



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

## Posgrado en Ciencias Biológicas

**Antagonismo de los receptores dopaminérgicos DA2  
presentes en el tejido ovárico de la rata adulta sobre la  
ovulación: un estudio del estrés oxidativo en la gónada**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Karla Nayelly González Quiroz

Directores:

Dra. Estela Cuevas Romero  
Dr. José Luis Morán Perales

Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2019



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Antagonismo de los receptores dopaminérgicos DA2  
presentes en el tejido ovárico de la rata adulta sobre la  
ovulación: un estudio del estrés oxidativo en la gónada**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

**Karla Nayelly González Quiroz**

Comité Tutorial

**Dra. Estela Cuevas Romero**

**Dr. José Luis Morán Perales**

**Dra. Berenice Venegas Meneses**

**Dr. Óscar González Flores**

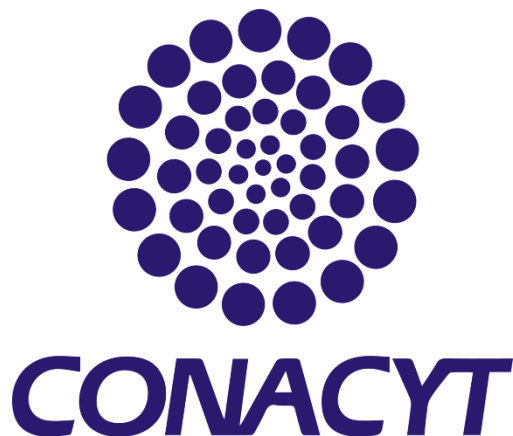
Tlaxcala, Tlax.

Diciembre, 2019



El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción (DBTR) del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección del Dr. José Luis Morán Perales (ICUAP-BUAP) y la Dra. Estela Cuevas Romero (CTBC-UATx)

Durante la realización del proyecto, la sustentante contó con el apoyo económico de la beca número 854110/632358 otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).





Universidad  
Autónoma de  
Tlaxcala

**Posgrado en Ciencias Biológicas**  
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

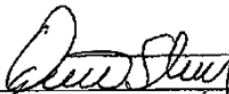


**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Karla Nayelly González Quiroz** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Antagonismo de los receptores dopaminérgicos DA2 presentes en el tejido ovárico de la rata adulta sobre la ovulación: un estudio del estrés oxidativo en la gónada”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., 31 DE OCTUBRE 2019

  
\_\_\_\_\_  
DR. OSCAR GONZÁLEZ FLORES

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO

  
\_\_\_\_\_  
DRA. BERENICE VENEGAS MENESES

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSÉ LUIS MORÁN PERALES

  
\_\_\_\_\_  
DRA. YOLANDA CRUZ GÓMEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:  
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, en el cual la Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca con número 854110/632358 que me fue otorgada para mis estudios de Maestría.

A continuación agradezco a los miembros del Comité Tutoral y a los miembros del Jurado por sus aportaciones a este trabajo de investigación:

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. José Luis Morán Perales

Dra. Berenice Venegas Meneses

Dr. Óscar González Flores

Dra. Yolanda Cruz Gómez

Dr. René Zempoalteca Ramírez

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco nuevamente al Doctor José Luis Morán Perales por apoyarme al aceptar ser mi director de Tesis, y una vez más aportar valiosos conocimientos y lecciones de vida para mi formación tanto profesional como personal, en el Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del Instituto de Ciencias.

Agradezco a la Dra. Estela Cuevas Romero por haberme brindado su valioso apoyo y asesoría durante mis estudios de Maestría, en el Centro Tlaxcala Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Agradezco al Bioterio “Claude Bernard” BUAP por haber proporcionado los animales utilizados en este proyecto de investigación.

Agradezco el apoyo que me fue proporcionado en todo momento por parte de todas las personas que colaboran en el Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del Instituto de Ciencias-BUAP.

Agradezco a la Dra. Berenice Venegas Meneses, al Dr. Alfonso Díaz Fonseca, al Dr. Samuel Treviño Mora y a todo su personal del Laboratorio de Análisis Clínicos y Especialidades Médicas los Angeles S.A. de C.V. por haber apoyado en la realización de los análisis bioquímicos necesarios para este proyecto.

Agradezco a mi compañero de Laboratorio y amigo MVZ. Jasiel Evani Olvera Herrera por ayudarme y colaborar conmigo durante la realización de mi tesis.

## DEDICATORIAS

*A mis padres, ni un millón de hojas me alcanzarían para poder escribir el inmenso cariño que les tengo.*

*A todas las personas que forman parte de mi familia, porque de nada sirve tener las más maravillosas experiencias sino tienes con quién compartirlas.*

*A todos mis sobrinos, ellos son la mejor la chispa y alegría de mi núcleo familiar, sino pongo nombres es porque ahora ya son tantos, y los que faltan...*

*A mis amigos, porque en los peores y mejores momentos sé que están ahí.*

*A mis queridas UVAS, a pesar de la distancia hemos podido aprender a conservar nuestra amistad y espero así siga siendo por un tiempo indefinido.*

## RESUMEN

En el presente trabajo se analizó el papel funcional del receptor dopaminérgico tipo 2 (RDA2), inducido por la microinyección local de su antagonista específico sulpirida, administrado a través de ambas bursas ováricas (MIB), sobre las principales funciones del ovario, así como el efecto de dicho bloqueo sobre la generación de indicadores de lipoperoxidación (malondialdehído y 4-hidroxi-alquenes) y de especies reactivas al oxígeno (ROS) en la gónada.

Para cumplir estos propósitos se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV de ciclo estral regular de cuatro días: diestro 1 (D-1), diestro 2 (D-2), proestro (P) y estro (E). A las 13:00h del D-1, D-2, P o E, diferentes grupos de animales recibieron una MIB con 20  $\mu$ L de solución de sulpirida (5 $\mu$ g/ $\mu$ L) por ovario y los grupos testigo recibieron la MIB con 20  $\mu$ L del vehículo (ácido ascórbico 0.1%) en cada ovario. En todos grupos se evaluó la duración del ciclo estral y el número de ovocitos liberados en la mañana del siguiente estro vaginal observado (EVO). Como grupo control absoluto, se utilizaron animales cíclicos intactos que se sacrificaron en la mañana del estro vaginal luego de presentar al menos, tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días.

La MIB con sulpirida realizada en el D-1 retrasó la presencia del estro vaginal un día (Sulpirida (n=8): 4.9 $\pm$ 0.1 días vs. Vehículo (n=8): 4.1 $\pm$ 0.1 días; p<0.03, U de Mann-Whitney), lo que no ocurrió en los otros días del ciclo. No se observaron cambios en el número de ovocitos liberados ni en el peso de las gónadas y el útero entre los grupos.

Los ovarios de cada grupo experimental fueron homogenizados para realizar las pruebas bioquímicas y estimar la concentración de los indicadores de lipoperoxidación y las ROS. En el grupo de animales cíclicos intactos, la producción de indicadores lipoperoxidación en el D-2 fue significativamente mayor respecto a los otros días del ciclo (D-2: 145.8 $\pm$ 15.2 nM/mg proteína vs D-1 + P + E: 83.0 $\pm$ 7.1 nM/mg proteína; p<0.05, U de Mann-Whitney). Comparados con un grupo de animales intactos, los indicadores de lipoperoxidación registrados en la mañana del EVO fueron significativamente menores en los grupos tratados con la sulpirida o el vehículo (Control: 101.2 $\pm$ 9.17 nM/mg proteína vs Sulpirida: 15.97 $\pm$ 2.90 o Vehículo: 27.31 $\pm$ 9.80 nM/mg proteína; p<0.05, Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn). Las concentraciones de ROS en los ovarios de los animales con vehículo, sacrificados en la mañana del EVO, mostraron concentraciones mayores respecto los grupos de animales intactos y con sulpirida (Vehículo: 2740.1 $\pm$ 558.5 nM/mg proteína vs Sulpirida: 216.5 $\pm$ 20.7 o Control: 313.1 $\pm$ 96.1 nM/mg proteína; p<0.05, Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

Los resultados indican que la sulpirida prolonga la duración del ciclo estral al afectar las señales endocrinas que se generan solo en la tarde del D-1 sin modificar la cuota ovulatoria, posiblemente por su influencia en la producción de progesterona durante la fase luteal. Por otra parte, el bloqueo a los RDA2 aparentemente no modifica la producción de las ROS, pero disminuye la de indicadores de estrés oxidativo en cualquier día del ciclo estral, lo que sugiere la presencia de un sistema suficientemente eficaz para controlar los mecanismos de óxido-reducción en la gónada.



## ÍNDICE:

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Estructura y Función del Ovario .....	1
1.2 Regulación Endocrina de la Función Ovárica .....	5
1.3 Relación Funcional entre el Ciclo Estral y Ciclo Ovárico .....	6
1.4 Papel de la Inervación en la Función Ovárica .....	12
1.5 Catecolaminas y la Función Ovárica: Dopamina .....	15
1.6 Receptores Dopaminérgicos en los Tejidos Ováricos .....	23
1.7 Bloqueo Farmacológico con Sulpirida a los Receptores Dopaminérgicos tipo 2 .....	26
1.7 Estrés Oxidativo y Funciones Ováricas .....	28
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	39
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	43
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	43
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	44
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	44
<b>6.1 Objetivo General</b> .....	44
<b>6.2 Objetivos Particulares</b> .....	44
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	45
7.1 Animales de Experimentación y Control del Ciclo Estral .....	45
7.2 Microinyección del antagonista específico: sulpirida sobre la ovulación espontánea y la secreción de gonadotropinas .....	46
7.3 Sulpirida: cuantificación de los indicadores de lipoperoxidación y especies reactivas al oxígeno en los ovarios .....	46
7.4 Análisis Estadístico .....	47
<b>8. RESULTADOS</b> .....	48
8.1 Efectos de la microinyección de sulpirida, en los diferentes días del ciclo	

estral sobre la ovulación espontánea y la duración del ciclo .....	48
8.2 Efectos de la microinyección de sulpirida en los diferentes días del ciclo estral, sobre la generación de indicadores de lipoperoxidación y las especies reactivas al oxígeno .....	50
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	66
<b>12. REFERENCIAS</b> .....	67
<b>13. ANEXOS</b> .....	81
<b>14. PUBLICACIONES</b> .....	81

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Estructura y Función del Ovario

El ovario de la rata adulta es un órgano que se encuentra suspendido del ligamento ancho uterino, en su pliegue peritoneal llamado mesovarium por el que discurren los vasos sanguíneos que se introducen en el ovario a través del hilio. Está altamente organizado, compuesto de células germinales (ovocitos) y células somáticas (tecales, granulosa y estroma) (Richards y Pangas, 2010). Está organizado internamente en dos zonas: una zona central llamada médula, la cual está rodeada por una prominente zona periférica conocida como corteza (Fawcett, 1995). La médula está formada por tejido conectivo laxo, rico en fibras elásticas que contienen muchos vasos sanguíneos, linfáticos y donde la foliculogénesis se inicia por ser una región que en su mayor parte esta innervada (Strauss y Williams, 2009) (Figura 1).

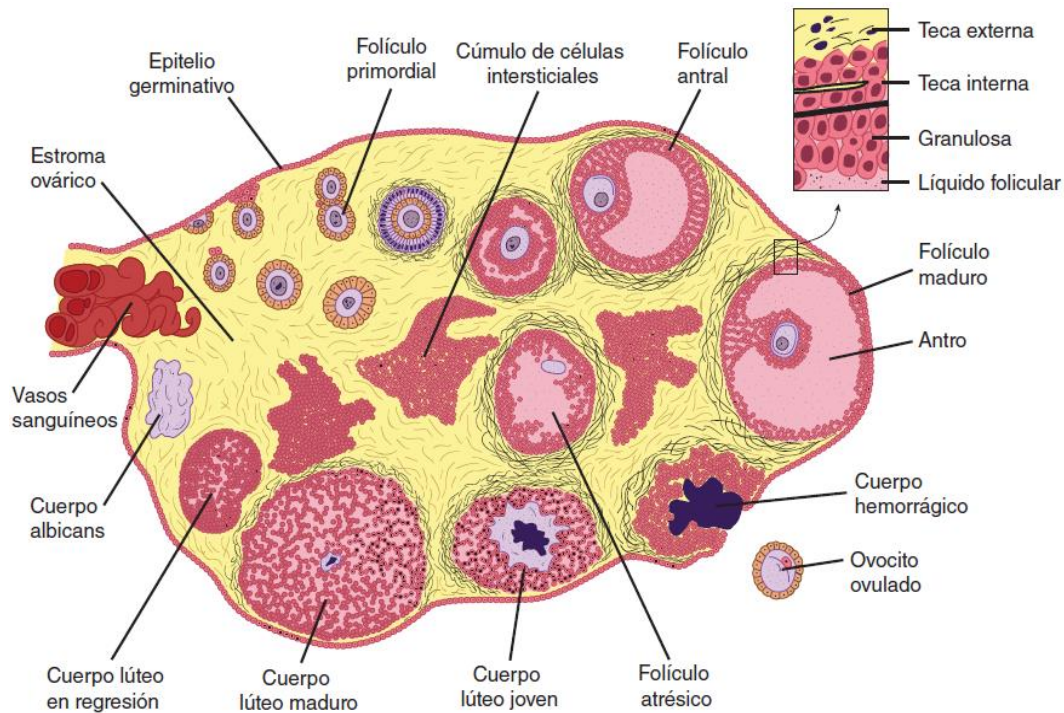


Figura 1. Estructura anatómica típica del ovario de los mamíferos. El ovario consta de una médula por la que transcurren vasos sanguíneos y nervios que conectan con los órganos funcionales de la corteza ovárica: folículos, cuerpos lúteos y tejido intersticial (Modificado de Yen y cols., 1999).

La corteza es una capa ancha interrumpida a nivel del hilio donde la médula se continúa con el tejido mesovárico. Está formada por tejido conectivo compacto en el cual están dispersas unas estructuras epiteliales características del ovario (Erickson, 1995) (Figura 1).

El ciclo de vida del ovario comprende las siguientes fases: embriogénesis, ovogénesis foliculogénesis, ovulación y luteogénesis (Erickson, 1995):

*\_Embriogénesis.* Las poblaciones de células germinales primordiales y células somáticas se encuentran aún integradas como un acumulo en el ovario.

*\_Ovogénesis.* La ovogénesis es el proceso de formación de los óvulos o gametos femeninos que tiene lugar en los ovarios de las hembras. Las células germinales diploides generadas por mitosis, llamadas ovogónias, se localizan en los folículos del ovario, crecen y tienen modificaciones, por lo que reciben el nombre de ovocitos primarios. Éstos llevan a cabo la primera división meiótica, dando origen una célula voluminosa u ovocito secundario que contiene la mayor parte del citoplasma original y otra célula pequeña o primer cuerpo polar. Estas dos células efectúan la segunda división meiótica; del ovocito secundario se forman otras dos células: una grande, que contiene la mayor parte del citoplasma original, y otra pequeña o segundo cuerpo polar. Los cuerpos polares se desintegran rápidamente, mientras que la otra célula se desarrolla para convertirse en un óvulo maduro haploide.

*\_Foliculogénesis.* La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) proveniente del hipotálamo aumenta los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH), que activa a los folículos primordiales para su crecimiento en folículos primarios, los cuales están compuestos por una sola capa de células de granulosa (Matsuda, 2012). Las células de granulosa secretan una membrana basal a lo largo de su superficie; las células de la teca derivadas del estroma que rodean a la capa de granulosa y se diferencian en dos capas teca interna y teca externa. Con el desarrollo del folículo, la capa de células de la granulosa secreta un líquido folicular o fluido antral que es un ultrafiltrado de plasma sanguíneo que forma una cavidad dentro del folículo denominado antro (Sutton y cols., 2003).

Característica que determina a un folículo secundario. La estadio final es el folículo terciario, el antro aumenta de tamaño y acumula gran cantidad de factores de crecimiento, hormonas peptídicas y esteroideas, proteínas, metabolitos energéticos y otras sustancias

desconocidas rodeado de una delgada capa de células de granulosa, el ovocito es cubierto por el *cumulus oophoro*. Los folículos maduros se localizan en la superficie del ovario.

\_ *Ovulación*. Uno de los procesos con que culmina el crecimiento y la diferenciación folicular es la expulsión del ovocito maduro y recibe el nombre de ovulación (Sutton y cols., 2003).

La ovulación es el proceso en el que el folículo maduro se rompe y libera a su ovocito. Es considerada como el resultado de un proceso inflamatorio localizado, ya que antes de que se produzca la salida del ovocito hay edema en la teca interna y muerte celular y aumento de las prostaglandinas en el área. Para que se produzca la ovulación, son necesarios varios cambios en la pared del folículo y en las relaciones entre las células de la granulosa y las tecales (Sutton y cols., 2003).

Por lo tanto la ovulación depende de una compleja sucesión de eventos neuroendocrinos en los que participan el hipotálamo, la hipófisis y el ovario. El control central del ciclo reside en la región arqueada del hipotálamo medio basal. Las neuronas de esta región tienen una actividad de la liberación pulsátil de la GnRH, que es transportada por los vasos del sistema portal-hipotalámico-hipofisiario al lóbulo anterior de la hipófisis (Hall, 2019).

Intervienen la FSH que estimula el desarrollo, la maduración y la diferenciación de los folículos ováricos y la hormona luteinizante (LH) que causa la ruptura del folículo maduro y la liberación del ovocito (Hall, 2019), las hormonas secretadas por el ovario, en particular los estrógenos; las hormonas de las suprarrenales y del timo, las hormonas tróficas y reguladoras de la energía como las hormonas secretadas por la tiroides y la hormona de crecimiento; y los neurotransmisores clásicos y peptidérgicos que llegan al ovario por los nervios o que son sintetizados en dicho órgano (Espey y Lipner, 1994). Esta característica física estimulada por un pico ovulatorio de GnRH e incrementar las concentraciones plasmáticas de FSH y LH. Esta última se eleva por un incremento progresivo de estradiol a la circulación (Espey y Lipner, 1994).

El surgimiento del pico de LH termina el crecimiento del folículo preovulatorio e inicia el proceso de ovulación (Richards y Pangas, 2010).

La LH inicia un grupo de eventos dentro del folículo como:

- a) Cambio de estradiol a progesterona como principal esteroide secretado.
- b) Reanudación de la meiosis de los ovocitos para generar el primer cuerpo polar.
- c) Transformación de la pared folicular para que el ovocito sea liberado.

*Luteogénesis.* Comienza después de la ovulación, cuando la pared folicular carente del ovocito se diferencia en una estructura endocrina, el cuerpo lúteo, que sufre apoptosis, secreta progesterona y en menores cantidades estradiol y estrógenos que inhiben la liberación tónica de GnRH en la fase luteal, por lo que el crecimiento folicular es detenido hasta el próximo ciclo ovulatorio (Erickson, 1995).

