 ^{**}	3, 3 ^{**}
	Right	10	10/10	3.1 \pm 0.3 ^b	1.7 \pm 0.2 ^b

The ovulation rate and the number of ova shed (mean \pm SEMs) by rats subjected to microinjection of the vehicle or atropine into the left or right side of the POA-AHA region were measured at the predicted estrus day

^a $p < 0.0007$ vs. left vehicle (Fisher's exact probability test)

^b $p < 0.001$ vs. right vehicle (Kruskal Wallis test, followed Dunn test)

^{**}represents the number of ova shed by the two ovulating rats

*Number of ovulating animals/number of treated animals

Effects of left or right ULO on spontaneous ovulation

On the predicted estrus day, the ovulation rate of the left or right laparotomized groups was similar to that in the intact group. However, the ovulation rate was lower in animals with ULO, compared to the respective laparotomized only groups. The number of ova shed by the remaining ovary (left ovary) in the right ULO group was lower than in the right laparotomized groups. In contrast, no changes were observed between left ULO and left laparotomized rats except for one single rat ovulating in the left ULO group (Table 2). The weight of the ovaries in the right laparotomized animals was higher than those in the intact group. However, the weight of the *in situ* ovaries in the left and right ULO groups were even higher than in the respective laparotomized groups (Table 2). In animals with ULO, vaginal estrus occurred 24 h after ULO. On this day, the animals with left ULO did not ovulate but right ULO rats did.

Injection with LHRH re-established ovulation in all rats with ULO (left ULO + LHRH 5/5 vs. left ULO: 1/10; right ULO + LHRH 5/5 vs. right ULO: 3/9, $p < 0.01$ Fisher's exact probability test). In animals with right ULO (left ovary *in situ*), replacement with EB induced ovulation in all treated animals, while in animals with left ULO (right ovary *in situ*), EB treatment induced ovulation only in 33 % of the treated animals (Fig. 2).

The number of ova shed by animals with right ULO injected with LHRH was higher than in animals with right ULO and no hormone injection (8.8 ± 0.9 vs. 2.0 ± 0.6 , $p < 0.01$). LHRH injection in animals with left ULO resulted in higher number of ova shed (7.2 ± 0.4), compared to the single animal with left ULO not treated with LHRH that ovulated (4 ova shed). The number of ova shed by animals with right ULO injected with EB was higher than that of rats with ULO (7.0 ± 0.7 vs. 2.0 ± 0.6 , $p < 0.01$). Rats with left ULO and EB injection released a similar number of ova as the group that did not receive hormone treatment (2.3 ± 0.9). The weight of the *in situ* ovaries in animals with left or right ULO and LHRH or EB was lower than in ULO animals without hormonal replacement (Table 3).

Table 2 Ovulation in rats with unilateral ovariectomy (ULO) performed at 13:00 h of diestrus-2 day

Group	Ovulation rate ^a	Number of ova shed by the <i>in situ</i> ovary		Weight of the <i>in situ</i> ovary (mg/100 g bw) ^{***}	
		Left ovary	Right ovary	Left ovary	Right ovary
Intact	10/10	7.1 ± 0.5	5.4 ± 0.3	16.5 ± 1.2	15.6 ± 1.2
L-laparotomy	9/10	3.2 ± 1.3 ^b	4.8 ± 2.6	14.9 ± 1.3	15.6 ± 1.4
L-ULO	1/10 ^c	–	4**	–	32.7 ± 3.3 ^c
R-laparotomy	10/10	6.2 ± 1.4	6.0 ± 1.1	24.9 ± 4.0 ^b	21.7 ± 2.2 ^b
R-ULO	3/9 ^c	2.0 ± 0.6 ^c	–	33.4 ± 3.6 ^a	–

The ovulation rate and the number of ova shed (mean ± SEMs) and weight of the left or right ovary of intact rats, or rats subject to left (L-laparotomy) or right (R-laparotomy) laparotomy, and those subject to left (L-ULO) or right (R-ULO) ULO were measured at the predicted estrus day

^a $p < 0.01$ vs. respective laparotomy group (Fisher's exact probability test)

^b $p < 0.01$ vs. respective intact group (Kruskall Wallis test, followed Dunn test)

^c $p < 0.01$ vs. respective laparotomy group (Kruskall Wallis test, followed Dunn test)

^{***}data statistically analyzed by ANOVA followed by Tukey test

**represents the number of ova shed by the ovulating rat

*Number of ovulating animals/number of treated animals

Effects of transitory mAChR blockade in the POA-AHA of ULO rats on spontaneous ovulation

The ovulation rate was not modified in ULO rat micro-injected with atropine in the left side of the POA-AHA, while ovulation was blocked by atropine was in the right POA-AHA (Fig. 3). The number of ova shed (data not shown) in ULO rats injected with atropine in either side of the POA-AHA was as low as that in ULO only rats (data not shown). The weight of the *in situ* ovaries in ULO rats plus atropine injected in either side of the POA-AHA was lower than that in ULO only rats (left ULO + left POA-AHA: 15.0 ± 0.8 , left ULO + right POA-AHA: 17.6 ± 0.9 vs. left ULO: 32.7 ± 3.3 , $p < 0.01$; right ULO + left POA-AHA: 15.1 ± 0.7 , right ULO + right POA-AHA: 17.9 ± 0.4 vs. right ULO: 33.4 ± 3.6 , $p < 0.001$).

In ULO animals' microinjected with atropine in either side of the POA-AHA, the number of ova shed induced upon replacement of LHRH or EB, depended on what ovary was remained *in situ*. For example, the injection of LHRH in animals retaining the right ovary *in situ* and microinjected with atropine in the right POA-AHA, shed a higher number of ova than the ULO alone group. By contrast, rats with the left ovary *in situ* microinjected with atropine in either POA-AHA released a smaller number of ova after LHRH injection (Fig. 4).

In ULO animals with the right ovary *in situ*, microinjection with atropine in the right or left POA-AHA and EB replacement resulted in a higher number of ova shed than in the ULO alone group. The injection of EB in rats with the left ovary *in situ* and atropine microinjection in either side of the POA-AHA did not modify the number of ova compared to ULO rats (Fig. 4).

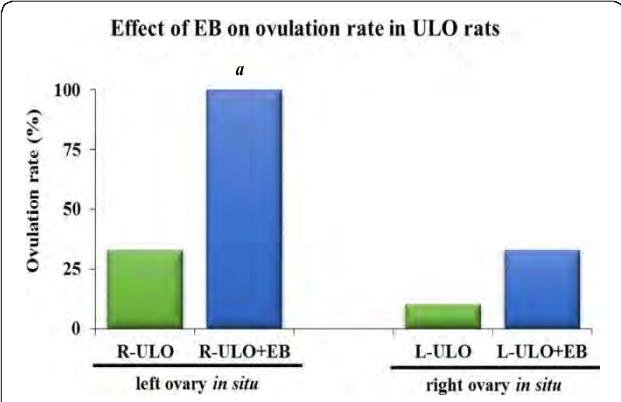


Fig. 2 Effects of EB on ovulation in ULO rats. Ovulation rate of the left or right *in situ* ovary of rats subject to left ULO (L-ULO) or right ULO (R-ULO), and ULO rats subsequently injected with 10 µg of EB at 14:00 h on the same day of ULO. The animals were sacrificed at the predicted estrus day. ^a $p < 0.01$ vs. the respective ULO only group (Fisher's Exact Probability test).

Table 3 Effects of LHRH or EB on the weight of the *in situ* ovary in rats with unilateral ovariectomy (ULO) performed at 13:00 h of diestrus-2 day

Group	Weight of the <i>in situ</i> ovary (mg/100 g bw)	
	Left	Right
L-ULO	-	32.7 ± 3.3
L-ULO + LHRH	-	17.4 ± 1.1 ^a
L-ULO + EB	-	19.6 ± 1.2 ^a
R-ULO	33.4 ± 3.6	-
R-ULO + LHRH	19.7 ± 1.5 ^a	-
R-ULO + EB	18.0 ± 1.3 ^a	-

The mean ± SEMs of the weight of the left or right ovary of intact rats, or rats subject to left ULO (L-ULO) or right ULO (R-ULO), and ULO rats injected with 3.7 µg/Kg body weight of synthetic LHRH at 14:00 h of the predicted proestrus day, or injected with 10 µg of EB at 14:00 h of the same day of the ULO. The animals were sacrificed at the predicted estrus day
^a $p < 0.01$ vs. the respective ULO group (MANOVA, followed Tukey test)

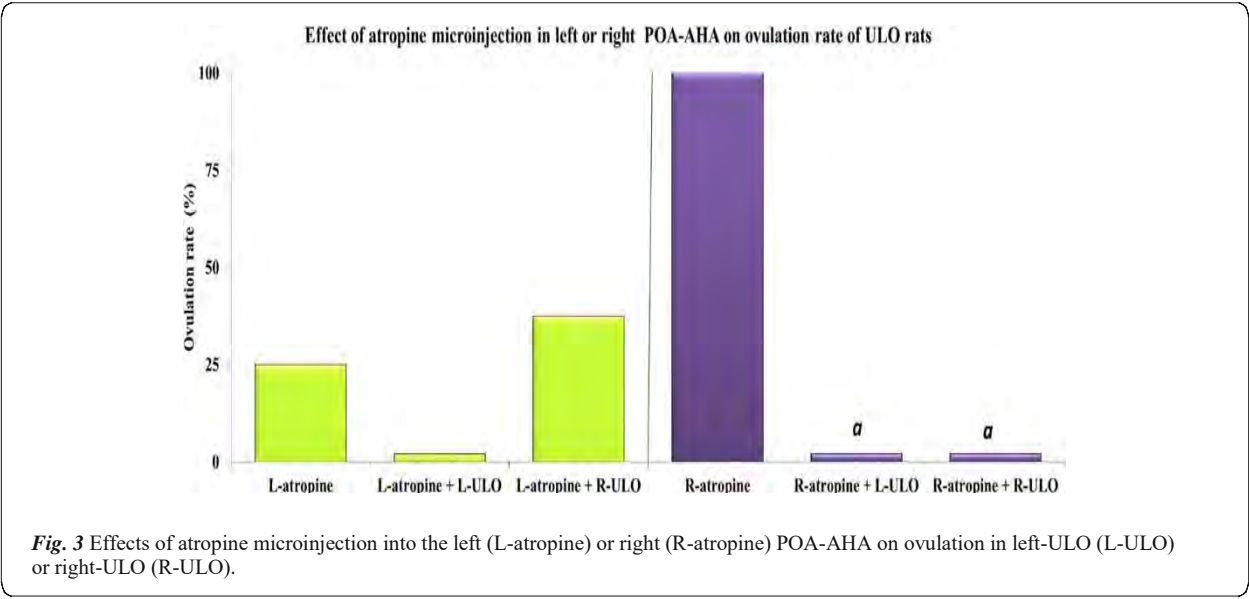


Fig. 3 Effects of atropine microinjection into the left (L-atropine) or right (R-atropine) POA-AHA on ovulation in left-ULO (L-ULO) or right-ULO (R-ULO).

Number of ova shed by ULO rats with unilateral atropine microinjection injected with LHRH or EB

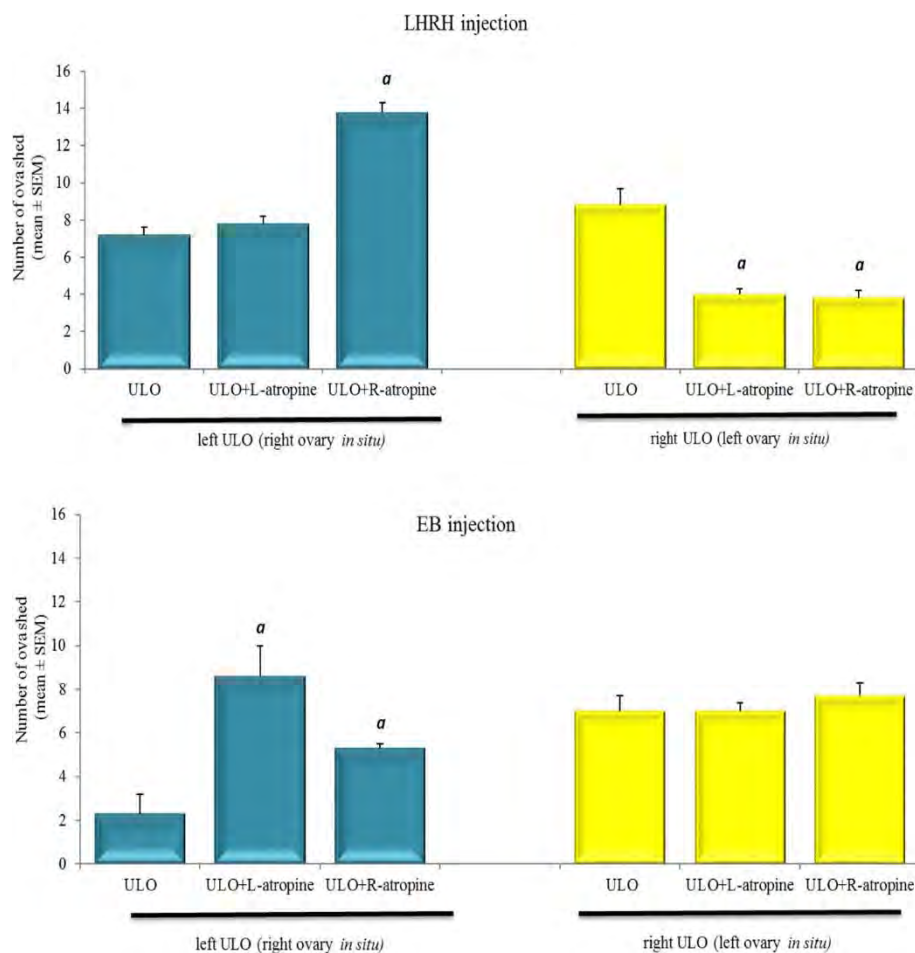


Fig. 4 Mean \pm SEM of the number of ova shed by ULO rats with unilateral atropine microinjection in the POA-AHA, treated with LHRH or EB. The number of ova shed from the left or right *in situ* ovary of rats subjected to left or right ULO plus atropine microinjection into the left (L-atropine) or right (R-atropine) POA-AHA, performed at 13:00 h of diestrus-2 and sacrificed at predicted estrus day. *a* $p < 0.01$ vs. the respective ULO only group (ANOVA followed Tukey test)

Effects of transitory mAChR blockade in the left or right POA-AHA on serum hormone levels At 11:00 h of the predicted proestrus day, the serum levels of E₂, LH and FSH were similar in all of the experimental groups. However, at 17:00 h animals microinjected with atropine in the left POA-AHA had lower E₂ and LH serum levels than the vehicle group, while rats treated in the right POA-AHA had levels similar to the vehicle group. FSH levels were higher in animals treated with atropine on the left or right side of the POA-AHA than in vehicle-treated rats (Table 4).

Effects of left or right ULO on hormone serum level measurements

At 11:00 h of the predicted proestrus day, E₂, LH and FSH serum levels in left ULO rats were higher than those in the left sham group while right ULO did not modify E₂ levels, but increased LH and FSH levels compared to sham operated rats. At 17:00 h on the predicted proestrus day, LH serum levels in the sham rats were lower than in the intact group. LH and FSH levels in ULO rats were lower than in the sham group (Table 5).

Group	Estradiol pg/mL	LH ng/mL	FSH ng/mL
POA-AHA			
Proestrus 11:00 h			
Intact	20.3 ± 0.3	0.7 ± 0.3	2.3 ± 0.4
Left vehicle	32.4 ± 9.0	0.4 ± 0.05	1.6 ± 0.13
Left atropine	27.2 ± 5.5	0.2 ± 0.03	2.4 ± 0.8
Right vehicle	33.4 ± 4.9	0.5 ± 0.02	1.2 ± 0.09
Right atropine	21.6 ± 1.9	0.4 ± 0.09	1.2 ± 0.3
Proestrus 17:00 h			
Intact	15.7 ± 2.9	22.8 ± 1.9	7.2 ± 0.50
Left vehicle	23.6 ± 6.0	24.9 ± 2.5	4.9 ± 2.5
Left atropine	3.9 ± 0.9 ^{abc}	3.6 ± 1.5 ^a	98.8 ± 4.4 ^{abc}
Right vehicle	37.2 ± 1.3	20.7 ± 1.8	4.1 ± 0.2
Right atropine	33.2 ± 10.2	21.2 ± 2.6	8.3 ± 2.5

The mean ± SEMs for the estradiol, LH and FSH of rats subjected to microinjection of vehicle or atropine into the left or right POA-AHA, at 13:00 h of diestrus-2 day, and sacrificed at 11:00 or 17:00 h on the predicted proestrus day
^ap < 0.01 vs. Left vehicle (ANOVA, followed Tukey test)
^bp < 0.01 vs. right atropine (ANOVA, followed Tukey test)
^cp < 0.01 vs. intact group (ANOVA, followed Tukey test)

Table 4 Effects of atropine microinjected in the left or right POA-AHA on hormone serum levels at 11:00 or 17:00 h on predicted proestrus day

Group	Estradiol pg/mL	LH ng/mL	FSH ng/mL
Proestrus 11:00 h			
Intact	20.3 ± 0.3	0.7 ± 0.30	2.3 ± 0.4
Left laparotomy	14.5 ± 4.0	0.4 ± 0.06	2.0 ± 0.1
Left ULO	61.4 ± 16.1 ^{ab}	1.3 ± 0.20 ^a	42.1 ± 14.7 ^{ab}
Right laparotomy	13.0 ± 4.8	0.4 ± 0.01	2.7 ± 0.6
Right ULO	12.4 ± 3.5	2.2 ± 0.40 ^a	>100 ^a
Proestrus 17:00 h			
Intact	15.7 ± 2.9	22.8 ± 1.90	7.2 ± 0.50
Left laparotomy	10.8 ± 0.5	12.5 ± 0.01	5.2 ± 0.50
Left ULO	11.5 ± 2.1	0.5 ± 0.10 ^a	<0.040 ^{ab}
Right laparotomy	10.7 ± 1.3	19.4 ± 0.2	8.8 ± 0.8
Right ULO	15.9 ± 3	1.4 ± 0.10 ^a	2.1 ± 1.04 ^a

The mean ± SEMs for the estradiol, LH and FSH of rats subjected to left or right laparotomy, and left or right ULO at 13:00 h of diestrus-2 day, and sacrificed at 11:00 or 17:00 h on the predicted proestrus day
^ap < 0.01 vs. corresponding laparotomy (MANOVA, followed Tukey test)
^bp < 0.02 vs. Right ULO (Student "t" test)

Table 5 Effects of ULO performed at 13:00 h on diestrus-2 day on hormone serum levels at 11:00 or 17:00 h on predicted proestrus day

Discussion

In the present study, transient blockade of the mAChRs in the POA-AHA with atropine modified the ovulation process: it inhibited the ovulation rate when the blockade is the left POA-AHA or reduced the number of ova shed when the right POA-AHA was treated with atropine. We think that the effect of the atropine on right POA-AHA on the number of ova shed but not on ovulation rate may be explained for the lack of muscarinic signals in the POA-AHA to the ovary for the growth and differentiation of follicles. Previously, our group showed that the ovaries of rats with implants of atropine in the POA-AHA had fewer small follicles in the left ovary compared to control group [19]. Regarding the decrease in the levels of the E₂ and LH on the afternoon of proestrus day after temporary blockade of the muscarinic system of the left POA-AHA, and considering that injection of EB restored ovulation, we believe that these low levels of E₂ are the cause of the observed blockade of ovulation. These results support the idea that neural signals arising from the left side of the POA-AHA modulate the sensitivity of the ovaries to FSH and LH [19] and by the muscarinic system. In fact, studies performed with subcutaneous injection of atropine on the diestrus-1 day causes a 24-h delay on preovulatory LH and E₂ levels, and ovulation [20]. Furthermore, the neural information coming from each side of the hypothalamus differentially regulates ovulation in the right and left ovary [19, 21]. Thus, the present study suggests that approximately at noon on diestrus-2 day, the muscarinic system innervating the left POA-AHA regulates in a stimulatory manner the preovulatory secretion of LH, indicating that activation of mAChRs is a key component in stimulating feedback of estrogens and in the pre-ovulatory surge of GnRH.

Tanaka et al. [22] have suggested that peritoneal innervation plays an essential role in the neural connection with the central nervous system. In the current study, the effects of laparotomy on ovarian weight supports that idea because the weight of the ovaries in rats with laparotomy on the right side was greater than in intact animals, possibility meaning that a higher number of follicles were growing. Previous studies by our group showed the participation of the muscarinic system on estradiol secretion in hemiovariectomized rats by laparotomy, these animals displayed an increase of LH and FSH at 11:00 h on the predicted proestrus day suggesting that nerve signal of the ovaries are involved in the regulation of gonadotropin secretion on the proestrus day [23]. Also our group has shown that the removal of the right ovary at 13:00 h on diestrus-2 day resulted in lower E₂ levels than in rats with perforation in the right side of the dorsal peritoneum, suggesting that it is neural communication with the ovaries what modulates the secretion of E₂. Based on this previous study and the current results, we postulate that extirpating the left ovary results in the concomitant removal of an inhibitory signal modulating E₂ secretion by the right ovary [23].

Mechanisms altered by the removal of an ovary are taken over by the remaining ovary. All rats with the left ovary *in situ* (right ULO) ovulated after injection of EB, while the EB had no effect when the right ovary remained *in situ* (left ULO). Despite the different effects on the levels of E₂ in ULO rats, the levels of FSH and LH increased in the morning of predicted proestrus day and decreased in the afternoon, suggesting that other mechanisms led to increased serum gonadotropin levels. One such mechanism could be down-regulation of E₂ of estrogen receptors in the hypothalamus and/or pituitary as previously proposed [17, 24]. Classic cholinergic synapses have rarely been observed in GnRHergic neurons, suggesting the presence of a predominantly non-synaptic path in this communication of the cholinergic neuronal system [13]. The current results in

rats with muscarinic temporal blockade in the right POA-AHA support previous hypothesis stating that muscarinic neuroendocrine mechanisms regulating ovulation are dependent on the neural information arising from the ovaries and reaching the POA-AHA [12]. It is also likely that a combination of two events is at play here: 1) the absence of estrogen α -receptor in POA-AHA secondary to the blockade of muscarinic receptors as previously shown [25]; and/ or 2) a decrease in the number of high affinity sites in the POA and adenohypophysis as suggested [26] as a consequence of changes on hormonal input [23] caused by ULO. Together, these two pieces of evidence allowed us to postulate that acetylcholine mediates, via muscarinic receptors, the feedback effects of gonadal hormones on the secretion of gonadotropins. There is evidence that the ovaries have neural connections with several brainstem nuclei and that representation of the left ovary in the central nervous system is greater than that of the right ovary [27]. In intact 4-day cyclic rats, the left ovary released more eggs than the right [28], and the ability of each ovary to respond to the same endocrine signals was different and variable throughout the estrous cycle [19, 23, 29, 30]. These findings suggest that asymmetric responses of the ovaries to neuroendocrine signals are the result of differences in the innervation received by each ovary and intrinsic differences between them. The current results support this idea because the number of ova shed by the right ovary was higher than that by the left ovary in ULO rats with mAChR blockade that were injected with LHRH or EB.

Conclusions

Taken together, the present results confirmed that at 13:00 h of diestrus-2 day, activation of mAChRs on the left side of the POA-AHA is required for the preovulatory secretion of GnRH and LH necessary for ovulation. Additionally, stimulation of these receptors is a key component of the stimulatory feedback of estrogens. We propose that the muscarinic system in the right POA-AHA participates in a feedback effect, by steroid hormones, on the pre-ovulatory secretion of gonadotropins and ovulation.

Abbreviations

ACh: Acetylcholine; E₂: 17 β -estradiol; EB: Estradiol benzoate; FSH: Follicle stimulating hormone; GnRH: Gonadotropin-releasing hormone; LH: Luteinizing hormone; LHRH: Synthetic LH-releasing hormone; mAChRs: Muscarinic receptors; POA-AHA: Preoptic and anterior hypothalamic areas; sc: Subcutaneous; ULO: Unilateral ovariectomy

Acknowledgments

This work was funded by Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM and CONACyT, Mexico. This work is a requirement for obtaining the degree of Doctor of Biological Sciences.

Funding

The experimental work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT No. 220014-3 and CONACyT Grant 236908.

Availability of data and materials

All data sets on which the conclusions of the paper rely are available to readers.

Authors' contributions

MEC, AEV and RDC wrote the manuscript. MEC and AEV designed the experiments; AEV performed the experiments; MC and RCH performed the RIA and ELISA assays. MEC, AEV, AF, IAC and RDC participated in the analysis and discussion of the results. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval

All experiments were performed in strict accordance with the Mexican Law of Animal Treatment and Protection Guidelines and the specifications of the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999. The Institutional Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México approved the experimental protocols (FES/DEPUCI/236/14). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Author details

¹Biology of Reproduction Research Unit, Laboratory of Neuroendocrinology, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, AP 9-020, CP 15000 Mexico City, Mexico. ²Department of Basic Research, National Institute of Geriatrics, México City, Mexico. ³Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México City, Mexico.

Received: 29 September 2016 Accepted: 25 October 2016

Published online: 04 November 2016

References

1. Levine JE. "Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat." In: Plant TM and Zeleznik AJ editors. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. USA. Elsevier Press; 2015; 1199–1257.
2. Shirley B, Wolinsky J, Schwartz NB. Effects of a single injection of an estrogen antagonist on the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*. 1968;82:959–68.
3. Ferin M, Tempone A, Zimmering PE, Van de Wiele RL. Effect of antibodies to 17beta-estradiol and progesterone on the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*. 1969;85:1070–8.
4. Schwartz NB. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. *Am J Physiol*. 1964;207:1251–9.

5. Herbison AE. "Physiology of the Adult Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network". In: Plant TM and Zeleznik AJ editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. USA. Elsevier Press; 2015:389–467.
6. Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R. Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J Endocrinol*. 1989;123:437–9.
7. Koren D, Egozi Y, Sokolovsky M. Muscarinic involvement in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat. *Mol Cell Endocrinol*. 1992; 90:87–93.
8. Simonovic I, Motta M, Martini L. Acetylcholine and the release of the follicle-stimulating hormone-releasing factor. *Endocrinol*. 1974;95:1373–9.
9. Monti JM, Sala MA, Otegui JT, Benedetti WL, Grino E. Inhibition of ovarian compensatory hypertrophy by implant of atropine in the hypothalamus. *Experientia*. 1970;26:1263–44.
10. Domínguez R, Riboni L, Zipitria D, Revilla R. Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat? *J Endocrinol*. 1982;95:175–80.
11. López E, Cruz ME, Domínguez R. Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the adult rat. *Arch Med Res*. 1997;28:343–8.
12. Cruz ME, Castro J, Domínguez R. A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J Endocrinol*. 1992;133:205–10.
13. Turi GF, Liposits Z, Hrabovszky E. Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *Neurochem Int*. 2008;52:723–8.
14. König JFR, Klippel RA. *The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem*. Robert E. Krieger Publishing Co. Inc. Huntington, New York. 1965, pp 162.
15. Derr RF. Pain perception in decapitated rat brain. *Life Sci*. 1991; 3149:1399–402.
16. Humphrey RR, Dermody WC, Brink HO, Bousley FG, Schotting NH, Sakowski R, et al. Induction of luteinizing hormone (LH) release and ovulation in rats, hamsters, and rabbits by synthetic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Endocrinology*. 1973;92:1515–26.
17. Weick RF, Smith ER, Domínguez R, Dhariwal APS, Davison JM. Mechanism of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. *Endocrinology*. 1978;88:293–301.
18. Lohmana R, Liu L, Morris M, O'Brien TJ. Validation of a method for localised microinjection of drugs into thalamic subregions in rats for epilepsy pharmacological studies. *J Neurosci Methods*. 2005;146:191–7.
19. Cruz ME, Flores A, Domínguez R. The cholinergic system of the preoptic-anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way. *Endocrine*. 2014;47:913–22.
20. Cruz ME, Villegas G, Domínguez-González A, Chavira R, Domínguez R. Ovulation delay induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior-hypothalamic area of the rat. *Brain Res Bull*. 2001;54:339–44.
21. Marchetti M, Cioni U, Scapagnini. Ovarian LHRH receptors increase following lesions of the major LHRH structures in the rat brain: involvement of a direct neural pathway. *Neuroendocrinology*. 1985;41:321–31.
22. Tanaka K, Matsugami T, Chiba T. The origin of sensory innervation of the peritoneum in the rat. *Anat Embryol*. 2002;205:307–13.
23. Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez JO, Chavira R, et al. The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4:43.
24. Borrás M, Hardy L, Lempereur F, el Khissi AH, Legros N, Gol-Winkler R, et al. Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1994;48:325–36.
25. Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Arrieta I, Mendoza-Rodríguez CA, Cruz ME. Effects of cholinergic blockade on the mRNA expression of estrogen receptor isoform α (ER α) in both sides of the preoptic and anterior hypothalamic area (POA-AHA). *Proceeding of the 35th Meeting of Society for Neuroscience*, Washington D.C., USA, 2005. Abst 759.2
26. Sokolovsky M, Egozi Y, Avissar S. Molecular regulation of receptors: interaction of beta-estradiol and progesterone with the muscarinic system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:5554–8.
27. Tóth IE, Banczerowski P, Boldogkoi Z, Tóth JS, Szabó A. Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary: A double viral tracing study. *Brain Res Bull*. 2008;77:306–11.
28. Domínguez R, Cruz ME, Chávez R. "Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation". In: Hirshfeld AM, editor. *Growth Factors and the Ovary*. New York. Plenum Press; 1989. p.321–325.
29. Domínguez R, Cruz-Morales SE. The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinol Metab Syndr*. 2011;S4:001. doi:10.4172/2161-1017.S4-001.
30. Cruz ME, Flores A, Alvarado BE, Hernández CG, Zárate A, Chavira R, et al. Ovulation requires the activation on proestrus of M₁ muscarinic receptors in the left ovary. *Endocrine*. 2015;49:809–19.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at www.biomedcentral.com/submit 

Discusión

Anteriormente se mostró que el implante de un cristal de atropina en POA-AHA Izquierda a las 13:00 h del diestro-2 bloquea la ovulación (Cruz *et al.*, 1989). En el presente estudio, la micro-inyección de 62.5 ng de atropina en el mismo día del ciclo estral y en el mismo lado de POA-AHA bloquea la ovulación, sugiriendo que la activación temporal o continua de la señal muscarínica del lado izquierdo de POA-AHA es requerida en la ovulación.