La comunicación entre los ovocitos y las células somáticas que están involucradas se establecen con la formación del folículo primordial. Las células de la granulosa proliferan durante las etapas siguientes de la foliculogénesis. La comunicación entre ovocitos y células de la granulosa está mediada por factores paracrinos secretados y uniones gap esto es esencial para la progresión del desarrollo de folículos, para la gametogénesis femenina, y el desarrollo embrionario después de la fertilización. Varios factores funcionan para promover o inhibir etapas específicas en esta progresión como son: la FSH; el factor en la línea germinal (FIG); el factor de diferenciación del crecimiento (GDF); y la sustancia inhibidora de Müller (MIS), (Strauss y Williams, 2009) (Figura 2).

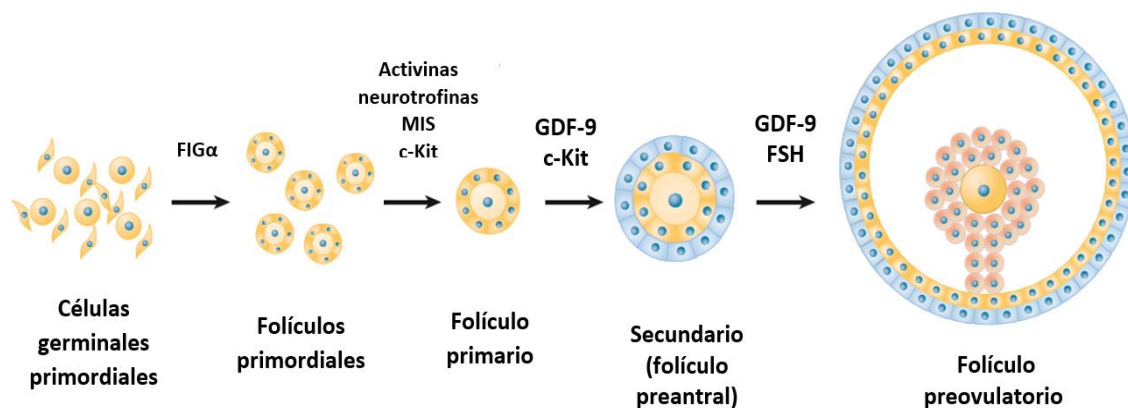


Figura 2. Factores implicados en la progresión de la foliculogénesis y la ovogénesis. Hormona folículo estimulante: FSH; factor en la línea germinal: FIG $\alpha$ ; factor de diferenciación del crecimiento: GDF-9; sustancia inhibitoria mülleriana: MIS (Modificado de Matzuk y cols., 2002).

## 1.2 Regulación Endocrina de la Función Ovárica

El eje hipotálamo-adenohipófisis-ovarios, se encarga de la síntesis, liberación y secreción de LH y FSH; la GnRH controla la liberación de las gonadotropinas en los roedores, por medio de las neuronas ubicadas en la región preóptica e hipotalámica anterior. La secreción de la GnRH está influida por factores internos (por ejemplo: neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas) y externos (por ejemplo: fotoperíodo, clima y nutrición) que actúan por distintas vías del SNC y alcanzan a los ovarios (Chaudhari y cols., 2018). A su vez, la secreción de la GnRH está regulada por acciones de retrocontrol en las cuales el papel de los esteroides gonadales desempeña papeles críticos.

Con base en el estudio de la biología reproductiva de la rata, actualmente es aceptado que los estrógenos ejercen un efecto *feedback* positivo en los circuitos neuroendocrinos que controlan la secreción de la GnRH, en cambio la progesterona controla la secreción de la GnRH ejerciendo un efecto *feedback* negativo sobre dichos circuitos (McEwen, 2001) (Figura 3).

Las hormonas ováricas pueden disminuir la liberación de gonadotropina al modular la frecuencia del pulso de la GnRH del hipotálamo y al observar la capacidad de la GnRH para estimular la secreción de gonadotropina desde la propia pituitaria (Chaudhari y cols., 2018). En la mujer, el estradiol aumenta la LH e inhibe indirectamente la liberación de la FSH, mientras que las *inhibinas A* y *B* (glucoproteínas de origen ovárico) reducen la secreción de FSH. Después de la ovulación, predomina la producción luteal de progesterona ovárica. La progesterona aumenta la actividad hipotalámica de opioides y retarda la secreción de GnRH, favoreciendo la producción de FSH y disminuyendo la liberación de LH (Chabbert y cols., 1998). La *inhibina B* alcanza su punto máximo en la fase folicular, mientras que la *inhibina A* alcanza su punto máximo en la fase lútea media.

El aumento de los niveles de *inhibina B* en la fase folicular media, actúa en el gonadotropo hipofisario para eliminar la señalización de *activina* y suprimir la biosíntesis de FSH de los niveles de fase folicular temprana. La disminución de la *inhibina A* al final de la fase lútea crea un entorno en el que los niveles de FSH pueden aumentar nuevamente (Molina, 2013) (Figura 3).

Neuromoduladores locales, como la noradrenalina, la dopamina y las  $\beta$ -endorfinas, juegan un papel fundamental en la secreción de GnRH. La noradrenalina estimula su secreción, y la dopamina,  $\beta$ -endorfina y opioides la inhiben (Chaudhari y cols., 2018).

Fallas en la inhibición de la producción de prolactina por parte de la dopamina, induce hiperprolactinemia lo que afecta la secreción de GnRH y provoca una disfunción ovulatoria con insuficiencia lútea con oligomenorrea a la amenorrea (Soule y Jacobs, 1995). El ácido gamma amino butírico (GABA) regula la menstruación, ovulación y fertilidad en mujeres, además la ausencia de receptores GABA funcionales compromete significativamente la reproducción en ratones (Catalano y cols., 2009). La leptina en mujeres, es capaz de regular la expresión de sus propios receptores a lo largo del eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario, bajos o altos niveles de leptina pueden alterar la función ovárica a través de una regulación positiva o negativa sobre sus receptores (Faletti, 2009) (Figura 3).

Asimismo, la ovulación requiere la presencia de mediadores locales como las citocinas, que participan en la respuesta inflamatoria. La IL-1 contribuye en la producción de prostaglandinas, progesterona, activador del plasminógeno, glucosaminoglicanos y en el aumento preovulatorio de la permeabilidad vascular (Flores y cols., 2001).

### **1.3 Relación Funcional entre el Ciclo Estral y Ciclo Ovárico**

El ciclo estral es un conjunto de procesos fisiológicos inducidos por las hormonas reproductivas (gonadotropinas y esteroides sexuales) que determinan el momento en el cual la hembra es receptiva a la cópula (Hafez y Hafez, 2000a).

El ciclo estral es un evento recurrente que determina el momento del celo en la hembra y está altamente sincronizado con el ciclo ovárico, que se define como un proceso determinado por las fases folicular (producción creciente de estrógenos) y luteal (producción creciente y condicionada de progestinas) separadas por la ovulación (Hafez y Hafez, 2000b).

Si la ovulación no se acompaña de la cópula y fertilización de los ovocitos, el ciclo estral se repite de manera paralela a los cambios cíclicos en la secreción de gonadotropinas y la resultante producción de esteroides sexuales que incidirán nuevamente en la aparición de la conducta de celo (Hafez y Hafez, 2000a).



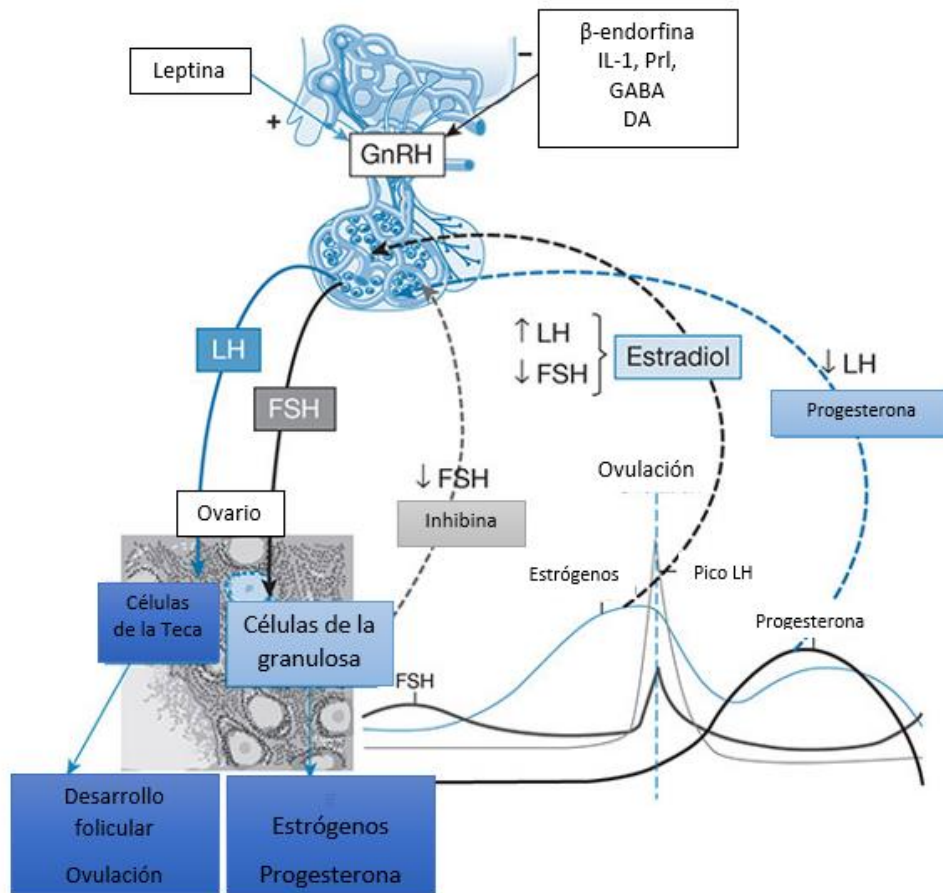


Figura 3. Diagrama del Eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovarios en la rata. La liberación pulsátil de GnRH estimula la liberación de LH desde la adenohipófisis. El pico de LH estimula el desarrollo folicular y la esteroidogénesis en el ovario. El aumento del nivel de estrógeno secretado por los folículos maduros estimula un aumento de GnRH en el proestro tardío, y luego de un pico de LH al terminar el proestro. El pico de LH provoca la ovulación durante las primeras horas de la fase del estro (Modificado de Molina, 2013).

### *Ciclo estral de la rata*

El ciclo estral de la rata no es como el de las demás especies, es único al tener una fase luteal breve y está determinado por un fotoperiodo (la luz influye en la incidencia y duración de las etapas del ciclo estral). Long y Evans en 1922 (citados por Freeman, 2006) analizaron alrededor de 1999 ciclos estrales en ratas de laboratorio y observaron que en promedio tuvieron una duración de 5.4 días con un rango de 3 a 38 días, si ellos excluían los ciclos de más de 8 días, la media era de 4.8 días que se comparaba favorablemente con los 4.4 días de Blandau, Boling y Young, y 4.5 días de Astwood (citados por Freeman, 2006). Con el frotis vaginal se pueden caracterizar sus fases por patrones celulares

describiendo así las fases (duración en días) del ciclo estral en diestro-1 y diestro-2, estro y proestro (Freeman, 2006) (Cuadro 1).

<b>Cuadro 1. Descripción general de las etapas del ciclo estral de la rata y su correlación con el ciclo ovárico (Freeman, 1988, 1994, 2006; Sánchez-Criado, 1999).</b>	
<b>Diestro-1</b> (Metaestro y Diestro temprano: 32 h)	La concentración de plasma de la LH y la FSH son bajas. Hay folículos en todas etapas de crecimiento. La rata hembra no permite la cópula. Las secreciones de progesterona por el cuerpo lúteo y la del estradiol por los folículos también son las más bajas respecto a otras fases del ciclo. La vascularización y motilidad del útero están disminuidas. En el frotis vaginal se aprecian gran cantidad de leucocitos junto con un gran número de células epiteliales nucleadas y células escamosas cornificadas. Los leucocitos son pequeños y tienen un citoplasma granular y por lo general contienen un núcleo vesicular. Durante este día comienza el establecimiento de un cuerpo lúteo funcional (Figura 4-A).
<b>Diestro- 2</b> (24 a 26h)	De manera similar que la fase anterior, las progestinas inhiben la secreción basal de gonadotropinas, pero el crecimiento folicular continúa. El cuerpo lúteo alcanza la máxima producción de progesterona hasta la mitad del día, que en la ausencia de cópula regresa acompañado de un decremento en las concentraciones plasmáticas de progesterona y el ascenso de los estrógenos a partir de la tarde de este día. Esto resulta en la estimulación de la enzima aromatasa por la FSH, que estimula la división mitótica de las células de la granulosa, lo que se traduce en el crecimiento de los folículos que ovularán en ese ciclo. El útero es pequeño, anémico y no contráctil. La apariencia del frotis vaginal es similar a la del diestro-1 (Figura 4-B).
<b>Proestro</b> (12 a 14 h)	Los folículos que han crecido óptimamente y no han degenerado han adquirido la forma de folículos preovulatorios y secretan grandes cantidades de estradiol. Los estrógenos ejercen un efecto estimulante (retroalimentación positiva) sobre la secreción de gonadotropinas. En la mañana de este día, las concentraciones plasmáticas de los estrógenos suben progresivamente y alcanzan un máximo, para disminuir en forma repentina al final de la fase luminosa, hecho que estimula la secreción preovulatoria de GnRH. Este evento estimula la liberación pre-ovulatoria de la FSH y de la LH (la liberación de FSH ocurre ligeramente antes que la descarga pre-ovulatoria de la LH. En la tarde de este mismo día, se alcanzan las máximas concentraciones de estas hormonas). El pico en la concentración plasmática de la LH estimula en el ovario la síntesis del plasminógeno que inicia los mecanismos celulares que llevan al rompimiento de la pared del folículo y expulsión del ovocito horas más tarde. Las células intersticiales y los folículos preovulatorios secretan progesterona, la cual favorece la conducta sexual asociada al apareamiento. La LH induce la ovulación y la luteinización del folículo postovulatorio. El útero, se hace extremadamente contráctil. En la citología vaginal, esta fase se caracteriza por la presencia dominante de células epiteliales nucleadas, redondas, con un núcleo definido, de vez en cuando aparecen unas cuantas células epiteliales escamosas cornificadas y ausencia de leucocitos (Figura 4-C).
<b>Estro</b> (25 a 27h)	La cópula es aceptada solo en el proestro tardío, con el comienzo de la fase oscura y el incremento de las concentraciones de progesterona. La secreción sostenida de la FSH en la mañana del día estro, se debe a la disminución de la secreción folicular de inhibina y se estimula el crecimiento folicular. Durante el celo, la hembra acepta el acercamiento, la monta y la cópula por el macho. Durante la fase oscura de este día ocurre la ovulación, los óvulos se encuentran en el oviducto. El folículo post-ovulatorio comienza a transformarse como cuerpo lúteo, mientras una nueva serie de folículos primarios comienzan a desarrollarse. En la mucosa vaginal se encuentran numerosas mitosis, que desplazan a las capas más superficiales (epitelio escamoso y cornificado), que son exfoliadas a la luz de la vagina. La presencia de estas células en el frotis vaginal es indicativa de que el estro ocurrió y signo de la probable ovulación. Las células epiteliales cornificadas son las dominantes en esta fase (Figura 4-D).

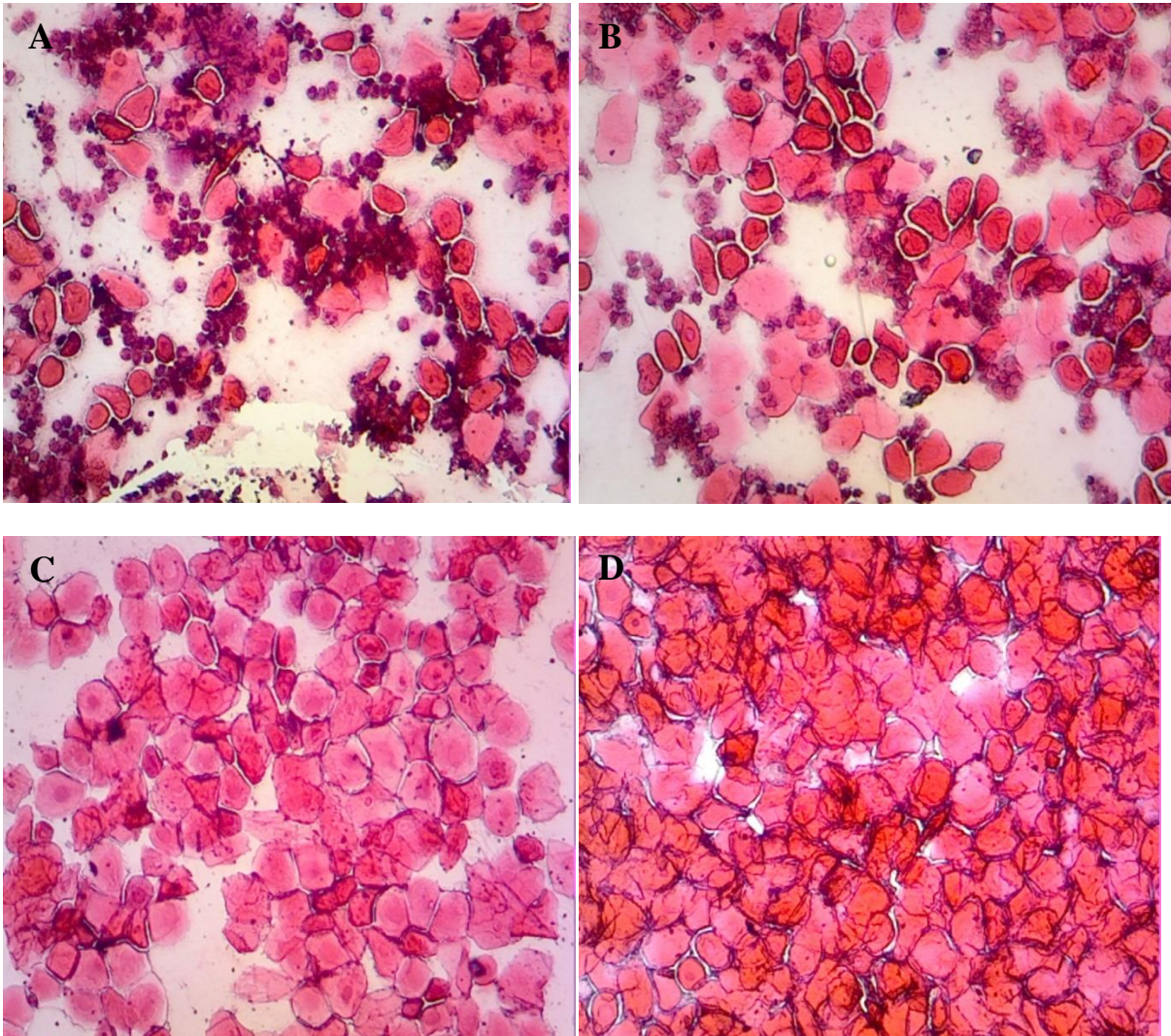


Figura 4. Ciclo estral estimado por el aspecto de la citología vaginal de la rata hembra adulta, observado al microscopio al 100X. A y B) Diestro Vaginal, presencia relativamente alta de leucocitos, pocas células epiteliales cúbicas con núcleos bien definidos y algunas células cornificadas del epitelio vaginal; C) Proestro Vaginal, predominio de células epiteliales cúbicas con núcleos bien definidos, algunas células cornificadas pero ausencia de leucocitos; D) Estró Vaginal, presencia de células sin núcleo – escamas – producto de la cornificación del epitelio vaginal, muy pocas células epiteliales con núcleos bien definidos. Foto obtenida en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Instituto de Ciencias-BUAP.

Dado que este ciclo conductual ocurre de manera sincrónica con el ciclo ovárico puede ser analizado con base en los cambios citológicos que sufre el epitelio vaginal a lo largo del ciclo estral (Maeda y cols., 2000) (Figuras 4 y 5).

En todos los mamíferos, el ciclo ovárico se divide en dos fases (Sánchez-Criado, 1999):

1) la *fase luteal*, en la cual todos los eventos postovulatorios conducen a la formación y consolidación del cuerpo lúteo pero la hembra permanece no receptiva a la cópula. Las concentraciones plasmáticas de progesterona crecen hasta un punto máximo pero las de los estrógenos son relativamente bajas; la secreción de gonadotropinas se mantiene en niveles basales por el efecto de retroalimentación negativa de las progestinas.

En el ovario se encuentran folículos pequeños y medianos pero cuerpos lúteos en desarrollo hasta alcanzar su mayor consolidación en la secreción de progestinas.

2) la *fase folicular*, que se inicia con la regresión del cuerpo lúteo y la concomitante caída en la secreción de progestinas, es caracterizada por el incremento gradual de la producción de estrógenos y su efecto de retroalimentación estimulante sobre el hipotálamo y la adenohipófisis, las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas se mantienen relativamente bajas hasta que los estrógenos alcanzan su máxima concentración en el sistema, y en el ovario los folículos alcanzan su máximo desarrollo, cuando esto ocurre, la concentración plasmática de estrógenos desciende súbitamente, la progesterona producida por los folículos preovulatorios se incrementa interrumpiendo la descarga de GnRH en el hipotálamo y de las gonadotropinas en la adenohipófisis, esta serie de acontecimientos explica la presencia del pico preovulatorio de la LH, fenómeno necesario para inducir la ruptura de la pared folicular y la ovulación.

Como se señaló en líneas anteriores, la actividad del ovario durante el ciclo estral es regulada por gonadotropinas que son secretadas por la adenohipófisis en la rata hembra.

Los perfiles de plasma de LH muestran una fluctuación pulsátil. En la rata hembra, la frecuencia de pulsos de LH varía durante el ciclo estral. Los pulsos de frecuencia de la LH son más altos en el proestro y más bajos en el estro (Gallo citado por Maeda y cols., 2000). Se ha visto que cada pulso de GnRH en el hipotálamo medial basal corresponde a un pulso de LH en la adenohipófisis (Maeda y cols., 2000). La concentración de estrógenos se incrementa junto con el desarrollo folicular en el inicio del proestro. La oleada de 17- $\beta$ -estradiol comienza en la mañana del proestro y culmina en por la tarde de este día. El pico de progesterona sigue a un pico de estrógenos y resulta en la descarga preovulatoria de la LH (Maeda y cols., 2000) (Figura 5).

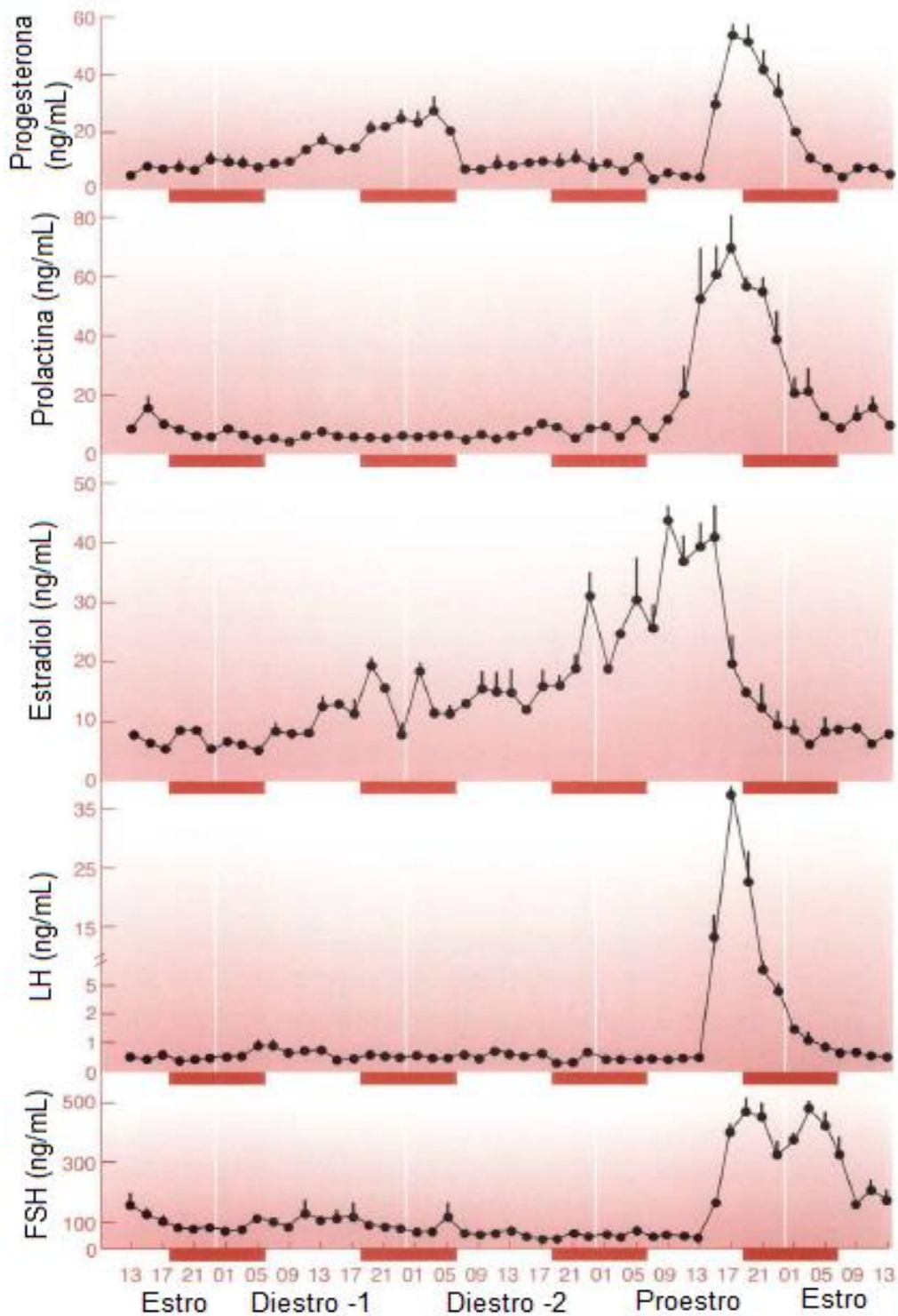


Figura 5. Perfiles hormonales durante el ciclo estral (4 días) en la ratona adulta. Las barras rojas horizontales y las líneas indican el periodo de oscuridad (18:00-6:00) y medianoche. Los valores indican  $\pm$  SEM. LH hormona luteinizante, FSH hormona foliculoestimulante (Modificado de Smith y cols., 1975).

Las funciones ováricas, como la secreción de hormonas y la producción de gametos (ovocitos) que pueden fertilizarse, están reguladas por señales hormonales que se originan en la glándula hipofisaria, las glándulas adrenales, la tiroides, el páncreas, el timo y por el mismo ovario (Williams y Erickson, 2012). En los ovarios, la FSH actúa sobre las células de la granulosa en el folículo, estimula el crecimiento y la maduración folicular, la síntesis de aromatasa que resulta en la secreción de estrógenos y los receptores de LH a las células de la granulosa (Molina, 2013).

La LH estimula la secreción de progesterona y andrógenos por las células de la teca intersticiales. Los andrógenos son los precursores de la secreción de estrógenos. La LH que actúa sobre los folículos maduros estimula la secreción de aromatasa y estrógenos, y la ovulación (Williams y Erickson, 2012).

#### **1.4 Papel de la Inervación en la Función Ovárica**

La inervación ovárica está dada por que el nervio ovárico superior (NOS), nervio plexo ovárico (NPO) y nervio vago (NV), los cuales modulan la reacción de los tres compartimentos ováricos (folicular, luteal e intersticial) a las señales hormonales. La regulación de las funciones ováricas son el resultado del ingreso de señales neurales e implican la liberación secuencial y ordenada de uno o más neurotransmisores, a una frecuencia y amplitud particulares (Domínguez y Cruz-Morales, 2011).

Existe evidencia de que los ovarios envían información neuronal a varias regiones del SNC y se especula que esta información participa en la regulación de la secreción de gonadotropinas (Tóth y cols., 2008). Además, los ovarios comparten información neuronal utilizando como intermediarios a los ganglios mesentéricos celíacos superiores (GC-GM) (Uchida, 2015) (Figura 6).

La participación del nervio vago en las inervaciones ováricas se ha demostrado inyectando peroxidasa de rábano picante en los ovarios izquierdo o derecho (Burden y cols., 1983), o utilizando la técnica de rastreo viral transneuronal (Tóth y cols., 2007; Tóth y cols., 2008). Los estudios que utilizan la técnica de rastreo viral transneuronal han demostrado la existencia de neuronas en varios núcleos del tronco encefálico y el hipotálamo, lo que indica que reciben o envían señales neuronales a los ovarios. Estas

neuronas se encuentran en la médula ventrolateral, el núcleo gigantocelular, el área postrema, núcleo vagal del tracto solitario, el núcleo dorsal del vago, los grupos de células noradrenérgicas A<sub>1</sub> y A<sub>5</sub>, los núcleos del rafe caudal, el *locus coeruleus*, el núcleo paraventricular hipotalámico y el hipotálamo lateral (Tóth y cols., 2007)

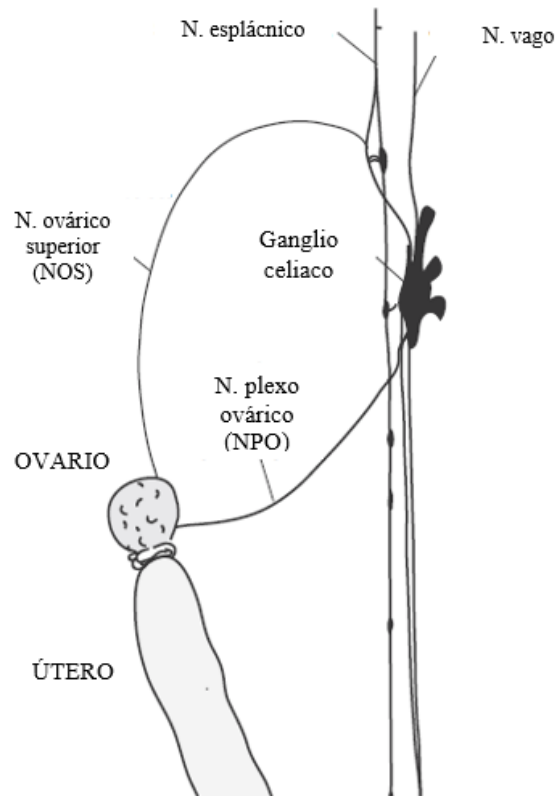


Figura 6. Ilustración anatómica que muestra la inervación del ovario por el nervio ovárico superior (NOS) y el nervio plexo ovárico (NPO) (Modificado de Uchida, 2015).

Además, algunas neuronas están conectadas simultáneamente con los ovarios y las glándulas adrenales, lo que sugiere que las glándulas adrenales también participan en la regulación de las funciones ováricas a través de señales hormonales y neuronales (Morán y cols., 2005; Tóth y cols., 2008; Gerendai y cols., 2009).

Varios neurotransmisores y las enzimas que participan en su síntesis o degradación (como noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolinesterasa, GABA, polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P (SP), neuropéptido Y (NPY), colecistoquinina-8, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la hormona liberadora de

corticotropina (CRH) están presentes en las fibras que inervan la teca interna de los folículos, las células intersticiales y la vasculatura ovárica (Aguado, 2002; Kiapekou y cols., 2010).

#### *Nervio ovárico superior*

El NOS libera noradrenalina en los ovarios y participa en la maduración folicular, regulando los niveles de estradiol y progesterona (Aguado y cols., 1984; Chávez y cols., 1991; Morán y cols., 2000; Zhang y cols., 2010).

La inyección de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) en ratas con un corte unilateral del NOS dio como resultado tasas de ovulación más bajas por parte del ovario denervado y tasas de ovulación normales por parte del innervado (Chávez y cols., 1991).

#### *Nervio vago*

En ratas adultas, la participación de la información vagal que regula la ovulación es asimétrica y varía durante el ciclo estral y la hora del día (Cruz y cols., 1986; Everardo y cols., 2011). Los resultados indican que las manipulaciones vagales realizadas al comienzo del ciclo estral (estro y diestro 1) inducen cambios más fuertes en la ovulación que las manipulaciones durante la segunda mitad del ciclo (diestro 2 y proestro), además, el ovario izquierdo es más sensible a los cambios en la inervación ovárica que el derecho (Chávez y cols., 1989) (Figura 7).

#### *Nervio Plexo ovárico*

El NPO inerva los ovarios, bursas y oviductos (Payer, 1978) y los cuernos uterinos craneales (Lawrence y Burden, 1980); los axones entran a través del hilio e inervan la región medular y cortical del ovario (Hanada y cols., 2011; Uchida y cols., 2005). El NPO está compuesto principalmente por fibras simpáticas y sensoriales, con una pequeña porción de fibras parasimpáticas (Klein y Burden, 1988; Uchida y cols., 2005; Gerendai y cols., 2009).



Las vías neurales y los ganglios simpáticos involucrados en la comunicación entre los ovarios y las neuronas preganglionares son diferentes en el lado izquierdo y derecho (Pastelín y cols., 2017) (Figuras 6 y 7).

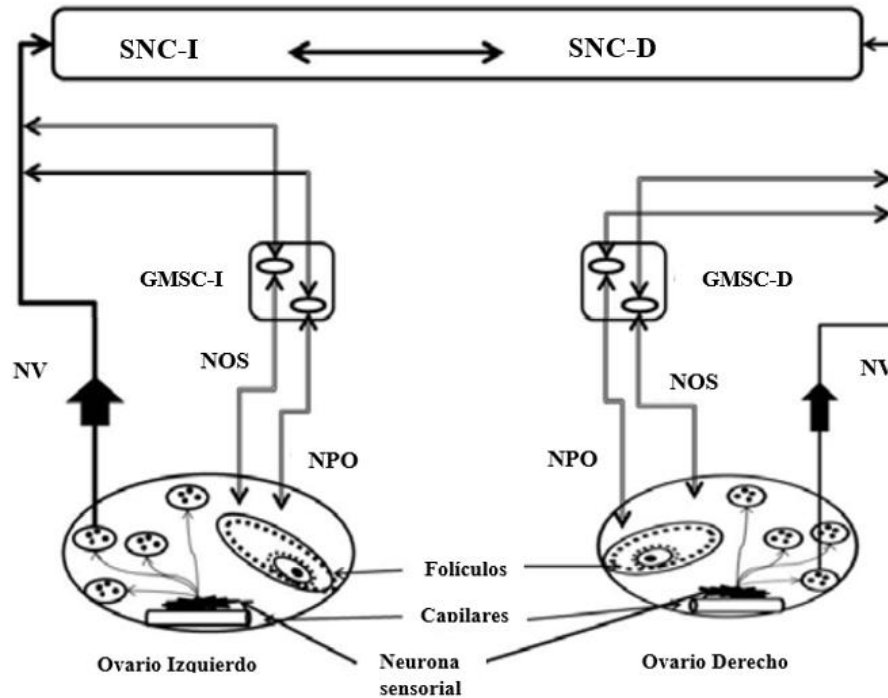


Figura 7. Las vías neurales se conectan de forma dual, el nervio vago con los ganglios mesentéricos (GMSC) superiores celiacos derecho e izquierdo. El GMSC se conecta de forma dual con los ovarios a través del nervio ovárico superior derecho e izquierdo (NOS) y el nervio plexo ovárico (NPO). Sus terminaciones llegan a los vasos sanguíneos, al tejido intersticial y cerca de los folículos. En la pared de los capilares, se encuentran ubicadas neuronas sensoriales, que actúan como sensores químicos que registran cambios en la cantidad de señales químicas que surgen de los folículos en crecimiento y maduración. El nervio vago transporta información neural originada en los ganglios ováricos al SNC izquierdo y derecho, que a su vez tiene una comunicación neural entre ellos. El ovario izquierdo envía una mayor cantidad de información neural al SNC que el ovario derecho (Modificado de Domínguez y Cruz-Morales., 2011).

### 1.5 Catecolaminas y la Función Ovárica: Dopamina

Se sabe desde hace muchos años que el ovario está innervado por las fibras nerviosas catecolaminérgicas, y la presencia de las catecolaminas está fisiológicamente involucrada en el control de la función ovárica (Greiner y cols., 2008).

Los estudios morfológicos, en los que los nervios simpáticos ováricos se visualizaron mediante métodos de histofluorescencia, sugirieron que las fibras eran principalmente noradrenérgicas. Posteriormente, esta noción se confirmó mediante la medición bioquímica

selectiva de las catecolaminas ováricas, un estudio que también mostró que la noradrenalina y la dopamina, aunque detectables, constituyen una fracción menor de las catecolaminas ováricas (Bahr y Jonathan, 1981).

El ovario contiene una población de receptores alfa adrenérgicos de alta afinidad y baja capacidad que se encuentran en la gran mayoría del subtipo adrenérgico. Estos receptores se encuentran en todos los compartimentos secretores ováricos, incluidas las células de la granulosa, la teca y el cuerpo lúteo. Su activación produce progesterona y liberación de andrógenos (Ojeda y Lara, 1989).

La regulación de los receptores alfa-adrenérgicos ováricos se ha estudiado en células de granulosa en cultivos. Parece que el contenido del receptor está modulado principalmente por las catecolaminas, siendo la noradrenalina el más potente en la regulación negativa del receptor con un  $IC_{50} 0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$  (Aguado y Ojeda, 1984).

Las funciones de la noradrenalina en el ovario son: regulación de la esteroidogénesis y apoptosis ovárica modulando la liberación de GnRH del ganglio celíaco y el ovario, siendo la noradrenalina, un posible generador de un eje GnRH-gonadotropinas en el ovario (Bronzi y cols., 2015).