La actividad colinérgica en POA-AHA es asimétrica a las 13:00 h del diestro-2 (Cruz *et al.*, 1998 Sánchez *et al.*, 1994), ya que la actividad de la ChAT es mayor en el lado izquierdo que del derecho (Cruz *et al.*, 1998). El número de sitios de unión (B_{max}) y la constante de disociación (K_d) para la (H³)-N-metyl-escoplamina es mayor en el lado izquierdo de POA-AHA. Además, la concentración de acetilcolina en ambos lados de POA-AHA fue menor que el límite detectado por la metodología usada (Sánchez *et al.*, 1994). Esta inherente asimetría del sistema colinérgico de POA-AHA explica los resultados asimétricos en la ovulación por el bloqueo de los mAChR en la porción izquierda de POA-AHA y no en la derecha (**Figura 4**).

El bloqueo unilateral de los mAChR por el implante de cristales de atropina en POA-AHA derecha a las 13:00 h del diestro-2 no modifica la ovulación (Cruz *et al.*, 1989). En el presente estudio, el bloqueo temporal de los mAChR no modifica la tasa de animales ovulantes, pero el número de ovocitos liberados por ovario fue más bajo que en el grupo con micro-inyección del vehículo, sugiriendo que el crecimiento y la diferenciación de los folículos se retrasó por la pérdida de la señal muscarínica de POA-AHA. Anteriormente se mostró que los ovarios de las ratas con implantes de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA realizados en el diestro-2 y estudiados en el proestro esperado o el estro presentan un menor número de folículos pequeños en el ovario izquierdo y algunos medianos o preovulatorios, comparados con ovarios de ratas implantados con colesterol (Cruz *et al.*, 2014). Este resultado apoya la idea de que la señal muscarínica proveniente de POA-AHA izquierda resulta necesaria en el crecimiento y diferenciación de los folículos.

El bloqueo sistémico de los mAChR por la inyección subcutánea de sulfato de atropina realizado en el diestro-1 a las 13:00h provoca disminución en la concentración de E₂ y el desfasamiento por 24 horas del pico preovulatorio de LH y de E₂ (Cruz *et al.*, 2001). En estos animales, la inyección de BE restablece la ovulación (Cruz *et al.*, 2001), sugiriendo que las bajas concentraciones de E₂ causan el bloqueo de la ovulación. En el presente estudio, un efecto similar se observa en ratas con el bloqueo temporal de los mAChR en el lado izquierdo de POA-AHA, dado que las ratas ovulan 48 horas después de lo esperado (**Figura 5**).

La secreción de hormonas esteroides en células de la granulosa humanas es mediada por la actividad muscarínica, la que podría desempeñar un papel en la regulación de la vías intraováricas (Kornya *et al.*, 2001). La participación del sistema colinérgico en la regulación de la secreción de E₂ varía de acuerdo al día del ciclo estral, ya que dos horas después de la inyección subcutánea de sulfato de atropina en el diestro-1 o proestro, la concentración de E₂ disminuye, y aparentemente no tuvo efectos cuando las ratas son inyectadas en diestro-2 (Cruz *et al.*, 2006). En nuestro estudio, el bloqueo temporal del sistema muscarínico del lado izquierdo de POA-AHA provoca disminución en la concentración de E₂ y de LH en la tarde del proestro (28 horas después del bloqueo de los mAChR), resultados que apoyan la idea de que el bloqueo de la ovulación es parcialmente explicado por la pérdida de la secreción de E₂ durante la fase preovulatoria del proestro. Estos resultados podrían también incluso explicar el bajo número de ovocitos liberados en ratas micro-inyectadas con atropina en el lado izquierdo de POA-AHA izquierda. En conjunto estos resultados apoyan la hipótesis de que señales neurales provenientes de POA-AHA izquierda, modulan la sensibilidad de los ovarios hacia la FSH y LH (Cruz *et al.*, 2014).

La baja concentración de E₂ en la tarde del proestro esperado en ratas con tratamiento de atropina del lado izquierdo de POA-AHA podría explicar la baja concentración de LH y el retraso de la ovulación durante 48 horas.

Con base en los resultados previos (Cruz *et al.*, 1989) y los actuales, sugerimos que en la tarde del diestro-2, el sistema muscarínico que inerva el lado izquierdo de POA-AHA regula de manera estimulante la secreción preovulatoria de LH. La inducción de la

ovulación en ratas con micro-inyección de atropina en POA-AHA izquierda ocurre después de la inyección de LHRH y BE, sugiriendo que la activación de los mAChR es componente principal en el “feedback” estimulante de los estrógenos y en el pico preovulatorio de GnRH (**Figura 5**).

En el presente estudio, el aumento en la concentración de FSH a las 17:00 horas del proestro en las ratas con bloqueo unilateral de los mAChR en POA-AHA podría ser explicado por una disminución en la concentración de progesterona. La inyección subcutánea de sulfato de atropina en el diestro-2 resulta en una elevación en la concentración de progesterona (Flores *et al.*, 2005), y en ratones hembra juveniles, la elevación en la concentración de FSH resultado de la ULO fue disminuida por la inyección de progesterona (Gibson *et al.*, 1979). La ligadura de la arteria ovárica provoca un decremento en la irrigación del flujo sanguíneo del ovario, y una disminución en la tasa de ovulación cuando las ratas fueron tratadas con una inyección de gonadotropinas, así como un decremento en la concentración de progesterona en suero (Zackarisson *et al.*, 2000).

La inervación peritoneal juega un papel esencial en la comunicación neural del sistema nervioso central (Tanaka *et al.*, 2002). Los efectos de la laparotomía sobre el peso de los ovarios apoyan la hipótesis de Tanaka, ya que el peso de los ovarios de las ratas con laparotomía del lado derecho aumentó respecto al animal intacto, sugiriendo que un gran número de folículos se encuentran en crecimiento.

El efecto del reflejo neural en la piel abdominal afecta el flujo sanguíneo de los ovarios y la actividad del nervio ovárico superior (Uchida *et al.*, 2005). La perforación del peritoneo derecho realizada en el día del diestro-2 resulta en una elevación en la concentración de estradiol en comparación de los controles, mientras que la perforación del lado izquierdo resulta en una disminución de la concentración de dicha hormona (Cruz *et al.*, 2006). En nuestro estudio, las altas concentraciones de LH y FSH detectadas a las 11:00 horas del proestro en ratas con laparotomía unilateral sugiere que la estimulación de la piel y el músculo en el lado derecho provocó una estimulación de tipo neural que participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas en el día del proestro. Gibson *et al.*, (1979) observaron un ligero aumento en la concentración sérica

de FSH y LH a las 4, 8, 32 y 51 h después de la ULO en ratonas jóvenes; el tratamiento con progesterona redujo la concentración de FSH en todos los tiempos estudiados, aunque la de LH no fue afectada. Resultados previamente reportados por nuestro grupo de investigación muestran que la concentración de progesterona en ratas con perforación dorsal en el peritoneo realizada en el diestro-2 fue más alta que en el grupo control (Flores *et al.*, 2008; 2011). Basados en este resultado, sugerimos que la ULO estimula la secreción de progesterona, lo cual resulta en la inhibición de la secreción de FSH. En este estudio la concentración de LH a las 17:00 horas del proestro fue más baja en ratas sometidas a la laparotomía. Sin embargo, estos animales ovularon en el día de estro esperado, lo que sugiere un retraso en la secreción preovulatoria de LH.

En el día del diestro-2, la expresión de la aromatasa es más alta en el ovario izquierdo que en el derecho (Domínguez *et al.*, 2013), e *in vitro* el ovario izquierdo presenta una mayor capacidad de secretar E₂ que el derecho (Ortega *et al.*, 2013). La extirpación del ovario derecho realizada a las 13:00 h del diestro-2 resulta en una baja en la concentración de E₂ en ratas con laparotomía en el lado derecho, lo que sugiere que una comunicación neural entre los ovarios modula la secreción de E₂ (Cruz *et al.*, 2006).

Con base en los resultados del presente estudio, sugerimos que la extirpación de un ovario a las 13:00 h del diestro-2, resulta en la eliminación de una señal estimulante que modula la secreción de GnRH, de LH y la ovulación (**Figura 6**).

Los mecanismos que son alterados por la extirpación de un ovario depende del ovario remanente, ya que en todas las ratas con el ovario izquierdo *in situ* (ULO derecha) ovularon después de la inyección de benzoato de estradiol, pero esta hormona no tuvo efecto cuando el ovario derecho permaneció *in situ* (ULO Izquierda) (**Figura 7**). A pesar de los diferentes efectos sobre la concentración de E₂ en ratas con ULO, la concentración de FSH y LH aumentó en la mañana del proestro y disminuyó en la tarde, sugiriendo que otro mecanismo estimuló el incremento en la concentración de gonadotropinas. Uno de estos mecanismos podría ser el efecto "down-regulation" del estradiol sobre los receptores a estrógenos en el hipotálamo y la hipófisis (Weick *et al.*, 1978, Borrás *et al.*, 1994).

Entre 50 y 80% de las neuronas colinérgicas en el núcleo preóptico medial, la estría terminal y el septum lateral de ratas ovariectomizadas presentan receptores a estrógenos (Gibbs, 1996), pero la sinapsis colinérgica clásica raramente ha sido observada en las neuronas GnRHérgicas, sugiriendo la presencia de una vía predominantemente no sináptica en esta comunicación del sistema neuronal colinérgico (Turi *et al.*, 2008). El E₂ participa en los mecanismos que regulan el sistema colinérgico de POA-AHA, ya que la inyección de 17β-estradiol en ratas ovariectomizadas aumenta la actividad de la acetilcolinesterasa en POA (Luine *et al.*, 1980) y la unión específica del antagonista (³H)-QNB (Benzilato de quinuclidilo tritiado) (Olsen *et al.*, 1988), y disminuye el número de sitios de unión muscarínicos (B_{max}), sin modificar su afinidad (K_d) (Dohanich *et al.*, 1982). En el día del estro en ratas con ULO, los efectos del implante unilateral de atropina fueron inversos a los observados en animales con ambos ovarios *in situ*, lo que sugiere que los mecanismos neuroendocrinos colinérgicos que regulan la ovulación están relacionados con la información neural que envían los ovarios al POA-AHA (Cruz *et al.*, 1992). Los resultados actuales observados en ratas con bloqueo temporal de los mAChR de POA-AHA izquierda apoyan la hipótesis anterior. Estas diferencias se relacionan con el día del ciclo estral en el que se realizaron los experimentos (estro en el estudio anterior y diestro-2 en este estudio), y quizás estén vinculados con la secreción de E₂ porque la inyección benzoato de estradiol en ratas con bloqueo de mAChRs en el diestro-2 restauró la ovulación. Así que, con base en estos resultados, sugerimos que en el día del diestro-2, los ovarios regulan la actividad del sistema muscarínico de POA-AHA derecha, pero no la de la izquierda (**Figura 8**).

Existe evidencia de que los ovarios envían proyecciones neuronales que van hacia núcleos del cerebro anterior y la presencia del ovario izquierdo es mayor hacia el sistema nervioso central, que la del derecho (Tóth *et al.*, 2007).

La respuesta asimétrica de los ovarios a las señales neuroendocrinas es el resultado de la diferencia en la innervación recibida por cada ovario en cada fase del ciclo estral y las diferencias intrínsecas entre ellos (Marchetti *et al.*, 1985, Domínguez *et al.*, 1989, Zackrisson *et al.*, 2000, Cruz *et al.*, 2014, Cruz *et al.*, 2015, Domínguez-Cruz-Morales, 2011, Flores *et al.*, 2005, Flores *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este

estudio apoyan esta hipótesis, cuando se considera que la inyección de LHRH y BE en ratas con ULO y bloqueo de los mAChR liberaron un mayor número de ovocitos por el ovario izquierdo que por el derecho.

Conclusiones

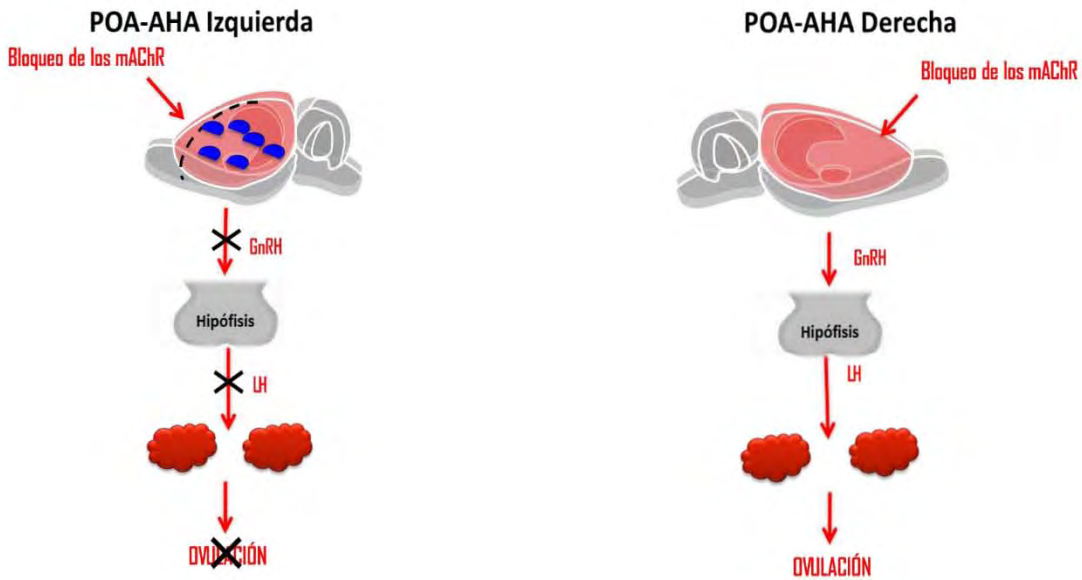
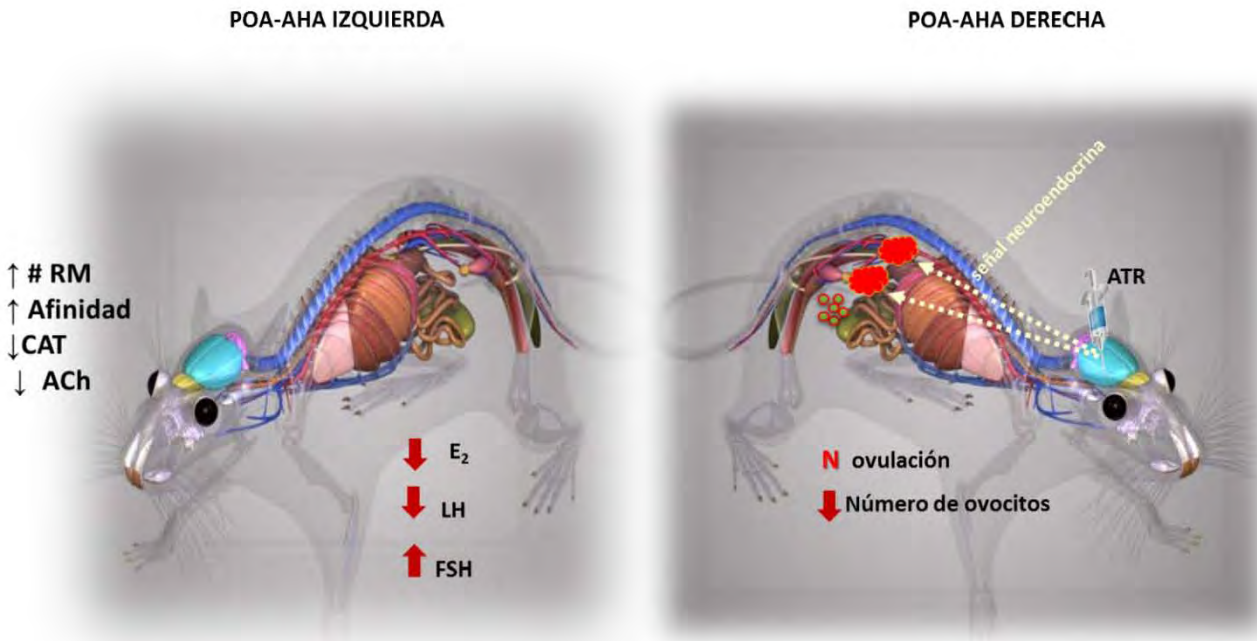
- 1) A las 13:00 h del diestro-2, la activación de los mAChRs en el lado izquierdo de POA-AHA es necesario en la secreción preovulatoria de GnRH, LH y la ovulación.
- 2) En este día y hora del ciclo, la ausencia de uno de los ovarios bloquea la ovulación del ovario remanente, la que ocurre 24 horas después, cuando el ovario *in situ* es el izquierdo. Cada ovario participa de manera diferente en los mecanismos de regulación estimulante de los estrógenos en la secreción de LH, los que dependen del ovario izquierdo.
- 3) La estimulación de los mAChRs en el diestro-2 es un componente clave en la retroalimentación estimulante de los estrógenos y los ovarios regulan la actividad del sistema muscarínico de POA-AHA derecha, pero no los de la izquierda.

Anexos

Modelos fisiológicos

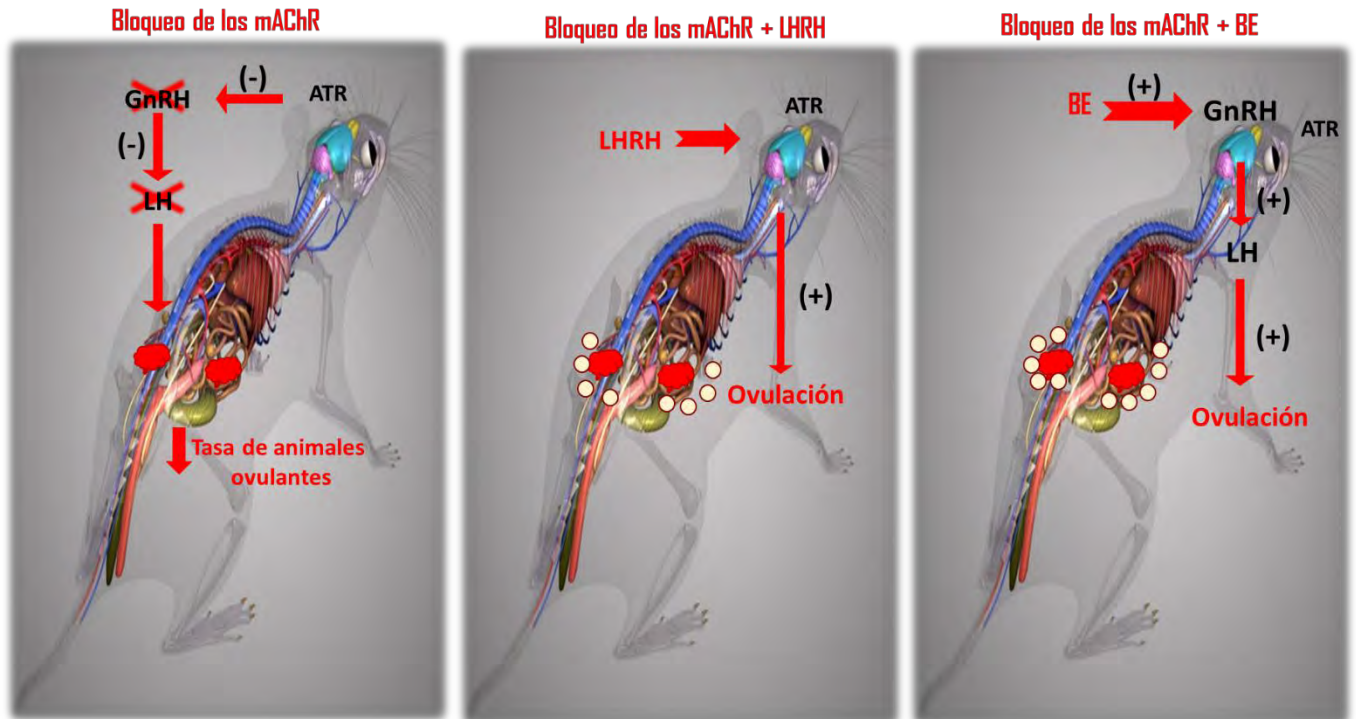
PRIMER MODELO

Figura 4.- Modelo fisiológico que explica la función de la acetilcolina vía mAChR de POA-AHA a las 13:00 h del diestro-2, sobre la ovulación.



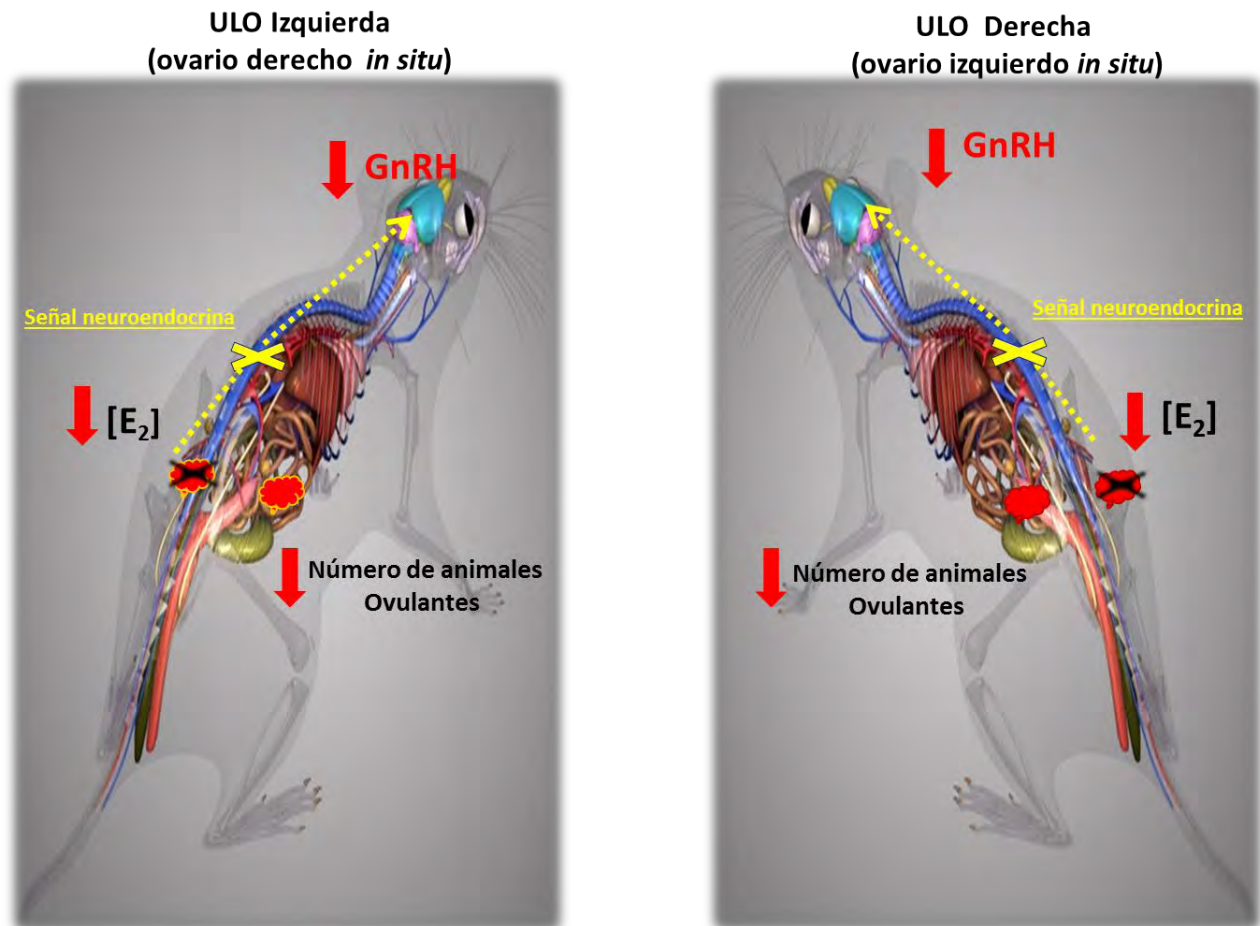
La señal muscarínica proveniente de POA-AHA izquierda a las 13:00 h del diestro-2 es indispensable y de tipo estimulante en la secreción de la GnRH, la LH y la ovulación.

Figura 5.- Modelo fisiológico que explica la función de la acetilcolina vía mAChR de POA-AHA a las 13:00 h del diestro-2, sobre el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.



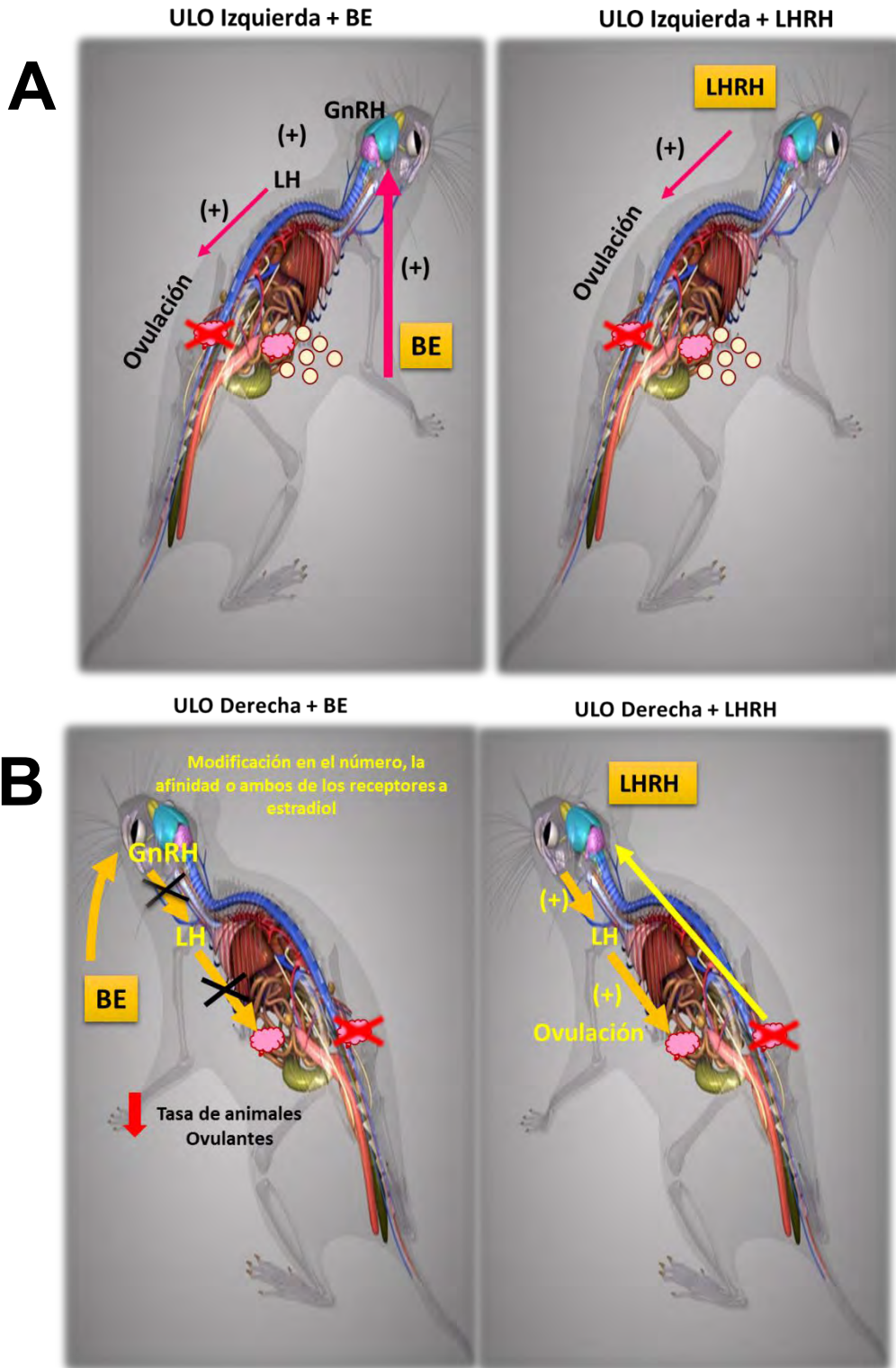
La activación de los mAChR es componente principal en el “feedback” estimulante de los estrógenos y en el pico preovulatorio de GnRH

Figura 6. Modelo fisiológico que explica la participación del ovario izquierdo y derecho en los mecanismos de regulación de la ovulación.