Otra catecolamina importante en las funciones reproductivas, es la dopamina, la cual es sintetizada en terminales nerviosas dopaminérgicas del aminoácido tirosina. La mayor parte de la tirosina que circula, proviene de la dieta, pero pequeñas cantidades son derivadas de la hidroxilación de la fenilalanina por la enzima fenilalanina hidroxilasa del hígado. La hidrólisis de la tirosina a L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y su subsecuente descarboxilación por la enzima dopamina descarboxilasa obtiene como producto final la formación de dopamina (Boureau, y Dayan, 2010) (Figura 8).

La actividad de la enzima tirosina hidroxilasa es controlada principalmente por el SNC y los productos metabólicos de la síntesis de neurotransmisores (L-DOPA a dopamina) inhiben la actividad de la tirosina hidroxilasa en el cerebro y la minoría de catecolaminas, que actúan como factores reguladores a través del mecanismo de recuperación (Meiser y cols., 2013).

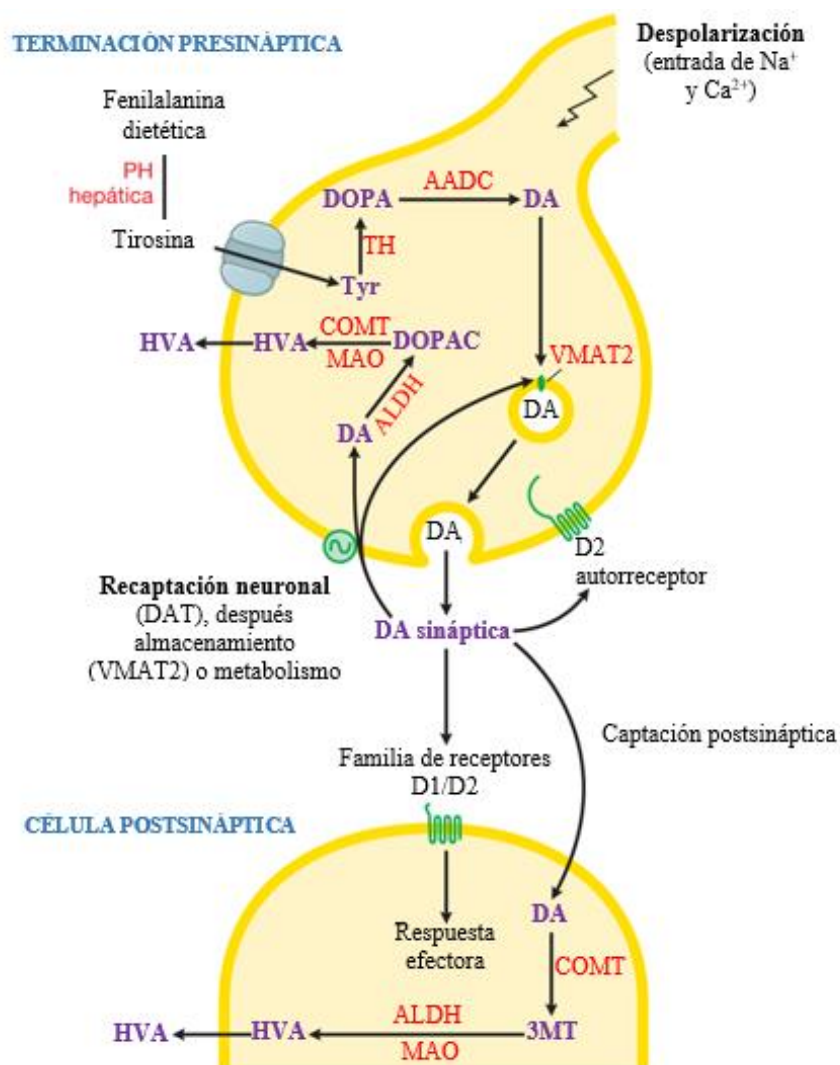


Figura 8. Biosíntesis de la dopamina. La dopamina (DA) sintetizada en las terminaciones neuronales a partir de la tirosina (Tyr) por la actividad de la hidroxilasa de tirosina (TH) que produce los productos intermedios L-hidroxifenilalanina (L-DOPA) y la descarboxilasa de L-aminoácido aromático (AADC). La DA es transportada al interior de vesículas de almacenamiento por medio de un transportador monoamínico vesicular (VMAT-2), la liberación, desencadenada por la despolarización y la penetración de calcio, permite que la DA actúe en diversos (receptores acoplados a proteínas G) GPCR postsinápticos para DA. Los receptores D1 y D2 son importantes en regiones encefálicas. Las acciones diferenciales de la DA en los sitios "blanco" postsinápticos que poseen tipos diferentes de receptores dopaminérgicos causan consecuencias importantes en la función de los circuitos neuronales. Las acciones de la DA terminan al haber recaptación en la terminación nerviosa (sitio en que la DA se puede almacenar de nuevo o metabolizar) o la captación al interior de una célula postsináptica (sitio en el cual es metabolizada la DA) el metabolismo se produce por las acciones seriadas de las enzimas catecol-O-metiltransferasa (COMT), monoaminoxidasa (MAO) y deshidrogenasa de aldehído (AD). 3MT, 3-metoxitiramina; DOPAC, ácido 3,4 dihidroxifenilacético; ácido homovanílico (HVA) ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético; transportador monoamínico vesicular (VMAT-2); transportador de dopamina (DAT). En los seres humanos, HVA es el principal metabolito de la dopamina (Modificado de Cooper y cols., 1996).

La dopamina también puede ser encontrada en vías nerviosas muy diferentes, hay cuatro vías nerviosas principales que controlan la síntesis y transmisión de esta catecolamina (Meiser y cols., 2013):

Vía Mesolímbica (amígdala, hipocampo, y corteza prefrontal). Esta vía transmite la dopamina desde el área tegmental ventral (VTA) hasta el núcleo *accumbens*. El VTA está localizada en el mesencéfalo, mientras el núcleo acumulado está localizado en el sistema límbico.

Vía Mesocortical. Esta vía transmite la dopamina desde la VTA hasta la corteza frontal cerebral.

Vía Nigroestriatal. Esta vía transmite dopamina desde la sustancia negra hasta los ganglios basales, específicamente el núcleo estriado. Es una vía neuronal asociada al control motor.

Vía tuberoinfundibular. Esta vía transmite dopamina desde el hipotálamo medio hacia la región infundibular. La última área conecta diferentes partes del hipotálamo y de la glándula hipófisis. También controla la secreción de hormonas, incluyendo la prolactina, desde la adenohipófisis.

En las terminales dopaminérgicas el neurotransmisor es sintetizado en el citoplasma desde donde puede ser liberado directamente dentro del espacio sináptico o transportado dentro de las vesículas sinápticas para ser liberado por la exocitosis. Una vez liberado dentro del espacio sináptico, la dopamina se une a receptores presinápticos y postsinápticos.

Las proyecciones de neuronas dopaminérgicas en el hipotálamo están localizadas en el hipotálamo posterior (A<sub>11</sub>), el núcleo arcuato (A<sub>12</sub>), la zona incerta (A<sub>13</sub>), el núcleo periventricular (A<sub>14</sub>) y el hipotálamo lateral y ventral (A<sub>15</sub>) y contribuyen a la secreción de hormonas hipofisarias. Las neuronas dopaminérgicas del hipotálamo están divididas en tres sistemas: el núcleo incerto-hipotalámico (IH), el núcleo tubero-hipofisial (TH) y el núcleo tuberoinfundibular (TI) mencionados anteriormente. Las neuronas IH incluyen las áreas A<sub>11</sub>, A<sub>13</sub> y A<sub>14</sub> que se proyectan dentro del hipotálamo. Las neuronas TH que integran el área A<sub>14</sub> y la parte rostral A<sub>12</sub> son invadidas hacia los lóbulos intermedios de la hipófisis. Las neuronas TI que se componen del área A<sub>12</sub> y proyectan a la eminencia media del hipotálamo (Björklund y Dunnett, 2007) (Figura 9).

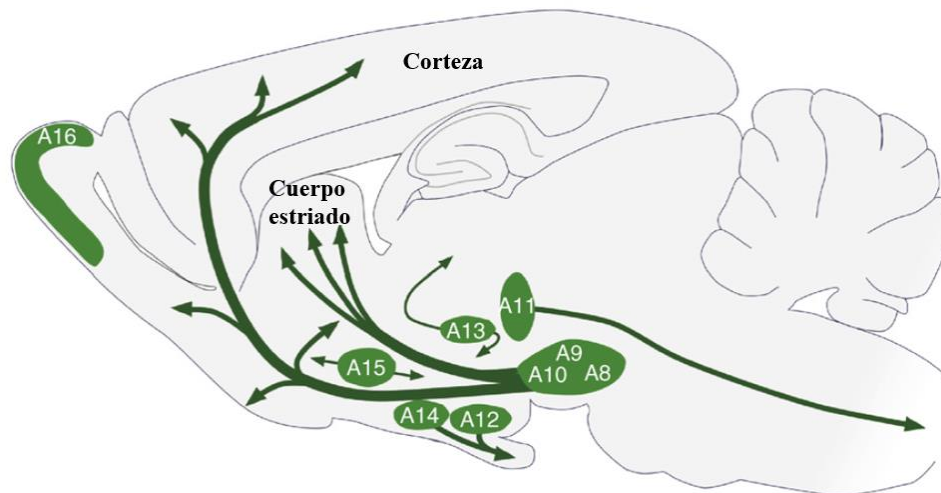


Figura 9. Distribución de los grupos de células neuronales dopaminérgicas en el cerebro de roedor. Las neuronas de dopamina en el cerebro de los mamíferos se localizan en nueve grupos celulares distintivos, distribuidos desde el mesencéfalo hasta el bulbo olfatorio. Las proyecciones principales de los grupos de células dopaminérgicas se ilustran con flechas (Tomado de Björklund y Dunnett, 2007).

La síntesis de la dopamina depende directamente de la disponibilidad de L-DOPA y su transporte al interior a la célula, lo que aumenta en presencia de sodio. Además, el cuerpo carotídeo, un quimio-receptor importante, libera dopamina bajo condiciones hipóxicas (Zeng y cols., 2007; Pardal y cols., 2007).

Las variedad de funciones fisiológicas controladas por el neurotransmisor catecolaminérgico dopamina, a nivel cerebral y en la periferia, por mencionar algunas son: movimiento voluntario, compensación, regulación del sueño, alimentación, afecto, atención, función cognitiva, olfato, visión, regulación hormonal, regulación simpática y erección del pene, también influye en el sistema inmunológico, así como en las funciones cardiovasculares, renales y gastrointestinales. Dichas funciones están mediadas por los cinco receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Ambrojo y cols., 2018) (Cuadro 2).

Con base en los criterios bioquímicos y farmacológicos, se han descrito inicialmente dos subtipos de receptores dopaminérgicos típicos (Weiner y Molinof, 1994; Seeman y cols., 1993): *receptores dopaminérgicos tipo 1* (RDA1), acoplados a la activación o estímulo de la enzima *Adenilato ciclasa* (AC) y por consiguiente estimular la producción del segundo mensajero AMPc, y *receptores dopaminérgicos tipo 2* (RDA2), acoplados de

manera inhibitoria a la actividad de la AC, por lo tanto inhiben la producción del AMPc, o bien que no están necesariamente acoplados a esta función. A la fecha se han identificado receptores múltiples del RDA1-like (que incluyen subtipos RDA1 y RDA5) y del tipo RDA2-like (que incluyen a los subtipos RDA2, RDA3 y RDA4) (Seeman y cols., 1993).

<b>Cuadro 2. Funciones generales de la dopamina (Tomado de Ambrojo y cols., 2018)</b>	
Sistema	Funciones
Endocrino	<ul style="list-style-type: none"> <li>*En las yeguas se sabe que modula su reproducción estacional (inhibe la secreción de prolactina hipofisaria, inhibición confortante en la actividad reproductiva durante el período del anestro en la vía tuberoinfundibular)</li> <li>*Regulación en la función luteal</li> <li>*En caballos modula la viabilidad espermática, la integración acrosomal, capacitación y motilidad</li> </ul>
Sistema Nervioso Central	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Control motriz y de movimiento (vía nigroestriatal)</li> <li>*Efectos en el comportamiento: alerta, curiosidad, cognición, aprendizaje y memoria (vía mesolímbica)</li> <li>*Modulación de los ritmos circadianos</li> </ul>
Gastrointestinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Regulación de la motilidad gastrointestinal</li> <li>-Efectos inhibitorios (relajación o inhibición de contracciones)</li> <li>-Efectos excitatorios (aumento de las contracciones, observadas con menor frecuencia)</li> </ul>
Función renal	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Incremento de la perfusión renal y vasodilatación arterial</li> <li>*Inhibición de la reabsorción tubular de sodio (natriuresis)</li> <li>*Incremento de la secreción de renina e inhibición de la secreción de aldosterona</li> </ul>
Cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Efectos dependientes de la dosis</li> <li>-Altas dosis incrementan la presión sanguínea y gasto cardiaco</li> <li>-Bajas dosis, no hay modificaciones</li> <li>-Vasodilatación (relajación)</li> </ul>

El empalme alternativo del RDA2 da como resultado la generación de dos variantes principales del RDA2, que difieren en la presencia de 29 aminoácidos adicionales en el tercer bucle intracelular con distintas propiedades fisiológicas, de señalización y farmacológicas, y se clasifican como RDA2S (S-corto) y RDA2L (L-largo). Los receptores de RDA1 son encontrados exclusivamente en células receptoras dopaminérgicas post sinápticas como neuronas GABA-érgicas en el cuerpo estriado. Los RDA2 y RDA3 se expresan tanto en neuronas dopaminérgicas presinápticas y células dopaminérgicas post sinápticas (Missale y cols., 1998).

Los receptores dopaminérgicos son objetivos bien establecidos en la farmacología clínica de numerosos trastornos y afecciones, como la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson (Beaulieu y cols., 2011).

La modulación de la síntesis de AMPc por los receptores dopaminérgicos resulta en la regulación de la proteína quinasa A (PKA) y potencialmente de otras proteínas de intercambio activadas por AMPc. Entre los sustratos de PKA, la dopamina multifuncional y la fosfoproteína regulada por AMPc (fosfoproteína regulada por dopamina y AMPc, Mr 32 kDa-DARPP-32), cuando se fosforila en Treonina (Thr) por PKA, DARPP-32 es un regulador negativo de la proteína fosfatasa 1 (PP1). En contraste, la fosforilación de DARPP-32 en Thr por la quinasa 5 dependiente de ciclina (CDK5), en respuesta a la activación sostenida del RDA1, resulta en la inhibición de la PKA (Beaulieu y cols., 2011).

Los mecanismos dependientes de la proteína G para los RDA2 están representados por la bien conocida cascada de AMPc-PKA-DARPP32 mediada por la subunidad G $\alpha$ i (inhibitoria) (Svenningsson y cols., 2004); y la activación de la PLC mediada por la subunidad G $\beta\gamma$ , que conduce a un aumento del calcio citoplásmico y eventos de señalización descendente (Weiner y Molinof, 1994; Hernández-López y cols., 2000; Beaulieu y Gainetdinov, 2011). Además, los mecanismos mediados por G $\beta\gamma$  están implicados en la regulación de la actividad de los canales de calcio de tipo L y N así como en los canales de potasio regulados por proteínas G heterotriméricas (GIRKs) (Yan y cols., 1997).

#### *Vías de transducción de señales*

Las vías de transducción de señales activadas por los receptores dopaminérgicos son numerosas, sin embargo, los efectos mejor descritos mediados por la dopamina son la activación o inhibición de la vía AMPc y la modulación de la señalización de Ca<sup>2+</sup> (Beaulieu y cols., 2011).

La estimulación del RDA1 aumenta las corrientes de Ca<sup>2+</sup> de tipo- L conducen a una reducción de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> de tipo N y P en las neuronas neostriatales de la rata y en las células GH4C1 derivadas de la pituitaria, a través de una acción directa o indirecta de

PKA (Missale y cols., 1998). Por el contrario, en las células glomerulosas de las glándulas adrenales de la rata, el RDA1 inhibe las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo T (Drolet y cols., 1997).

Los RDA1 también pueden movilizar las reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  activando la vía de AMPc sin activar la hidrólisis de fosfoinositida (PI) (Missale y cols., 1998).

Los RDA2 pueden modular directamente varios efectores diferentes mediante el acoplamiento de las subunidades  $G_i$  (inhibitorias). Los RDA2L y RDA2S inhiben diferencialmente las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el acoplamiento a  $G_\alpha$  (estimulantes) en células pituitarias de la rata (Missale y cols., 1998; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994). Además, a través de una proteína  $G_i$ , los receptores D2 reducen las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N en interneuronas colinérgicas neostriatales de la rata (Yan y cols., 1997) y controla la inhibición de la actividad del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en melanotrofos (Taraskevich, y Douglas, 1990).

La modulación de los RDA2 en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  puede tener un papel importante en la biosíntesis de dopamina, ya que los RDA2 son tanto pre como post-sinápticos. De hecho, TH, la enzima limitante de la velocidad en la producción de dopamina, se activa por la proteína quinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulina (CaM quinasa o CaM II) (Braun y Schulman, 1995) y CaM II se activa posteriormente por calmodulina unida a  $\text{Ca}^{2+}$  (Choi y cols., 1993). Ha habido informes contradictorios sobre si los RDA1 son capaces de aumentar o disminuir el flujo de salida de potasio. Se ha demostrado que los agonistas similares a los RDA1 aumentan la corriente de potasio de las células de la retina de pollo a través de un mecanismo independiente de AMP, pero inhiben este flujo en las neuronas estriatales de la rata (Missale y cols., 1998).

Las corrientes de  $\text{K}^+$  en varios tejidos neurales, como el cuerpo estriado, las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, los lactótrofos, los melanótrofos y las células NG108-15 están reguladas por la activación de los RDA2. Las isoformas RDA2S y RDA2L parecen modular de forma diferencial la corriente de  $\text{K}^+$  externa a través de la interacción con diferentes proteínas G (Jackson y Westlind-Danielsson, 1994; Liu y cols., 1996).

Además de las vías de transducción de señales descritas, los RDA2 también participan en la modulación de la síntesis de ácido araquidónico. Cuando se eleva la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , la señalización de los RDA2 puede potenciar la síntesis de ácido araquidónico en las



células ováricas de hámster chino, mientras que los RDA1 no tienen ese efecto (Piomelli, 1993; Jackson y Westlind-Danielsson, 1994).

### **1.6 Receptores Dopaminérgicos en los Tejidos Ováricos**

El eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Ovarios es el controlador primario de la función gonadal tradicionalmente aceptado; sin embargo, un creciente número de evidencias experimentales apunta a un mecanismo adicional que controla la función gonadal que involucra la actividad neuronal autonómica (catecolaminérgica-dopamina) y posiblemente los efectos similares a los endocrinos producidos por los neurotransmisores químicos secretados por las células ováricas no neuronales (King y cols., 2005).