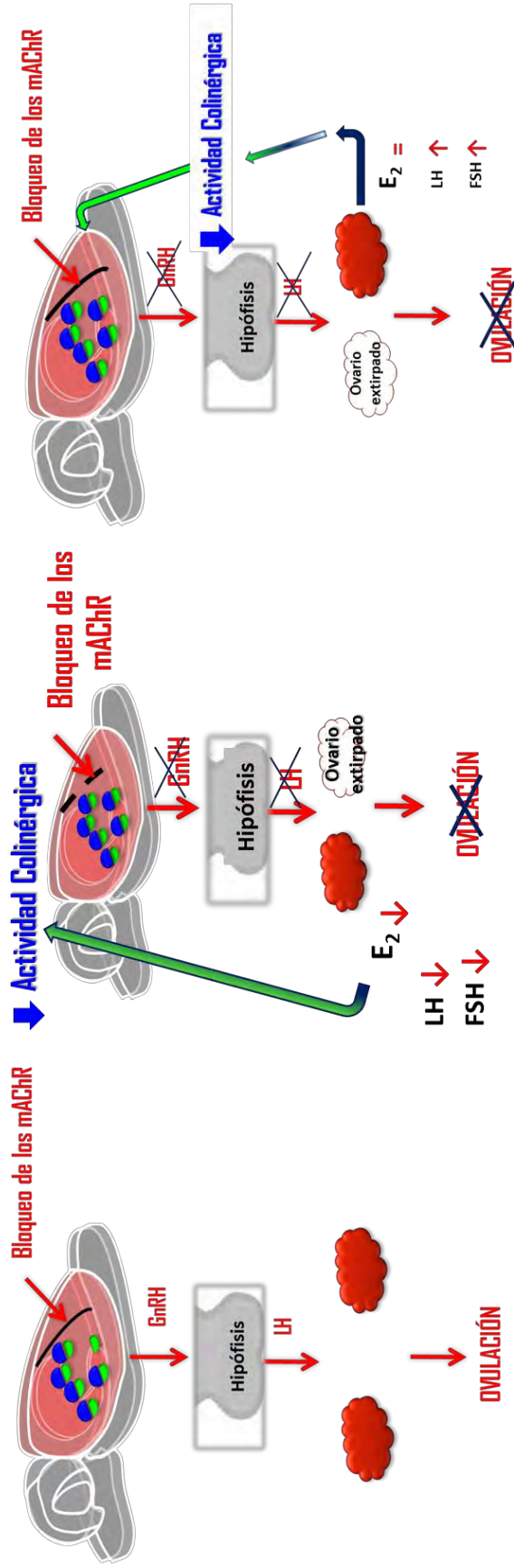
La extirpación de un ovario a las 13:00 h del diestro-2, resulta en la eliminación de una señal estimulante que modula la secreción de GnRH, de LH y la ovulación.

Figura 7. Modelo fisiológico que explica los mecanismos neuroendocrinos que regula el ovario **derecho** (A) y el **izquierdo** (B) a las 13:00 h del diestro-2.



Los mecanismos que son alterados por la extirpación de un ovario dependen del ovario in situ.

Figura 8. Modelo fisiológico que explica los efectos de la falta de un ovario, a las 13:00 h del diestro-2, sobre los mecanismos de regulación de los mAChR de POA-AHA derecha sobre la ovulación



En el día del diestro-2, los ovarios regulan de manera estimulante la actividad del sistema muscarínico de POA-AHA derecha, pero no la izquierda.

Literatura citada

Arteaga-López PR., Domínguez R, Cerbón MA, Mendoza-Rodríguez CA, Cruz ME. (2003). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and Right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*. 21:251-260.

Avissar S, Egozi Y, Sokolovsky M. (1981). Studies on muscarinic receptors in mouse and rat hypothalamus: A comparison of sex and cyclical differences. *Neuroendocrinology*. 32 (5): 295-302.

Bakalkin GY, Tsibezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID y Krivosheev OG. (1984). Lateralization of LH-RH in rat hypothalamus. *Brain Research*. 296: 361-364

Borrás M, Hardy L, Lempereur F, el Khissiin AH, Legros N, Gol-Winkler R, Leclercq G. (1994): Estradiol-induced down-regulation of estrogen receptor. Effect of various modulators of protein synthesis and expression. *Journal Steroid Biochem Mol Biol*. 48:325-36.

Butcher RL. (1977). Changes in gonadotropins and steroids associated with unilateral ovariectomy of the rat. *Endocrinology*. 101: 830-839.

Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of Endocrinology*. 123: 437- 439.

Cruz ME, Morán JL, Jaramillo LP, Domínguez R. (1990^a). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Research Bulletin*. 24; 739- 742.

Cruz ME, Morán JL, Jaramillo LP, Domínguez R. (1990^b). Differential effects of unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rat. *Journal of Endocrinology*. 124; 37- 41.

Cruz ME, Castro J, Domínguez R. (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Endocrinology*. 133: 205- 210.

Cruz ME, Arteaga PR, Huerta-Delgadillo M, Sánchez A, Domínguez R (1998).

Differences in acetylcholine content, binding and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrus cycle of rat. *Medical Science Research*. 25: 823-825.

Cruz ME, Villegas G, Domínguez-González A, Chavira R, Domínguez R. (2001). Ovulation delay induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior-hypothalamic area of the rat. *The Brain Research Bulletin*. 54:339-344.

Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez JO, Chavira R, Domínguez R. (2006). The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 21; 4:43.

Cruz ME, Hernández S, Toledo S, Alvarado B, Hernández C, Flores A, Domínguez R. (2011). Effects of muscarinic M₁ and M₂ receptor blockade of the left or right ovary at proestrus on spontaneous ovulation of the rat. 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C. Poster Session No. XXX.XX.

Cruz ME, Alvarado B, Hernández C, Domínguez R. (2012). Spontaneous ovulation in both ovaries depends on the stimulation of M₁ muscarinic receptor of the left ovary. 42th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. New Orleans. Poster Session.

Cruz ME, Flores A, Domínguez R. (2014). The cholinergic system of the preoptic-anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way. *Endocrine*. 47:913-922.

Cruz ME, Flores A, Alvarado BE, Hernández CG, Zárate A, Chavira R, Cárdenas M, Arrieta-Cruz I, Gutiérrez-Juárez R. (2015). Ovulation requires the activation on proestrus of M₁ muscarinic receptors in the left ovary. *Endocrine*. 49:809-819.

Dohanich GP, Witcher JA, Weaver DR, Clemens LG. (1982). Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Research*. 241:347-50.

Domínguez R, Riboni L, Zipitria D, Revilla R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the estrous cycle related to ovulation in the rat? *Journal of Endocrinology*. 95: 175-180.

Domínguez R, Cruz ME, Chávez R. (1989). "Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation". In: Hirshfiel AM, editor.

Growth Factors and the Ovary. New York. Plenum Press; p.321–325.

Domínguez R, Cruz ME, Morán C. (1998). Differential effects of ovarian local anesthesia during proestrus, on the ovulation by the right or left ovary, normal and hemiovariectomized adult rat. *Journal of Reproduction and Fertility*. 113:185-190.

Domínguez R, Cruz-Morales SE. (2011). The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinology and Metabolic Syndrome S4:001*. doi:10.4172/2161-1017.S4-001.

Domínguez R, Rosas NL, Santiago ML, Zárate A, Flores A. (2013). The transcription of 3 β -HSD, 17 β -HSD and P450 aromatase in the ovaries varies during the estrous cycle and is asymmetric. *Endocrine reviews* 34, 3 June 2013. MON-519. The Endocrine Society Meeting

Egozi Y, Sokolovsky M. (1985). Muscarinic receptors in the preoptic area are sensitive to 17 beta- estradiol during the critical period. *Neuroendocrinology*. 40 (5):385-392.

Egozi Y, Kloog Y, Sokolovsky M. (1986). Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with the estrus cycle. *Brain Research*. 383: 310-313.

Everett JW. (1949). Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in rat. *Endocrinology*. 4-3:389-405.

Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Barco AI, Chavira R, Domínguez R, Cruz ME. (2005). The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine*. 28:145-51.

Flores A, Gallegos A, Velazco J, Mendoza F, Montiel C, Everardo P, Cruz M E, Domínguez R. (2008). The acute effects of bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, testosterone and estradiol serum levels depend on the surgical approach and the day of the estrous cycle when they are performed. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 6:48.

Flores A, Velasco J, Gallegos AI, Mendoza FD, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. (2011). Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9:34

Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya M, Arai Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neuroscience. Let.* 51: 365-370.

García JM. (2007). Efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos de las porciones izquierda o derecha de POA-AHA, realizado en el día del diestro-2, sobre el eje hipotálamo-hipófisis- ovario de la rata. Tesis. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.

Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U. (1978). Unilateral ovariectomy- induced luteinizing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neuroscience Letters*, 9:333-336.

Gerendai I. (1986). Laterality in the Neuroendocrine Systems. En: Duality and unity of the brain. Unified functioning and specialization of the hemispheres. Editor Ottoson, D., Proceedings of an International Symposium held at The Wenner Gren Center, Stockholm. 17-28.

Gerendai I, Banczerowski P, Halász B. 2005. Functional significance of the innervations of the gonads. *Endocrine*. 28: 309-318.

Gibbs RB. (1996). Fluctuations in relative levels of choline acetyltransferase mRNA in different regions of the rat basal forebrain across the estrous cycle: effects of estrogen and progesterone. *Journal of Neuroscience*.16:1049–1055.

Gibson WR, Ingram BW, Lee VW. (1979). Can reduced consumption of gonadotrophins account for ovarian compensation in unilaterally ovariectomized, immature mice injected with gonadotrophins? *J Reprod Fertil*. 57:209-218.

Herbison AE. (2015). Physiology of the Adult Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. In: Plant TM and Zeleznik AJ (eds). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. USA. Elsevier Press: 389-467.

Inase Y, Machida T. (1992). Differential effects of right-sided and left-sided orquidectomy on lateral asymmetry of LH cells in the mouse brain. *Brain Research*. 580:338-340.

Jacobowitz DM y Palkovits M. (1974). Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase containing in the brain. I. Forebrain (Telencephalon). *Journal of Comparative Neurology*. 157:13.

Kornya LA, Bódis JB, Koppán MB, Tinneberg HRC, Török AB. (2001). Modulatory Effect of Acetylcholine on Gonadotropin-Stimulated Human Granulosa Cell Steroid Secretion. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 52:104–107

Libertum C, McCann SM. (1973). Blockade of the release of gonadotropins and prolactin by subcutaneous or intraventricular injection of atropine in male and female rats. *Endocrinology*. 92:1714-1724.

López E, Cruz ME, Domínguez R. (1997). Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the rat. *Archives of Medical Research*. 28 (3):343-348.

Luine V, Park D, Tong J, Reis D, McEwen B. (1980). Immunochemical demonstration of increased choline acetyltransferase concentration in rat preoptic area after estradiol administration, *Brain Research*. 191:273-277

Marchetti, M. Cioni, U. Scapagnini. (1985). Ovarian LHRH receptors increase following lesions of the major LHRH structures in the rat brain: involvement of a direct neural pathway. *Neuroendocrinology*. 41:321–331.

Markee J.E., Everett J.W. y Sawyer C.H. (1952). The relationship of the nervous system to the release of gonadotropin and regulation of the sex cycle. *Recent Program in Hormone Research*. 7: 139-163.

Mendoza-Garcés L, Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Arrieta-Cruz I, Flores A, Cruz ME. (2007). Changes in the number of estrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells on POA-AHA during the estrous cycle of the rat. 40th Annual Meeting of Society Study of Reproduction, San Antonio, Texas. 21-25 julio, Abst 128, pp 106.

Monti JM, Sala MA, Otegi JT, Benedetti WL, Grino E. (1970). Inhibition of ovarian compensatory hypertrophy by implant of atropine in the hypothalamus. *Experientia*. 26:1263-1244.

Morán JL, Cruz ME, Domínguez R. (1994). Differences in the ovulatory response to unilateral lesions in the preoptic and anterior hypothalamic area performed on each day of the oestrus cycle of adult rat. *Brain Research Bulletin*. 33:663-668.

Müller EE, Nisticó G, Scapagnini U. (1977). Neurotransmitters and anterior pituitary function. Academic Press, New York, 435.

Nance DM, Moger WH. (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemicastration. *The Brain Research Bulletin*. 10:353-355.

Nance DM, Bhargava M, Myatt GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *The Brain Research Bulletin*. 13: 651-655.

Nance DM, Burns J, Klein CM, Burden HW. (1988). Afferent fibers in the reproductive system and pelvic viscera of female rats: anterograde tracing and immunocytochemical studies. *The Brain Research Bulletin*. 2: 701-709.

Nisticó G, Müller EE. (1989). Neurotransmitters, neuromodulators and neuromediators. En: *Brain messengers and the pituitary*, 2da. Edición, Academic Press. New York. 15-228.

Nordeen EJ, Yahr P. (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science*. 218: 391-393.

Olsen KL, Edwards E, Schechter N, Whalen RE. (1988). Muscarinic receptors in preoptic area and hypothalamus: effects of cyclicity, sex and estrogen treatment. *The Brain Research Bulletin*. 448:223-229.

Ortega CC, Chavira R, Santiago LM, Rosas P, Cruz-Morales S, Domínguez. The in vitro ability of the right and left ovary of cyclic rats to spontaneous or LH or FSH stimulated estradiol release varies during the estrous cycle and the time of the day. *Proceeding of the 46th Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, Montreal, Canada, 2013. Abs. 337, 22-26.

Sala MA, Otegi JT, Benedetti WL, Monti JM, Grino E. (1971). Blockade of ovarian compensatory hypertrophy and ovulation in the rat by hypothalamic implant of an anticholinergic drug. *Journal of Neuro-Visceral Relations*. 32:241-248

Sánchez MA, Lopez GM, Cruz ME, Tapi R, Domínguez R. (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Neuroreport*. 5: 433-434.

Sawyer CH, Maerkee JE, Townsend BE. (1949). Cholinergic and adrenergic components in the neurohumoral control of release of LH in the rabbit. *Endocrinology*. 44: 18-37.

Sokolovsky M, Egozi Y, Avissar S. (1981). Molecular regulation of receptors: interaction of beta- estradiol and progesterone with the muscarinic system. *Proceeding of National Academy of Science of USA*. 78 (9):5554-5548.

Tanaka K, Matsugami T, Chiba T. (2002). The origin of sensory innervation of the peritoneum in the rat. *Anatomy and Embryology*. 205: 307-313.

Tóth IE, Wiesel O, Boldogkői Z, Bálint K, Tapaszti Z, Gerendai I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microscopy Research and Technique*. 70:710-718.

Turi GF, Liposits Z, Hrabovsky E. (2008). Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. Ed. Elsevier, *Neurochemistry International*. 52:723-728.

Uchida S, Kagitani F, Hotta H, Hanada T, Aikawa Y. (2005) Cutaneous mechanical stimulation regulates ovarian blood flow via activation of spinal and supraspinal reflex pathways in anesthetized rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 55: 265-277.

Wang H, Jaquette J, Collison K, Segaloff DL. (1993). Positive charges in a putative amphiphilic helix in the carboxyl-terminal region of the third intracellular loop of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor are not required for hormone-stimulated cAMP production but are necessary for expression of the receptor at the plasma membrane. *Molecular Endocrinology*. 7:1437–1444.

Weick RF, Smith ER, Domínguez R, Dhariwal APS, Davison JM. (1978). Mechanism of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. *Endocrinology*. 88:293-301.

Zackrisson U, Mikuni M, Peterson MC, Nilsson B, Janson PO, Brannstrom M. (2000). Evidence for the involvement of blood flow-related mechanisms in the ovulatory process of the rat. *Human Reproduction: Oxford Journals*. 15: 264-272.

Capítulo 2

- ❖ Papel de la inervación de la pared abdominal y el peritoneo en la regulación de la ovulación.
- ❖ Regulación de la síntesis y secreción de la GnRH y sus efectos sobre la ovulación.
- ❖ Asimetría hipotalámica y la regulación neuroendocrina de las glándulas endocrinas.

Papel de la inervación de la pared abdominal y el peritoneo en la regulación de la ovulación.

La epidermis posee capacidades metabólicas y endocrinas, ya que las células epidérmicas pueden sintetizar y liberar hormonas tales como la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), proopiomelanocortina (POMC), hormona estimulante de los melanocitos (MSH), hormona estimulante de la corteza adrenal (ACTH), β -endorfinas, hormona liberadora de la corticotropina (CRH), péptidos de la urocortina, acetilcolina (ACh) y catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina), serotonina, además de precursores de amina biogénicas (Deplewski y Rosenfield, 2000).

La piel es también un sitio de activación de hormonas esteroideas ya que convierte testosterona a 5α -dihidrotestosterona o a estradiol; o bien de la conversión de T_4 a T_3 a partir de tiroglobulina. Estas hormonas y neurotransmisores sintetizados localmente pueden actuar de forma autocrina o paracrina (Deplewski y Rosenfield, 2000).

La presencia de numerosas terminales nerviosas y una extensa red vascular provee a la piel de mecanismos adicionales para la expresión de las funciones neuroendocrinas (Deplewski y Rosenfield, 2000).

Considerar la piel como órgano neuroendocrino es un concepto relativamente nuevo en el campo de la fisiología, dado que combina tópicos de inmunología, endocrinología y neurobiología, que intervienen en la comunicación multidireccional entre el sistema nervioso central (SNC), el sistema endocrino e inmunológico y los órganos periféricos (Slominski y Wortsman, 2000).

La piel tiene un papel único debido a su localización, tamaño y diversidad funcional. Además, las señales cutáneas enviadas desde diferentes zonas del SNC pueden ejercer funciones neuroendocrinas que regulan a su vez funciones de órganos periféricos que resulta en el mantenimiento de la homeostasis local y sistémica (Deplewski y Rosenfield, 2000).

La piel presenta una red neural extensa representada por nervios colinérgicos y adrenérgicos, así como fibras sensitivas mielínicas y amielínicas. Los nervios autónomos inervan arteriolas, vasos sanguíneos, músculos piloerectores y glándulas apocrinas y ecrinas. Las terminales de las fibras sensoriales están cada una rodeadas de estructuras histológicas distintas, tales como los corpúsculos de Pacini y de Meissner, el órgano de Ruffini, los discos de Merkel y órganos mucocutáneos terminales. La vasta red de terminales sensoriales libres rodea y penetra en los folículos pilosos, las unidades pilosebáceas, glándulas apocrinas y ecrinas, así como la dermis y epidermis. Las redes sensoriales autónomas, muestran diferencias regionales, de acuerdo a los sitios anatómicos, en áreas bien definidas llamadas dermatomas. El torso, las extremidades,

la parte posterior de la cabeza y la nuca están inervados por nervios originados en los ganglios de la raíz dorsal de la medula espinal, mientras que la cara y el cuello están inervados por ramas del nervio trigémino (Deplewski y Rosenfield, 2000).

A finales de 1905 Heape demostró que en la coneja la ovulación era inducida por los estímulos asociados al coito, lo que provocaba que ésta se produjera entre 10 y 12 horas después. Por lo tanto en este animal la ovulación se produce por medio de una respuesta neurohormonal, que cuenta con dos vías; una vía aferente nerviosa que transmite los estímulos provocados por el coito al SNC y una vía eferente hormonal que envía la señal del SNC al ovario produciéndose la ovulación.

En los mamíferos la reproducción es una función compleja que además de implicar mecanismos neuroendocrinos entre el hipotálamo, la hipófisis y la gónada, que finaliza en la ovulación; también involucra conductas sexuales que facilitan la ovulación y la aceptación al coito. Se trate de especies de ovulación refleja o inducida, las conductas sexuales suelen ser agresivas. El primer órgano que recibe este tipo de agresiones o estímulos es la piel exterior de todo el cuerpo, como la que recubre a la vagina.

En la gata, como en los felinos la ovulación es inducida por la cópula (Lein y Concannon, 1983) se ha mostrado que la ovulación ocurre mediante estimulación cervical (Lawler *et al.*, 1993; Gudermuth *et al.*, 1997; Verstegen, 2002).

El hurón y el visón, comparten la peculiaridad de ser especies de ovulación inducida a través de la cópula (Verstegen, 1998), esta última estimula un reflejo que libera la luteinizante (LH) por parte de la hipófisis mediado por el hipotálamo medio basal (Robinson y Sawyer, 1987).

La piel provee al individuo las sensaciones del tacto, presión, vibración, temperatura, dolor y placer a través de su red nerviosa que comprende receptores especializados y terminales nerviosas desnudas (Deplewski y Rosenfield, 2000).

Las células de la piel presentan receptores a neuropéptidos y neurotransmisores idénticos a los expresados en el SNC, por ejemplo los queratinocitos, que tienen receptores muscarínicos, nicotínicos, opioides, a CRH, estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides e histamina; mientras que los melanocitos tienen receptores a CRH, LH, andrógenos, estrógenos, glucocorticoides, muscarina e histamina (Slominski y Wortsman, 2000).

En la piel de los mamíferos se encuentra una proteína precursora de alto peso molecular llamada proencefalina A (PEA), que produce encefalinas como la Met-encefalina (Met-E) y leu-encefalina (Leu-E). Además de éstas la piel de los mamíferos sintetiza una gran cantidad de neuropéptidos que incluyen a las taquininas, sustancia P, neurocinina A (NKA), proteína acoplada a proteína G (CGRP), péptido intestinal vasoactivo (VIP), neuropéptido Y (NPY), somatostatina (SOM), galanina, péptido natriurético atrial (ANP),

péptido metionina histidina (PHM), péptido histidina isoleucinamida (PHI), bradicinina, colescisticinina (CCK) y el péptido liberador de la gastrina (GRP) (Slominski y Wortsman, 2000).

También puede sintetizar las neurotrofinas, tales como el factor de crecimiento neural (NGF), neurotrofinas 3 y 4 (NT-3, NT-4) y el factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF). En el caso específico de NT-3, se detecta en los queratinocitos epidérmicos y foliculares de la piel joven, mientras que en los animales adultos se encuentra en queratinocitos de folículos pilosos y fibroblastos (Slominski y Wortsman, 2000).

En cultivos celulares de queratinocitos se ha demostrado que pueden sintetizar, secretar y degradar ACh (Slominski y Wortsman, 2000).

La actividad de la acetilcolinoesterasa ha sido detectada en los melanocitos epidérmicos. Además de la síntesis local de ACh, ésta es liberada por las terminaciones nerviosas que inervan las estructuras de la piel. La epidermis de los humanos y roedores tienen la capacidad de sintetizar dopamina, noradrenalina y adrenalina. La actividad de síntesis de catecolaminas cutáneas reside predominantemente en los queratinocitos (Slominski y Wortsman, 2000).

La piel puede convertir la dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEA-S) en andrógenos y estrógenos activos. Específicamente, la actividad enzimática corresponde al 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta 5\Delta 4$ isomerasa (3β -HSD), localizada en las glándulas sebáceas y en menor grado, en los folículos pilosos, epidermis y glándulas eccrinas, mientras que la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD), ha sido localizada en los queratinocitos epidérmicos y foliculares. La testosterona es también convertida en dihidrotestosterona (DHT) a través de la acción de la 5α -reductasa, detectada en los fibroblastos dérmicos y en la papila dérmica, queratinocitos epidérmicos y glándulas sebáceas y apocrinas (Slominski y Wortsman, 2000)

La piel cubre al peritoneo que es una membrana serosa fuerte y resistente, que tapiza las paredes de la cavidad abdominal y forma pliegues (los mesos, los epiplones y los ligamentos) que envuelven, total o parcialmente, gran parte de las vísceras situadas en ella, de tal forma que mantiene en su lugar ese órgano. El peritoneo está en contacto, por un lado, con la cara interna de la cavidad abdominal y por el otro, con la cara externa de los órganos. Este doble contacto es posible ya que el peritoneo es una membrana serosa de dos capas u hojas (Tanaka *et al.*, 2002).

A la capa exterior se le denomina peritoneo parietal y a la capa interior, peritoneo visceral. (Bentley *et al.*, 1981). La mayor parte del peritoneo parietal recibe nervios sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal, mientras que el peritoneo visceral los recibe de la raíz dorsal, el ganglio nodoso y del nervio vago (Tanaka *et al.*, 2002).

Iggo (1986) identificó una categoría del mecano receptor C, el cual es una unidad de distensión sensitiva que se encuentra debajo de la capa serosa (o en el epiplón), pero no se ve afectada por la contracción muscular; este autor describió que tal unidad recibe fibras aferentes vagales.

Glise y Abrahamsson (1980 a, b, c) observaron que la estimulación de los nervios aferentes al peritoneo genera una respuesta inhibitoria refleja en la motilidad gástrica. Mediante diferentes estudios estos autores concluyen que la estimulación peritoneal difusa suprime la motilidad gástrica a través de mecanismos reflejos vagales originados en el ganglio nodoso y fibras vagales noradrenérgicas inhibitorias, lo que incluye al mecanismo reflejo espino-vagal compuesto por las aferencias espinales de los nervios simpáticos, las vías ascendentes espino-bulbares y axones vagales eferentes (Gebhart, 2000).

La mayoría de las terminales nerviosas sensoriales viscerales de la médula espinal y las fibras sensoriales contenidas en el nervio vago inervan los mismos órganos viscerales. La inervación sensorial del tracto gastrointestinal incluye todas las capas de una víscera incluyendo al peritoneo (Gebhart, 2000).

Los nervios que inervan el peritoneo parietal, presentan fibras aferentes de los segmentos L3 a L4 en el peritoneo que envuelve el espacio retroperitoneal (Bahn *et al.*, 1986).

De acuerdo con Williams *et al.* (1995), el peritoneo parietal está inervado por los nervios que estimulan a los músculos y la piel, mientras que el peritoneo visceral, como una parte integral de las vísceras, es inervado por las fibras aferentes autónomas o viscerales.

Tanaka *et al.* (2002), analizo en la rata la distribución de neuronas sensitivas que inervan al peritoneo mediante el uso del trazador axonal fluoro-gold. El número y la distribución de neuronas marcadas en la raíz dorsal resulta en un marcaje de células mayor en los segmentos T8 y T9 del abdomen rostral derecho, T13 del abdomen caudal derecho; T10 del abdomen rostral izquierdo y L1 del abdomen caudal izquierdo. Asimismo describió que el peritoneo parietal recibe segmentos de las fibras neuronales del ganglio de la raíz dorsal. La inervación visceral de este segmento está dada por fibras del ganglio de la raíz dorsal que atraviesan el tronco simpático. El nervio vago también envía fibras sensoriales del ganglio nodoso al peritoneo visceral.

Robbins *et al.*, (1992) examinaron y compararon directamente las respuestas electrofisiológicas de las fibras nerviosas aferentes hipogástricas y pélvicas a la distensión uterina y vaginal durante cada día del ciclo estral. Estos autores sugirieron que la sensibilidad de la respuesta de las fibras aferentes en los nervios pélvicos e hipogástrico se ve afectada de forma diferente por las variaciones hormonales que ocurren durante el ciclo estral (Robbins *et al.*, 1989; Robbins *et al.*, 1992).

La existencia de una comunicación neural entre el ovario y el cerebro se ha sugerido a partir de diferentes resultados experimentales (Gerendai *et al.*, 2005). Mediante la inyección del virus de la seudorabia en el ovario izquierdo o en el derecho, se demostró que la marca llega al puente ventrolateral, a los núcleos gigantocelular, paragigantocelular, al núcleo del tracto solitario, al núcleo dorsal vagal, al grupo de células A1 y A5, al núcleo del raquí caudal, al núcleo hipotalámico paraventricular y al el hipotálamo lateral (Tóth *et al.*, 2007).

En la rata la información sensorial de los órganos reproductivos pélvicos se transmite al SNC a través de las fibras aferentes en los nervios hipogástrico y pélvico (Peters *et al.*, 1987; Robbins y Sato, 1991). Mientras que el útero está inervado principalmente por fibras aferentes del nervio hipogástrico. En cambio la vagina está inervada principalmente por fibras del nervio pélvico (Peters *et al.*, 1987).

En la rata adulta la estimulación cutánea nociceptiva aferente a la zona peritoneal estimula contracciones vesicales. El cese de la actividad derivada de la estimulación de las ramas del nervio pélvico podría tener un papel en la inhibición de estas contracciones, ya que la denervación de los nervios hipogástricos no alteró la respuesta, mientras que la denervación de los nervios pélvicos suprimió todos los efectos (Sato *et al.*, 1975).

Las vías simpáticas tienen sus neuronas preganglionares dentro de los segmentos espinales torácicos y lumbares, mientras que las vías parasimpáticas proceden de los núcleos craneales y segmentos sacros de la médula espinal. En cualquiera de los casos, la actividad ganglionar está determinada principalmente por el centro de salida de los axones preganglionares, de tal manera que si los nervios espinales están dañados, la actividad refleja cesa (Keast, 1999).

Los ganglios simpáticos son de dos tipos, paravertebrales y prevertebrales, que difieren en su localización, conexiones, propiedades de integración, receptores y transmisores (Janig y McLachlan, 1987, 1992b; Gabella, 1995).

Los ganglios paravertebral descansan en dos redes lineales ("cadenas") a cada lado de la columna vertebral. En algunos lugares, con mayor frecuencia en la región caudal, estas cadenas se fusionan en un solo ganglio que se encuentra cerca de la línea media. La mayoría de estas neuronas son noradrenérgicas y contiene el neuropéptido Y (NPY), aunque algunas son colinérgicas y contienen otros péptidos, como, el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Las neuronas poseen dendritas y típicamente reciben un pequeño número de aferencias preganglionares, las cuales activan las células ganglionares a través de los receptores nicotínicos de acetilcolina (ACh). La mayoría de estas neuronas inervan la vasculatura periférica y como tal, su actividad está vinculada a eventos cardiovasculares (Janig y McLachlan, 1992a).

Los ganglios simpáticos prevertebrales son únicos y se encuentran cerca de la línea media, cercanos a los órganos periféricos que inervan. Son referidos como el "plexo abdominal" o "ganglios mesentéricos", ya que se encuentran en el mesenterio y sus conectores neuronales viajan con los vasos mesentéricos. La mayoría de las neuronas son noradrenérgicas, aunque una minoría son colinérgicas y contienen péptidos, tales como el VIP. Las neuronas normalmente poseen muchas dendritas y la complejidad de su enramado dendrítico puede variar entre las neuronas (Szurszewski, 1981).

Cada neurona recibe numerosas terminales sinápticas, sin embargo, mientras que en los ganglios paravertebrales éstos surgen sólo de los axones preganglionares espinales, en los ganglios prevertebrales muchas neuronas reciben aportes de otras neuronas periféricas (Miolan y Niel, 1996).