Estudios previos identificaron los neurotransmisores noradrenalina y dopamina en el ovario humano; sin embargo, de esta última no se sabe si se encuentra en terminales nerviosas como si lo hace la noradrenalina (Lara y cols., 2001).

Se ha mapeado la inervación autonómica del ovario en la fase folicular en doce especies de mamíferos. Se documentó una rama de nervio adrenérgico denso que llega a la teca y se evidenció la presencia de células nerviosas secretoras de dopamina en el folículo de Graaf de la vaca y la oveja (Stephenson y cols., 1981), también existen terminales nerviosas que contienen dopamina en la capa de células de la teca y alrededor de las paredes de los folículos maduros en cobayas, pero no en la capa de células de la granulosa (Bahr y cols., 1974).

El descubrimiento de la producción de neurotropinas dependiente de gonadotropina por los folículos antrales en la oveja, proporcionó evidencia de un mecanismo mediante el cual se puede lograr el control dinámico de la proliferación neuronal de las estructuras ováricas. Hay evidencia indirecta que sugiere que los mecanismos dopaminérgicos locales afectan el ovario (Mattioli y cols., 1999).

Las novillas alimentadas con *festuca*, planta que contiene alcaloides del tipo *ergot* y agonistas de la dopamina, mostraron diferencias en la duración del ciclo estral, en las concentraciones de progesterona circulante, que mejoró con un antagonista del RDA2 como la domperidona (Jones y cols., 2003; Jones y cols., 2004). La domperidona no cruza la barrera hematoencefálica, lo que sugiere un efecto local en el ovario (Barone, 1999).

Además se sabe que el ovario cuenta con el sistema de recaptura de dopamina, en células de la granulosa humana se encuentra el transportador de dopamina (DAT), la catecol-O-metiltransferasa (COMT), las monoaminooxidasas A y B, así como el transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), mientras que en cepas de ratas Wistar y Sprague-Dawley se demostró que expresan tanto DAT como VMAT (Greiner y cols., 2008; Saller y cols., 2014).

### *Vías de señalización de los receptores dopaminérgicos tipo 2*

La activación de la familia de los RDA2, se caracteriza por la inhibición de la actividad de la AC, y por lo tanto hay una inhibición de la PKA y DARPP-32 como ya se ha mencionado anteriormente. No obstante, unas pequeñas y complejas diferencias en la respuesta funcional y activación de señalización han sido observadas en los receptores de esta familia, en particular para el RDA3 (Beaulieu y cols., 2011). Por ejemplo, el RDA2 induce una fuerte inhibición de AMPc inducido por forskolina acumulado en células embrionarias de riñón humano (HEK-293), mientras la estimulación de los RDA3 expresados en células HEK-293 transfectadas muestran un efecto bajo o inhibitorio en la actividad de la AC (MacKenzie y cols., 1994). A pesar de ello, cuando los RDA3 fueron expresados en una línea celular de neuroblastoma humano, los efectos fueron consistentes con las células HEK-293 (Zaworski y cols., 1999). Las discrepancias podrían deberse a una expresión diferencial de las isoformas de la AC, ya que los RDA3 pudieron inhibir la actividad de la AC cuando se co-transfectaron con la isoforma V de la AC (ACV) pero no con la isoforma VI (Missale y cols., 1998). Los RDA2 también modulan los canales de potasio, proteína G acoplada al canal de K<sup>+</sup> rectificador interno (GIRK, por sus siglas en inglés) que median la respuesta eléctrica neuronal, a través de GPCR acoplados a la proteína G<sub>oi</sub> y también varían los efectos entre los receptores de esta familia, el efecto parece ser a través de las subunidades βγ para los RDA2 y los RDA4, pero no para los RDA3 (Rangel-Barajas y cols, 2015) (Figura 10).

Además, se ha demostrado que los RDA2 pero no los RDA3 se acoplan al canal GIRK en las neuronas de la sustancia negra. Se ha informado que los RDA2 también pueden

activar las vías relacionadas con la proliferación celular, como la señalización de la *proteína quinasa activada por mitógeno* (MAPK) (Beaulieu y cols., 2014).

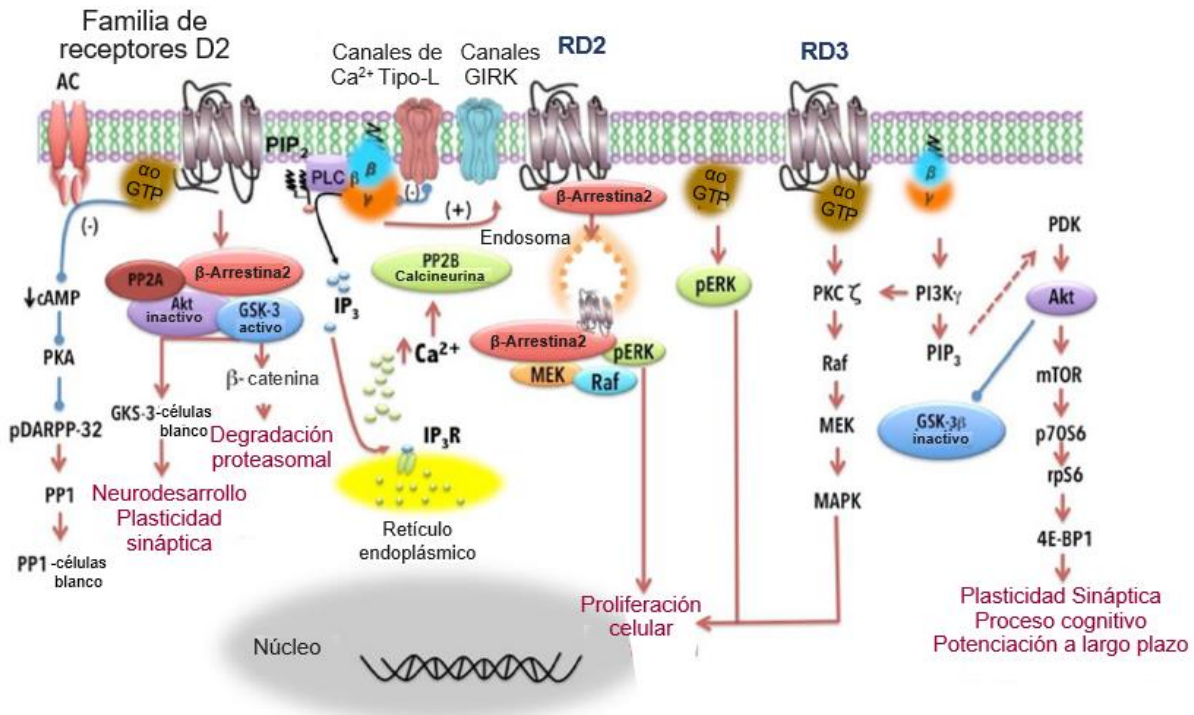


Figura 10. Vías de señalización intracelular activadas por los receptores dopaminérgicos tipo 2. Muestra los efectos mediados por dopamina a través de receptores dopaminérgicos tipo 2, que se producen por una activación compleja de señales intracelulares que están relacionadas con eventos como el desarrollo neurológico, la degradación proteasomal, la proliferación celular y el proceso cognitivo. Los efectos estimulantes se indican con flechas rojas, la flecha roja discontinua indica una activación plausible y los efectos inhibitorios en la línea azul terminados con un círculo. AMPc, monofosfato de adenosina 3'-5'-cíclico;  $\alpha$ /i/o ATP, proteína G*α*/i/o activa; PKC $\zeta$ : proteína quinasa C atípica C; PKA, proteína quinasa A; DARPP-32, fosfoproteína regulada por AMP cíclico y dopamina de 32 kDa; AC, adenilato ciclasa; PP1, PP2A o PP2B, proteína-fosfatasa 1, 2A o 2B; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; PKC, proteína quinasa C; Akt, proto-oncogen viral del timoma; GSK-3, glucógeno sintasa quinasa-3; PLC $\beta$ , fosfolipasa isoforma beta C; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PIP2, PIP3, fosfatidilinositol 2 y 3; IP3, trifosfato de inositol; Ca<sup>2+</sup>, calcio; GIRK, canales de potasio regulados por proteínas G heterotriméricas; proteína quinasa activada por mitógenos MEK; Raf ; ERK, proteína quinasa de cinasa regulada por señal extracelular; PDK, quinasa dependiente de fosfoinositido; mTOR, objetivo de rapamicina en mamíferos; p70S6, p70S6 quinasa; rpS6, proteína ribosomal S6; 4E-BP, factor de iniciación eucariótico unión a proteína 4E1 (Modificado de Rangel-Barajas y cols., 2015).

La activación de *quinasas reguladas extracelularmente* (ERK1 o ERK2) también se ha observado en una variedad de líneas celulares, incluidas las células HEK-293, las células *células transformadas de fibroblastos renales del mono verde africano* (COS-7) y las

células de glioma C6, para esta vía de señalización; los RDA2 y los RDA4 también muestran algunas diferencias en la intensidad de la activación de ERK o MAPK en comparación con los RDA3, utilizando compuestos altamente selectivos (González y cols., 2012). Por otro lado, el complejo GPCRs- $\beta$ -arrestina también activa ERK o MAPK una vez que el receptor se internaliza (Rangel-Barajas y cols., 2015). Recientemente se demostró que el complejo de RDA2-arrestina puede activar ERK pero este efecto no se observó en los receptores RDA3, sin embargo, en las mismas condiciones, se encontró que ERK podría ser activado por los receptores RDA3 en las líneas celulares HEK-293 y COS-7 solo cuando G $\alpha$ o se co-expresa pero no G $\alpha$ i, mientras que los receptores RDA2 pueden mediar la activación de ERK por ambas isoformas de proteínas G $\alpha$ i o por el complejo de los RDA2- $\beta$ -arrestina (Lefkowitz y Shenoy, 2005).

La estimulación de los RDA2 activa la señalización del Akt (proto-oncogén viral del timoma, también conocido como proteína quinasa B PKB) (Figura 10). *In vivo* se ha demostrado la activación de Akt en cuerpo estriado y células del núcleo accumbens (Nacc) después de la administración de agonistas para los RDA2 (Rangel-Barajas y cols., 2015).

### **1.7 Bloqueo farmacológico con Sulpirida a los Receptores Dopaminérgicos tipo 2**

La sulpirida es un polvo cristalino blanco, tiene una escasa liposolubilidad, esto hace que sea difícil que atraviese la barrera hematoencefálica, y por lo tanto este fármaco suele administrarse en dosis altas (Figura 11). Se disuelve en soluciones diluidas de ácidos minerales y en hidróxidos alcalinos. Es un fármaco perteneciente al grupo de los antipsicóticos, es una benzamida. La sulpirida es un antagonista específico de los RDA2, también tiene afinidad por los RDA3 (Martin y cols., 1996; Palomo, 1991), actúa a nivel mesolímbico y no interactúa significativamente con los receptores de otros neurotransmisores, a diferencia de otros antagonistas como la clozapina o el haloperidol, lo que significa que no se relaciona con el bloqueo serotoninérgico, muscarínico o  $\alpha$ -adrenérgico (Gibert-Rahola y Micó, 2009).

Los receptores periféricos de dopamina en los vasos sanguíneos y el músculo liso gastrointestinal son antagonizados por la sulpirida. Las propiedades farmacodinámicas que distinguen a la sulpirida como un antipsicótico atípico incluyen la falta de inhibición de la

estimulación de la AC inducida por dopamina, una inducción débil de catalepsia, un antagonismo débil de la locomoción inducida por apomorfina y la falta de inhibición de la conducta inducida por apomorfina en modelos animales (Caley y Weber, 1995). En humanos, se observan propiedades desinhibitorias y falta de sedación. Al igual que con otros antagonistas del RDA2, la sulpirida tiene un pronunciado efecto estimulante sobre la liberación de prolactina de la glándula pituitaria (Wagstaff y cols., 1994).

Los RDA2 regulan los procesos motores, al encontrarse localizados en la zona estriada palidal de los ganglios basales. Al igual que los receptores CB1, forman parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G de tipo inhibitorio, y su activación tiene que ver con la inhibición de la liberación de GABA ya que ejercen control sobre la síntesis de AMPc. No obstante, la interacción existente entre ambos receptores no es concluyente (Glass y Felder, 1997).

El control que el sistema dopaminérgico ejerce sobre la liberación de GABA, a través del RDA2, ha demostrado en estudios in vitro, donde se determina que la liberación de [3 H]-GABA en secciones de proteínas G estimulantes disminuye en un 46% al estimular la liberación de dopamina por la administración de metanfetamina, y este efecto se revierte al administrar sulpirida, el antagonista de los RDA2. Este hecho demuestra que los RDA2 presentes en las terminales GABA-érgicas del globo pálido externo regulan la liberación de GABA al espacio sináptico, y los bloqueos farmacológicos ayudan a comprender estos fenómenos fisiológicos (Floran y cols., 1997).

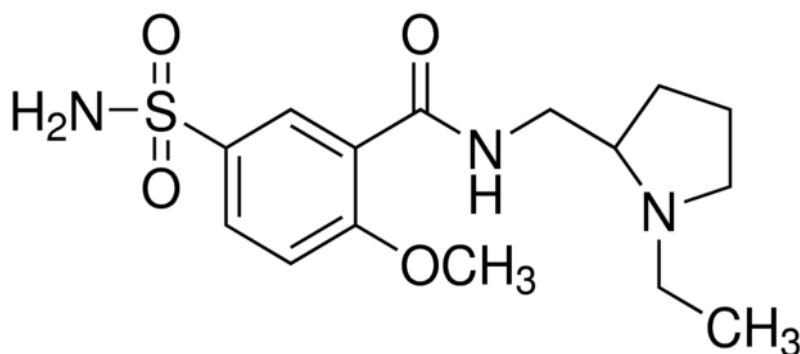


Figura 11. Estructura química de la sulpirida (Nombre IUPAC N - [(1-etilpirrolidin-2-il) metil] -2-metoxi-5-sulfamoilbenzamida (Wagstaff y cols., 1994).

## 1.8 Estrés Oxidativo y Funciones Ováricas

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes. Esta relación puede alterarse por el aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o especies reactivas de nitrógeno (RNS), por una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante o cambios en el entorno que repercuten en el organismo (Ruder y cols., 2009; Al-Gubory y cols., 2010; Burton y Jauniaux, 2010) (Figura 12).

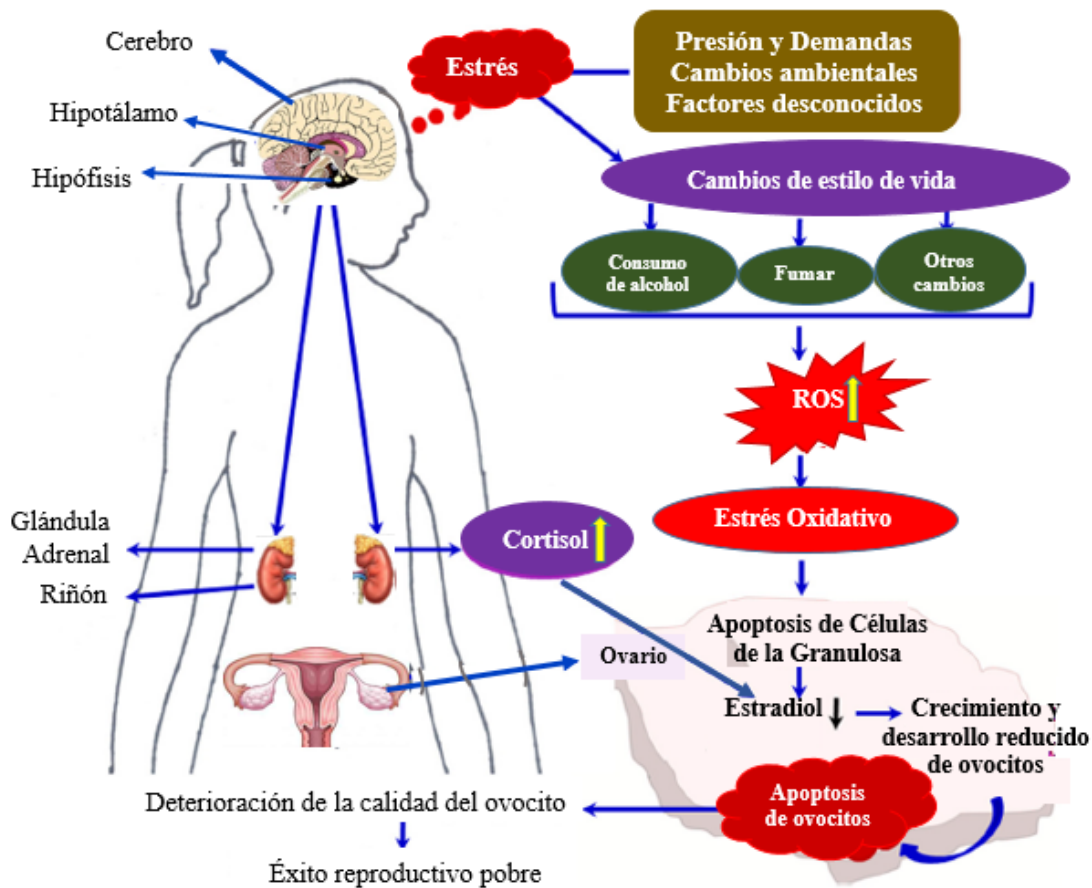


Figura 12. Diagrama esquemático que muestra el impacto del estrés en el resultado reproductivo. Cambios ambientales, presiones y demandas y varios otros factores generan estrés psicológico. El estrés psicológico induce cambios en el estilo de vida y la producción de cortisol en las glándulas adrenales que afectan directa e indirectamente a la fisiología ovárica. Los cambios en el estilo de vida que incluyen el consumo de alcohol y fumar llevan a aumentar el nivel de ROS. El aumento del nivel de ROS da como resultado un estrés oxidativo. El aumento de cortisol y los niveles de estrés oxidativo afectan las funciones de las células de la granulosa, posiblemente induciendo la apoptosis. La apoptosis de las células de la granulosa produce una reducción de la biosíntesis de estradiol en el ovario, lo que reduce el crecimiento y el desarrollo de los ovocitos foliculares e induce la apoptosis de los ovocitos. La apoptosis deteriora la calidad de los ovocitos, lo que lleva a un resultado reproductivo deficiente en mamíferos, incluidos los humanos (Tomado de Prasad y cols., 2016).

El estrés oxidativo puede llevar a una serie de enfermedades reproductivas, entre ellas la endometriosis, el síndrome de ovario poliquístico (SOP) y la infertilidad inexplicable. También puede causar complicaciones durante el embarazo, como el aborto espontáneo, la pérdida recurrente de embarazo, la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino (Al-Gubory y cols., 2010) (Figura 12).

El metabolismo aeróbico está asociado a la generación de moléculas prooxidantes llamadas radicales libres o ROS, que incluyen radicales hidroxilos ( $\text{OH}^\cdot$ ), anión superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y óxido nítrico (NO). Existe una interacción compleja de los prooxidantes y antioxidantes, que resulta en el mantenimiento de la homeostasis intracelular. Cuando hay un desequilibrio entre los prooxidantes y los antioxidantes, se inicia un estado de estrés oxidativo (Agarwal, 2006).

Los radicales libres tienen un doble papel en el tracto reproductivo. También son moléculas de señal clave que modulan diversas funciones reproductivas. Los radicales libres pueden influir en los ovocitos, espermatozoides y embriones en sus microentornos, por ejemplo, líquido folicular, líquido hidrosalpingal (salpinges uterinas) y líquido peritoneal. Estos microambientes tienen una relación directa con la calidad de los ovocitos, la interacción de los ovocitos espermáticos, la implantación y el desarrollo temprano del embrión. El estrés oxidativo afecta tanto la implantación como el desarrollo temprano del embrión que determina un embarazo exitoso. Existe una compleja interacción de citocinas, hormonas y otros factores de estrés que afectan la generación celular de radicales libres; estas moléculas actúan aún más a través de la modulación de muchos factores de transcripción y expresión génica. El estrés oxidativo está involucrado en el funcionamiento fisiológico del tracto reproductivo femenino e influye en los resultados de la tecnología de reproducción asistida (TAR) (Agarwal, 2006).

Biológicamente el sistema contiene una gran cantidad de  $\text{O}_2$  que actúa como dirradical (una molécula que tiene dos electrones no apareados en diferentes puntos de la molécula, de modo que estos llamados centros radicales son independientes entre sí), esto hace que el  $\text{O}_2$  reaccione rápidamente con otros radicales, además de convertirlo en inestable. Los radicales libres a menudo se generan a partir del propio  $\text{O}_2$ , y las especies parcialmente reducidas resultan de procesos metabólicos normales en el cuerpo. Las especies reactivas

de oxígeno son productos intermedios prominentes y potencialmente tóxicos, que están comúnmente involucrados en el estrés oxidativo (Kehrer, 2000). La reacción de Haber-Weiss, es el principal mecanismo por el cual se genera el radical hidroxilo que es altamente reactivo (OH $\cdot$ ). Esta reacción puede generar más radicales tóxicos a través de las interacciones entre el anión superóxido (SO) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Liochev, 1999; Kehrer, 2000). Sin embargo, se encontró que esta reacción era termodinámicamente desfavorable en los sistemas biológicos. La reacción de Fenton, que consiste en dos reacciones, implica el uso de un catalizador de ión metálico para generar OH.

Ciertos cationes metálicos, como el cobre (Cu<sup>+2</sup>) y el hierro (Fe<sup>2+/3+</sup>), pueden contribuir significativamente a la generación de ROS. Por otro lado, los quelantes de iones metálicos, como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y la transferrina pueden unir estos cationes metálicos y, por lo tanto, inhibir su reactividad (Halliwell y Gutteridge, 1990). Los procesos fisiológicos que utilizan O<sub>2</sub> como sustrato, como las reacciones de oxigenasa y las reacciones de transferencia de electrones (ET), crean grandes cantidades de ROS, de las cuales el anión SO es el más común (Chandra y cols., 2009). La mayoría de las ROS se producen cuando los electrones se escapan de la cadena respiratoria mitocondrial, también conocida como la cadena de transporte de electrones (ETC). Otras fuentes del anión SO incluyen la cadena corta de electrones en el retículo endoplásmico, el citocromo P450 y la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, que genera cantidades sustanciales, especialmente durante el embarazo temprano, y otras oxido-reductasas (Burton y Jauniaux, 2010; Fujii y cols., 2005).

Las mitocondrias son fundamentales para las actividades metabólicas en las células, por lo que cualquier alteración en sus funciones puede conducir a una generación profundamente alterada de adenosín trifosfato (ATP). La energía del ATP es esencial para las funciones del gameto. Aunque las mitocondrias son sitios importantes de producción de ROS, el exceso de ROS puede afectar las funciones de las mitocondrias en ovocitos y embriones. Esta disfunción mitocondrial puede conducir a la detención de la división celular, desencadenada por el estrés oxidativo (Liu y cols., 2000). Un aumento moderado en los niveles de ROS puede estimular el crecimiento y la proliferación celular, y permite las funciones fisiológicas normales. A la inversa, un exceso de ROS causará lesiones



celulares (daño al ADN, membranas lipídicas y proteínas). El anión  $\text{SO}$  se desintoxica mediante las enzimas superóxido dismutasa (SOD), que lo convierten en  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La catalasa (CAT) y el glutatión peroxidasa (GPx) degradan aún más el producto final a agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Aunque el  $\text{H}_2\text{O}_2$  técnicamente no es un radical libre, generalmente se lo conoce como uno debido a su participación en la generación y descomposición de los radicales libres. La defensa antioxidante debe contrarrestar la concentración de ROS, ya que un aumento en el anión  $\text{SO}$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede generar un radical hidroxilo más tóxico;  $\text{OH}^*$  que modifica las purinas y pirimidinas, causando roturas de las cadenas de ADN y daños en el mismo ADN. Para mantener la homeostasis de los tejidos y limpiar las células dañadas, la apoptosis es clave en el desarrollo normal. La apoptosis es el resultado de una sobreproducción de ROS, la inhibición de la ETC, la disminución de las defensas antioxidantes y las proteínas activadoras de la apoptosis, entre otras (Agarwal, 2004; Agarwal y cols., 2008).

#### *Mecanismos antioxidantes*

Los antioxidantes son eliminadores que desintoxican el exceso de ROS, lo que ayuda a mantener el delicado equilibrio oxidante/antioxidante del cuerpo. Hay dos tipos de antioxidantes: enzimáticos y no enzimáticos.

*Antioxidantes enzimáticos:* los antioxidantes enzimáticos poseen un centro metálico, que les brinda la capacidad de tomar diferentes valencias a medida que transfieren electrones al equilibrio de las moléculas para el proceso de desintoxicación. Neutralizan el exceso de ROS y previenen el daño a las estructuras celulares. Las enzimas antioxidantes endógenas incluyen SOD, CAT, GPx y glutatión oxidasa. La eliminación del anión  $\text{SO}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  por SOD es fundamental para las reacciones antioxidantes. La enzima SOD existe como tres iso-enzimas: SOD1, SOD2 y SOD3. La SOD 1 contiene Cu y zinc (Zn) como cofactores metálicos y se encuentra en el citosol. SOD2 es una isoforma mitocondrial que contiene manganeso (Mn), y SOD3 codifica la forma extracelular. SOD3 es estructuralmente similar a Cu, Zn-SOD, ya que contiene Cu y Zn como cofactores (Fujii y cols., 2005).

La familia de enzimas glutatión (GSH) incluye GPx, GST (glutatión transferasa) y GSH reductasa. GPx utiliza la forma reducida de GSH como un donante de  $\text{H}^+$  (catión

hidrógeno) para degradar los peróxidos. El agotamiento de GSH resulta en daño al ADN e incrementa las concentraciones de  $H_2O_2$ ; como tal, el GSH es un antioxidante esencial. Durante la reducción de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y  $O_2$ , el GSH se oxida a GSSG (glutati6n oxidado) por GPx. El glutati6n reductasa participa en la reacci6n inversa, y utiliza la transferencia de un prot6n donante de NADPH a GSSG, y esto se convierte en un reciclaje de GSH.

La GPx existe en cinco isoformas: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 y GPx5. GPx1 es la isoforma citos6lica que se distribuye ampliamente en los tejidos, mientras que GPx2 codifica una forma gastrointestinal sin funci6n espec6fica; GPx3 est1 presente en plasma y fluido del epid6dimo. La GPx4 desintoxica espec6ficamente el hidroper6xido de fosfol6pido dentro de las membranas biol6gicas. La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) protege a las c6lulas deficientes de GPx4 de la muerte celular. GPx5 se encuentra en el epid6dimo (Maiorino y cols., 2003). El glutati6n es el principal tamp6n de tiol en las c6lulas y se forma en el citosol a partir de la ciste6na, el glutamato y la glicina. Sus niveles se regulan a trav6s de su formaci6n de novo, que es catalizada por las enzimas  $\gamma$ -glutamilciste6na sintetasa y glutati6n sintetasa. En las c6lulas, el GSH desempe1a m6ltiples funciones, que incluyen el mantenimiento de las c6lulas en un estado reducido y la formaci6n de conjugados con algunos compuestos end6genos y xenobi6ticos peligrosos (Fujii y cols., 2005; Perkins y cols., 2006; Ruder y cols., 2009).

*Antioxidantes no enzim1ticos:* los antioxidantes no enzim1ticos consisten en suplementos diet6ticos y antioxidantes sint6ticos como la vitamina C, GSH, taurina, hipotaurina, vitamina E, Zn, selenio (Se),  $\beta$ -caroteno, y caroteno. La vitamina C (1cido asc6rbico) es un conocido catalizador *redox* que puede reducir y neutralizar las ROS. Su forma reducida se mantiene mediante reacciones con GSH y puede ser catalizada por la prote6na disulfuro isomerasa y glutaredoxinas (Sharma y Agarwal, 2004).

El glutati6n es un p6ptido que se encuentra en la mayor6a de las formas de vida aer6bica, ya que se produce en el citosol a partir de ciste6na, glutamato y glicina. Tambi6n es el principal antioxidante no enzim1tico que se encuentra en los ovocitos y embriones (Ruder y cols., 2009). Sus propiedades antioxidantes se derivan del grupo tiol de su componente de ciste6na, que es un agente reductor que permite que se oxide reversiblemente y se reduzca a su forma estable (Sharma y Agarwal, 2004). Los niveles de

GSH están regulados por su formación *de novo*, que es catalizada por las enzimas gamma-GCS y glutatión sintetasa (Agarwal, 2004). El glutatión participa en reacciones, incluida la formación de disulfuro de glutatión, que se transforma de nuevo en GSH por la glutatión reductasa a expensas de NADPH (Behrman y cols., 2001; Sharma y Agarwal, 2004; Fujii y cols., 2005).

La cisteína y la cisteamina (CSH) aumentan el contenido de GSH del ovocito. La cisteamina también actúa como un eliminador y es un antioxidante esencial para el mantenimiento de altos niveles de GSH. Además, la CSH se puede convertir en otro antioxidante, la hipotaurina. Las concentraciones de muchos aminoácidos, incluida la taurina, fluctúan considerablemente durante la foliculogénesis. La taurina y la hipotaurina son eliminadores que ayudan a mantener la homeostasis redox en los gametos. Ambos neutralizan los productos de la lipoperoxidación, y la hipotaurina neutraliza aún más los radicales hidroxilos (Guerin, 2001; Orsi y cols., 2005).

Al igual que GSH, el sistema de Tiorredoxina (Trx) regula las funciones de los genes y coordina diversas actividades enzimáticas. Desintoxica el  $H_2O_2$  y lo convierte a su estado reducido a través de la Trx reductasa (Borchert y cols., 2003). Normalmente, Trx está vinculado a la señal reguladora de la apoptosis quinasa 1 (ASK1), por lo que queda inactivo. Sin embargo, cuando el grupo tiol de Trx se oxida por el anión  $SO$ , ASK1 se separa de Trx y se activa, lo que lleva a una mejor apoptosis. ASK1 también puede activarse por exposición a  $H_2O_2$  o por hipoxia re-oxigenación, e inhibirse por las vitaminas C y E (Borchert y cols., 2003; Chandra y cols., 2009). El sistema Trx también desempeña un papel en la reproducción femenina y el desarrollo fetal al participar en el crecimiento celular, la diferenciación y la muerte. El plegamiento incorrecto de la proteína y la formación de enlaces disulfuro pueden ocurrir a través de la liberación de iones  $H^+$  del grupo tiol de la cisteína, lo que conduce a una función de la proteína desordenada, agregación y apoptosis (Burton y Jauniaux, 2010). La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) es una vitamina soluble en lípidos con actividad antioxidante. Se compone de ocho tocoferoles y tocotrienoles, es importante en las actividades antioxidantes porque reacciona con los radicales lipídicos producidos durante la lipoperoxidación. Esta reacción produce  $\alpha$ -radicales tocoferoxilo (vitamina E oxidada) que pueden ser transformados de nuevo a la

forma activa reducida reaccionando con otros antioxidantes como ascorbato (es una sal sódica del ácido ascórbico), retinol o ubiquinol (Behrman y cols., 2001).

La hormona melatonina es un antioxidante que, a diferencia de las vitaminas C, E y GSH, es producida por el cuerpo humano. Sin embargo, a diferencia de otros antioxidantes, la melatonina no puede experimentar un ciclo redox; una vez que se oxida, la melatonina no puede volver a su estado reducido porque forma productos finales estables después de que se produce la reacción (Shkolnik y cols., 2011). La transferrina y la ferritina, ambas proteínas de unión al hierro, desempeñan un papel en la defensa de los antioxidantes al prevenir la catalización de los radicales libres a través de la quelación (formación de complejos con iones de metales pesados).

Se requieren nutrientes como Se, Cu y Zn para la actividad de algunas enzimas antioxidantes, aunque no tienen acción antioxidante en sí mismas.

El estrés oxidativo se produce cuando la producción de ROS supera los niveles de antioxidantes y puede tener efectos perjudiciales en las capacidades reproductivas masculinas y femeninas. De todos modos, debe recordarse que el estrés oxidativo también se considera un estado fisiológico normal, que es esencial para muchos procesos metabólicos y sistemas biológicos para promover la supervivencia celular (Agarwal y cols., 2012).

*Mecanismos de señalización redox:* los estados redox del ovocito y del metabolismo embrionario están fuertemente determinados por las enzimas oxidorreductasas que realizan reacciones de oxidación o reducción, y por lo tanto se denominan reacciones redox (Agarwal y cols., 2008). Las fuentes significativas de ROS en los folículos de Graaf incluyen a los macrófagos, neutrófilos y células de la granulosa. Durante la foliculogénesis, los ovocitos están protegidos del daño oxidativo por antioxidantes como la catalasa, SOD, glutatión transferasa, paraoxonasa, proteína de choque térmico (HSP) 27 y proteína isomerasa (Angelucci y cols., 2006).

Una vez ensambladas, las ROS son capaces de reaccionar con otras moléculas para interrumpir muchos componentes y procesos celulares. La producción continua de ROS en exceso puede inducir resultados negativos en muchos procesos de señalización (Agarwal y cols., 2008). Las ROS no siempre apuntan directamente a la vía; en cambio, pueden

producir resultados anormales al actuar como segundos mensajeros en algunas reacciones intermedias (Irani, 2000). El daño inducido por ROS puede ocurrir a través de la modulación de la expresión de citocinas y sustratos proinflamatorios, mediante la activación de los factores de transcripción sensibles a redox como el factor de transcripción redox AP (AP-1), la proteína supresora de tumores (p53) y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kappa B), es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. En condiciones estables, el NFκB permanece inactivo por subunidad inhibitoria, IκB. El aumento de las citoquinas proinflamatorias como la interleucina-1 beta (IL) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) activa la cascada de apoptosis, causando la muerte celular. A la inversa, los antioxidantes como la vitamina C y E, y la sulfalazina pueden prevenir este daño al inhibir la activación de NFκB (Cindrova-Davies y cols., 2007).

Los ataques deletéreos por exceso de ROS pueden finalmente terminar en muerte celular y necrosis. Estos ataques dañinos están mediados por los siguientes mecanismos, mismos que implican el despliegue de procesos especializados (Burton y Jauniaux, 2010) (Cuadro 3).

<b>Cuadro 3. Mecanismos especializados relacionados con el estrés oxidativo</b>	
A. Apertura de los canales iónicos	El exceso de ROS conduce a la liberación de Ca <sup>2+</sup> del retículo endoplásmico, lo que resulta en la permeabilidad mitocondrial. En consecuencia, el potencial de la membrana mitocondrial se vuelve inestable y cesa la producción de ATP.
B. Lipoperoxidación	Esto ocurre en áreas donde prevalecen las cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados. Estas cadenas reaccionan con O <sub>2</sub> , creando el radical peroxilo, que puede obtener H <sup>+</sup> de otro ácido graso, creando una reacción continua. La vitamina E puede romper esta reacción en cadena debido a su solubilidad en los lípidos y su cola hidrofóbica.
C. Modificaciones de proteínas: los aminoácidos son objetivos del daño oxidativo	La oxidación directa de las cadenas laterales puede conducir a la formación de grupos carbonilo.
D. Oxidación del ADN	El ADN mitocondrial es particularmente propenso al ataque de ROS debido a la presencia de O <sub>2</sub> en la ETC (cadena de transporte de electrones), la falta de protección de las histonas y la ausencia del ETC, la falta de protección de histonas y la ausencia de mecanismos de reparación.

El cuerpo humano está compuesto de muchas vías de señalización importantes. Entre las vías de señalización más importantes en el cuerpo está la proteína quinasa activada por

mitógenos (MAPK) (Boutros y cols., 2008). Las vías de MAPK son los principales reguladores de la transcripción de genes en respuesta al sistema operativo. Sus cascadas de señalización están controladas por fosforilación y desfosforilación de residuos de serina y/o treonina. Este proceso promueve las acciones de la tirosina quinasa receptoras, las proteínas tirosina quinasa, los receptores de citoquinas y los factores de crecimiento (Brown y Sacks, 2009). Las cantidades excesivas de ROS pueden alterar los efectos normales de estas cascadas de señalización. Otras vías que pueden ser activadas por ROS incluyen las quinasa c-Jun N-terminal (JNKs) y las vías de las proteínas quinasa activadas por mitógeno p38 (p38). La vía JNK evita la fosforilación debido a su inhibición por la enzima GST. La adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a esta cascada puede alterar el complejo y promover la fosforilación (Kamata y cols., 2005; Nagai y cols., 2007). La presencia de ROS también puede disociar el complejo ASK1-Trx activando la quinasa (Matsuzawa e Ichijo, 2008). La concentración de Ca<sup>2+</sup> debe estar bien regulada, ya que juega un papel importante en muchos procesos fisiológicos. La presencia de cantidades excesivas de ROS puede aumentar los niveles de Ca<sup>2+</sup>, promoviendo así su participación en vías como las vías dependientes de la CaM, (Dröge, 2002; Harvey y cols., 2002). Los factores inducibles por hipoxia (HIF) se controlan mediante la concentración de O<sub>2</sub>. Son esenciales para el crecimiento y desarrollo embrionario normal. Los niveles bajos de O<sub>2</sub> pueden alterar los procesos reguladores de HIF mediante la activación de la eritropoyetina, otro factor esencial para el correcto crecimiento y desarrollo embrionario. La preservación de las funciones celulares fisiológicas depende del equilibrio homeostático entre oxidantes y antioxidantes (Harvey y cols., 2002; Dennery, 2004).