Tanto la aferencia periférica como la central a las neuronas prevertebrales son excitatorios y son reguladas por las respuestas nicotínicas-colinérgicas. En los ganglios prevertebrales también existe una considerable divergencia y convergencia de las aferencias (Szurszewski, 1981; Janig y McLachlan, 1992a; Miolan y Niel, 1996).

Las neuronas que se encuentran en los ganglios permanecen muy cerca de sus órganos blancos. En algunos casos, estos se encuentran incrustados en los tejidos cercanos o en la musculatura externa de los órganos, haciendo que el acceso experimental o quirúrgico sea difícil (Keast, 1999).

Las neuronas dentro del ganglio parasimpático son un grupo funcional relativamente homogéneo en comparación con lo de los ganglios simpáticos. Las neuronas parasimpáticas también son estructuralmente homogéneas y por lo general poseen pocas o ninguna dendrita. Se cree que todas las neuronas parasimpáticas son colinérgicas y que pueden sintetizar diversos péptidos dependiendo del órgano diana. Otras sustancias comúnmente sintetizados por las células ganglionares parasimpáticas incluyen la sintetasa de óxido nítrico (NOS) y el VIP (Keast, 1999).

Muchos órganos reciben inervación simpática y parasimpática, aunque en unos cuantos casos los axones inervan los mismos tejidos dentro del órgano y tienen una acción realmente antagónica (por ejemplo, el nodo senoatrial del corazón). En general los tejidos reciben axones parasimpáticos o simpáticos. Por lo tanto, el comportamiento de los órganos viscerales ha sido analizado por el tipo y número de células ganglionares autonómicas activadas, así como por su patrón temporal de activación (Furness y Costa, 1987).

La integración central de la información sensorial y el patrón motor subsecuente a través de las vías simpáticas y parasimpáticas son críticos para una función autónoma adecuada. Sin embargo, los eventos que ocurren dentro de los ganglios periféricos y en

sus terminales proporcionan los puntos finales en el que la actividad motora puede ser modificada (Keast, 1999).

Los ovarios envían información neural hacia varias regiones del SNC (Tóth *et al.*, 2008, Gerendai *et al.*, 2009) y esta información participa en la regulación de la secreción de hormonas esteroides (Domínguez *et al.*, 2003, Domínguez y Cruz, 2011, Tóth *et al.*, 2008, Gerendai *et al.*, 2009). Pero además los ovarios comparten información neural (Tóth *et al.*, 2008, Gerendai *et al.*, 2009) y el ganglio celíaco mesentérico superior (CG-MG) facilita la comunicación entre los ellos (Gerendai *et al.*, 2005, Morán *et al.*, 2005).

Según Barco *et al.*, (2003), una posible explicación para la participación de la inervación en la regulación de la secreción de hormonas ováricas, es que el SNC envíe diferentes señales nerviosas a los ovarios derecho e izquierdo. Una de las vías finales comunes para cada ovario es el nervio ovárico superior (NOS), que también envía y recibe información neuronal diferente de cada glándula suprarrenal y del peritoneo. En el ovario, tal inervación modula la respuesta de los folículos a las gonadotropinas a través de la liberación de neurotransmisores, principalmente noradrenalina y actúa en las neuronas del ovario; también es posible que afecte al sistema colinérgico no neuronal del ovario. Para cerrar el circuito, algunas de las neuronas en el ovario registra cambios de la función ovárica los que se envían al SNC a través del nervio vago, los ganglios paravertebrales, la columna intermediolateral y quizá el ovario contralateral, por medio de nervios simpáticos (Barco *et al.*, 2003).

Los ovarios de los mamíferos están inervados por neuronas simpáticas y sensoriales (con un pequeño componente parasimpático) cuyas fibras llegan con los vasos por el hilio o por el borde del ligamento suspensorio hasta la médula del ovario. Una parte de los nervios pasan a la corteza del ovario a través del tejido intersticial y forman un plexo que rodea a los folículos en desarrollo, o en la teca interna y externa, pero no penetran la capa de las células de la granulosa ni el cuerpo lúteo (Burden, 1985; Dissen y Ojeda, 1999; Gerendai y Halász, 1997).

Los nervios que inervan al ovario tienen su origen en el ganglio celíaco, el ganglio mesentérico superior y el nervio esplácnico lumbar (Dissen y Ojeda, 1999). En la rata, la inervación simpática ovárica procede de dos vías; el plexo ovárico (PO), que viaja a lo largo de la arteria ovárica y el NOS que está asociado al ligamento suspensorio (Lawerence y Burden, 1980, Gerendai y Halasz, 1997), ambos nervios llegan a los ovarios por el hilio (Bergman *et al.*, 1998).

La inervación simpática del ovario no solo tiene un papel en su actividad secretora (Lara *et al.*, 1990), sino también en la regulación del desarrollo folicular. La inyección de anticuerpos al factor de crecimiento neural (NGF) a ratas neonatas resulta en el retraso del desarrollo folicular, la pubertad, decremento en la secreción de estradiol e irregularidad del ciclo estral (Burden *et al.*, 1978; Lara *et al.*, 1990).

La información parasimpática que llega al ovario es aportada por el nervio vago (Burden *et al.*, 1982, 1983; Burden, 1985; Lawrence *et al.*, 1980), el cual sintetiza diversos péptidos como la somatostatina, sustancia P, gastrina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Dissen y Ojeda, 1999; Ojeda *et al.*, 1983).

Las neuronas que dan origen al nervio vago se localizan en: el núcleo ambiguo (somatomotor); el núcleo cardio-neumo-enterico (visceromotor); el núcleo dorsal del vago (viscerosensitivo) y la parte inferior del núcleo del fascículo solitario (somatosensitivo) (Bouchet y Willeret, 1978). Como se mencionó, mediante el uso de técnicas de rastreo transneuronal se ha descrito la existencia de una vía multisináptica entre los ovarios y el cerebro. El marcaje de neuronas por los ovarios fue detectado en el núcleo del tracto solitario, en el núcleo dorsal del vago, en el grupo celular A5 noradrenérgico, en el núcleo del rafe y en el núcleo paraventricular hipotalámico. Cuando la inyección del virus de la pseudorabia se realizó en el ovario izquierdo, se observó que el patrón de marcaje es diferente al observado para el ovario derecho, abarcando también el núcleo caudal del rafe. Además que el marcaje proveniente del ovario izquierdo en el SNC es mayor que el derecho (Gerendai *et al.*, 2009).

El nervio vago es la vía de conexión entre el útero, el cérvix y el SNC. Los cuerpos celulares de las aferencias vagales relacionadas con el útero se ubican en los ganglios nodosos (Collings *et al.*, 1999). Por otra parte el ovario forma parte del recorrido neural del nervio vago (Gerendai *et al.*, 2000).

La distribución de las neuronas sensoriales que inervan el peritoneo parietal recibe nervios sensoriales de la raíz del ganglio dorsal mientras que el peritoneo visceral las recibe de la médula espinal y del nervio vago, por lo que la inervación del peritoneo juega un papel esencial en la comunicación neural entre el peritoneo y el SNC (Tanaka *et al.*, 2002).

En la rata el estudio de la participación neural en las diferentes funciones del ovario, así como de la respuesta asimétrica de éstos a estímulos neuroendocrinos, requiere de llevar a cabo un procedimiento quirúrgico invasivo de la cavidad abdominal. Con la finalidad de analizar los efectos del estrés sobre el fenómeno en estudio se llevan a cabo las denominadas laparotomías que pueden ser ventrales, dorsales o dorso-laterales. Durante este tipo de cirugías, se lava el área con jabón quirúrgico, se afeita el pelo y se procede a realizar un corte transversal de la piel y músculo con el fin de acceder al ovario. Esta serie de procedimientos generan infinidad de estímulos sobre la piel que repercuten en las funciones del ovario.

Una hora después de realizar una laparotomía ventral o dorso-lateral se altera la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol, lo que depende del día del ciclo en el que se realiza. La laparotomía ventral resulta en mayores cambios en la concentración de estas hormonas que el tratamiento dorso-lateral unilateral o bilateral.

Con base a sus resultados los autores sugieren que diferentes vías nerviosas que surgen de la pared abdominal participan y desempeñan diferentes funciones en la regulación de la liberación de hormonas esteroides de origen ovárico (Flores *et al.* 2008). La laparotomía ventral simulada, incrementa la concentración sérica de progesterona y testosterona en todos los días del ciclo estral. Mientras que la laparotomía dorso-lateral no eleva la concentración de estas hormonas cuando se realiza en el día del estro (Flores *et al.*, 2008, 2011).

El flujo sanguíneo que llega al ovario es otra de las funciones que se altera al estimular la zona ventral abdominal es el flujo sanguíneo que llega al ovario (FBO) (Stern *et al.* 2006). El análisis de la participación de los reflejos espinales y supra-espinales en el flujo sanguíneo del ovario muestran que durante la fase de estro o diestro-2 la electro-estimulación abdominal resulta en un aumento del flujo sanguíneo del ovario. En los miembros posteriores la estimulación disminuye el flujo sanguíneo. Como es de esperarse la estimulación a frecuencias menores no resultó en respuesta alguna. Los efectos sobre el flujo sanguíneo del ovario por la electro-estimulación abdominal es más pronunciada en la fase de estro que en el diestro-2 (Stern *et al.* 2006).

Cuando la electro estimulación se aplica tanto en la zona abdominal como en las extremidades posteriores la regulación del flujo sanguíneo del ovario se anuló después de seccionar los nervios simpáticos y la médula espinal. Con base en estos resultados los autores sugieren que los efectos en el flujo sanguíneo del ovario a la electro-estimulación abdominal y de las extremidades posteriores es una respuesta refleja que ocurre a través de los nervios simpáticos del ovario, la cual es controlada por vías supra-espinales (Stern *et al.*, 2003, 2004, 2006).

Los nervios simpáticos del ovario y no los nervios vagales, son responsables de regular el flujo de sangre en el ovario. El aumento del flujo sanguíneo del ovario se reduce pasivamente en respuesta al aumento o disminución de la presión sanguínea arterial sistémica que resulta de la estimulación mecánica aferente de un miembro posterior. Estas respuestas pasivas son moduladas por la actividad refleja de los nervios ováricos vasoconstrictores simpáticos que regulan los cambios pasivos dependientes de la presión sanguínea del ovario (Uchida *et al.*, 2003).

La activación supra-espinal simpática se produce cuando el estímulo surge de los segmentos cervical o lumbar, mientras que la respuesta espinal, se produce cuando el estímulo llega desde los segmentos espinales (Sato *et al.*, 1997).

La inervación simpática del ovario de la rata procede de la médula espinal en los segmentos T9-T10 (Gerendai *et al.*, 1998). Por lo tanto, las agujas insertadas en el abdomen pueden modular la respuesta simpática a través de estos segmentarios. La electro-estimulación de los músculos inferiores produce impulsos aferentes al segmento

lumbar (Takahashi y Nakajima, 1996), y por lo tanto, podría modular el flujo sanguíneo a través de reflejos supra-espinales.

En esta intercomunicación del peritoneo con el ovario participa el sistema muscarínico, en ratas con cirugía simulada dorso-lateral bilateral, la inyección de sulfato de atropina incrementa la concentración de testosterona. La cirugía simulada unilateral izquierda dorso-lateral en proestro también aumenta la concentración de testosterona, mientras que la cirugía simulada derecha no lo hace. En comparación con los animales sometidos a la perforación peritoneal unilateral izquierda, la concentración sérica de testosterona disminuye significativamente cuando la ovariectomía izquierda (ovario derecho *in-situ*) se realiza en proestro (Cruz *et al.*, 2006).

Conclusión

El tipo y la inervación del peritoneo y de la piel son semejantes a la de los ovarios. Así que cualquier estímulo sensorial o físico en la piel o el peritoneo pueden resultar en diferencias en la fisiología del ovario y del útero. Esto se ha observado en el cambio de la irrigación sanguínea del ovario y la concentración de hormonas esteroideas. Por lo que es importante decidir con base a esta información el tipo de abordaje quirúrgico que se diseñará al realizar una laparotomía.

Bibliografía

Akasu T, Nishimura T. (1995). Synaptic transmission and function of parasympathetic ganglia. *Progress in Neurobiology*. 45: 459-522

Barco A, Flores A, Chavira R, Matsumura P, Domínguez R, Cruz ME. (2003). Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the in situ ovary. *Endocrine* 21: 209-215.

Bentley GA, Newton SH, Starr J. (1981). Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. *British Journal of Pharmacology*. 73: 325–332.

Bergman RA, Afifi AK, Heidger PM. (1998). Sistema Reproductor Femenino. *Histología*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp. 307-320

Bouchet A, Willeret J. (1978). Anatomía descriptiva, topográfica y funcional. SNC. Ed. Médica Panamericana.

Burden HW. (1978). Ovarian innervation in vertebrate ovary; comparative Biology and Evolution. Plenum, New York Pp. 615-638.

Burden HW, Capps ML, Smith CP, Harns P, Lawrence IE. (1982). Extrinsic sensory innervation of the rat ovary. *Federation Proceedings*. 41:1492.

Burden HW, Leonard M, Smith CP, Lawrence E Jr. (1983). The sensory innervation of the ovary: A horseradish peroxidase study in the rat. *The Anatomical Record*. 207: 623–627.

Burden HW. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: *Catecholamines as hormone regulators* (Ben-onathan N, Bahr JM, Weiner RI, editors). New York: Publications from Raven Press. Pp 261-278.

Collins JJ, Lin CE, Berthou HR, Papka. (1999). Vagal afferents from the uterus and cervix provide direct connentions to the brainstem. *Cell Tissue Research* 295; 43-54.

Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez JO. (2006). The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reproduction Biology Endocrinology* 4: 43.

Deplewski D, Rosenfield R. (2000). Role of hormones in pilosebaceous unit development. *Endocrine Reviews* 21: 363-392.

Dissen GA, Ojeda S. (1999). Ovarian inervation. In: *Enciclopedia of reproduction*. Vol 3:583-589.

Domínguez R, Morales L, Cruz ME. (2003). Ovarian asymmetry. *Annual Review Biology Science* 5: 95-104.

Domínguez R, Cruz-Morales SE. (2011). The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinology and Metabolic Syndrome* S4:001. doi:10.4172/2161-1017.S4-001.

Flores A, Gallegos AI, Velasco J, Mendoza FD, Montiel C, Everardo P, Cruz ME, Domínguez R. (2008). The acute effects of bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, testosterone and estradiol serum levels depend on the surgical approach and the day of the estrous cycle when they are performed. *Reproduction Biology Endocrinology* 6: 48.

Flores A, Velasco J, Gallegos AI, Mendoza FD, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. (2011). Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle. *Reproduction Biology Endocrinology* 9: 34.

Fumes JB, Costa M. (1987). "The Enteric Nervous System." Churchill Livingstone, Edinburgh UK.

Gabella, G. (1995). Autonomic nervous system. In "The Rat Nervous System" (G. Paxinos,Ed.). Academic Press, New York. Pp. 81-103.

Gebhart GF. (2000). Visceral pain – peripheral sensitization. *Gut* 47(Suppl 4): 54–55.

Gerendai I, Hálás B. (1997). Neuroendocrine Asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 18: 354-391.

- Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B. (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology* 68: 244–256.
- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Medveczky, Halász B. (2000). CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal Autonomic Nervous System* 80: 40-45.
- Gerendai I, Banczerowski P, Halász B. (2005). Functional significance of the innervations of the gonads. *Endocrine* 28: 309-318.
- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Medveczky, Halász B. (2009). Recent findings on the organization of central nervous system structures involved in the innervation of endocrine glands and other organs; observations obtained by the transneuronal viral double-labeling technique. *Endocrinology*. 36:179–188.
- Glise H, Abrahamsson H. (1980 a). Spino-vagal nonadrenergic inhibition of gastric motility elicited by abdominal nociceptive stimulation in the cat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Vol. 15, No. 6: 665-672.
- Glise H, Abrahamsson H. (1980 b). Reflex adrenergic inhibition of gastric motility by nociceptive intestinal stimulation and peritoneal irritation in the cat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Vol. 15, No. 6: 673-681
- Glise H, Abrahamsson H. (1980 c) Reflex vagal inhibition of gastric motility by intestinal nociceptive stimulation in the cat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Vol. 15 No.6:769–774
- Gudermuth DL, Newton P, Daels P, Concannon. (1997). Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and fecal concentrations of progesterone. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 177-184.
- Heape W. (1905-1934). *Ovulation and Degeneration of Ova in the Rabbit*. Heape, W. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*.
- Iggo A. (1986). Afferent C-fibers and visceral sensation. *Progress in Brain Research*. Chapter 3. pp 29-36.
- Janig W, McLachlan EM. (1987). Organization of the lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiology Review*. 67, 1332-1404.
- Janig W, McLachlan EM. (1992a). Characteristics of function-specific pathways in the sympathetic nervous system. *TINS* 15,475-481.
- Janig, W, McLachlan EM. (1992b). Specialized functional pathways are the building blocks of the autonomic nervous system. *Journal Autonomic Nervous System* 41:3-14.

Keast JR. (1999). Unusual Autonomic Ganglia: Connections, Chemistry, and Plasticity of Pelvic Ganglia. *International Review of Cytology* Volume 193. pp 1–69

Lara HE, Mcdonalds JK, Ahmed CE, Ojeda SR. (1990). Guanethidine mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127: 2199-2209.

Lawrence IE, Burden HW. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record* Volume 196, Issue 1, pages 51–59.

Lawler DS, Johnston R, Hegstad D, Keltner S, Owens. (1993). Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. *Journal of reproduction and fertility. Supplement.* 47: 57-61.

Lein D, Concannon P. (1983). Infertility and fertility treatments and management in the queen and tomcat. In: *Current Therapy VIII*. Kirk, R. (ed). W. B. Saunders Co. Philadelphia: 936-987.

Miolan JP, Niel JP. (1996). The mammalian sympathetic prevertebral ganglia: Integrative properties and role in the nervous control of digestive tract motility. *Journal of the Autonomic Nervous System.* 58:125-138.

Morán C, Franco A, Morán JL, Handal A, Morales L. (2005). Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac-superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat. *Endocrine* 26: 147-152.

Ojeda SR, Smith WS, Aguado LL, Advis JP, Andersen JM. (1983). Abdominal vagotomy delays onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat. *Neuroendocrinology.* 36: 261-267.

Peters LC, Kristal MB, Komisaruk BR. (1987). Sensory innervations of the external and internal genitalia of the female rat. *Brain Research.* 408:199-204.

Robbins A, Sato Y, Berkley KJ. (1989) Hormonal variation in sensitivity of afferent fibers supplying reproductive organs in the female rat, *Society of Neuroscience Abstr.*, 15-104.

Robbins A, Berkley KJ, y Sato, Y. (1992). Estrous cycle variation of afferent fibers supplying reproductive organs in the female rat. *Brain Research,* 596: 353-356.

Robbins A, Sato Y. (1991). Cardiovascular changes in response to uterine stimulation. *Journal of the Autonomic Nervous System.* 33:55-64.

Robinson B, Sawyer C. (1987). Hypothalamic control of ovulation and behavioral estrus in the cat. *Brain Research.* 418: 41-51.

Sato A, Sato Y, Shimada F, Torigata Y. (1975). Changes in gastric motility produced by nociceptive stimulation of the skin in rats, *Brain Research,* 87:151-159.

Sato A, Sato Y, Schmidt RF. (1997). The impact of somatosensory input on autonomic functions. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 130: 1-328.

Slominski A, Wortsman J. (2000). Neuroendocrinology of the skin. *Endocrine Reviews*. 21 (5): 457-487.

Stener VE, Kobayashi R, Kurosawa M. (2003). Ovarian blood flow responses to electro-acupuncture stimulation at different frequencies and intensities in anaesthetized rats. *Autonomic Neuroscience* 108: 50–56.

Stener VE, Kobayashi R, Watanabe O, Lundeberg T, Kurosawa M. (2004). Effect of electro-acupuncture stimulation of different frequencies and intensities on ovarian blood flow in anaesthetized rats with steroid-induced polycystic ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2: 16.

Stener VE, Shigeko F, Mieko K. (2006). Ovarian blood flow responses to electro acupuncture stimulation depend on estrous cycle and on site and frequency of stimulation in anesthetized rats. *Journal of Applied Physiology* 101: 84–91.

Szurszewski JH. (1981). Physiology of mammalian prevertebral ganglia. *Annual Review of Physiology*. 43: 53-68.

Takahashi Y, Nakajima Y. (1996). Dermatomes in the rat limbs as determined by antidromic stimulation of sensory C-fibers in spinal nerves. *Pain* 67: 197–202.

Tanaka K, Matsugami T, Chiba T. (2002). The origin of sensory innervation of the peritoneum in the rat. *Anatomy and Embryology* 205: 307-313.

Tóth IE, Wiesel O, Boldogkói Z, Bálint K, Tapaszti Z, Gerendai I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microscopy Research and Technique*, 70:710-718.

Tóth IE, Banczerowski P, Boldogkoi Z, Tóth JS, Szabó A, Halász B, Gerendai I. (2008). Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary: A double viral tracing study. *Brain Research Bull* 77: 306-311.

Uchida S, Hotta H, Kagitani F, Aikawa Y. (2003). Ovarian blood flow is reflexively regulated by mechanical afferent stimulation of hindlimb in non-pregnant anesthetized rats. *Autonomic Neuroscience* 106: 91–97.

Verstegen, J. (1998). Physiology and Endocrinology of Reproduction in Female Cats. In: *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*. British Small Animal Veterinary Association. United Kingdom: 11-16.

Verstegen J. (2002). Reproducción felina. En: *Tratado de medicina interna veterinaria*. Ettinger SJ, Feldman E. C. (Ed.). 5ª. Ed. Buenos Aires: Inter-Médicap.1764-1780.

Williams PL, Bannister LH, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MW J. (eds) (1995) *Gray's Anatomy* Churchill Livingstone, London, pp 1746

Regulación de la síntesis y secreción de la GnRH y sus efectos sobre la ovulación.

Introducción

Las funciones del ovario están reguladas por señales neuroendocrinas que provienen del sistema nervioso central incluyendo áreas hipotalámicas y extrahipotalámicas, de la hipófisis y del propio ovario. Estas señales presentan en forma secuencial y sincrónica (fenómeno en “cascada”), que dan como resultado la ovulación (Cruz *et al.*, 1992).

La producción de gametos fértiles está regulado por el eje hipotálamo- hipófisis- gónada (H-H-G). En el hipotálamo se localiza un grupo de neuronas especializadas, que integran una variedad de estímulos externos y propios del organismo y como respuesta estas neuronas secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), por lo que se denominan neuronas GnRHérgicas. A su vez, la GnRH la adenohipófisis para que secrete la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH), las cuales actúan sobre el ovario estimulando el crecimiento y maduración de los folículos ováricos y contribuyen a la maduración de los gametos, así como a la secreción de las hormonas sexuales. A su vez, la hormonas sexuales regulan la actividad del eje reproductor y estimulan el comportamiento reproductivo (Cruz *et al.*, 2001). En todo el hipotálamo hay células nerviosas peptidérgicas llamadas neuronas GnRHérgicas las cuales son células muy especializadas que secretan a la GnRH (Jennes y Stumpf, 1980; Gore, 2002).

Bioquímica y evolución de la GnRH

La GnRH es un decapeptido cuya secuencia lineal de aminoácidos es la siguiente:



La GnRH se sintetiza como parte de una molécula precursora de mayor peso molecular, la que después de acciones enzimáticas, se elimina un péptido (señal) en el grupo N-terminal denominado péptido asociado a la GnRH (GAP). Todas las formas del decapeptido presentan un pGlu en el grupo N-terminal y una Gly-amida en el grupo C-

terminal (Kronenberg *et al.*, 2009). En los mamíferos se han identificado dos genes que codifican para la síntesis de la GnRH (Sherwood *et al.*, 1993; Urbanski *et al.*, 1999). El primer gen codifica una proteína precursora de 92 aminoácidos, conocida como GnRH-I; ésta es la que se encuentra en las neuronas hipotalámicas (Urbanski *et al.*, 1999). El segundo gen de la GnRH, codifica para la GnRH-II, este decapeptido difiere del primero en tres aminoácidos (el número 5, 7 y 8): pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr--Pro-Gly-NH₂ (Pawson *et al.*, 2003). Esta última forma de GnRH se encuentra en el mesencéfalo, y actúa más como neurotransmisor que como factor de liberación hipotalámico (Pawson *et al.*, 2003).

Estudios filogenéticos indican que la GnRH es una molécula muy antigua y que durante la evolución, a partir de un gen ancestral común, se derivaron distintas formas moleculares. Se han descrito 15 formas moleculares de la GnRH (Montaner *et al.*, 2001). Tanto la GnRH-I como la GnRH-II se encuentran en especies filogenéticamente diferentes, desde los peces hasta los mamíferos, lo que sugiere que estas formas múltiples de la GnRH se separaron desde las primitivas fases de la evolución de los vertebrados (Fernald y White, 1999).

El gen que codifica la GnRH-I ha sido aislado originalmente en mamíferos y presente en los humanos. La forma de GnRH-II fue aislada en primera instancia del cerebro de gallina y junto con la GnRH-I regulan la liberación de las gonadotropinas en las aves. Al parecer, la GnRH-II es la isoforma más antigua identificada hasta hoy y la más común entre los vertebrados (Montaner *et al.*, 2001). La información obtenida de cDNAs clonados del hipotálamo y de la placenta indica cuatro exones. El primer exón consiste de la región 5'- que no se traduce que difiere de los ADN codificados en la placenta y el hipotálamo. El segundo exón codifica para el péptido señal, la secuencia completa de GnRH madura (10 aa) y los primeros 11 residuos de aminoácidos de GAP. El tercer exón codifica para los residuos 12-43 de GAP. El cuarto exón codifica para los 13 residuos de aminoácidos terminales del GAP y la porción restante del ARNm corresponde a la región 3' que no se traduce (Kronenberg *et al.*, 2009).

GnRH biosíntesis

Genes de la GnRH

En el ser humano la secuencia codificante de la GnRH se encuentra en el cromosoma 8 y en el ratón en cromosoma 14 (Williamson, *et al.*, 1991). El gen se compone de cuatro exones y tres intrones cortos largos que abarcan aproximadamente 4,5 kb. El decapeptido de la GnRH se deriva en última instancia desde el exón 2, mientras que GAP se transcribe a partir de los exones 2, 3, y 4 (Adelman, *et al.*, 1986; Seeburg y Adelman, 1984).

En términos de regulación transcriptional, la vida media relativamente corta de la GnRH primaria (~18 minutos) y madura (~10 minutos) (Yeo *et al.*, 1996, Maurer y Wray, 1997) sugieren que existe una alta transcripción basal de genes para mantener el elevado número de copias de ARNm de la GnRH en las neuronas GnRHérgicas (Maurer y Wray, 1999). Existe evidencia de que la transcripción del gen de la GnRH no se produce a una velocidad constante, pero fluctúa en aproximadamente 2 horas en las células GT1 (línea celular de neuronas hipotalámicas de ratón) (Nunez, *et al.*, 1998).

Tal vez el mejor ejemplo caracterizado de la regulación de la transcripción de genes de la GnRH *in vivo* es el que está asociado con la retroalimentación positiva de los estrógenos en un modelo en rata, en donde se ha demostrado que la transcripción de genes de la GnRH aumenta en un 40% de 2 a 4 horas antes de la aparición del pico de este péptido (Gore y Roberts, 1995; Petersen *et al.*, 1996).

Si este aumento se requiere para la generación de un nuevo péptido que será liberado unas horas más tarde o si puede utilizarse para reponer las reservas del próximo pico de la GnRH que habrá de liberarse 4 días después, permanece desconocido. Las alteraciones fisiológicas en la transcripción de la GnRH son improbables, sin embargo, en la rata están restringidas únicamente a la retroalimentación positiva.

El ARNm de la GnRH

La transcripción del gen de la GnRH produce un transcrito primario poliadenilado de ~ 4200 bases que se procesa por corte y empalme para un ARN maduro de 560 bases (Adelman *et al.*, 1986). Se estima que una simple neurona GnRHérgica contiene > 1000 ARNms (Maurer y Wray, 1999).

Una característica inusual de la neurona GnRHérgica es que de 30% a 40% de todas las transcripciones de la GnRH se realizan en el núcleo en cualquier momento (Yeo, *et al.*, 1996; Jakubowski y Roberts, 1994) y se ha sugerido que esto actúa como un gran pool de ARNm disponible para la translocación en el citoplasma cuando se requiera (Gore y Roberts, 1997).

El procesamiento de la transcripción primaria parece ser rápida, con una vida media de 18 minutos (Yeo, *et al.*, 1996).

Aunque estudios iniciales en el ratón no sugirieron ningún orden específico del intrón que empalma para la GnRH (Yeo, *et al.*, 1996), otros estudios en la rata y el ratón indican que el intrón B y luego el intrón C son suprimidos rápidamente de la transcripción primaria, con el intrón A siendo empalmado hacia fuera más despacio (Jakubowski y Roberts, 1994; Seong *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que la eliminación del intrón A es un evento regulador clave que permite en última instancia, la traducción eficaz del ARNm de la GnRH madura (Han *et al.*, 2002). Considerando que los intrones B y C contienen sitios de empalme apropiados, el intrón A exhibe un sitio de empalme 3' subóptimo (Seong *et al.*, 1999). El intrón A solo puede ser empalmado después de la formación de un complejo potenciador formado por la proteína GAP de unión al ARN, la Tra2 α y serina/arginina. Este complejo debe interactuar con el potenciador exónico de empalme ubicado en los exones 3 y 4 para lograr el corte y empalme del intrón A (Seong *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2001; Seong *et al.*, 2002). Por lo tanto, se postula que los intrones B y C se retiran de la manera normal, trayendo así a los exones 3 y 4 físicamente más cerca del intrón A, para permitir el reclutamiento del complejo potenciador de empalme, que facilita el sitio de unión 3' en el intrón A (Han *et al.*, 2002).