### *Función ovárica y ROS*

El metabolismo aeróbico que utiliza O<sub>2</sub> es esencial para los requerimientos de energía de los gametos, y los radicales libres desempeñan un papel importante en los procesos fisiológicos dentro del ovario (Figura 13). Muchos estudios han demostrado la participación de las ROS en el entorno del fluido folicular, foliculogénesis y esteroidogénesis (Cindrova-Davies y cols., 2007; Al-Gubory y cols., 2010). El papel de las ROS y las enzimas antioxidantes, la superóxido dismutasa de cobre zinc (Cu-Zn SOD), la

superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) y GPx, en la maduración de los ovocitos fue proporcionado utilizando métodos de localización inmunohistoquímica, expresión de ARNm y ácido tiobarbitúrico que sugirieron un papel complejo en la ovulación y la función lútea en el ovario humano (Riley y Behrman, 1991; Tamate y cols., 1995) (Figura 13).

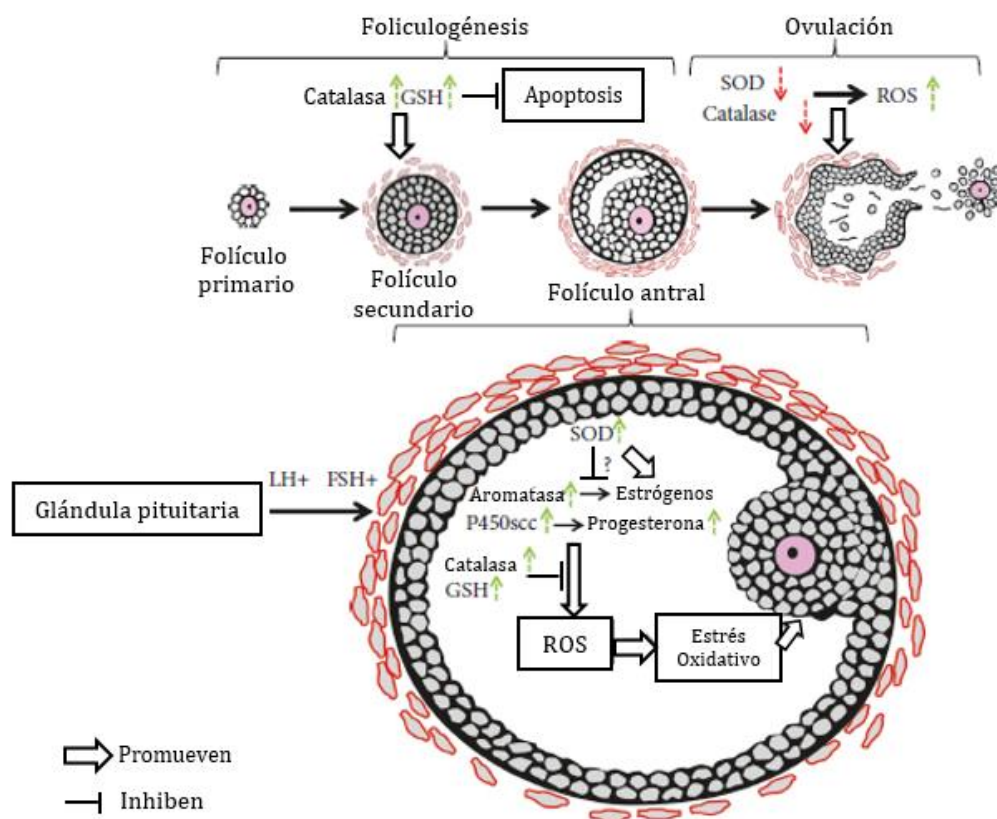


Figura 13. Representación esquemática de la regulación antioxidante en el desarrollo folicular. El proceso de desarrollo folicular se inicia con folículos primordiales a folículos primarios, seguido de folículos secundarios y folículos terciarios. Los folículos preovulatorios se forman bajo la estimulación de la FSH y, finalmente, la ovulación se desencadena por un aumento de la hormona luteinizante (LH). Todos estos eventos consecutivos y sincronizados están acompañados por la producción y eliminación de ROS. Los antioxidantes están fuertemente modulados durante este proceso. La expresión de catalasa y GSH en los folículos mejora con el crecimiento folicular, mientras que la actividad SOD se reduce en la foliculogénesis. Se demostró que la SOD tiene efectos inhibitorios sobre la síntesis de estrógenos al inhibir la actividad de la aromatasa inducida por FSH en las células de la granulosa cultivadas, mientras que la actividad de la enzima SOD se correlaciona positivamente con los niveles de estradiol en el líquido folicular. Se puede producir una gran cantidad de ROS durante la esteroidogénesis, especialmente durante la conversión de colesterol a pregnenolona a través del citocromo P450scc. La gonadotropina induce la regulación positiva de antioxidantes como la catalasa; GSH en los folículos protege a los ovocitos del estrés oxidativo generado por procesos metabólicos fisiológicos, como la esteroidogénesis, en el ovario (Modificado de Wang y cols., 2017).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo afecta el cuerpo lúteo y la capacidad esteroidogénica tanto *in vitro* como *in vivo*. En un estudio en el que utilizaron cuerpos

lúteos recolectados de pacientes embarazadas y no embarazadas, se observó que en situaciones normales la expresión Cu-Zn SOD, es paralela a los niveles de progesterona, con un aumento de la fase luteal temprana a la fase lútea media y una disminución durante la regresión del cuerpo lúteo. Sin embargo, la expresión de ARNm de Cu-Zn SOD en el cuerpo lúteo durante el embarazo fue mucho mayor que la de los cuerpos lúteos en la mitad del ciclo. Este factor aumentó la expresión de SOD durante el embarazo, posiblemente causada por el aumento de los niveles de gonadotropina coriónica humana (hCG), y puede ser la causa de la apoptosis de los cuerpos lúteos (Agarwal y cols., 2012).

Del mismo modo, las enzimas antioxidantes GPx y MnSOD se consideran los marcadores para la maduración citoplásmica, ya que se expresan solo en los ovocitos en metafase II (Mouatassim y cols., 1999). La disminución del potencial de desarrollo de los ovocitos de los folículos pobremente vascularizados también se ha atribuido a la baja oxigenación intrafolicular (Chui y cols., 1997; Van Blerkom y cols., 1997).

Una lipoperoxidación intensificada en el folículo de Graaf preovulatorio y que la GPx puede ayudar a mantener niveles bajos de hidroperóxidos dentro del folículo, lo que sugiere un papel importante del estrés oxidativo en la función ovárica (Paszowski y cols., 1995; Jozwik y cols., 1999). El estrés oxidativo y el proceso inflamatorio toman su lugar en la fisiopatología de la enfermedad del ovario poliquístico y los fármacos como la rosiglitazona puede ser eficaz al disminuir los niveles de estrés oxidativo (Sabuncu y cols., 2001; Yilmaz y cols., 2005).

Los cambios cíclicos en el endometrio están acompañados por cambios en la expresión de varios antioxidantes en el endometrio. La tiorredoxina, tiene una mayor expresión en la fase secretora temprana y esto podría ser importante para la implantación (Maruyama y cols., 1997).

La alteración dirigida del gen de la tiorredoxina en ratones se asoció con los efectos letales en el embrión temprano (Matsui y cols., 1996).

Además, se observó un aumento de la expresión de SOD en el endometrio en la fase secretora tardía, justo antes de la menstruación. Se observó que la expresión de MnSOD inducida por el TNF- $\alpha$  en las células del estroma endometrial humano era mediante la activación del NF $\kappa$ B (Sugino y cols., 2002). La extracción de estrógeno o progesterona



condujo a un aumento de la expresión del ARNm de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y un aumento de la síntesis de prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) en células endometriales in vitro. Estos estudios sugieren un papel para la activación de NFκB mediada por ROS en la fisiología endometrial en relación con la implantación y/o la menstruación (Sugino y cols., 2004).

## 2. ANTECEDENTES

### *Bloqueos farmacológicos a la Dopamina*

Domínguez y colaboradores (1987) evaluaron los efectos del antagonista inespecífico de la dopamina: haloperidol, en diferentes fases del ciclo estral sobre la ovulación espontánea y la distribución de la población folicular de los ovarios de la rata adulta. En este experimento se utilizaron *ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días* (animales cíclicos) que fueron inyectadas con haloperidol (2.5 mg/kg de peso; i.m.), a las 08:00, 13:00 y 20:00 h del día del estro, diestro1, diestro 2 o proestro, y todas ellas se sacrificaron en la mañana del estro esperado. El haloperidol inhibió la ovulación cuando se administró en los días del estro y diestro-1 pero fue menos efectivo cuando se inyectó en el diestro-2 y en el proestro; la población folicular mostró alteraciones en el crecimiento de los folículos que dependieron del momento en que se bloquearon los receptores dopaminérgicos. Estos resultados permitieron sugerir que la información dopaminérgica en la primera mitad del ciclo estral es fundamental para que la secuencia de eventos neuroendocrinos y endocrinos que culminan con la ovulación se lleve a cabo de manera normal, lo que aparentemente es diferente en la segunda mitad del ciclo estral.

Se ha reevaluado la participación de la dopamina en la regulación del ciclo estral y la ovulación espontánea de la rata y se han confirmado las observaciones de Domínguez y colaboradores (1987). La administración subcutánea de una dosis única de haloperidol en la primera (Ramírez-Ávila, 2001) o en la segunda mitad del ciclo estral (Pastelín-Rojas, 2003) interrumpe el ciclo e inhibe de modo claro la secreción de gonadotropinas y de estrógenos.

En estos trabajos, independientemente del momento del ciclo estral en que se realizó el bloqueo de los receptores dopaminérgicos, el desarrollo folicular se ve interrumpido y los índices de atresia se incrementan casi de manera absoluta en todos los animales. Si bien estos

efectos pudieran ser explicados por la interrupción de la secreción de gonadotropinas, el reemplazo hormonal fue ineficaz para restablecer la función ovárica (Vargas-Torres, 2002), lo que nos permitió suponer que el bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos de los ovarios pudiera involucrar de manera directa mecanismos endócrinos, neuroendocrinos y nerviosos que son indispensables en el autocontrol de la función ovárica dentro del eje Hipotálamo-Adenohipófisis-Gónada.

El efecto preferente de la sulpirida sobre estructuras límbicas (relacionado con la acción antipsicótica de los neurolépticos), junto con su escasa actividad en áreas *nigro-estriatales* (relacionada con los efectos extrapiramidales), podría estar favoreciendo una acción antipsicótica específica sin acompañarse de los importantes efectos extrapiramidales provocados por otros neurolépticos típicos como el haloperidol. Por otro lado, a diferencia de otros neurolépticos como la clozapina o el haloperidol, la sulpirida no interactúa significativamente con receptores de otros neurotransmisores, por lo que su perfil atípico no parece relacionarse con el bloqueo serotoninérgico, muscarínico o alfa-adrenérgico (Palomo, 1991).

Estudios en los que se han utilizado agonistas y antagonistas de la dopamina alteran los eventos reproductivos en el ovario. Nuestro grupo de investigación ha mostrado recientemente la importancia del sistema dopaminérgico ovárico (Venegas y cols., 2015), confirmando las observaciones de Domínguez y colaboradores (1987) hace tres décadas. Se corroboró que en el modelo de la rata adulta con ciclos estrales regulares de cuatro días (animales cíclicos), en el día del diestro 1, el sistema de receptores dopaminérgicos del ovario es indispensable para que se presente la ovulación en la mañana del estro esperado.

Este estudio se realizó al administrar de forma local, tres diferentes antagonistas dopaminérgicos: haloperidol (antagonista inespecífico de los receptores a la dopamina), un antagonista específico del RDA2 como la sulpirida y un antagonista específico del RDA1 como el SCH23390; estos antagonistas se inyectaron dentro de las bursas ováricas en diferentes horarios a lo largo del ciclo estral. De manera interesante, la sulpirida y haloperidol se comportaron de manera semejante, inhibiendo la ovulación espontánea cuando se administró desde la noche del estro, hasta la mañana del diestro 2, lo que no

ocurrió cuando se inyectó el SCH23390, que inhibió la ovulación espontánea solo en la mañana y noche del diestro 1.

La dopamina ha sido encontrada en el líquido folicular de folículos preovulatorios humanos en altas concentraciones y en cultivo de células de la granulosa de folículos humanos se ha mostrado la presencia de cuatro de los cinco subtipos de receptores dopaminérgicos, excepto el RDA3. En el ovario de rata se encontró el ARNm de los RDA1 y RDA2 en cuerpos lúteos y tejido intersticial mientras que en los folículos ováricos es moderada su presencia (Rey-Ares et al, 2007).

Con base en lo anterior, no hay suficiente evidencia que describa el papel funcional de la dopamina presente en los tejidos ováricos. Los diferentes estudios que abordan el análisis del papel de la innervación ovárica sobre las funciones de la gónada se han enfocado en los sistemas noradrenérgicos y peptidérgicos, funciones que se afectan sensiblemente cuando se modifican las influencias nerviosas que llegan al ovario. Incluso, se ignora si la dopamina detectada en los compartimentos anatómicos funcionales del ovario procede de terminales nerviosas o de algún otro tejido ovárico.

Por lo tanto, el antagonismo de los receptores dopaminérgicos del ovario permitiría analizar el papel funcional de la dopamina y sus receptores en el eje anatómico-funcional hipotálamo-adenohipófisis-gónada. En este proyecto de tesis, nos enfocaremos en las posibles funciones del RDA2.

### *Dopamina y Especies Reactivas al Oxígeno en la Reproducción*

Recientemente, se ha probado que la dopamina puede incrementar las ROS, en células de la granulosa humana, incremento que es independiente de la unión a su receptor, pero si a través del sistema de recaptura y su metabolismo. Este efecto se vio en pacientes con SOP y en mujeres sanas, donde se demostró que la dopamina presente en el líquido folicular se encuentra incrementada en las pacientes con el síndrome, así como los niveles del mensajero del DAT, MAO A y MAO B; en este mismo estudio se probó el uso de inhibidores del DAT y de las MAOs en cultivo de células de la granulosa de mujeres sanas, las cuales habían sido estimuladas previamente con dopamina lo que provocó la

disminución de la concentración de ROS, provocando modificaciones sobre las funciones de los ovarios que muestran los pacientes con SOP (Saller y cols., 2014).

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

Los efectos observados por el bloqueo farmacológico del RDA2 podrían explicarse por la expresión diferencial de los receptores de acuerdo al día del ciclo estral y por ovario; es decir, que en los días donde se encontraron cambios por la administración de los antagonistas sean los días de mayor expresión de los receptores y que al bloquear un receptor particular, el sistema responda para compensar la disminución de sus función incrementando la expresión de los receptores bloqueados además del incremento en la concentración de dopamina dando como resultado la “desregulación” de la función ovárica modulada por el sistema dopaminérgico ovárico. Por otra parte, el incremento de dopamina ovárica resultaría en un incremento de su metabolismo, una mayor actividad por parte del DAT, las MAO y COMT para la generación de ácido homovanílico y peróxido de hidrógeno, el aumento de las ROS provocaría a su vez un desequilibrio en el balance oxido-reducción con efectos que podrían influir sobre la ovulación. Aunque, hasta hoy, aún no existe evidencia que respalde esta hipótesis.

La formación de ROS es importante para la ovulación, se ha demostrado que al administrar antioxidantes directamente en las bursas ováricas de ratones hormonalmente inducidos a ovular reduce la cuota ovulatoria de estos animales, los antioxidantes previenen la expansión del cumulus inducido por la LH esto es necesario para que se lleve a cabo la

ovulación, en el mismo estudio utilizaron peróxido de hidrógeno el cual resulto tener un efecto muy similar a la LH, esto sugiere que la producción de ROS en los ovarios es un evento de señalización preovulatorio esencial, muy probablemente desencadenado transitoriamente por LH (Shkolnik y cols., 2011).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Como se ha señalado, es probable que exista una relación funcional entre la dopamina y la generación de las ROS pero se tiene escasa información sobre el papel de la señal dopaminérgica a lo largo del ciclo estral y los índices de estrés oxidativo en la rata adulta. El papel que juega la dopamina y el estrés oxidativo en el ovario ha sido tema de análisis de varios investigadores y se especula sobre esta relación y el desarrollo de ciertas patologías que comprometen la fertilidad en las hembras.

El impacto del estrés oxidativo sobre la ovulación y las funciones reproductivas cuando se bloquean las funciones de la dopamina, aún no es del todo claro, por lo que el presente trabajo pretende analizar el efecto de la interrupción de la señal dopaminérgica en diferentes momentos del ciclo estral de la rata y con ello, intentar describir el papel de la dopamina ovárica en la integración de señales endócrinas y neuroendócrinas que operan en el eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario que conducen a la ovulación en la rata. Por tanto, la pregunta de investigación sería: ¿De qué manera influye la presencia de la dopamina y la generación de las ROS en los ovarios en los diferentes días del ciclo estral en la rata adulta?

### **4. JUSTIFICACIÓN**

Existe un creciente interés por dilucidar las causas de diferentes síndromes y patologías ováricas que producen infertilidad o problemas en la ovulación, enfermedades como el SOP, las que pudieran deberse a disfunciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

Si estos trastornos de la función reproductiva son ocasionados por deficiencia en los mecanismos de señales humorales, otros podrían ser explicados por alteraciones en las señales nerviosas de ingreso y salida por los ovarios; aunque no ha sido demostrado el papel

funcional de esta señal química. El propósito del presente trabajo fue analizar los efectos del antagonismo hacia el RDA2 y analizar los efectos sobre la ovulación espontánea y las concentraciones de las ROS y algunos metabolitos indicadores de lipoperoxidación a lo largo del ciclo estral en los ovarios de la rata.

## **5. HIPÓTESIS**

La microinyección dentro de las bursas ováricas con el antagonista sulpirida, en los diferentes días del ciclo estral, induce cambios en la ovulación espontánea, en la generación de indicadores de lipoperoxidación y de especies reactivas al oxígeno.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. General:**

Analizar los efectos de la microinyección sulpirida dentro de las bursas ováricas en ratas adultas cíclicas, en diferentes días del ciclo estral, sobre la ovulación espontánea, la generación de indicadores de lipoperoxidación y de especies reactivas al oxígeno.

### **6.2 Particulares:**

6.2.1 Analizar los efectos de la microinyección de sulpirida, en los diferentes días del ciclo estral sobre la ovulación espontánea y la duración del ciclo.

6.2.2 Analizar los efectos de la microinyección de sulpirida en los diferentes días del ciclo estral, sobre la generación de indicadores de lipoperoxidación y las especies reactivas al oxígeno.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Animales de Experimentación y Control del Ciclo Estral

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa CII-ZV, con edades de 90-120 días y con peso corporal de 200-250 g, mantenidas en condiciones de iluminación controlada (14 h luz/10 h oscuridad; luces de las 05:00 h a las 19:00 h) y con libre acceso al agua y al alimento balanceado. Todos los animales incluidos en los experimentos fueron tratados de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999.

Con el fin de controlar las fases del ciclo reproductor, se realizaron los registros del ciclo estral por medio de frotis vaginales que se tomaron diariamente entre las 09:00 y las 10:00 h. Una vez que los animales presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración (diestro 1, diestro 2, proestro y estro; ratas cíclicas) fueron asignados a los diferentes grupos experimentales (los números entre paréntesis indican el total de animales utilizados por cada grupo experimental, siendo una N=138, sumando todos los grupos experimentales) (Cuadro 4).