Las transcripciones se encuentran junto al ARNm maduro en el cerebro (Jakubowski y Roberts, 1994) y también proporciona una explicación para la presencia de bajos niveles de un ARN de la GnRH ante la falta del exón 2 (Seong *et al.*, 1999; Zhen *et al.*, 1997). En este caso es probable que el splicing ocurra entre el sitio de empalme 5' del intrón A y el sitio 3' del intrón B escindiendo de este modo al exón 2 en su totalidad (Han *et al.*, 2002). La importancia funcional del splicing del intrón A fue revelada al demostrar que la

traducción del intrón A que contiene transcripciones es muy pobre en comparación con el ARN maduro (Son *et al.*, 2003). Este reporte en relación con el intrón A proporciona una buena explicación del fracaso del ratón hpg para producir GnRH. El ratón HPG es estéril como resultado de una delección espontánea de ~ 30 kb en el cromosoma 14 que incluye los exones 3 y 4 del gen de GnRH (Mason *et al.*, 1986). A pesar de la presencia de ARN transcrito a partir del exón 2, no estaba claro por qué los ratones hpg no producían el péptido. Ahora parece probable que la ausencia de los exones 3 y 4 en estos ratones da como resultado ARN truncados incapaces de reclutar el complejo potenciador de corte y empalme necesario para empalmar al intrón A y por lo tanto resulta en la presencia de un intrón A que contiene ARN que no se puede traducir de manera eficiente (Seong *et al.*, 2001).

Juntos, estos estudios indican que el procesamiento de pre-ARN y la escisión del intrón A, en particular, es crítico para la biosíntesis de la GnRH. El mecanismo subyacente a la degradación del ARNm citoplásmico de la GnRH no ha sido establecido, sin embargo el decaimiento de la transcripción de la vida media de las neuronas en cultivos primarios presenta una fase de 5 a 13 minutos, seguida de un detrimento más lento que dura alrededor de 300 horas (Maurer y Wray, 1999). Se piensa que una de las funciones del acortamiento de la cola de poli(A+) en la decadencia de la transcripción y la región no traducida 3' del ARNm maduro, representan dos motivos altamente conservados que pueden unirse a factores que regulan la degradación (Gore y Roberts, 1997; Maurer y Wray, 1997). Se ha demostrado que el contenido del ARNm de la GnRH puede cambiar ante la presencia del transcrito primario inalterado durante la pubertad (Gore *et al.*, 1999), y en respuesta a los neurotransmisores como la N-metil-D-aspartato (NMDA) (Gore y Roberts, 1994), la regulación de la degradación o la estabilidad del ARNm de la GnRH parece ser una forma importante de regulación de biosíntesis *in vivo*. Sin embargo, vale la pena señalar las considerables diferencias entre especies y de modelos que existen en este sentido.

Considerando que la activación del receptor de NMDA utiliza mecanismos postranscripcionales para inducir un rápido aumento en los niveles de ARNm de la GnRH *in vivo* en ratas macho (Gore y Roberts, 1994; Petersen *et al.*, 1991), En contraste, en

las células GT1, de NMDA utiliza los mecanismos de transcripción, ya sea a estimular (Jung *et al.*, 1998) o inhibir (Belsham *et al.*, 1996) el contenido de ARNm de la GnRH.

Traducción de la GnRH

La traducción del transcrito maduro de la GnRH resulta en la producción de una preprohormona que consiste en 92 aminoácidos. Los primeros 23 aminoácidos N-terminales comprenden una secuencia de señal con el resto que representa la prohormona de la GnRH en el que se encuentra en el extremo N-terminal y está separada de GAP por un sitio de escisión de 3 aminoácidos. Debido a que la activación de la proteína cinasa C resulta en una disminución significativa en el número de ribosomas asociados con el ARNm de la GnRH (Gore *et al.*, 1995), es posible que la traducción de la prepro-de GnRH sea autoregulada. Por lo menos cuatro pasos enzimáticos diferentes están involucrados en el procesamiento de la prohormona (Wetsel y Srinivasan, 2002). El paso inicial involucra el clivaje de la preprohormona para sintetizar a la GnRH intermedia y la maduración de GAP, esto se logra mediante una o más endopeptidasas y prohormonas convertasa 1/3 y 2 que están implicadas en este proceso. La GnRH intermedia se somete entonces a la división de sus residuos básicos C-terminal mediante carboxipeptidasa E (Wetsel y Srinivasan, 2002; Wetzel *et al.*, 1998).

La importancia de la carboxipeptidasa E en el procesamiento de la Pro-GnRH *in vivo* se demostró en el ratón infértil *Cpe^{fat}*, donde se encontró que una mutación puntual de la carboxipeptidasa E inactiva resultó en un aumento del C-terminal de la GnRH no procesado (Rangaraju y Harris, 1993). Los pasos finales en la generación del decapeptido biológicamente activo requieren la conversión de la glutamina N-terminal (Gln¹-GnRH) a piroglutamato (pGlu¹-GnRH) por glutaminil ciclasa y la amidación de la glicina C-terminal por α -aminación de la monooxigenasa peptidilglicina (Wetsel *et al.*, 1995). Estudios inmunocitoquímicos sugieren que el procesamiento de la prohormona de la GnRH se produce dentro de las vesículas durante su transporte por el axón y mientras residente dentro de los terminales nerviosos (Rubin *et al.*, 1987; King y Anthony, 1983; Rangaraju *et al.*, 1991). Una modificación ulterior postraduccional de la GnRH es la de la hidroxilación del residuo de prolina para crear hidroxiprolina (Hyp⁹) GnRH. Se ha demostrado que existe en el hipotálamo de ratas adultas

aproximadamente 10% de péptido GnRH-like como de (Hp⁹) GnRH (Rochdi, *et al.*, 2000). Aunque no es tan potente como la GnRH normal, el resto de hidroxiprolina es capaz de estimular la liberación de LH y FSH (Gautron *et al.*, 1992). Se desconoce la importancia fisiológica y el papel de (Hyp⁹) GnRH. Puede ser de importancia que representa hacia arriba de 40% de todas las moléculas de GnRH en la rata neonatal (Rochdi, *et al.*, 2000) y se ha descrito que se localizan preferentemente en los terminales nerviosos de la GnRH, además de que se ha encontrado fuera del hipotálamo (Gautron *et al.*, 1993).

Distribución anatómica de las neuronas GnRHÉRGICAS

Las neuronas que producen la GnRH, tienen su origen embrionario fuera del sistema nervioso central, derivan de la placoda olfatoria durante la gestación temprana; dichas neuronas migran hacia el hipotálamo junto con o como parte del nervio terminal a través de la lámina cribiforme (Prieto y Velázquez, 2002).

Las neuronas GnRHérgicas son células pequeñas, de forma bipolar y fusiforme, con finos axones que se proyectan predominantemente a la eminencia media y al tallo infundibular (Phoenix y Chambers, 1990). Las principales vías de neuronas que sintetizan la GnRH en el sistema nervioso son: la septo-preóptico infundibular, la de la región pericomisural, las vías procedente de los órganos circunventriculares y las que proyectan a zonas extra hipotalámicas (Gore, 2002).

En todas las especies, la vía más importante de fibras GnRHérgicas es la septopreóptica–infundibular, la cual es una vía común que participa en la regulación de la función secretora de la hipófisis. Esta vía se conforma de las neuronas GnRH que se localizan en zonas rostrales a la Banda Diagonal de Broca. Este paquete de axones GnRHérgicos se bifurca cerca del área preóptica (POA), donde principia el tercer ventrículo. Ambos paquetes viajan en la línea media: uno dorsal y el otro ventral a lo largo de la superficie del quiasma óptico (Jennes *et al.*, 1985; Silverman, 1994). Los axones de las neuronas GnRH de las zonas más caudales y laterales a POA y al hipotálamo anterior viajan cerca del haz medial del cerebro anterior, cerca de la eminencia media, este haz se desvía hacia la zona medial del hipotálamo. Estas fibras

periventriculares contribuyen a la innervación de la eminencia medial del hipotálamo y quizá a la de estructuras más caudales (Prieto y Velázquez, 2002).

En la rata, las neuronas GnRHérgicas hipotálamicas se concentran en el área preóptica medial, la banda diagonal de Broca, las áreas septales y el hipotálamo anterior (Phoenix y Chambers, 1990).

Los Receptores a la GnRH (RGnRH) Efectos de la GnRH en la hipófisis

Los RGnRH se encuentran exclusivamente en las membranas citoplasmáticas. El principal sitio blanco de esta hormona es el gonadotropo de la adenohipófisis. Sin embargo, receptores para el decapeptido se han observado en las gónadas de la rata y del humano, en la placenta, en el tejido adrenal, en algunos tejidos cancerígenos de mama y en el sistema nervioso central (SNC) (Kronenberg *et al.*, 2009). El RGnRH es un receptor de siete dominios transmembranales acoplado a la proteína G (Cheng y Lung, 2005). Existen considerables evidencias *in vivo* e *in vitro* de que el número de receptores de GnRH presentes en la superficie celular de los gonadotropos está regulado por variaciones de la frecuencia de los pulsos GnRH (Katt *et al.*, 1985). La GnRH al unirse a su receptor de membrana en los gonadotropos, estimula la síntesis y secreción tanto de la FSH como de la LH. Las concentraciones de GnRH están reguladas por neurotransmisores (acetilcolina, serotonina, noradrenalina, dopamina), aminoácidos (ácido gama amino butírico [GABA], ácido glutámico, aspartato, glicina), opióides, péptidos y hormonas esteroides (el estradiol puede provocar tanto supresión como estimulación) las gonadotropinas (que provocan supresión) y el calcio y la proteína cinasa C (que provocan la estimulación) (Norris, 1996; Cheng y Lung, 2005).

Regulación de la actividad de la neurona GnRHérgica por los sistemas colinérgico y monoaminérgico

Sistema Colinérgico

Las neuronas colinérgicas se organizan principalmente como neuronas de proyección. En el cerebro de la rata se han descrito dos vías colinérgicas principales. La vía tegmental dorsal y la ventral. La primera, formada por fibras que contienen tanto colinesterasa inespecífica (ChE) como acetilcolinoesterasa (AChE), se origina en el núcleo cuneiforme

de la formación reticulada mesencefálica y se proyecta hacia el núcleo cuneiforme, el área pretectal, los cuerpos geniculados, el tálamo y el sistema límbico. Las fibras de la vía tegmental ventral, que sólo contienen AChE, se originan en la sustancia negra y el área tegmental ventral en el cerebro medio, atraviesan el hipotálamo y el subtálamo hasta llegar al tallo cerebral. Desde aquí, muchas neuronas que contienen AChE, se proyectan a todas las regiones de la corteza cerebral y del bulbo olfatorio (Müller *et al.*, 1977)

En el núcleo submamilar del hipotálamo se encuentra un núcleo denso de neuronas colinérgicas. Dispersas en las áreas posterior y lateral del hipotálamo existen otras neuronas acetilcolinesterasa-positivas. El área preóptica lateral es rica en células acetilcolinesterasa-positivas y aquellas que se ubican en la porción dorsal del área preóptica envían fibras hacia la amígdala, vía la estría terminal (Müller *et al.*, 1977).

El hecho de que después del aislamiento del hipotálamo medio basal no existan cambios significativos en la actividad de la colín-acetiltransferasa (CAT) abre la posibilidad de la existencia de una vía colinérgica tuberoinfundibular semejante a la dopaminérgica (Shieh y Pan, 1995).

En el área preóptica existen diferencias sexuales en el número de sitios de unión de agonistas muscarínicos, siendo mayor en los machos que en las hembras. En las ratas hembras cíclicas se observa que en el área preóptica la población de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos es mucho mayor en el día del proestro que en los demás días del ciclo estral (66 vs. 38%). La lesión inducida por la inyección de 6-hidroxidopamina intracisternal produce un decremento de 1/6 del número total de receptores en el hipotálamo, por lo que es posible pensar en la existencia de receptores muscarínicos presinápticos ubicados en las terminales catecolaminérgicas del hipotálamo (Bahr *et al.*, 1974).

Estudios *in vivo* muestran que en el área preóptica de la rata hembra el número de receptores muscarínicos varía durante el ciclo estral. En el día del proestro se observa un aumento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos (60%), comparado a lo observado en diestro-2 o en la tarde del proestro (35%). Cuando porciones homogenadas de POA se exponen a la presencia de 17β -

estradiol resulta en la conversión de los sitios de unión de alta afinidad a los agonistas muscarínicos a sitios de unión de baja afinidad. Este efecto de la hormona se observa únicamente en muestras de POA obtenidas en la mañana del proestro y puede ser bloqueado por clomifeno (antiestrógeno) o prevenido por la ocupación previa de los receptores muscarínicos por sus propios ligandos antes de la adición de la hormona. Los cambios significativos en los receptores muscarínicos de POA coinciden con el llamado “periodo crítico”, caracterizado por altas concentraciones de estrógenos y gran número de receptores a estrógenos en POA (Egozy y Kloog, 1985).

En el hipotálamo y la adenohipófisis de la rata, las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos, evaluados por ensayos de competencia con H³-N-Metil-4-piperidil bencilato (antagonista muscarínico tritiado de alta afinidad) muestran que únicamente las hormonas sexuales (17β-estradiol y progesterona) afectan las propiedades de los sitios de unión a los agonistas muscarínicos. Ambas hormonas provocan decremento en la proporción de sitios de unión de alta afinidad y en la constante de disociación. Esto permite sugerir una vinculación entre el sistema colinérgico muscarínico y los mecanismos por los cuales los esteroides ováricos inducen la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis (Sokolovsky *et al.*, 1981).

Evidencias experimentales muestran que el sistema colinérgico del POA-AHA presenta cambios cíclicos, durante el ciclo estral, en el contenido de acetilcolina (Cruz *et al.*, 1998), la actividad de las enzimas de síntesis (colín-acetiltransferasa) (Sánchez *et al.*, 1994) y degradación (acetilcolinoesterasa) (Cruz *et al.*, 1990) y el número y afinidad de los receptores muscarínicos en POA-AHA (Cruz *et al.*, 1998).

La sensibilidad del sistema colinérgico al sulfato de atropina varía durante el ciclo estral de la rata y la dosis necesaria para bloquear la ovulación en el 100 por ciento de los casos depende del día del ciclo y la hora en que se administre, siendo el diestro 1 el día más sensible, ya que ello requiere la dosis menor (Domínguez *et al.*, 1982).

Durante el “periodo crítico” en el día de proestro la concentración de acetilcolina en POA cae y luego se incrementa de modo abrupto (Egozi *et al.*, 1986).

Durante el ciclo estral de la rata, en el área preóptica hipotalámica anterior existe un ritmo colinérgico endógeno. En el día de diestro 1 se presentan las concentraciones máximas de acetilcolina y en diestro 2 las mínimas. El número y la afinidad de receptores muscarínicos también varían durante el ciclo estral. El marcaje con el agonista muscarínico [³H]-N-metil escopolamina muestra que la unión específica (B_{max}) y la constante de disociación (K_d) para dicho fármaco son máximas en el día del estro y disminuyen progresivamente en los demás días del ciclo estral (Eckenstein y Thoenen, 1982). En los resultados obtenidos mediante el marcaje con el antagonista colinérgico muscarínico [3H] bencilato de quinuclidina se observan también cambios cíclicos en el marcaje, con un máximo en proestro y un mínimo en los días de diestro (Olsen *et al.*, 1988). La discrepancia aparente de estos resultados podría explicarse por el hecho de que los fármacos usados en los experimentos posiblemente tengan diferente afinidad a los subgrupos de receptores muscarínicos en POA-AHA y abre la puerta a la especulación sobre la importancia de cada uno de estos subgrupos de receptores en la regulación del proceso reproductor (Cruz *et al.*, 2001).

El número y afinidad de los receptores muscarínicos en el hipotálamo son regulados por las hormonas esteroides ováricas. Experimentos *in vitro* con el área preóptica muestran que existe una relación directa entre la concentración de 17 β -estradiol y la proporción de receptores muscarínicos de alta y baja afinidad. Durante la mañana del proestro se observa un incremento significativo en la proporción de receptores muscarínicos de alta afinidad (60%), comparado con el día de diestro 2 o la tarde del proestro (35%). Es posible que estos cambios en la afinidad de los receptores muscarínicos reflejen variaciones en la actividad colinérgica en POA durante el ciclo estral (Egozi y Kloog, 1985).

En la rata hembra cíclica, la actividad máxima de la enzima acetilcolinesterasa en el hipotálamo se presenta en los días de estro y diestro 1 y la mínima en proestro (Cruz *et al.*, 1990).

En las ratas ovariectomizadas, la administración sistémica de benzoato de estradiol aumenta significativamente el marcaje de los receptores muscarínicos por [³H] bencilato

de quinuclidina en el hipotálamo medio basal y los disminuye en el área preóptica medial de modo dosis dependiente (Dohanich *et al.*, 1982).

En el hipotálamo y la hipófisis, las progestinas y sus metabolitos inhiben el marcaje de los receptores muscarínicos por [³H] bencilato de quinuclidina (Klein y Burden, 1988).

El sistema colinérgico regula la respuesta de las neuronas hipotalámicas a los estrógenos, ya que el tratamiento con betanecol, un agonista colinérgico muscarínico, incrementa en 38% el número de sitios de unión al estradiol en el citosol de neuronas hipotalámicas de ratas hembras ovariectomizadas y el pre- tratamiento con atropina bloquea los efectos del betanecol. En machos castrados, el betanecol no tuvo efectos sobre la concentración de sitios de unión al estradiol (Lehmann y Langer, 1983).

El sistema colinérgico interactúa con otros sistemas de neurotransmisión que participan en la regulación de la secreción de la GnRH. El sistema colinérgico modula la actividad neural de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA). En la rata hembra, las neuronas TIDA presentan cambios circádicos en su actividad, con alta actividad por las mañanas y bajas en las tardes (Cruz *et al.*, 2001).

En ratas ovariectomizadas, con o sin reemplazo estrogénico, la aplicación intra cerebro-ventricular de atropina o mecamilamina no tuvo efecto en la actividad de las neuronas TIDA cuando se realizó antes de las 12:00h, momento en el que la actividad endógena de las neuronas TIDA es alta. Sin embargo, ambas drogas produjeron una estimulación dosis dependiente en la actividad de las neuronas TIDA cuando se utilizaron en la tarde, periodo de actividad endógena baja (Cruz *et al.*, 2001)

En la rata, el “pico” de PRL inducido por estrógenos fue bloqueado por la inyección de atropina o mecamilamina, un antagonista nicotínico, a las 13:00h. Los cambios diarios en la actividad de las neuronas colinérgicas pueden ser responsables de los cambios en la actividad de las neuronas TIDA de la rata hembra, prerequisite para que se produzca el “pico” de PRL (Shieh y Pan, 1995). La administración central de mecamilamina, aumenta la actividad de TIDA si se aplica en la tarde y no tiene efectos si se aplica en la noche o en machos (Shieh y Pan, 1996).

Existen evidencias de la interacción entre los sistemas monoaminérgicos y entre éstos y el sistema colinérgico en la regulación de la liberación de GnRH, así como en procesos fisiológicos (Cruz *et al.*, 2001).

La liberación de GnRH por la eminencia media en ratas cíclicas es estimulada significativamente por antagonistas muscarínicos 11(2) (dietilamino)metil[-1-piperidil]-acetil-5, (AF-DX-116) y metoctramina. Dicha estimulación depende del día del ciclo estral en que se realice el tratamiento. Es posible que los efectos inducidos por la administración de estos fármacos sean mediados por receptores muscarínicos del subtipo m4. El bloqueo de los efectos de los antagonistas muscarínicos sólo fue posible en presencia de prazosin un antagonista α_1 -adrenérgico. Una posible explicación para la estimulación de la liberación de GnRH por un antagonista muscarínico es que los efectos son el resultado de una intercomunicación, entre los receptores muscarínicos y los receptores α_1 -adrenérgicos. Así, los agonistas muscarínicos inhiben la liberación de GnRH inducida por los agonistas α_1 -adrenérgicos y los antagonistas muscarínicos, al cancelar este efecto inhibitorio permite a los agentes α_1 -endógenos (noradrenalina) induzcan la liberación de GnRH (Koren *et al.*, 1992).

En ratas ovariectomizadas, la inyección en el tercer ventrículo de 20 a 100 μ g de sulfato de atropina (2 μ l) redujo significativamente las concentraciones plasmáticas de LH y PRL. La inyección intraventricular de 20 μ g de acetilcolina indujo un incremento significativo de la concentración de LH y redujo la de PRL durante los 5 minutos siguientes a la inyección, mientras que la concentración de FSH se elevó 30 minutos después de la inyección. El bloqueo de los receptores dopaminérgicos con pimozide previene los incrementos en las concentraciones plasmáticas de LH y FSH así como la disminución de PRL inducidos por la inyección intraventricular de acetilcolina. La supresión de la liberación de LH inducida por la atropina fue revertida y ocurrió una elevación en los animales que fueron pre-tratados con el bloqueador de los receptores dopaminérgicos. La inyección de atropina no tuvo efectos sobre las concentraciones de PRL en los animales tratados con pimozide. Estos resultados apoyan la idea de los papeles estimulantes de la acetilcolina sobre la liberación de las gonadotropinas en inhibitorio

sobre la liberación de PRL e indican que el control colinérgico podría ser mediado por las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (Vijayán y McCann, 1980).

El bloqueo de los receptores noradrenérgicos (fenoxibenzamina 20 mg/kg de peso), dopaminérgicos (pimozide 1 mg/kg de peso) o colinérgicos (atropina 700 mg/kg de peso) impide la liberación de gonadotropinas inducida por la inyección de 2 mg de progesterona a animales ovariectomizados tratados con estrógenos. El implante unilateral de dopamina o acetilcolina en el área preóptica media (mPOA) indujo un incremento significativo de las concentraciones plasmáticas de LH, 5 horas después, mientras que la noradrenalina redujo la concentración de LH.

Los implantes de noradrenalina o acetilcolina en la cama del núcleo de la estría terminal o la amígdala medial incrementó la concentración sérica de LH, aunque en el caso de la noradrenalina este incremento no fue estadísticamente significativo. Sólo el implante de noradrenalina en el septo lateral indujo la liberación de LH (Kawakami *et al.*, 1979).

En mPOA, la noradrenalina y la acetilcolina regulan tínicamente el ciclo sueño- vigila y la temperatura corporal. Las inyecciones combinadas de prazosin (antagonista α_1) y carbacol (antagonista colinérgico) y metoxamina (agonista α_1) resultan en la sumatoria de los efectos de cada una de las drogas por separado, por lo que se sugiere una interacción e integración de las aferencias noradrenérgicas y colinérgicas en mPOA para la regulación del ciclo sueño-vigila y la temperatura corporal (Mallick y Joseph, 1998). Además, existen evidencias que los receptores presinápticos α_2 -adrenérgicos de mPOA participan en la regulación sueño-vigila, vía los receptores α_1 -adrenérgicos (postsinápticos) y dado que la inyección de clonidina (agonista α_2) no afecta la temperatura corporal es posible que existan grupos separados de terminales noradrenérgicas que controlen el sueño y la temperatura corporal de modo independiente (Ramesh y Kumar, 1998).

Sistema monoaminérgico

En las células GnRH se integra la información de una red neuronal compleja usada por el cerebro para generar la secreción pulsátil de las gonadotropinas por la hipófisis. Entre los sistemas de neurotransmisión que integran esta red neuronal, los sistemas

monoaminérgicos son unos de los que mayor atención han recibido. Las monoaminas derivan de aminoácidos y también se les conoce como amina biogénicas. Desde el punto de vista de su estructura química, las aminas biogénicas más importantes en el sistema nervioso se clasifican en dos grupos: las catecolaminas, llamadas así porque la base de su estructura es el núcleo catecol y las indolaminas cuya base es el indol (Pérez *et al.*, 1993).

Las catecolaminas se sintetizan a partir del aminoácido tirosina y son la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina. En el cerebro existen 19 grupos celulares que contienen catecolaminas, de los cuales siete son de naturaleza noradrenérgica (A1-A7), nueve dopaminérgicos (A8-A16) y los tres restantes adrenérgicos (C1-C3) (Berk y Finkelstein, 1981).

Los grupos noradrenérgicos y adrenérgicos se localizan en la porción caudal del cerebro y presentan fibras ascendentes que inervan el diencefalo y el cerebro anterior y fibras descendentes que proyectan hacia la médula (McKellar y Loewy, 1982).

Las neuronas noradrenérgicas del grupo A1 están situadas en la porción ventrolateral de la médula oblongada y emiten proyecciones ascendentes que viajan por el tracto tegmental ventral, desde la médula (VLMO) y el puente, e inervan POA-AHA (Sánchez y Domínguez, 1994). Se ha mostrado que las neuronas vecinas a las del grupo A1, entre las que probablemente haya intercomunicación, también son de naturaleza catecolaminérgica, principalmente y proyectan sus fibras hacia todos los niveles de la médula espinal (Herbison *et al.*, 1990). Los cuerpos celulares de las neuronas del grupo A2 se ubican en el núcleo caudal del tracto solitario, los cuerpos celulares A4 en la porción ventral del puente, los cuerpos celulares de A6 en el locus coeruleus y los cuerpos celulares A7 en la formación reticulada mesencefálica (Koren *et al.*, 1992).

La inervación noradrenérgica de mPOA, donde se concentran los somas neuronales GnRHérgicos, proviene principalmente de los grupos medulares A1 y A2. La inyección unilateral de peroxidasa del rábano (HRP) un trazador retrógrado en mPOA revela la presencia de células HRP-positivas en ambos lados de la médula oblongada (Day *et al.*, 1980). Las neuronas del grupo A1 proyectan a ambos lados del área preóptica, experimentos con estimulaciones eléctricas de mPOA y A1 muestran que las aferencias

contralaterales son más eficaces para estimular la liberación de LH que las aferencias ipsilaterales (Gitler y Barraclough, 1988).

Los somas neuronales del grupo adrenérgico C1 se ubican en la porción rostro ventral de la médula, el grupo C2 en la porción rostromedial del núcleo del tracto solitario y el grupo C3 en la porción rostro medial de la médula (Honma y Wutte, 1980).

Los grupos neuronales dopaminérgicos que inervan el hipotálamo son A11, A12, A13 y A14 (Björklund y Novin, 1973). Las neuronas del grupo A12 o neuronas tuberoinfundibulares conforman el grupo de mayor tamaño y proyectan sus axones a la eminencia media, donde se encuentran en aposición con los capilares del sistema portahipofisiario. Estas neuronas liberan grandes cantidades de dopamina al sistema portal (Ben-Jonathan *et al.*, 1977) y regulan la liberación de prolactina al actuar directamente sobre los lactotrofos hipofisarios (Vijayán y McCann, 1980).

Los grupos A11, A13 y A14 conforman el sistema incertohipotálamico (Björklund y Novin, 1973). Las neuronas del grupo A11 se ubican en el hipotálamo posterior y el tálamo ventral; son la fuente principal de inervación dopaminérgica espinal. Los somas dopaminérgicos de los grupos A13 y A14, localizados en la zona incerta medial y la porción rostral del núcleo periventricular proyectan sus axones hacia las áreas hipotalámicas que contienen somas de neuronas GnRHérgicas por lo que podrían estar involucradas en el control de la secreción de gonadotropinas (Sanhera *et al.*, 1991).

Existen nueve grupos neuronales setoninérgicos (B1-B9). Los grupos B1-B5 se encuentran situados caudalmente, en la porción del puente. Los grupos B6-B9 se distribuyen en el núcleo del rafé, el cual se subdivide en las porciones dorsal y medial. En el rafé dorsal, situado en la porción ventral de la sustancia gris periacueductal, se encuentran los grupos B6 y B7 y en la porción medial el grupo B8 y parte del B9. Las neuronas serotoninérgicas de las porciones dorsal y medial del rafé proyectan sus fibras hacia el hipotálamo, la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, las áreas rostrales del sistema límbico, el órgano vasculoso de la lámina terminal y la eminencia media. Las neuronas del puente, envían sus fibras hacia regiones caudales como el bulbo raquídeo y la médula espinal (Frazer y Hensler, 1993). Al parecer, existe una fuente de serotonina

dentro del hipotálamo, en el núcleo dorsomedial, ya que la deafferentación hipotalámica reduce sólo parcialmente la concentración de serotonina (Palkovits, 1979).

Sistema noradrenérgico

La regulación de la secreción de GnRH se realiza principalmente en POA-AHA, donde se localizan la mayoría de los somas GnRHérgicos y de la eminencia media, donde se ubican las terminales peptidérgicas que descargan sus productos de secreción a la circulación portal (Barraclough, 1983).

La participación del sistema noradrenérgico en la regulación de la liberación de las gonadotropinas ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la interpretación de los resultados ha sido difícil, dado que la diversidad de los modelos experimentales y la complejidad intrínseca de la organización neuroanatómica en el hipotálamo han generado resultados, al parecer contradictorios. Los estudios sobre los cambios temporales de la concentración y tasa de recambio de las catecolaminas en el hipotálamo permiten visualizar el perfil de liberación fisiológico y la participación temporal de los sistemas catecolaminérgicos en la regulación de la liberación de las gonadotropinas que sucede en el animal (Cruz *et al.*, 2001).

Las tasas de recambio de las catecolaminas en las áreas preóptica hipotalámica y núcleo supraquiasmático incrementan significativamente entre las 15:00 y 17:00 del proestro, junto con las concentraciones plasmáticas de LH, FSH y prolactina (Barraclough, 1983). En particular, el recambio de noradrenalina se incrementa de marcado en aquellas áreas donde se localizan los somas (mPOA) o las terminales (eminencia media, EM) de las neuronas GnRH (Rance *et al.*, 1981).

Estudios realizados con la técnica de *push-pull cannula* muestran que en los animales ovariectomizados, el ambiente neuroendocrino en el área preóptica se caracteriza por la liberación pulsátil de noradrenalina, adrenalina y dopamina y que la liberación masiva de la LH, inducida por el reemplazo hormonal con estrógenos, es precedida por un aumento abrupto en la secreción de estas aminas entre 10 y 100 veces, mayor a la tasa de liberación basal (Demling *et al.*, 1985). Estudios realizados en animales entero con esta misma técnica en el hipotálamo medio basal (HMB) muestran que la tarde del proestro

se caracteriza por un incremento gradual de la liberación de noradrenalina y simultáneamente un decremento gradual de la liberación de dopamina y el cenit de la liberación de noradrenalina y el nadir de dopamina se presentan alrededor del momento en que se presentan los “picos” preovulatorios de LH y PRL (Tobet *et al.*, 1996).

La lesión bilateral de la VLMO, donde se ubican los somas del grupo neuronal A1, bloquea la liberación de FSH, LH y PRL, mientras que el implante de dietil carbamato de sodio, un inhibidor de la dopamina β -hidroxilasa, en la misma zona bloquea la liberación preovulatoria de gonadotropinas y en muchos casos, también la ovulación. Este bloqueo de la secreción de gonadotropinas se acompaña de un aumento en la concentración de dopamina en el hipotálamo medio posterior. Es posible que este incremento en la concentración de dopamina contribuya al bloqueo de la secreción preovulatoria de gonadotropinas (Kerdelhué *et al.*, 1989). Los animales con lesión del VLMO pueden recuperar la capacidad ovulatoria con la inyección intraventricular de noradrenalina o estimulando el núcleo supraquiásmico, por lo que se ha planteado que la liberación preovulatoria de gonadotropinas esta mediada por el efecto estimulante de la noradrenalina de las células A1 que inervan POA-AHA (Kerdelhué *et al.*, 1989).

El estudio de la participación de los diferentes núcleos noradrenérgicos en la regulación de la liberación de las gonadotropinas incluye el empleo de modelos experimentales basados con la estimulación eléctrica o electroquímica de aquellos núcleos noradrenérgicos cuyas neuronas proyectan sus fibras a las áreas de regulación de la secreción de GnRH (Cruz *et al.*, 2001).

Los resultados de la estimulación eléctrica de los grupos neuronales noradrenérgicos o de sus vías muestran que en animales ovariectomizados con reemplazo hormonal de estrógenos, la estimulación electroquímica del núcleo A5 disminuye la secreción de LH evoca la por la estimulación eléctrica previa de POA, disminución que es proporcional a la cantidad de corriente aplicada. El mismo tratamiento realizado en proestro provoca el bloqueo de la ovulación, cuando se estimula el locus coeruleus, A5 o A1 (Dotti y Taleisnick, 1982).

En los animales ovariectomizados, la estimulación eléctrica del haz ventral noradrenérgico no altera el patrón pulsátil de LH en sangre, típico de estos animales,

mientras que la estimulación del haz dorsal provoca inhibición de la liberación pulsátil de LH por 1 hora. Estos animales ovariectomizados con reemplazo hormonal, la estimulación de los haces ventral o dorsal no afecta o altera mínimamente las concentraciones plasmáticas no pulsátiles de LH. Cuando la estimulación de los haces dorsal o ventral se realiza en la tarde provoca un decremento en la concentración de LH a las 17:00 horas (Bergen y Leung, 1988).

En animales ovariectomizados con reemplazo hormonal de estrógenos, la estimulación eléctrica de A1 amplifica la secreción de LH evocada por la estimulación electroquímica previa de POA. La administración intra peritoneal de dietilditiocarbamato (inhibidor de la dopamina- β -hidroxilasa) y fenoxibenzamina (antagonista α -adrenérgico) bloquean completamente la amplificación del pico de LH inducido por la estimulación eléctrica de A1 (Gitler y Barraclough, 1988).

La estimulación ipsilateral de mPOA y A1 no provoca incremento en la liberación de LH. Cuando se estimulan las proyecciones A1 contralaterales se presenta un incremento en la liberación de GnRH (Gitler y Barraclough, 1988). Al parecer, la inervación cruzada que llega a POA desde A1 es más importante que las aferencias ipsilaterales en el control de la secreción de GnRH.

Los efectos inhibitorios sobre la liberación de LH por la estimulación electroquímica del locus coeruleus pueden ser suprimidos por antagonistas β -adrenérgicos y no por antagonistas α -adrenérgicos. También pueden ser suprimidos por la destrucción ipsilateral del haz noradrenérgico dorsal. Al parecer, la inervación ipsilateral del haz dorsal que inerva POA participa de modo preponderante en el efecto inhibitorio de la noradrenalina sobre la liberación de LH (Dotti y Taleisnick, 1982).

La información presentada pone de manifiesto que en muchos casos, diferencias en los modelos experimentales causa resultados antagónicos y la dificultad de precisar un modelo que explique la variedad de resultados. Una hipótesis que explique esta diferencia en los resultados es que los efectos inhibitorios de la noradrenalina son consecuencia de una sobre estimulación del sistema que revierte su papel fisiológico estimulante, al actuar sobre receptores tipo β -adrenérgicos, ya que el efecto de altas dosis de noradrenalina se revierte con un antagonista β -adrenérgicos, mientras que los

efectos excitatorios se bloquean con un antagonista α -1-adrenérgico, como la fenoxibenzamina (Cruz *et al.*, 2001)

Sistema serotoninérgico

Existen evidencias experimentales que apoyan la idea de la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la liberación de las gonadotropinas y que los efectos de la serotonina sobre la secreción de LH y la ovulación se expresan por cambios en la liberación de GnRH por las neuronas neurosecretoras del hipotálamo, más que por una acción directa de la serotonina sobre la hipófisis (Leonhardt *et al.*, 1995).

La micro-inyección de 5,7-DHT, un inhibidor de la síntesis de serotonina (5-HT), en el HMB aumenta la concentración de LH, mientras que el mismo tratamiento en el área preóptica la disminuye (Johnson y Crowley, 1983), lo que apoyaría la idea propuesta por Kordon y Glowinski (1972) sobre la existencia de un centro serotoninérgico inhibitorio, ubicado en el HMB y otro estimulante o permisivo en la región preóptica-supraquiasmática.

Las acciones opuestas de la 5-HT en la liberación de LH pueden ser explicadas también con base en la participación de las diferentes vías que inervan el hipotálamo. La estimulación electroquímica del rafe medial o la lesión del núcleo dorsal del rafe bloquearon la liberación preovulatoria de LH, lo que permite sugerir que el rafe medial juega un papel inhibitorio mientras que el rafe dorsal es estimulador (Morello *et al.*, 1989).

El bloqueo de la ovulación por la lesión del rafe dorsal puede ser revertido por la inyección sistémica de propanolol (antagonista β -adrenérgico) o la microinyección de 5-HT en el locus coeruleus (Morello y Taleisnik, 1988), mientras que el bloqueo de la ovulación inducido por la estimulación del rafe medial puede ser prevenido por la inyección de antagonistas GABA_A como picrotoxina y bicuculina (Morello *et al.*, 1989).

Los esteroides sexuales parecen ser un factor crítico en la expresión de la actividad de las neuronas serotoninérgicas sobre la secreción de las gonadotropinas. En el núcleo supraquiasmático y en la eminencia media se presenta un pico preovulatorio de LH, el cual no se expresa en las ratas macho y ratas ovariectomizadas. El tratamiento

secuencial con hormonas sexuales produce un incremento significativo en la síntesis y la concentración de serotonina en el núcleo dorsal del rafe (Cone *et al.*, 1981) donde se ubican somas serotoninérgicos y en la concentración de serotonina en la EM (Crowley *et al.*, 1979), POA-AHA (Kirsch, 1980) y otras áreas hipotalámicas relacionadas (Jones *et al.*, 1990).

En ratas ovariectomizadas, la inyección de estrógenos también aumenta la densidad de los receptores serotoninérgicos en POA-AHA, el septo lateral y la eminencia media (Biegon *et al.*, 1982). La densidad de receptores a serotonina en el hipotálamo y el área preóptica presentan cambios durante el ciclo estral, con a menor densidad en el proestro y el estro (Bhar y Ben-Johnathan, 1981).

Bibliografía

Adelman, J. P., Mason, A. J., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H. (1986). Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83: 179–183.

Bahr, J., Kao L., Nalbandov AV. (1974). The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biology of Reproduction*. 10: 273-290.

Bhar JM, Ben-Johnathan N. (1981). Preovulatory depletion of ovarian catecholamine. *Endocrinology*. 108:1815-1820.

Barracough C.A. (1983). The role of catecholamines in the regulation of gonadotropin secretion. *Acta Morphologica Hungarica*. 31:101-116.

Belsham, D. D., Wetsel, W. C., Mellon, P. L. (1996). NMDA and nitric oxide act through the cGMP signal transduction pathway to repress hypothalamic gonadotropin releasing hormone gene expression. *EMBO J*. 15, 538–547.

Ben-Jonathan N., Oliver C., Weiner HJ., Mical RS., Porter JC.(1977). Dopamine in hyperphysical portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology*. 100 (2):452-458

Bergen H., Leung PCK. (1988). Electrical stimulation of ascending noradrenergic tracts in the midbrain: Suppression steroid-induced luteinizing hormone release. *Endocrinology*. 122(3):899-905.

Berk ML. Finkelstein JA. (1981). Afferents projections to the preoptic area and hypothalamic regions in the rat brain. *Neuroscience* 6:1601-1624.

Biegon A., Fischette CT., Rainbow TC. McEwen BS.(1982). Serotonin Receptor Modulation by Estrogen in Discrete Brain Nuclei. *Neuroendocrinology* 35:287–291.

Björklund A., Novin A. (1973). Fluorescence histochemical and microspectrofluorometric mapping of dopamine and noradrenaline cells groups in the rat diencephalon. *Brain Research*; 51:193-205.

Chandran, U. R, De Franco, D. B. (1999). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene transcription. *Behavioral Brain Research*. 105, 29–36.

Cheng CK., Leung PC. (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocrinology Review*. 26; 283-306.

Cruz ME., Chávez R., Rosas P., Lujambic VM., Moran JL., Domínguez R. (1990). Diurnal changes in hypothalamic acetylcholinesterase activity during the estrus cycle of the rat. *Medical Science Research*. 18(4): 137-138.

Cruz ME., Castro J., Domínguez R. (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J. Endocrinol*; 133: 205-210.

Cruz ME., Arteaga PR., De la huerta M., Sánchez M., Domínguez R. (1998). Differences in acetylcholine content and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic during the oestrus cycle of the rat. *Med Science Res*. 25:823-825.

Cruz EM., Villegas G., Domínguez-González A., Chavira R. y Domínguez R (2001). The delay of ovulation induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus 1 is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior hypothalamic area of rat. *Brain Research*. 54: 339-344.

Cone RI. Davis GA., Goy RW. (1981). Effects of ovarian steroids on serotonin metabolism within grossly dissected and micro dissected brain regions of the ovariectomized rat. *Brain Research Bulletin*. (6):639-44.

Crowley WR., O'Donohue TL., Muth EA., Jacobowitz DM.(1979).Effects of ovarian hormones on levels of luteinizing hormone in plasma and on serotonin concentrations in discrete brain nuclei. *Brain Research Bulletin*. 4(4):571-4.

Day TA. Blessing W., Willoughby. (1980). Noradrenergic and dopaminergic projections to the medial preoptic area of the rat. A combined horseradish peroxidase/catecholamine florescence study. *Brain Research*; 193:543-548.

Demling J., Fuchs E., Baumert M., Wuttke W. (1985). Preoptic catecholamine, GABA, and glutamate release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-primed rats utilizing a push-pull cannula technique. *Neuroendocrinology*. 41(3):212-8.

- Dohanich GP, Witcher JA, Weaver DR, Clemens LG. (1982). Alteration of muscarinic binding in specific brain areas following estrogen treatment. *Brain Research*. 241(2):347-50.
- Domínguez, R., Riboni L., Zipitria D., Revilla R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?. *Journal of Endocrinology* 95(2): 175-180.
- Dotti C., Taleisnick S. (1982). Inhibition of the release of LH and ovulation by activation of the noradrenergic system. Effect of interrupting the ascending pathway. *Brain Research*. 249:281-290.
- Eckenstein F. Thoenen H. (1982). Production of specific antisera and monoclonal antibodies to choline acetyltransferase: Characterization and use for identification of cholinergic neurons. *EMBO J*; 1:363-368.
- Egozi, Y., Kloog Y. (1985). Muscarinic receptors in the preoptic area are sensitive to 17β -estradiol during the critical period. *Neuroendocrinology*. 40; 385–392
- Egozi Y., Kloog Y., Sokolovsky M. (1986). Acetylcholine rhythm in the preoptic area of the rat hypothalamus is synchronized with estrous cycle. *Brain Research*. 383:310-313.
- Fernald, R D., White R. B. (1999) Gonadotropin-Releasing Hormone Genes: Phylogeny, Structure and Functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20:224-240.
- Frazer A., Hensler JG. (1993). Serotonin. En: *Basic Neurochemistry*. Editores: GJ Siegel, BW Agranoff, RN Albers, PB Molinoff. Raven Press, Nueva York, pp. 283-308.
- Gautron, J. P., Leblanc, P., Bluet-Pajot, M. T., Pattou, E., L'Heritier, A., Mounier, F., Ponce, G., Audinot, V., Rasolonjanahary, R., and Kordon, C. (1992). A second endogenous molecular form of mammalian hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), (hydroxyproline⁹) LHRH, releases luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 85, 99–107.
- Gautron, J. P., Pattou, E., Leblanc, P., L'Heritier, A., Kordon, C. (1993). Preferential distribution of C-terminal fragments of (hydroxyproline⁹) LHRH in the rat hippocampus and olfactory bulb. *Neuroendocrinology* 58, 240–250.
- Gitler MS., Barraclough C.A. (1988). Stimulation of the medullary A1 noradrenergic system augments luteinizing hormone release induced by medial preoptic stimulation. *Neuroendocrinology*; 48: 351-359.
- Gore, A. C., Roberts, J. L. (1994). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression by the excitatory amino acids kainic acid and N-methyl-D, L-aspartate in the male rat. *Endocrinology* 134, 2026–2031.

- Gore, A. C., Ho, A., Roberts, J. L. (1995). Translational efficiency of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid is negatively regulated by phorbol ester in GT1-7 cells. *Endocrinology* 136, 1620–1625.
- Gore, A. C., Roberts, J. L. (1995). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat during the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 136: 889–896.
- Gore, A. C., Roberts, J. L. (1997). Regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in vivo and in vitro. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 18: 209–245.
- Gore, A. C., Roberts, J. L., Gibson, M. J. (1999). Mechanisms for the regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression in the developing mouse. *Endocrinology* 140: 2280–2287.
- Gore AC. (2002). GnRH: the master molecule of reproduction. Editorial Kluwer Academic Publishers. Massachusetts. (ISB 0-7923-7681-1) pp.10- 85.
- Han, J., Seong, J. Y., Kim, K., Wuttke, W., Jarry, H. (2001). Analysis of exonic splicing enhancers in the mouse gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 173:157–166.
- Han, J., Son, G. H., Seong, J. Y., Kim, K. (2002). GnRH pre-mRNA splicing: role of exonic splicing enhancer. *Progress in Brain Research* .141: 209–219.
- Herbison AE., Heavens RP. Dyer R. (1990). Oestrogen modulation of excitatory A1 noradrenergic inputs to rat mediopreoptic gamma aminobutyric acid neurons demonstrated by microdialysis. *Neuroendocrinology*; 52; 161-168
- Honma K., Wutte W. (1980). Norepinephrine and dopamine turnover rates in the medial preoptic area and mediobasal hypothalamus of the rat after various endocrinological manipulations. *Endocrinology*; 106(6):1848-1853.
- Jakubowski, M., Roberts, J. L. (1994). Processing of gonadotropin-releasing hormone gene transcripts in the rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*. 269: 4078–4083.
- Jennes L. Stumpf WE. (1980). LH-RH- systems in the brain of the golden hamster. *Cell and Tissue Research*. 209; 239-256.
- Jennes L., Stumpf WE., Sheedy ME. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) producing neurons. *Journal of Comparative Neurology*. 232; 534-547.
- Jones RE., Desan PH., Lopez KH. Austin HB. (1990). Asymmetry in diencephalic monoamine metabolism is related to side of ovulation in a reptile. *Brain Research*. 506(2):187-91.
- Johnson MD., Crowley WR. (1983). Acute effects of estradiol on circulating luteinizing hormone and prolactin concentrations and on serotonin turnover in individual brain nuclei. *Endocrinology*; 113:1934-1941.

- Jung, N., Sun, W., Lee, H., Cho, S., Shim, C., Kim, K. (1998). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene regulation by N-methyl-D-aspartic acid in GT1-1 neuronal cells: differential involvement of c-fos and c-jun protooncogenes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 61:162–169.
- Katt JA., Duncan JA., Herbon I. (1985). The frequency of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured pituitary cells. *Science.* 215; 983-985.
- Kawakami M., Arita J., Kimura F., Hayashi R. (1979). The stimulatory roles of catecholamines and acetylcholine in the regulation of gonadotropin release in ovariectomized estrogen-primed rats. *Endocrinologia Japonica* 26(2):275-284.
- Kerdelhué B., Bojda F., Lesieur P., Pasqualini C., Abed A., Lenoir V., Douillet P., Chiueh MC., Palkovits M.(1989). Median eminence dopamine and serotonin neuronal activity. Temporal relationship to preovulatory prolactin and luteinizing hormone surges. *Neuroendocrinology.* 49(2):176-80.
- King, J. C., Anthony, E. L. (1983). Biosynthesis of LHRH: inferences from immunocytochemical studies. *Peptides* 4: 963–970.
- Kirsch B. (1980). Two types of luteinizing hormone-immunoreactive perikarya in the preoptic area of the rat. *Cell Tissue Research*; 212:443-455.
- Klein CM. Burden HW. (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters.* 85:217-22.
- Kordon C. Glowinski J. (1972). Role of hypothalamic monoaminergic neurons in gonadotropin release-regulating mechanisms. *Neuropharmacology.* 11.153-162.
- Koren D., Egozi Y., Sokolovsky M. (1992). Muscarinic envelopment in the regulation of gonadotropin-releasing hormone in the cyclic rat. *Molecular Cell Endocrinology.* 90 (1): 87-93.
- Kronenberg M., Melmed S., Polonski K., Larsen R. (2009). *Williams Textbook of Endocrinology.* 11a ed. Editorial Elsevier España. Pp. 133-140.
- Lawson, M. A. Mellon, P. L. (2002). GnRH gene expression: lessons learned from immortalized cells. In *Neuroplasticity, Development, and Steroid Hormone Action* (R. J. Handa, S. Hayashi, E. Terasawa, and M. Kawata, Eds.), pp. 141–152. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lehman J., Langer SZ. (1983). The striatal cholinergic interneuron: a synaptic target of dopaminergic terminals? *Neuroscience,* 10:1105-1120.
- Leonhardt S., Seong JY., Kim K, Thorun Y., Wuttke W., Jarry H. (1995). Activation of central GABAA-but not of GABAB-receptors rapidly reduces pituitary LH release and GnRH gene expression in the preoptic/anterior hypothalamic area of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology.* 61(6):655-62.

Mallicka BN., Josepha MM. (1998). Adrenergic and Cholinergic Inputs in Preoptic Area of Rats Interact for Sleep–Wake Thermoregulation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 61 (2):193–199.

Mason AJ., Hayflick J.S., Zoeller RT., Young WS. 3rd, Phillips H S., Nikolics K., Seeburg, PH. (1986). A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 234: 1366–1371.

Maurer JA., Wray S. (1997). Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons maintained in hypothalamic slice explant cultures exhibit a rapid LHRH mRNA turnover rate. *The Journal of Neuroscience*. 17: 9481–9491.

Maurer J A., Wray S. (1999). Luteinizing hormone releasing hormone quantified in tissues and slice explants cultures of postnatal rat hypothalamic. *Endocrinology* 140: 791–799.

McKellar S., Loewy AD. (1982). Efferent projections of the A1 catecholamine cell group in the rat: An autoradiographic study. *Brain Research*; 241: 11-29.

Montaner AD., Mongiat L., Lux-Lantos VA., Park MK., Fischer WH., Craig AG., Rivier JE., Lescheid D., Lovejoy D., Libertun C., Sherwood NM., Somoza GM. (2001). Structure and biological activity of gonadotropin-releasing hormone isoforms isolated from rat and hamster brains. *Neuroendocrinology*. 74; 2-12.

Morello H., Taleisnik S. (1988). The inhibition of proestrus LH surge and ovulation in rats bearing lesions of the dorsal raphe nucleus is mediated by the locus coeruleus. *Brain Research*. 440:227-231.

Morello H., Caligaris L., Haymal B., Taleisnik S. (1989). Inhibition of proestrous LH surge and ovulation in rats evoked by stimulation of the medial raphe nucleus involves a GABA-mediated mechanism. *Neuroendocrinology*. 50(1):81-7.

Müller EE., Nistico G., Scapagnini U. (1977). Neurotransmitters and anterior pituitary function. Academic Press, New York, 435.

Norris OD. (1996). An overview of chemical regulation. *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press. 1(22); 146-150.

Nelson, S. B., Eraly, S. A., Mellon, P. L. (1998). The GnRH promoter: target of transcription factors, hormones, and signaling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 140: 151–155.

Nunez, L., Faught, W. J., Frawley, L. S. (1998). Episodic gonadotropin-releasing hormone gene expression revealed by dynamic monitoring of luciferase reporter activity in single, living neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 9648–9653.

Olsen KL. Edwards E., Schecheter N. Whalen R.E. (1988). Muscarinic receptors in preoptic area hypothalamus: effects of the hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 29:140-148.

- Palkovits M. (1979). Effects of surgical deafferentation on the transmitter and hormone content of the hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 29:140-148.
- Pawson AJ., Morgan K., Maudsley SR. (2003). Type II gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in reproductive biology. *Reproduction*. 126; 271-278.
- Perez J., Naftolin F., Garcia-Segura LM. (1993). Cycloheximide mimics effects of oestradiol that are linked to synaptic plasticity of hypothalamic neurons. *J Neurocytology*. 22(4):233-243.
- Petersen SL., McCrone S., Keller M., Gardner E. (1991). Rapid increase in LHRH mRNA levels following NMDA. *Endocrinology* 129: 1679–1681.
- Petersen SL., Gardner E., Adelman J., McCrone S. (1996). Examination of steroid-induced changes in LHRH gene transcription using 33P- and 33S-labeled probes specific for Intron 2. *Endocrinology* 137: 234–29.
- Phoenix C. Chambers KC. (1990). Sexual performance of old and young male rhesus macaques following treatment with GnRH. *Physiology Behavior*. 47; 513-517.
- Prieto GB, Velázquez PM. (2002). Fisiología de la reproducción; hormona liberadora de gonadotropinas. *Rev. Fac. Med. UNAM*. 45(6):252-257.
- Ramesh V., Kumar VM. (1998). The role of alpha-2 receptors in the medial preoptic area in the regulation of sleep-wakefulness and body temperature. *Neuroscience*. 85(3):807-17.
- Rance N., Wise PM., Selmanoff MK., Barraclough CA.(1981).Catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in median eminence luteinizing hormone-releasing hormone and serum gonadotropins on proestrus and diestrous day 1. *Endocrinology*. 108(5):1795-802.
- Rangaraju NS. Xu J. F., Harris RB. (1991). Progonadotropin-releasing hormone protein is processed within hypothalamic neurosecretory granules. *Neuroendocrinology* 53: 20–28.
- Rangaraju NS. Harris RB. (1993). GAP-releasing enzyme is a member of the pro-hormone convertase family of precursor protein processing enzymes. *Life Sci*. 52:147–153.
- Rochdi L., Theraulaz L., Enjalbert A., Gautron JP. (2000). Differential in vitro secretion of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and (hydroxyproline) GnRH from the rat hypothalamus during postnatal development. *Journal of Neuroendocrinology*. 12: 919–926.
- Rubin BS. King JC., Millar RP., Seeburg PH., Arimura A. (1987). Processing of luteinizing hormone releasing hormone precursor in rat neurons. *Endocrinology* 121: 305–309.

- Sánchez MA., Domínguez R. (1994). Asimetrías en los sistemas nervioso, inmune y endocrino. Archivos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (MEX) 9:66-72.
- Sánchez MA., López GM., Cruz ME., Tapi R, Domínguez R. (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. Neuroreport. 5; 433-434.
- Sanghera MKA, Anselmo-Franci JB., McCann SMC. (1991). Effect of Medial Zona Incerta Lesions on the Ovulatory Surge of Gonadotrophins and Prolactin in the Rat. Neuroendocrinology; 54:433–438.
- Seeburg, PH., Adelman, JP. (1984). Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. Nature 311: 666–668.
- Seong JY, Park S., Kim K. (1999). Enhanced splicing of the first intron from the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) primary transcript is a prerequisite for mature GnRH messenger RNA: presence of GnRH neuron-specific splicing factors. Molecular Endocrinology. 13: 1882–1895.
- Seong JY., Kim B. W., Park S., Son GH, Kim K. (2001). First intron excision of GnRH pre-mRNA during postnatal development of normal mice and adult hypogonadal mice. Endocrinology 142: 4454–4461.
- Seong JY, Han J., Park S., Wuttke W., Jarry H., Kim K. (2002). Exonic splicing enhancer-dependent splicing of the gonadotropin-releasing hormone premessenger ribonucleic acid is mediated by tra2alpha, a 40-kilodalton serine/arginine-rich protein. Molecular Endocrinology. 16: 2426–2438.
- Sherwood NM, Lovejoy DA., Coe IR. (1993). Origin of mammalian gonadotropin-releasing. Endocrinology Review 14; 241-254.
- Shieh KR., Pan JT. (1995): An endogenous cholinergic rhythm may be involved in the circadian changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in ovariectomized rats treated with or without estrogen. Endocrinology. 136 (6): 2383-2388.
- Shieh KR., Pan JT. (1996). Sexual differences in the diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity in the rat: role of cholinergic control. Biology of Reproduction 54 (5): 987-992
- Siverman AJ. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neural system: immunocytochemistry and in situ hybridization. En: The Physiology of reproduction. Knobil E y Neill D. Raven Press. 1; 1638-709.
- Sokolovsky M., Egozi Y., Avissar S. (1981). Molecular regulation of receptors: interaction of beta-estradiol and progesterone with the muscarinic system. Proceedings of the National Academy of Science. U S A. 78(9): 5554–5558.
- Son G.H., Jung H., Seong JY., Choe Y., Geum D., Kim K. (2003). Excision of the first intron from the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) transcript serves as a key

regulatory step for GnRH biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 18037–18044.

Tobet SA., Chickering TW., King JC., Stopa EG., Kim K., Kuo-Leblank V., Schwarting GA. (1996). Expression of gamma-aminobutyric acid and gonadotropin-releasing hormone during neuronal migration through the olfactory system. *Endocrinology*. (12):5415-20.

Urbanski HF., White RB., Fernald RD. (1999). Regional expression of mRNA encoding a second form of gonadotropin-releasing hormone in the macaque brain. *Endocrinology* 140; 1945-1948.

Vijayán E., McCann SM. (1980). Effect of blockade of dopaminergic receptors on acetylcholine (Ach) - induced alterations of plasma gonadotropin and prolactin (Prl) in conscious ovariectomized rats. *Brain Research Bulletin*. 5(1):23-29.

Wetsel, WC. Liposits Z., Seidah NG., Collins S. (1995). Expression of candidate pro-GnRH processing enzymes in rat hypothalamus and an immortalized hypothalamic neuronal cell line. *Neuroendocrinology* 62: 166–177.

Wetsel WC. Srinivasan S. (2002). Pro-GnRH processing. *Progress in Brain Research*. 141: 221–241.

Wetzel CH., Hermann B., Behl C., Pestel E., Rammes G., Zieglgansberger W., Holsboer F., Rupprecht R. (1998). Functional antagonism of gonadal steroids at the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor. *Molecular Endocrinology*. 12: 1441–1451.

Williamson, P., Lang, J., Boyd, Y. (1991). The gonadotropin-releasing hormone (Gnrh) gene maps to mouse chromosome 14 and identifies a homologous region on human chromosome 8. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 17: 609–615.

Yeo TT, Gore AC., Jakubowski M., Dong KW, Blum M., Roberts JL. (1996). Characterization of gonadotropin releasing hormone gene transcripts in a mouse hypothalamic neuronal GT1 cell line. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 42: 255–262.

Zhen S, Dunn IC., Wray S., Liu Y., Chappell PE., Levine JE., Radovick S. (1997). An alternative gonadotropin-releasing hormone (GnRH) RNA splicing product found in cultured GnRH neurons and mouse hypothalamus. *Journal of Biological Chemistry*. 272: 12620–12625.

Asimetría hipotalámica y la regulación neuroendocrina de las glándulas endocrinas

Esta revisión pretende mostrar diferentes resultados experimentales que permitirían responder a la pregunta *¿cuál es el papel de la asimetría hipotalámica y la regulación neuroendocrina de las glándulas endocrinas?*, desarrollé el presente documento en el cual primero se analizan las consideraciones experimentales que demuestran claramente que tanto los ovarios como el hipotálamo, son funcionalmente asimétricos, debido a que estas glándulas están inervadas y vascularizadas de forma asimétrica (diferencial). Posteriormente se analiza el papel de la asimetría de dichas glándulas sobre el proceso de la ovulación en mamíferos.

ASIMETRÍA CEREBRAL

La asimetría cerebral se puede definir como la presencia de diferencias anatómicas, funcionales o bioquímicas o todas a la vez entre ambos hemisferios cerebrales. Aunque la naturaleza de las diferencias estructurales y funcionales entre los hemisferios está lejos de ser completamente entendido (Toga y Thompson, 2003; Goldberg *et al.*, 2013; Pepe *et al.*, 2014), se dispone de datos que sugieren que bajo las asimetrías morfo-funcionales subyacen lateralizaciones neuroquímicas (Myslobodsky, 1983; Hellige, 1993; Ramírez y Alba 1993). Sin embargo, la conexión entre estos 3 aspectos de la asimetría cerebral es aún poco conocida (Ramírez *et al.*, 2004; Pepe *et al.*, 2014).

Existen evidencias que apoyan la hipótesis de la asimetría cerebral y que virtualmente todas las funciones cerebrales están organizadas, en mayor o menor grado, siguiendo un modelo asimétrico (Goldberg *et al.*, 2013; Pepe *et al.*, 2014). Además, se podría especular que las alteraciones en las asimetrías cerebrales establecidas (bien hacia la simetría o bien hacia una mayor asimetría) podrían dar lugar a desviaciones patológicas de las funciones cerebrales. Esta organización asimétrica es el resultado de una adaptación evolutiva y se han encontrado evidencias de asimetría cerebral no sólo en nuestros primitivos ancestros, sino también en todas las etapas de la evolución cerebral (Ramírez y Alba 1993). A finales del siglo XIX, Broca, (1861, 1881) y Wernicke, (1874) asociaron la expresión del lenguaje con un área cerebral, focalizada en el hemisferio izquierdo. Estos autores demostraron de manera definitiva que los cerebros post mortem de pacientes con trastornos del lenguaje tenían lesiones predominantemente en el hemisferio izquierdo y que en esencia eran diestros. Años más tarde se demostró que, mientras que unas funciones predominaban en el hemisferio izquierdo, otras predominaban en el derecho. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que no había un hemisferio dominante sino que la “dominancia” dependía del tipo de función. El lenguaje, la habilidad de una mano sobre la otra, el talento musical, la orientación espacial, la atención o la emoción son, posiblemente, las funciones cerebrales más relacionadas con el predominio de un hemisferio sobre el otro (Goldberg *et al.*, 2013). Hasta finales de la década de los sesenta la comunidad científica no aceptó la presencia de asimetrías macroscópicas en el cerebro humano. La primera vez que se aportaron evidencias de

una diferencia hemisférica en el tamaño del plano temporal fue en 1968 (Geschwind y Levitsky, 1968).

Con la aplicación de técnicas morfométricas mediante el uso de resonancia magnética, se han identificado varias diferencias volumétricas entre los dos hemisferios del cerebro humano. La corteza inferoparietal y prefrontal lateral que son parte de la corteza visual, son más extensas en el hemisferio derecho que el hemisferio izquierdo. La corteza prefrontal, cingulada y la heteromodal orbital que pertenecen a la corteza somato sensorial, auditiva y parte de la corteza motora son más extensas en el hemisferio izquierdo que el derecho. Por lo tanto, las cortezas de asociación heteromodal están representadas más en la cara lateral del hemisferio derecho, y la corteza modal específica está ubicada en la cara lateral del hemisferio izquierdo. Desde el punto de vista de la lateralidad a nivel frontal, históricamente se han atribuido funciones de lenguaje a la corteza izquierda y funciones viso espaciales a la corteza derecha. La funcionalidad de esta asimetría estaría vinculada a las conductas, bien por representaciones internas (conocimientos) en el caso del sistema frontal izquierdo; y externas (ambiente) en los derechos. Por Tanto, la corteza prefrontal izquierda sería dominante para funcionar en la rutina diaria, mientras que la derecha sería crucial para afrontar nuevas situaciones (Goldberg, 2001; Goldberg *et al.*, 2013).

Diversos estudios morfo funcionales han conducido a la hipótesis de que bajo estas asimetrías debe subyacer un sustrato neuroquímico. Sin embargo, la relación directa entre una asimetría funcional y/o anatómica y una lateralización neuroquímica es aún objeto de un intenso debate. La asimetría cerebral no es un fenómeno estático, sino es un concepto dinámico. Su presencia, su magnitud y el lado (izquierdo o derecho) predominante muestran cambios ultradianos (Meier-Koll, 1999), presentan variaciones fisiológicas estacionales (Wisniewski y Nelson 2000) y patológicas (Cohen *et al.*, 1992; Volf *et al.*, 1993) y también cambian durante el ciclo ovárico (Hausmann y Gunturkun 2000).

Además, la asimetría cerebral se modifica durante el desarrollo y el envejecimiento (Hellige, 1993; Saugstad, 1998; Dolcos *et al.*, 2002) y también se ha demostrado que diversos factores ambientales como, por ejemplo, la luz y la oscuridad o la presencia de estímulos de placer o dolor (Sullivan y Gratton, 1999; Verstynen *et al.*, 2001; Kline *et al.*, 2002). También se ha demostrado que algunas hormonas (Hellige, 1993), son moduladoras de la asimetría cerebral. Por otro lado, algunas alteraciones psiquiátricas, como la esquizofrenia, la depresión, el autismo infantil o la enfermedad de Alzheimer, se caracterizan por la presencia de alteraciones en determinadas asimetrías cerebrales (Ramírez *et al.*, 2004; Pepe *et al.*, 2014).

La capacidad de discriminación táctil de las manos izquierda y derecha presenta ritmos ultradianos endógenos, con una frecuencia de 2-3 h. Estos ritmos son diferentes según el hemisferio implicado: mientras que los ciclos de discriminación táctil de la mano derecha (controlada por el hemisferio izquierdo) tienen una frecuencia de 2 h, la discriminación táctil de la mano izquierda (controlada por el hemisferio derecho) es

modulada por períodos más largos, de aproximadamente 3 h. Esto sugiere que estos ritmos ultradianos asimétricos están implicados en la modulación de diversas funciones fisiológicas, perceptivas y cognitivas (Meier-Koll, 1999).

El ser humano también exhibe fluctuaciones estacionales en determinadas formas de procesamiento cognitivo. Durante la primavera, el análisis tanto de varones como de mujeres mostró modelos exagerados de asimetría cuando se comparaba con los resultados obtenidos durante el otoño. En este sentido, hay variaciones estacionales en las concentraciones de testosterona, pero las asimetrías estacionales en el procesamiento cognitivo no parecen estar relacionadas con estos cambios hormonales (Wisniewski y Nelson, 2000). Por otro lado, los pacientes con alteraciones afectivas estacionales se caracterizan por la alteración de los patrones normales en la asimetría cerebral, con cambios en la tasa metabólica de las regiones prefrontal y parietal (Cohen *et al.*, 1992). Algunos datos sugirieron que la depresión típica invernal está asociada con un cambio del predominio normal izquierdo del lenguaje hacia un mayor predominio del hemisferio derecho. Estas “anomalías” invernales en la lateralización cerebral parecen normalizarse tras sesiones de fototerapia, con alta intensidad lumínica (Volf *et al.*, 1993).

Las fases del ciclo ovárico en seres humanos también muestran importantes cambios en la asimetría cerebral. Mediante la utilización de diversas pruebas específicas para el estudio del hemisferio izquierdo o derecho, jóvenes voluntarias mostraron patrones muy notorios de lateralización cerebral durante la menstruación; sin embargo, hacia la mitad de la fase lútea, en la que las concentraciones de progesterona se encuentran elevadas, estos patrones de asimetría cerebral eran menos patentes y la organización cerebral era más “simétrica”. Después de la menopausia, cuando las concentraciones de hormonas gonadales son bajas y más estables, los patrones de lateralización eran similares a los de los varones y a los que presentaban las mujeres con un ciclo ovárico normal durante la menstruación. Según estos resultados, los autores sugirieron que las concentraciones constantes de esteroides sexuales, especialmente de progesterona, eran los causantes de la reducción de la asimetría cerebral (Hausmann y Gunturkun, 2000).

Se ha propuesto que el envejecimiento implica un mayor déficit funcional del hemisferio derecho que del izquierdo (se trata del modelo denominado de “hemienvejecimiento”), posiblemente debido a que el hemisferio derecho envejece antes o con más rapidez que el izquierdo (Hellige, 1993). El modelo de hemienvejecimiento y la reducción de la asimetría hemisférica en ancianos, denominado HAROLD (por sus siglas en idioma inglés de “hemispheric asymmetry reduction in old adults”) propone que la actividad frontal durante el procesamiento cognitivo tiende a estar menos lateralizada en ancianos que en adultos jóvenes (Dolcos *et al.*, 2002).

Se sugiere que las reducciones de la asimetría relacionadas con la edad pueden reflejar una compensación funcional entre los dos hemisferios y que ambos modelos de asimetría hemisférica y envejecimiento son compatibles. El modelo HAROLD podría aplicarse a las regiones prefrontales y el modelo hemienvejecimiento a otras regiones cerebrales (Dolcos *et al.*, 2002). Además, se ha propuesto que la asimetría del plano

temporal y la preferencia por emplear una u otra mano podrían predecir el índice de maduración del sistema nervioso central (SNC). La asimetría hacia la izquierda del plano temporal, la preferencia por usar la mano derecha y las ventajas cognitivas del hemisferio izquierdo indicarían una maduración más rápida. La asimetría del plano temporal hacia la derecha, la preferencia por usar la mano izquierda y la ventaja cognitiva del hemisferio derecho indicarían un retraso en la maduración; sin embargo, una mayor simetría del plano temporal y el hecho de ser ambidiestro representaría un índice de maduración intermedio (Saugstad, 1998). No sólo los factores endógenos y ambientales cíclicos son moduladores de la asimetría cerebral, sino que algunos estímulos específicos transitorios pueden determinar el grado de la asimetría y el lado de predominio. Se ha descrito que los olores agradables producen mayor activación del lóbulo frontal izquierdo, en comparación con el efecto que producen olores desagradables o neutros. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la región frontal izquierda del cerebro está involucrada en reacciones emocionales positivas de acercamiento (Kline *et al.*, 2002).

La corteza prefrontal medial se activa intensamente ante una situación de estrés y es moduladora de las funciones neuroendocrinas y autónomas. En ratas sometidas al estrés de inmovilización, mientras que las lesiones bilaterales o del lado derecho de la corteza prefrontal medial reducían la consecuente respuesta neuroendocrina y autónoma, las del lado izquierdo no la modificaban. Estos resultados sugieren que, para generar las respuestas neuroendocrina y autónoma, el estrés produce esencialmente una activación de la corteza prefrontal derecha (Sullivan y Gratton, 1999). Además, se ha demostrado que en las primeras etapas de la vida, determinados estímulos, breves y transitorios, son capaces de modular el desarrollo de algunas asimetrías cerebrales. En concreto, estos estímulos incrementaron, en edades adultas, la asimetría de predominio derecho que se observa en el volumen del hipocampo derecho (Verstynen *et al.*, 2001).

ASIMETRÍA NEUROQUÍMICA DEL CEREBRO

Se ha demostrado que el contenido de noradrenalina está distribuido de forma asimétrica en el tálamo humano. En la región pulvinar, el hemisferio izquierdo contiene mayor concentración de noradrenalina que el derecho; sin embargo, la noradrenalina predomina en las áreas somato sensoriales del lado derecho (Oke *et al.*, 1978^{a,b}). En cerebros humanos, obtenidos *post mortem*, se demostró que la enzima colina acetil-transferasa (ChAT) y el neurotransmisor dopamina (DA) son significativamente mayores en el globo pálido izquierdo que en el derecho (Glick *et al.*, 1982). La ChAT predomina en el lóbulo temporal izquierdo del cerebro humano (Amaducci *et al.*, 1981). Usando ¹²⁵I-yodobenzamida y tomografía por emisión de fotones, se ha demostrado que existen más receptores dopaminérgicos tipo 2 en el cuerpo estriado derecho en comparación con el izquierdo, con lo cual los autores propusieron que la función motriz podría estar implicada en este tipo de asimetría (Larisch *et al.*, 1998).

La asimetría cerebral también puede estar relacionada con la conducta de rotación que se ha observado en los seres humanos. Durante la rutina diaria, los varones y las mujeres tienden a girar preferentemente hacia el lado izquierdo o hacia el derecho. El nivel medio

de rotación es mayor en las mujeres que en los varones. En los varones diestros, en los que el hemisferio izquierdo es el dominante, la rotación espontánea al caminar y los giros oculares se hacían en dirección derecha más que izquierda. Sin embargo, en las mujeres diestras (hemisferio izquierdo dominante) ambos giros se dirigían más hacia la izquierda que hacia la derecha (Bracha *et al.*, 1987^a). La rata hembra corre preferencialmente hacia la derecha, mientras que el macho, lo hace hacia la izquierda. Este hecho puede estar vinculado con la concentración de dopamina en los cuerpos estriados, la que es 15% mayor en el lado opuesto al que el animal corre (Glick *et al.*, 1982). El equivalente en los seres humanos del comportamiento de giro persistente que se observa en los animales a los que se les ha lesionado unilateralmente el cuerpo estriado, es el comportamiento de giro que se observa en pacientes con hemi parkinsonismo. Al igual que en las ratas lesionadas, los pacientes con la modalidad de la enfermedad de Parkinson en la que sólo está afectado un lado del cuerpo estriado presentan rotación espontánea hacia el lado del cuerpo estriado, que contiene menor actividad dopaminérgica (Bracha *et al.*, 1987^b). En el cerebro humano se ha descrito una asimetría cerebral de predominio derecho, asociada con procesos en los que interviene la serotonina como neurotransmisor (Arato *et al.*, 1991).

Algunas conductas también están relacionadas con las asimetrías bioquímicas. Por ejemplo, la rata hembra corre preferencialmente hacia la derecha, mientras que el macho, lo hace hacia la izquierda. Este hecho puede estar vinculado a la concentración de dopamina en los cuerpos estriados, la que es 15% mayor en el lado opuesto al que el animal corre (Glick *et al.*, 1982).

En la rata, la ligadura de la arteria cerebral media derecha, provoca hiperactividad en los animales, disminución de la concentración de noradrenalina en toda la corteza y el locus ceruleus, así como la dopamina en la sustancia negra; mientras que la ligadura de la misma arteria, pero del lado izquierdo no tiene efectos (Robinson, 1979).

En el pollo de 2 días de edad, la inhibición unilateral de la síntesis de proteínas con ciclohexamida o de neurotransmisores con glutamato, el hemisferio cerebral estriado modifica el aprendizaje por discriminación visual o la conducta copulatoria según el lado en que se inyecte el fármaco (Arnold y Bottjer, 1985). Estos resultados llevan a pensar que la respuesta asimétrica del animal a las drogas es el resultado de la distribución asimétrica de receptores relacionados con dichos fármacos (Geschwind y Galaburda, 1985).

La asimetría fisiológica puede ocurrir aunque no existan disimilitudes anatómicas; por ejemplo, el canto de las aves paserianas está controlado por el núcleo hiperestriado ventral del hemisferio izquierdo, que es anatómicamente simétrico. Este hecho sugiere que el patrón de las conexiones neurales es asimétrico, de tal forma que cada lado podría controlar diferente función. De hecho, cada lado de la siringe de esta ave controla en forma diferente la vocalización, ya que la sección del nervio hipogloso izquierdo altera el canto del ave, mientras que la sección del nervio derecho no tiene efectos significativos (Arnold y Bottjer, 1985).

ASIMETRÍA CEREBRAL EN LAS ALTERACIONES PSIQUIÁTRICAS

La asimetría cerebral se pone de manifiesto cuando se observa que determinadas alteraciones neuropsiquiátricas se caracterizan, en parte, por desequilibrios de algunas de las lateralizaciones interhemisféricas que en condiciones normales presenta el individuo sano (Serafetinides, 1965; Gainotti, 1972; Galin, 1974; Reynolds, 1983; Schaffer *et al.*, 1983; Galaburda *et al.*, 1985; Robinson *et al.*, 1985; Banki *et al.*, 1988; Jordan *et al.*, 1992; Hellige, 1993; Chiron *et al.*, 1995; Gur y Chin, 1999; Jones y Field, 1999; Scarone *et al.*, 1999; Wieddemann *et al.*, 1999; Highley *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1999; Vlachos y Karapetsas, 1999; Crow, 2000; Geroldi *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2000; Weinberg, 2000; Shirakawa *et al.*, 2001; Slap *et al.*, 2001; Sommer *et al.*, 2001; Atchley *et al.*, 2003; Audenaert *et al.*, 2003; Togay y Thompson, 2003; Welsh *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2008; Goldberg *et al.*, 2013; Pepe *et al.*, 2014;). El estudio de la esquizofrenia parece derivarse de anormalidades en la función del hemisferio izquierdo, en particular en el lóbulo temporal (Gur y Chin, 1999). Los pacientes normalmente presentan un “descenso” en la actividad eléctrica de esta área, es decir una mayor simetría, en la lateralización cerebral de esta zona (Sommer *et al.*, 2001). Los cambios incluyen anormalidades morfológicas (Highley *et al.*, 1999; Sommer *et al.*, 2001), funcionales (Crow, 2000; Sommer *et al.*, 2001) y neuroquímicas (Reynolds, 1983; Gur y Chin, 1999; Shirakawa *et al.*, 2001).

Se ha descrito la reducción significativa del tamaño de la circunvolución temporal superior izquierda en varones y mujeres con esquizofrenia (Highley *et al.*, 1999). Algunas asimetrías funcionales, como el uso de la mano izquierda o derecha y el lenguaje, también han sido descritas en la esquizofrenia. Tanto la preferencia en el uso de ambas manos (ambidiestros), como la preferencia en el uso de la mano izquierda (zurdos), pero no la preferencia de uso de la mano derecha (diestros), son significativamente mayores en pacientes con esquizofrenia en comparación con los controles sanos y también si se comparan con otros tipos de pacientes psiquiátricos. Además, el análisis de estudios específicos de audición dicótica también revelaron descenso de la lateralización en la esquizofrenia (Shirakawa *et al.*, 2001; Sommer *et al.*, 2001). Se han descrito asimetrías neuroquímicas en pacientes esquizofrénicos. Desde el punto de vista bioquímico, se han observado cambios en los receptores de serotonina en el lóbulo temporal izquierdo (Gur y Chin, 1999; Shirakawa *et al.*, 2001) y el incremento de dopamina en la amígdala izquierda (Reynolds, 1983).

En pacientes depresivos se sugiere mayor activación del hemisferio derecho en comparación con el izquierdo o, dicho de otro modo, de menor excitabilidad del hemisferio izquierdo, incrementándose por tanto la asimetría que hay en condiciones normales (Schaffer *et al.*, 1983; Jones y Field, 1999; Martin *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2000; Atchley *et al.*, 2003). Estudios electroencefalográficos (Schaffer *et al.*, 1983) y de neuroimagenología (Maeda *et al.*, 2000) muestran, en comparación con sujetos control, mayor activación frontal y prefrontal derecha en pacientes depresivos.

Por el contrario, otros estudios sostienen que la asimetría, que en condiciones normales presenta el volumen del lóbulo frontal, disminuye cuando aumenta la gravedad de la depresión (Kumar *et al.*, 2000). En estudios de procesamiento del lenguaje se ha demostrado que los estímulos dirigidos al hemisferio derecho en pacientes depresivos se procesaban de forma más rápida y exacta en relación con la opinión que estos enfermos expresaban ante palabras que conllevaban conceptos negativos; sin embargo, los sujetos control respondieron más rápida y exactamente a palabras que conllevaban conceptos positivos. Estos efectos no se observaron cuando los estímulos se dirigían al hemisferio izquierdo (Atchley *et al.*, 2003).

En este sentido, se ha sugerido que, en los varones, la exposición prenatal a una elevada concentración de testosterona se asocia con mayor tendencia a padecer estados depresivos (Martin *et al.*, 1999). Para la enfermedad de Alzheimer, se ha descrito un modelo anómalo de asimetría cerebral: mientras que en los sujetos control el hipocampo derecho es de mayor tamaño que el izquierdo, en los pacientes con la enfermedad de Alzheimer esta asimetría se reducía progresivamente en relación a la gravedad de la enfermedad (Geroldi *et al.*, 2000). Esto estaría de acuerdo con el modelo de hemienvejecimiento anteriormente descrito, en el que se postulaba que el envejecimiento normal lleva implícita mayor pérdida funcional del hemisferio derecho.

Otras alteraciones psiquiátricas y comportamientos anormales, como es el caso del síndrome de Down, el autismo infantil, las conductas suicidas, las situaciones de pánico o la anorexia nerviosa, menos estudiadas en relación con la asimetría cerebral, también presentan anomalías en algunos aspectos de la lateralización cerebral. En pacientes con síndrome de Down hay un predominio de zurdos y ambidiestros sobre los diestros (Vlachos y Karapetsas, 1999). Estos pacientes tienden a presentar una ventaja atípica para la percepción del habla a través del oído derecho y mayor procesamiento de ésta en el hemisferio izquierdo (Welsh *et al.*, 2003). En el autismo infantil, caracterizado entre otros aspectos por la presencia del deterioro en la comunicación, el lenguaje, las relaciones sociales y la capacidad de ficción, se presenta disfunción del hemisferio izquierdo, especialmente de las áreas corticales relacionadas con el lenguaje y la habilidad manual (Chiron *et al.*, 1995). Por otro lado, algunos comportamientos anormales en los que subyacen situaciones de extrema ansiedad, como el suicidio o el pánico pueden, en parte, ser explicados en términos de asimetría interhemisférica. Se ha sugerido que, según el déficit funcional del hemisferio derecho, la persona con tendencias suicidas presentaría un desplazamiento compensatorio hacia mayor actividad del hemisferio izquierdo. Este desplazamiento se manifestaría en la inversión del contenido asimétrico de diversos neurotransmisores y en la aparición de determinados comportamientos anómalos como, por ejemplo, tendencia a la disociación, percepción negativa del cuerpo o disminución de la sensibilidad al dolor, que conducirían al suicidio (Weinberg, 2000). En contraste con los pacientes con tendencias suicidas, los ataques de pánico se caracterizan por mayor activación frontal derecha en comparación con la izquierda (Wieddemann *et al.*, 1999). Algunos estudios interhemisféricos neuroquímicos también se han asociado con el suicidio. Así, en comparación con sujetos control, el

contenido de beta-endorfina mostró menores concentraciones en el lado izquierdo de las cortezas frontal y temporal, así como en el núcleo caudado de pacientes con tendencias suicidas (Scarone *et al.*, 1999). Se han referido valores aumentados de hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en el líquido cefalorraquídeo de pacientes depresivos (Banki *et al.*, 1988) y que la depresión se ha relacionado con la conducta suicida (Slap *et al.*, 2001). La asimetría que se observa en condiciones fisiológicas, en relación al contenido hipotalámico de TRH (predominio del lado izquierdo), desaparece en los pacientes con tendencias suicidas (Jordan *et al.*, 1992). En la anorexia nerviosa, mediante el uso de isótopos radiactivos, se ha observado una anomalía en la distribución bilateral de receptores serotoninérgicos. En comparación con voluntarios sanos, los pacientes con anorexia nerviosa se reduce significativamente la afinidad de la serotonina por los receptores tipo 5-HT_{2A}, en la corteza frontal izquierda (Audenaert *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que la lateralización, según el sistema emocional, sólo existe para algunos de los componentes de estos circuitos, en particular la activación de la corteza pre frontal. Así, se concibe que la corteza pre frontal derecha esté directamente implicada con el sistema de inhibición, mientras que la izquierda lo estaría con el sistema de aproximación. Esto quiere decir que los sujetos con asimetría derecha de la activación tónica de la corteza pre frontal tienen una tendencia a experimentar mayor intensidad de afecto negativo, en comparación con su contraparte izquierda. Así mismo, los individuos con la corteza pre-frontal derecha tónicamente más activa están predispuestos a ser más sensitivos a los estímulos amenazantes, inhibiendo su conducta y experimentando más afecto negativo (Silva, 2005). En relación con el daño frontotemporal-límbico izquierdo, la violencia está en parte determinada por el daño en las zonas izquierdas frontales, córtex temporal anterior, y las zonas amigdalares hipocámpicas del mismo lado. La evidencia empírica para esta hipótesis está basada en un gran número de estudios neuropsicológicos en sujetos habitualmente violentos y agresivos. Los estudios efectuados muestran 76% de este tipo de disfunciones en criminales están localizadas en las regiones frontales y temporales del cerebro. De estos, el 79% mostraban anomalías fronto-temporales lateralizadas a izquierda. Se han encontrado, en adolescentes violentos, localizaciones similares de actividad dominante de lóbulo temporal izquierdo (Valencia, 2007; Keune *et al.*, 2012).

LOS ASPECTOS ASIMÉTRICOS DE LA FUNCIÓN REPRODUCTORA

En las aves sólo el ovario izquierdo es funcional y la gónada derecha se reduce a una capa de tejido localizado por debajo de la vena cava. La ovariectomía provoca que la gónada derecha se diferencie en una glándula semejante a un testículo, en la cual se pueden observar espermatozoides (Benoit, 1923, Møller y Swaddle, 1997), en un ovario o en un ovotestes (Benoit, 1932, Kempnaers *et al.*, 2002).

En el murciélago nariz de hoja (*Macrotus californicus*) la ovulación ocurre predominantemente en la gónada derecha; el ovario contralateral tiene la capacidad de funcionar, sólo si se extirpa el ovario dominante (Blejer y Ehteshani, 1981). En el murciélago insectívoro *Pteronotus parnellii mexicanus* Miller, en el 96.2% de las veces

los embriones se encuentran implantados en el lado derecho del útero, que es bicorne, por lo que se reconoce una asimetría funcional que favorece al cuerno derecho del útero, siendo ambos ovarios funcionales (Garrido, 1984). En el quiróptero *P. rubigilosa* solamente el ovario derecho y el cuerno del útero correspondiente son funcionales en la totalidad de los casos (Wimsatt, 1979). Se ha descrito seis patrones básicos de asimetría funcional del aparato reproductor en murciélagos. Por ejemplo el patrón "Myotis" (*Vespertilionidae*) que se caracteriza porque la ovulación se presenta en igual proporción en ambos ovarios sin alternancia definida. El cuerno derecho del útero es dominante en el 100% de los casos y sólo en él se han encontrado embriones. Este cuerno normalmente es de mayor tamaño que el izquierdo en hembras paridas y se describe que el huevo originado en el ovario izquierdo siempre migra y se implanta en el lado derecho del útero. Las especies donde se presenta esta asimetría son monoestras y viven en latitudes templadas. Por otra parte, el patrón "Molósido" (*Molossidae*) muestra dominancia absoluta del cuerno y ovario derechos, donde el ovario izquierdo es más o menos atrófico, presentando gran cantidad de tejido intersticial. En las hembras que no han parido, los cuernos del útero son simétricos (Wimsatt, 1979).

En la cerda, se han observado diferencias bioquímicas entre el ovario derecho e izquierdo (Sánchez y Domínguez, 1994). La sangre venosa del ovario derecho llega a la vena cava inferior, mientras que la vena del ovario izquierdo entra en la vena renal izquierda (Gerendai y Halász, 1997).

Resultados experimentales de varios autores han mostrado que la regulación neuroendocrina que ejerce el hipotálamo sobre la función de uno y otro ovario es asimétrica (Cruz *et al.*, 1989, 1990^a, 1990^b, 1998, 2006, 2009; 2014; Domínguez *et al.*, 1988, 1998, 2011).

La cantidad de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal es significativamente mayor que en el izquierdo (Bakalkin *et al.*, 1984 Gerendai *et al.*, 1979).

No hay que dejar de considerar que esta asimetría funcional y bioquímica del hipotálamo puede ser el resultado de diferencias bioquímicas y anatómicas de las diversas señales neuroendocrinas que regulan la secreción de la GnRH, como pueden ser las que provienen del propio ovario, ya que la extirpación de uno de los ovarios aumenta significativamente el contenido de la GnRH en el hipotálamo del mismo lado que se extrajo el ovario (Gerendai *et al.*, 1979). La ovariectomía del lado derecho aumenta la asimetría en el contenido de la GnRH, mientras que la del lado izquierdo la disminuye (Gerendai *et al.*, 1979).

Además, la región preóptica responde de manera asimétrica a las hormonas esteroideas. El implante de estradiol en el lado derecho del área preóptica (POA) o el núcleo ventromedial de ratas hembras de 5 días de edad provoca masculinización cuando los animales llegan a la edad adulta. En cambio, cuando el estradiol se implanta en el lado izquierdo, ocurre pérdida de la feminización, ya que los animales carecen de ciclos estrales (Nordeen y Yahr, 1982).

Asimismo, el lado derecho del área hipotalámica anterior (AHA) parece jugar un papel más importante en el proceso de hipertrofia compensadora del ovario que el lado izquierdo, ya que en la rata ovariectomizada, la lesión por radiofrecuencia, es decir la inducción de la muerte neuronal de esta área mediante la utilización de un electrodo, del lado derecho previene la hipertrofia compensadora del ovario remanente, en tanto que del lado izquierdo no la modifica (Fukuda *et al.*, 1984); la lesión unilateral de esta misma área con ácido kaínico, bloquea la hipertrofia compensadora sólo si la lesión y la ovariectomía se realizan del mismo lado (Nance *et al.*, 1984).

Por el contrario en la rata prepúber el proceso de hipertrofia compensadora del ovario parece estar controlado por el hipotálamo izquierdo, ya que su deafferentación bloquea la hipertrofia compensadora del ovario, en tanto que la deafferentación del hipotálamo derecho no modifica este proceso (Nance *et al.*, 1983).

Es evidente que cada lado de POA-AHA regula la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario ipsilateral, siendo esta regulación asimétrica respecto al ovario contralateral, mientras que el hipotálamo medio (que comprende los núcleos arcuato y ventromedial) regula la ovulación de uno u otro ovario, de manera estimulante y asimétrica, la hipertrofia compensadora del ovario (Cruz *et al.*, 1989). En el animal intacto las regiones media y posterior del hipotálamo regulan en forma asimétrica el peso de los ovarios, ya que la lesión del lado derecho de estas áreas lo disminuye, mientras que el lado izquierdo lo aumenta (Cruz *et al.*, 1990^a).

Esta asimetría neuroendocrina descrita para la rata hembra, también existe en el macho. La extirpación del testículo derecho incrementa el contenido de GnRH en el núcleo arcuato y en la eminencia media del mismo lado, sin modificar la del izquierdo (Mizunuma *et al.*, 1983). El incremento en la concentración plasmática de la FSH, que se presenta después de extirpar uno de los testículos, depende de que se mantenga la conexión neural entre la gónada y el hipotálamo del mismo lado (Nance y Moger, 1982).

La prolactina es otra gonadotropina cuya síntesis y liberación está regulada en forma asimétrica. Tanto en el humano (Herman *et al.*, 1981) como en la rata (Gerendai *et al.*, 1984) la mastectomía modifica la concentración de prolactina en la sangre, fenómeno que depende de la mama extirpada. Si se extirpa la derecha, el animal presenta concentraciones muy elevadas de prolactina en la sangre (hiperprolactinemia); por el contrario, la ablación de la mama izquierda, provoca hipoprolactinemia (Gerendai *et al.*, 1984). Del mismo modo, la sección del nervio vago izquierdo, a la altura de las vértebras cervicales, incrementa la concentración basal de la hormona (Gerendai *et al.*, 1983).

No sólo cada lado del hipotálamo regula en forma lateralizada la función de una y otra gónada, sino que ésta responde de manera asimétrica a los mecanismos neuroendocrinos que la regulan. Así, el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo de la rata adulta es mayor que el derecho (Domínguez *et al.*, 1988); cuando se extirpa el ovario derecho, el número de animales que ovulan es significativamente menor que cuando se extirpa la gónada izquierda (Chávez *et al.*, 1987). En la cerda, el número

de receptores a la gonadotropina coriónica humana (hCG), la concentración de progesterona, la actividad de la β -N-acetil-D-glucosaminidasa y de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa son mayores en los cuerpos lúteos del ovario izquierdo que en los del derecho (Rao y Edgerton, 1984); la concentración de testosterona en la vena testicular aumenta al doble en el 58% de los animales hemicastrados del lado izquierdo, mientras que sólo ocurre en el 27% de los que fueron sometidos a la orquidectomía unilateral derecha (Frankel *et al.*, 1989).

La respuesta del ovario a la acción de las gonadotropina también depende de la integridad del nervio vago derecho e izquierdo, ya que cuando se deja el ovario izquierdo *in situ* y se secciona el nervio vago del mismo lado, aumenta la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario. Por el contrario, si se secciona este mismo nervio, pero el ovario *in situ* es el derecho, disminuyen estos parámetros. La sección del nervio vago del lado derecho no modifica la ovulación compensadora del ovario *in situ* (Chávez *et al.*, 1987) y reduce el grado de hipertrofia compensadora (Burden, 1978).

En el ovario de la rata prepúber, el número de fibras que contienen el péptido intestinal vasoactivo (VIP), péptido que estimula la liberación de los estrógenos, está regulada por POA-AHA, ya que la lesión del lado izquierdo, derecho o de ambos incrementa el contenido de VIP en el ovario izquierdo y no modifica las del derecho (Advis *et al.*, 1989).

El lado derecho de POA-AHA normalmente regula la secreción tónica-fásica de la GnRH y por ende, de las gonadotropinas, ya que en ratas con los receptores muscarínicos bloqueados mediante el implante de atropina en el lado izquierdo de POA-AHA, en diestro 1 o diestro 2, la ovulación se restablece por la inyección de gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG) o gonadotropina coriónica humana (hCG), después de una hora de haber sido tratadas con la atropina, o por la inyección de benzoato de estradiol a las 14:00h del diestro 2. (Cruz *et al.*, 1992). Estos resultados sugieren que la señal neural que surge o llega al lado izquierdo de POA-AHA modula la sensibilidad de los ovarios a las gonadotropinas (Cruz *et al.*, 2014). El bloqueo de los receptores muscarínicos en el lado derecho de POA-AHA en el día del estro y diestro 1, resulta en el incremento notable del número de folículos pre-ovulatorios atrésicos en el ovario ipsilateral. Con base en estos resultados se sugiere que la ausencia de la ovulación en ratas, con implante de atropina en el lado derecho de POA-AHA, fue la consecuencia de una oleada insuficiente de LH en el proestro (Cruz *et al.*, 1989, Cruz *et al.*, 1992). El papel de los receptores muscarínicos en POA-AHA es asimétrico y varía durante el ciclo estral (Cruz *et al.*, 1992).

En el ratón se han reportado un mayor número de neuronas GnRH en el lado derecho del cerebro (Inase y Machida, 1992). La expresión ARNm para la GnRH en el lado derecho de POA-AHA es mayor que en lado izquierdo a las 13:00 h del diestro-2 (Arteaga *et al.*, 2005).

Se ha mostrado que los genes que codifican para el RE α o para el RE β alcanzan su expresión máxima en días diferentes del ciclo estral y son asimétricos entre la porción

izquierda y derecha de POA-AHA. La expresión del ARNm del *Rea* presenta su máxima expresión en el lado derecho de POA-AHA en el día del estro a las 17:00 horas; mientras que la del *RE* ocurre de las 09:00 a las 13:00 horas del diestro-2 (Arteaga *et al.*, 2005).

La estimulación del sistema colinérgico de POA-AHA, mediante implantes de pilocarpina, tiene un efecto opuesto al bloqueo del sistema por atropina: en el día del estro, los implantes en el lado izquierdo provocan bloqueo de la ovulación, mientras que los del lado derecho no la afectan. En los días de diestro, tanto el implante del lado izquierdo o derecho impiden la ovulación; y en el día del proestro los efectos son muy semejantes a los observados en el día del estro (López *et al.*, 1997).

No sólo cada lado del hipotálamo regula en forma asimétrica la función de una y otra gónada sino que éstas responden de manera asimétrica a los mecanismos neuroendocrinos que la regulan. Así, el número de ovocitos liberado por el ovario izquierdo de la rata adulta es mayor que el del derecho (Domínguez *et al.*, 1988).

Cuando se extirpa el ovario derecho, el número de animales que ovulan es significativamente menor que cuando se extirpa la gónada izquierda (Chávez *et al.*, 1987). En la cerda, el número de receptores a la gonadotropina coriónica humana (hCG), la concentración de progesterona, la actividad de la β -N-acetil-D glucosaminidasa y de la glucosa-fosfato deshidrogenasa son mayores en los cuerpos lúteos del ovario izquierdo que en los del derecho (Rao y Edgerton, 1984). La concentración de testosterona en la vena testicular aumenta al doble en el 58% de los animales hemicastrados del lado izquierdo, mientras que sólo ocurre en el 27% de los que fueron hemicastrados del lado derecho (Frankel *et al.*, 1989).

Mediante la inserción dorsal de una aguja (25G) de acero inoxidable dirigida hacia la parte media del POA-AHA, se observó que la ovulación puede ser alterada, pero esto depende del día del ciclo y de la porción de POA-AHA en que se lleve a cabo el procedimiento experimental (Cruz *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2011, Reynoso, 2013).

Con este diseño experimental se mostró que en el día del estro, la inserción de la aguja en POA-AHA derecha provocó el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales tratados, mientras que la inserción en POA-AHA izquierda no indujo modificaciones, ya que el 80% de los animales ovula. El número de ovocitos, liberados por el ovario izquierdo disminuye en los animales con inserción de la aguja en POA-AHA izquierda, pero el peso de este ovario es semejante al grupo control. En cambio, en las ratas con inserción de la aguja en POA-AHA derecha, se observó aumento en el peso de los ovarios sin cambio en el número de ovocitos. Estos resultados se acompañaron del aumento del peso del útero (Cruz *et al.*, 2009).

En el diestro-1, la inserción de la aguja en POA-AHA izquierda o derecha resulta en el bloqueo de la ovulación en el 100% de los animales, así como en el aumento del peso de los ovarios y el útero. En las fases de diestro-2 y proestro, la inserción en POA-AHA de uno u otro lado no afecta la ovulación (Cruz *et al.*, 2009; Reynoso, 2013). Los efectos de la falta de ovulación por la inserción unilateral de la aguja en POA-AHA en las fases

de estro y diestro-1 se acompañan de un retraso de 24 horas en la secreción preovulatoria de la LH y de la FSH (Domínguez *et al.*, 2011).

El sistema colinérgico de POA-AHA regula de manera asimétrica la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, como resultado de la actividad asimétrica intrínseca del propio sistema. Durante el ciclo estral de la rata, en POA existe un ritmo colinérgico endógeno en la concentración de ACh. En el diestro-1 se presentan las concentraciones máximas de ACh y en diestro-2 las mínimas. En el diestro-1 y el proestro, se observaron diferencias asimétricas; es decir, el POA-AHA del lado derecho tiene más ACh que el izquierdo (Sánchez *et al.*, 1994).

La actividad de la colino-acetiltransferasa (CAT) (enzima que sintetiza a la acetilcolina) en POA-AHA derecha varía durante el ciclo estral; sus valores máximos se observan en el día del estro y sus mínimos en diestro-2. En cambio, la actividad de la CAT en POA-AHA izquierda no varía. Además, en estro, la actividad de la CAT en POA-AHA derecha es mayor que en la izquierda; y en diestro 2 esta relación se invierte (Sánchez *et al.*, 1994). La cantidad de sitios de unión (B_{max}) para la [3H]N-metil-escopolamina en membranas de tejido de POA-AHA cambia durante el ciclo estral. La mayor cantidad se midió en el estro y la menor en el proestro. En los días del diestro-2 y del proestro, la B_{max} del lado derecho fue menor que del izquierdo, llegando a ser indetectables en el proestro (Sánchez *et al.*, 1994).

En conjunto, estos resultados sugieren que varios sistemas de neurotransmisores modulan los efectos de las gonadotropinas sobre la ovulación y la capacidad de los ovarios para secretar hormonas esteroides. Además, la asimetría ovárica que resulta en la ovulación y la secreción hormonal, podría explicarse por las asimetrías en sus inervaciones. Debido a que hay un componente neural en cada ovario, suponemos que estas neuronas participan directamente, y en forma asimétrica, en la traducción de la información neural que llega a los ovarios.

Por lo tanto, aparte de la función desempeñada por las señales hormonales y la participación de la inervación de los ovarios en la regulación de sus acciones, para entender mejor los mecanismos neuroendocrinos que regulan las funciones del ovario se deben tener en cuenta las señales neuronales derivadas de cada ovario hacia el otro ovario; y de éstas hacia el SNC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Advis JP, Ahmed CE, Ojeda SR. (1989). Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal peptide (VIP) levels in the developing rat ovary. *Brain Research Bulletin*. 22:605-610.
2. Alves, N.T., Fukusima, S.S., Aznar-Casanova, J.A. (2008). Models of brain asymmetry in emotional processing. *Psychology and Neuroscience* 1, 63–66.

3. Amaducci L, Sorbi S, Albanese A, Gainotti G. (1981). Choline acetyltransferase (ChAT) activity differs in right and left human temporal lobes. *Neurology*. 31:799-805.
4. Arato M, Freeska E, Tekes K, MacCrimmon DJ. (1991). Serotonergic interhemispheric asymmetry: gender difference in the orbital cortex. *Acta Psychiatrica Scandinavica*. 84:110-1.
5. Arnold AP y Bottjer SW. (1985). Cerebral lateralization in birds. En: *Cerebral lateralization in nonhuman species*. Editor Glick, S.D., Academic Press, Inc. Orlando, Florida, p.p. 11-39.
6. Arteaga-López PR. (2005). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*. 21: 251-260.
7. Atchley RA, Hardi SS, Enloe A. (2003). Hemispheric asymmetry in the processing of emotional content in word meanings: the effect of current and past depression. *Brain and Language*. 84:105-19.
8. Audenaert K, Van Laere K, Dumont F, Vervaet M, Goethals I, Slegers G. (2003). Decreased 5-HT_{2a} receptor binding in patients with anorexia nervosa. *Journal of Nuclear Medicine*. 44:163-9.
9. Bakalkin GY, Tsibezov VV, Sjutkin EA, Veselova SP, Novikov ID y Krivosheev OG. (1984). Lateralization of LH-RH in rat hypothalamus. *Brain Research*, 296: 361-364
10. Banki CM, Bissette G, Arato M, Nemeroff CB. (1988). Elevation of immunoreactive CSF TRH in depressed patients. *American Journal of Psychiatry*. 145:1526-31.
11. Benoit J. (1923). Transformation expérimentale du sexe par ovariectomie précoce chez la poule domestique. *C R Acad Sci Paris* 177:1074–1077.
12. Benoit J. (1932). L'inversion sexuelle de la poule de terminée par l'ovaire gauche. *Arch Zool Exp Gen* 73:1–112.
13. Bleier WJ, Ehteshami M. (1981). Ovulation following unilateral ovariectomy in the California leaf-nosed bat (*Macrotus californicus*). *Journal of reproduction and fertility*. 63:181-183.
14. Bracha HS, Seitz DJ, Otemaa J, Glick SD. (1987)^a. Rotational movement (circling) in normal humans: sex difference and relationship to hand, foot and eye preference. *Brain Research*. 411:231-5.

15. Bracha HS, Shults C, Glick SD, Kleiman, JE. (1987)^b. Spontaneous asymmetric circling behavior in hemi-parkinsonism; a human equivalent of the lesioned-circling rodent behavior. *Life Sciences*. 40:1127-30.
16. Broca P. (1861). Remarques sur le siege de la faculte du langage articule, suivies d'une observation d'aphemie. *Bulletin Société Anatomique de París*. 6:398-407.
17. Broca P. (1881). Remarques sur le Siége de la Faculté du Langage Articulé, Suivies d'une Observation d'Aphémie (Perte de la Parole). *Bulletin Société Anatomique de París*. 6:330-57.
18. Burden H. (1978). Ovarian innervation. En: *The vertebrate ovary. Comparative Biology*. Editor R.E. Jones. New York, Plenum Press, pp. 615-638.
19. Chávez R, Cruz ME, Domínguez R. (1987). Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: effect of ipsi- and contralateral vagus nerves on the remaining ovary. *Journal of Endocrinology*. 113:397-401.
20. Chiron C, Leboyer M, Leon F, Jambaque I, Nuttin C, Syrota A. (1995). SPECT of the brain in childhood autism: evidence for a lack of normal hemispheric asymmetry. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 37:849-60.
21. Cohen RM, Gross M, Nordahl TE, Semple WE, Oren DA, Rosenthal N. (1992). Preliminary data on the metabolic brain pattern of patients with winter seasonal affective disorder. *Archives of General Psychiatry*. 49:545-52.
22. Crow TJ. (2000). Schizophrenia as the price that homo sapiens pays for language: a resolution of the central paradox in the origin of the species. *Brain Research Reviews*. 31:118-29.
23. Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of Endocrinology*. 123: 437-439.
24. Cruz ME, Morán JL, Jaramillo LP, Domínguez R. (1990^a). Differences in spontaneous ovulation in rats with unilateral lesion of the hypothalamus. *Brain Research Bulletin* 24; 739- 742.
25. Cruz ME, Chávez R, Rosas P, Lujambic MV, Morán LJ, Domínguez R. (1990^b). Diurnal changes in hypothalamic acetylcholinesterase activity during the oestrus cycle of the rat. *Medical Science Research*. 18: 137-138
26. Cruz ME, Castro J, Domínguez R. (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Endocrinology*; 133: 205-210.

27. Cruz ME, Arteaga PR, Huerta-Delgadillo M, Sánchez A, Domínguez R (1998). Differences in acetylcholine content, binding and affinity parameters of muscarinic receptors in the preoptic anterior hypothalamic area during the oestrus cycle of rat. *Medical Science Research*. 25: 823-825.
28. Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez JO, Chavira R, Domínguez R. (2006). The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 21; 4:43.
29. Cruz ME, Rodríguez D, Olvera E, Flores A, Galindo JL, Vázquez M, Domínguez R. (2009). Asymmetric effects of the unilateral section of dorsal POA-AHA on spontaneous ovulation. Program No. 81.18/CC11.39th Meeting of Society for Neuroscience. Chicago Illinois, pp: 17-21.
30. Cruz ME, Rodríguez D, Flores A, Domínguez R. (2014). The cholinergic system of the preoptic-anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way. *Endocrine*. DOI 10.1007/s12020-014-0266-2
31. Dolcos F, Rice HJ, Cabeza R. (2002). Hemispheric asymmetry and aging: right hemisphere decline or asymmetry reduction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 26:819-25.
32. Domínguez R, Cruz ME, Chávez R. (1988). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: *Growth factors and the ovary*. Editor A. Hirshfield. Plenum Press, Nueva York Cap. 39: 321-325.
33. Domínguez R, Cruz ME, Morán C. (1998). Differential effects of ovarian local anesthesia during proestrus, on the ovulation by the right or left ovary, normal and hemiovariectomized adult rat. *Journal of reproduction and fertility*. 113:185-190.
34. Domínguez R, Cruz-Morales SE. (2011). The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinology and Metabolic Syndrome S4:001*. doi:10.4172/2161-1017.S4-001.
35. Domínguez R, Cabrera E, Cárdena M, Flores A, Cruz ME. (2011). Differential effects of the section of dorsal connections to the anterior hypothalamus on FSH and LH surge secretion. 8th WOLD CONGRESS OF IBRO. CONVENTION CENTER. FIRENZE. ITALY
36. Frankel AI, Chapman JC, Cook B. (1989). Testes are asymmetric in the testicular hemicastration response of the male rat. *Journal of Endocrinology*. 122: 485-488.

37. Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya M, Arai Y. (1984). Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neuroscience. Let.* 51: 365-370.
38. Gainotti G. (1972). Emotional behavior and hemispheric side of the lesion. *Cortex* 8: 41-45
39. Galaburda A, Sherman G y Geschwind N. (1985). Cerebral lateralization: Historical note on animal studies en: *Cerebral lateralization in nonhuman species*. Editor Glick, S.D., Academic Press, Inc. Orlando Florida, p.p.1-10
40. Galin D. (1974). Implications for psychiatry of left and right cerebral specialization. *Archives of General Psychiatry.* 31:572-583.
41. Garrido Rodríguez D. (1984). Patrón de reproducción del murciélago insectívoro *Pteronotus parnellii mexicanus* Miller, 1902 (Chiroptera: Mormoopidae). *Revista de biología tropical.* 2:253-262.
42. Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U. (1979). LH-RH content changes in medio basal hypothalamus after unilateral ovariectomy. En: *Neuroendocrinology: Biological and Clinical Aspects. Proceeding of Sorono Symposia, Vol 19*, editores A. Polleri y R. MacLeod. New York. Academic Press, pp 97-102.
43. Gerendai I, Clement G, Prato A, Scapagnini U. (1983). Unilateral vagotomy induced hyperprolactinemia in male rats. *Neuroendocrinology Letters.* 5: 41-45.
44. Gerendai I, Drago F, Continella G, Scapagnini U. (1984). Effects of mastectomy and vagotomy on grooming behavior of the rat: possible involvement of prolactin. *Physiology and Behavior.* 33:1-4
45. Gerendai I. (1986). Laterality in the Neuroendocrine Systems. En: *Duality and unity of the brain. Unified functioning and specialization of the hemispheres*. Editor Ottoson, D., *Proceedings of an International Symposium held at The Wenner Gren Center, Stockholm.* 17-28.
46. Gerendai I, Halász B. (1997). Neuroendocrine asymmetries, *Frontiers in neuroendocrinology;* 18:354-381.
47. Geroldi C, Laakso MP, DeCarli C, Beltramello A, Bianchetti A, Soininen H. (2000). Apolipoprotein E genotype and hippocampal asymmetry in Alzheimer's disease: a volumetric MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 68:93-6.
48. Geschwind N, Levitsky W. (1968). Asymmetries of the right and left hemisphere in man. *Science.* 161:186-187.

49. Geschwind N y Galaburda M. (1985). Cerebral lateralization. Biological mechanisms. Associations and pathology: A hypothesis and a program for research. *Arch Neurol.* 42:428-459.
50. Glick SD, Ross DA y Hough LB (1982). Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain. *Brain Research.* 234: 53-63
51. Goldberg E. (2001). *The executive brain: Frontal Lobes and the Civilized Mind.*
52. Goldberg E, Roediger D, Kucukboyaci NE, Carlson C, Devinsky O, Kuzniecky R, Halgren E, Thesen T.(2013). Hemispheric asymmetries of cortical volume in the human brain.*Cortex.*49: 200-210.
53. Gur RE, Chin S. (1999). Laterality in functional brain imaging studies of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin.* 25:141-56.
54. Hausmann M, Gunturkun O. (2000). Steroid fluctuations modify functional cerebral asymmetries: the hypothesis of progesterone mediated interhemispheric decoupling. *Neuropsychologia.* 38:1362-74.
55. Hellige JB. (1993). *Hemispheric asymmetry: what's right and what's left.* London: Harvard University Press.
56. Herman V, Kalk WJ, de Moor NG, Levin J. (1981). Serum prolactin after chest wall surgery: elevated levels after mastectomy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*52:148-51.
57. Highley JR, McDonald B, Walker MA, Esiri MM, Crow TJ. (1999). Schizophrenia and temporal lobe asymmetry. A post-mortem stereological study of tissue volume. *The British Journal of Psychiatry.* 175:127-34.
58. Inase Y, Machida T. (1992). Differential effects of right-sided and left-sided orchidectomy on lateral asymmetry of LHRH cells in the mouse brain. *Brain Research.* 580: 338–340.
59. Jones NA, Field T. (1999). Massage and music therapies attenuate frontal EEG asymmetry in depressed adolescents. *Adolescence.* 34:529-34.
60. Jordan D, Borson-Chazot F, Veisseire M, Deluermoz S, Malicier D, Dalery J. (1992). Disappearance of hypothalamic TRH asymmetry in suicide patients. *Journal of Neural Transmission.* 89:103-10.
61. Kempnaers B, Peer K, Vermeirssen ELM, Robertson R J. (2002). Testes size and asymmetry in the tree swallow *Tachycineta bicolor*: a test of the compensation hypothesis. *Avian Science* 2: 1-8
62. Keune PM, van der Heiden L, Várkuti B, Konicar L, Veit R, Birbaumer N. (2012). Prefrontal brain asymmetry and aggression in imprisoned violent offenders. *Neuroscience Letters.* 2:191-1945.

63. Kline JP, Blackhart GC, Woodward KM, Williams SR, Schwartz GER. (2000). Anterior electroencephalographic asymmetry changes in elderly women in response to a pleasant and an unpleasant odor. *Biological Psychology*. 52:241-50.
64. Kumar A, Bilker W, Lavretsky H, Gottlieb G. (2000). Volumetric asymmetries in late-onset mood disorders: an attenuation of frontal asymmetry with depression severity. *Psychiatry Research*. 100:41-7.
65. Larisch R, Meyer W, Klimke A, Kehren F, Vosberg H, Muller-Gartner HW. (1998). Left-right asymmetry of striatal dopamine D2 receptors. *Nuclear Medicine Communications*. 19:781-787.
66. López E, Cruz M.E, Domínguez R. (1997). Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the rat. *Archives of Medical Research*. 28(3): 343-348.
67. Maeda F, Keenan JP, Pascual-Leone A. (2000). Interhemispheric asymmetry of motor cortical excitability in major depression as measured by transcranial magnetic stimulation. *The British Journal of Psychiatry*. 177:169-73.
68. Martin SM, Manning JT, Dowrick CF. (1999). Fluctuating asymmetry, relative digit length, and depression in men. *Evolution and Human Behavior*. 20:203-14.
69. Meier-Koll A. (1999). Lateralized ultradian rhythms of the right and left brain: temporal variations of tactile discrimination tested in German subjects. *Journal of Biosocial Science*. 31:221-31.
70. Mizunuma RL, De Palantis LR y McCann SM. (1983). Effect of unilateral orquidectomy on plasma FHS concentrations: Evidence for direct neural connection between testes and CNS. *Neuroendocrinology* 37: 219-296.
71. Møller, AP, Swaddle JP. (1997). *Asymmetry, developmental stability, and evolution*. Oxford University Press, Oxford.
72. Myslobodsky MS. (1983). *Hemisyndromes Psychobiology*. Neurology. Psychiatry. New York: Academic Press.
73. Nance DM, Moger WH. (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemi-castration. *Brain Research Bulletin* 8:299-302.
74. Nance DM, Bhargava M, Myatt GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Research. Bull.* 13: 651-655.
75. Nordeen EJ, Yahr P. (1982). Hemispheric asymmetries in the behavioral and hormonal effects of sexually differentiating mammalian brain. *Science*. 218: 391-393.

76. Oke A, Lewis R y Adams RN (1978^a). Hemispheric asymmetry of norepinephrine distribution in rat thalamus. *Brain Research* 188: 269-272.
77. Oke A, Keller R, Mefford I, Adams RN. (1978^b). Lateralization of norepinephrine in human thalamus. *Science*. 200:1411-3.
78. Pepe A, Dinov I, Tohka J. (2014). An automatic framework for quantitative validation of voxel based morphometry measures of anatomical brain asymmetry. *Neuroimage* 18:444-459.
79. Ramírez M, Alba F. (1993). Bases biológicas de la asimetría cerebral. *Revista de psicología general y aplicada*. 46:33-43.
80. Ramírez M, Prieto I, Vives F, De Gasparo M, Alba F. (2004). Neuropeptides, neuropeptidases and brain asymmetry. *Current Protein and Peptide Science*. 5:497-506.
81. Rao CV, Edgerton LA. (1984). Dissimilarity of corpora lutea within the same ovaries or those from right and left ovaries of pigs during the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Infertility*. 70: 61-66.
82. Reynolds GP. (1983). Increased concentrations and lateral asymmetry of amygdala dopamine in schizophrenia. *Nature*. 305: 527-9.
83. Reynoso JA. (2013). Estructuras nerviosas dorsales a POA-AHA que participan en la regulación de la ovulación. Tesis. Facultad de Estudios Superiores. UNAM.
84. Robinson RG. (1979). Differential behavioral and biochemical effects of right and left hemispheric cerebral infarction in the rat. *Science* 205: 707-710.
85. Robinson TE, Becker JB, Camp DM y Mansour A. (1985). Variations in the pattern of behavioral and brain asymmetries due to sex differences. En: *Cerebral lateralization in nonhuman species*. Editor Glick, S.D., Academic Press, Inc. Orlando, Florida, p.p. 185-231.
86. Sánchez MA, Lopez GM, Cruz ME, Tapi R, Domínguez R. (1994). Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Neuroreport*. 5: 433-434.
87. Sánchez MA, Domínguez R. (1994) Asimetrías en los sistemas nervioso, inmune y endócrino. *Archivos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (MEX)* 9:66-72
88. Saugstad LF. (1998). Int Cerebral lateralization and rate of maturation. *Journal of Psychophysiology*. 28:37-62.

89. Scarone S, Gambini O, Calabrese G, Sacerdote P, Bruni M, Carucci M. (1999). Asymmetrical distribution of beta-endorphin in cerebral hemispheres of suicides: preliminary data. *Psychiatry Research*. 32:159-66.
90. Schaffer CE, Davidson RJ, Saron C. (1983). Frontal and parietal electroencephalogram asymmetry in depressed and nondepressed subjects. *Biological Psychiatry*. 18:753-62.
91. Serafetinides EA. (1965). The significance of the temporal lobes and of hemispheric dominance in the production of LSD-25 symptomatology in man. *Neuropsychologia* 3:69-79
92. Shirakawa O, Kitamura N, Lin XH, Hashimoto T, Maeda K. (2001). Abnormal neurochemical asymmetry in the temporal lobe of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 25:867-77.
93. Silva J. (2005) Regulación emocional y psicopatología: el modelo de vulnerabilidad/resiliencia. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*. 3: 201-209.
94. Slap G, Goodman E, Huang B. Adoption as a risk factor for attempted suicide during adolescence. (2001). *Pediatrics*. 108: 30E.
95. Sommer I, Aleman A, Ramsey N, Bouma A, Kah R. (2001). Handedness, language lateralization and anatomical asymmetry in schizophrenia: meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry*. 178:344-51.
96. Sullivan RM, Gratton A. (1999). Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *The Journal of Neuroscience*. 19:2834-40.
97. Toga AW, Thompson PM. (2003). Mapping brain asymmetry. *Nature Reviews Neuroscience*. 4:37-48.
98. Valencia L. (2007). Asimetrías cerebrales en la psicopatología. *Perspectivas en psicología*. 3: 275-286.
99. Verstynen T, Tierney R, Urbanski T, Tang A. (2001). Neonatal novelty exposure modulates hippocampal volumetric asymmetry in the rat. *Neuroreport*. 12:3019-22.
100. Vlachos FM, Karapetsas AB. (1999). A developmental study of handedness in Down syndrome pupils. *Perceptual and motor skills*. 88:427-8.
101. Volf NV, Senkova NI, Danilenko KV, Putilov AA. (1993). Hemispheric language lateralization in seasonal affective disorder and light treatment. *Psychiatry Research*. 47:99-108.
102. Weinberg I. (2000). The prisoners of despair: right hemisphere deficiency and suicide. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 24:799-815.

103. Welsh TN, Elliot D, Simon DA. (2003). Cerebral specialization and verbal-motor integration in adults with and without Down syndrome. *Brain and Language*. 84:152-69.
104. Wernicke C. (1874). *Der Aphasische Symptomencomplex*. Breslau: Cohn and Weigert.
105. Wieddemann G, Pauli P, Dengler W, Lutzenberger W, Birbaumer N, Buchkremer G. (1999). Frontal brain asymmetry as a biological substrate of emotions in patients with panic disorders. *Archives of General Psychiatry*. 56:78-84.
106. Wisniewski AB, Nelson RJ. (2000). Seasonal variation in human functional cerebral lateralization and free testosterone concentrations. *Brain and Cognition*. 43:429-38.
107. Wimsatt, WA. (1979). Reproductive asymmetry and unilateral pregnancy in Chiroptera. *Journal of reproduction and fertility*. 56, 345-357.