	<b>Diestro 1</b>	<b>Diestro 2</b>	<b>Proestro</b>	<b>Estro o EVO*</b>
<b>Control</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6*</b>
<b>Vehículo</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6 (24*)</b>
<b>Sulpirida</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6 (24*)</b>
<b>Vehículo</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6 (30)</b>
<b>Sulpirida</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6 (36)</b>

### ***7.2 Microinyección del antagonista específico: sulpirida sobre la ovulación espontánea y la secreción de gonadotropinas (estimada por la duración del ciclo estral).***

Entre las 13:00-14:00 h del diestro 1, diestro 2, proestro o estro, se formaron grupos de animales cíclicos que fueron sedados con vapores de isoflurano y sometidos a laparotomía dorso-bilateral a nivel de la región inguinal, se exteriorizaron los ovarios y se realizó una microinyección dentro de cada bursa ovárica con ayuda de una bomba de nanoperfusión molar, se administró 20 µL de solución de sulpirida (100µg/ovario). Como grupos testigo, se utilizaron animales cíclicos que recibieron la microinyección en las bolsas ováricas del vehículo: ácido ascórbico al 0.1%.

En todos los animales, se reanudó el registro del ciclo estral al día siguiente y todos los animales fueron sacrificados entre las 09:00 y 10:00 h del siguiente estro vaginal observado (EVO) y se registró la duración del ciclo estral en cada grupo. Como grupos control absolutos, se utilizaron animales cíclicos intactos que fueron sacrificados en la mañana del EVO, luego de tres o cuatro ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración.

Para realizar la autopsia, los animales fueron sedados con vapores de isoflurano. Se disecaron los ovarios y los oviductos, en estos últimos se buscaron los signos de ovulación y se contó el número de ovocitos liberados. Los ovarios, fueron manejados en frío, pesados en balanza de precisión 0.1 mg y almacenados en congelación a -40°C hasta el momento de su análisis para los indicadores de lipoperoxidación y de las ROS, como se indica a continuación.

### ***7.3 Sulpirida: cuantificación de los indicadores de lipoperoxidación y especies reactivas al oxígeno en los ovarios.***

Para extraer los indicadores de lipoperoxidación y de las ROS, con ayuda de un homogenizador, cada ovario fue triturado en hielo, fue pulverizado exhaustivamente; posteriormente se centrifugó a 3500 RPM durante 40 minutos para obtener el sobrenadante, que se utilizó para el ensayo de los indicadores de lipoperoxidación (cuantificación de *malondilaldehído*, MDA, y *4-Hidroxi-Alquenes*, 4-HDA) y ROS, por medio de la técnica de Gérard-Monnier.



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

Las ROS se evaluaron utilizando 5  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, que se diluyó en 9 volúmenes de 40 mM de tampón TRIS más HEPES y luego se incubaron con diacetato de diclorodihidrofluoresceína 2'7' (DCFH-DA) 5  $\mu\text{M}$ . Las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C bajo agitación constante antes de que las señales de fluorescencia fueran determinadas en un espectrómetro de luminiscencia *Perkin Elmer* LS50-B con longitud de onda de excitación de 488 nm y de onda de emisión de 525 nm. Los valores se obtuvieron interpolando las lecturas con una curva estándar de 2'7'-diclorofluoresceína (DCF) (Sigma-Aldrich). Los resultados se expresaron como nanomolas de DFC formados por miligramo de proteína por minuto.

En aquellos grupos donde se observaron cambios en la duración del ciclo estral y/o en el número de ovocitos liberados, otros animales tratados con la sulpirida fueron sacrificados cada 24 horas, con la finalidad de obtener un perfil de los cambios en los indicadores de lipoperoxidación y en las ROS a lo largo del ciclo estral.

#### **7.4 Análisis Estadístico**

La duración del ciclo estral y el número de ovocitos liberados fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. En aquellos casos donde se compararon pares de medianas, se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Los datos de la cuantificación de indicadores de lipoperoxidación y las especies reactivas al oxígeno al tener una muestra menor a 6, fueron analizados por la prueba de

Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; en aquellos casos donde se compararon pares de medias. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias iguales o menores al  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Efectos de la microinyección de sulpirida, en los diferentes días del ciclo estral sobre la ovulación espontánea y la duración del ciclo.

El tratamiento con sulpirida realizado a las 13:00h del diestro 1 indujo un retraso significativo en la duración del ciclo estral, lo que no ocurrió en ninguno de los otros grupos tratados con el antagonista ni en los grupos testigo tratados con el ácido ascórbico (Tabla 1). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos liberados entre los diferentes grupos respecto a la cuota ovulatoria del grupo de animales intactos (Tabla 1).

<b>Tabla 1. Número de ovocitos liberados y duración del ciclo estral (días) <math>\pm</math> e.e.m de las ratas que presentaron un patrón regular de ciclicidad vaginal y que recibieron una microinyección en las bursas ováricas (MIB) 20 <math>\mu</math>L de sulpirida (10<math>\mu</math>g/<math>\mu</math>L) o del vehículo (ácido ascórbico 0.1%) a las 13:00h del Estro, Diestro-1, Diestro-2 o Proestro.</b>				
<b>Grupo Experimental</b>	<b>Duración del ciclo estral (días) (n)</b>		<b>Número de ovocitos liberados (n)</b>	
<b>Control Absoluto</b>	<b>4.0 <math>\pm</math> 0.0 (10)</b>		<b>12.4 <math>\pm</math> 0.4 (10)</b>	
	<b>Vehículo</b>	<b>Sulpirida</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Sulpirida</b>
<b>MIB en Estro</b>	<b>4.2 <math>\pm</math> 0.2 (6)</b>	<b>4.0 <math>\pm</math> 0.0 (6)</b>	<b>12.1 <math>\pm</math> 1.4 (6)</b>	<b>13.3 <math>\pm</math> 1.0 (6)</b>
<b>MIB en Diestro 1</b>	<b>4.1 <math>\pm</math> 0.1 (8)</b>	<b>4.9 <math>\pm</math> 0.1* (8)</b>	<b>12.8 <math>\pm</math> 0.7 (8)</b>	<b>12.8 <math>\pm</math> 0.9 (8)</b>
<b>MIB en Diestro 2</b>	<b>4.0 <math>\pm</math> 0.0 (6)</b>	<b>4.0 <math>\pm</math> 0.0 (6)</b>	<b>12.8 <math>\pm</math> 1.2 (6)</b>	<b>10.8 <math>\pm</math> 0.4 (6)</b>
<b>MIB en Proestro</b>	<b>4.0 <math>\pm</math> 0.0 (6)</b>	<b>4.0 <math>\pm</math> 0.0 (6)</b>	<b>11.8 <math>\pm</math> 0.8 (6)</b>	<b>11.5 <math>\pm</math> 0.6 (6)</b>
<b>* <math>p &lt; 0.001</math> comparado con todos los grupos (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn)</b>				

Tampoco se observaron cambios en el peso relativo de los ovarios ni en el peso del útero entre los diferentes grupos experimentales (Tabla 2).

<b>Tabla 2. Peso relativo de los ovarios (mg/100 g peso corporal) <math>\pm</math> e.e.m. y peso relativo del útero (mg/100 g peso corporal) en los animales cíclicos que recibieron una microinyección de sulpirida o de ácido ascórbico dentro de las bolsas ováricas a las 13:00h de uno de los días del ciclo estral (Estro, Diestro 1, Diestro 2 o Proestro). Los datos que se muestran corresponden a la mañana del siguiente estro vaginal observado.</b>				
<b>Grupo</b>	<b>OI</b>		<b>OD</b>	<b>Peso del Útero</b>
<b>Control Absoluto</b>	<b>14.1 <math>\pm</math> 0.6</b>		<b>13.4 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>157.1 <math>\pm</math> 3.5</b>
	<b>Ácido Ascórbico</b>		<b>Sulpirida</b>	
	<b>OI</b>	<b>OD</b>	<b>OI</b>	<b>OD</b>
<b>Estro</b>	<b>12.9 <math>\pm</math> 1.2</b>	<b>14.2 <math>\pm</math> 1.2</b>	<b>14.8 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>13.7 <math>\pm</math> 0.5</b>
<b>Diestro 1</b>	<b>15.6 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>14.6 <math>\pm</math> 1.0</b>	<b>13.3 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>12.7 <math>\pm</math> 0.6</b>
<b>Diestro 2</b>	<b>11.9 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>13.6 <math>\pm</math> 0.7</b>	<b>14.2 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>14.3 <math>\pm</math> 0.7</b>
<b>Proestro</b>	<b>14.4 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>15.0 <math>\pm</math> 0.9</b>	<b>15.8 <math>\pm</math> 1.2</b>	<b>13.0 <math>\pm</math> 0.6</b>
	<b>Peso Ovárico</b>			
	<b>Ácido Ascórbico</b>		<b>Sulpirida</b>	
<b>Estro</b>	<b>13.5 <math>\pm</math> 0.8</b>		<b>14.3 <math>\pm</math> 0.5</b>	
<b>Diestro 1</b>	<b>15.1 <math>\pm</math> 0.7</b>		<b>13.0 <math>\pm</math> 0.6</b>	
<b>Diestro 2</b>	<b>12.8 <math>\pm</math> 0.4</b>		<b>14.3 <math>\pm</math> 0.4</b>	
<b>Proestro</b>	<b>14.7 <math>\pm</math> 0.5</b>		<b>14.4 <math>\pm</math> 0.7</b>	
	<b>Peso del Útero</b>			
	<b>Ácido Ascórbico</b>		<b>Sulpirida</b>	
<b>Estro</b>	<b>149.4 <math>\pm</math> 5.0</b>		<b>152.7 <math>\pm</math> 8.9</b>	
<b>Diestro 1</b>	<b>153.8 <math>\pm</math> 7.4</b>		<b>155.1 <math>\pm</math> 9.9</b>	
<b>Diestro 2</b>	<b>170.8 <math>\pm</math> 8.2</b>		<b>145.7 <math>\pm</math> 8.3</b>	
<b>Proestro</b>	<b>177.2 <math>\pm</math> 12.9</b>		<b>169.0 <math>\pm</math> 10.4</b>	
<b>p&lt;0.05 comparado con los grupos tratados con ácido ascórbico y sulpirida indicados (ANOVA seguida de la Prueba de Tukey-Kramer).</b>				

## 8.2 Efectos de la microinyección de sulpirida en los diferentes días del ciclo estral, sobre la generación de indicadores de lipoperoxidación y las especies reactivas al oxígeno.

En el grupo de animales intactos se observó una mayor producción de indicadores de lipoperoxidación en la tarde del diestro 2, que es significativamente mayor a la que se genera en diestro 1 y proestro (diestro 2:  $145.8 \pm 15.2$  nM/mg proteína vs diestro 1:  $70.6 \pm 12.4$  nM/mg y proestro:  $69.5 \pm 9.7$  nM/mg proteína) (Figura 14).

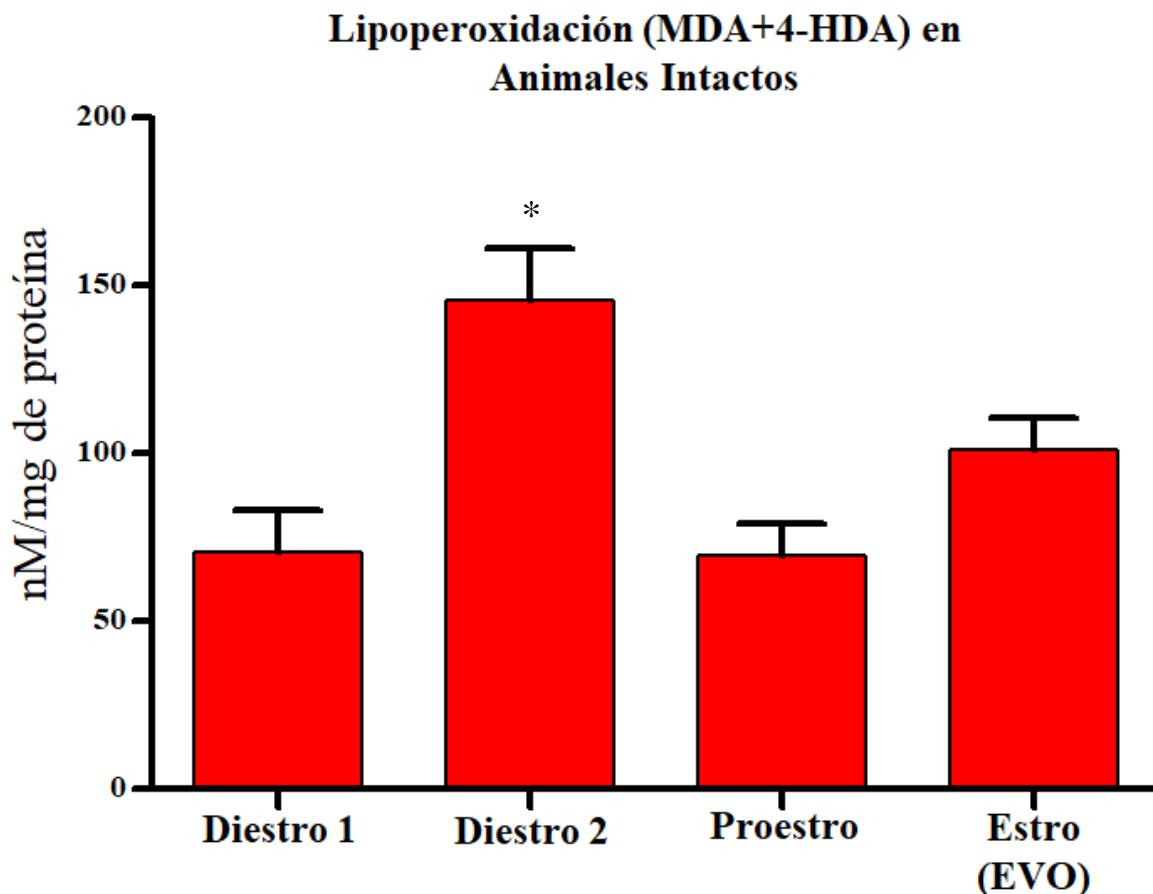


Figura 14. Media  $\pm$  e.e.m de las concentraciones de indicadores de lipoperoxidación (MDA: malondialdehído, 4-HDA: 4-hidroxi-alquenes) de animales intactos en homogenados de los ovarios sacrificados a las 13:00h del diestro 1, diestro 2 o proestro (la última barra indica la concentración de indicadores de lipoperoxidación correspondiente a animales cíclicos que se sacrificaron en la mañana del estro vaginal observado: EVO); \*  $p < 0.05$  comparado con diestro-1 y proestro; prueba de Kruskal-Wallis y *post hoc* de Dunn).

Sin embargo, el análisis de las concentraciones de las ROS mostró que en el grupo de animales intactos no hubo diferencia significativa en los diferentes días del ciclo estral (Figura 15).

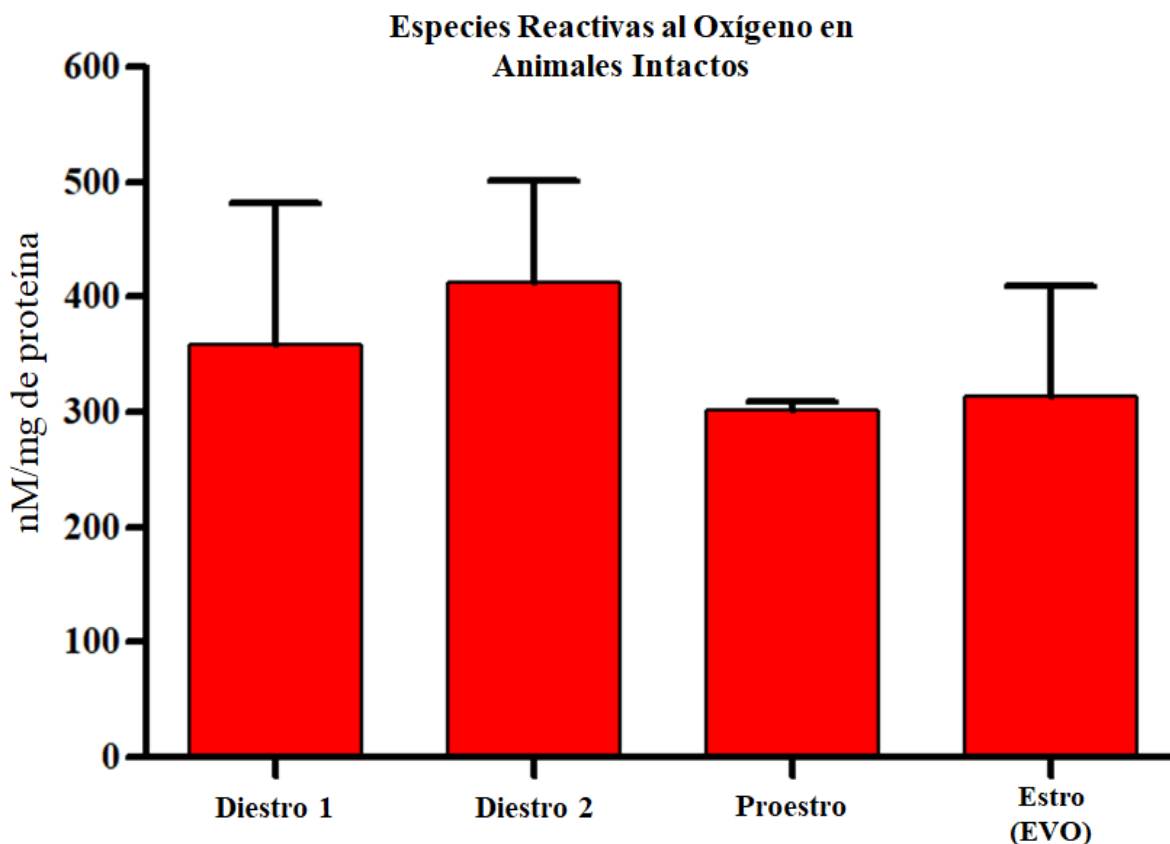


Figura 15. Media  $\pm$  e.e.m de las concentraciones de especies reactivas al oxígeno (ROS) de animales intactos sacrificados a las 13:00h en homogenados de ovarios sacrificados a las 13:00h del diestro 1, diestro 2 o proestro (la última barra indica la concentración de ROS correspondiente a animales cíclicos que se sacrificaron en la mañana del estro vaginal observado: EVO).

Los indicadores de lipoperoxidación en el tejido ovárico registrados en la mañana del EVO fueron significativamente menores en los grupos tratados con la sulpirida o el ácido ascórbico comparados con los del grupo de animales cíclicos intactos (Sulpirida:  $15.97 \pm 2.90$ , Ácido Ascórbico:  $27.31 \pm 9.80$  vs Control:  $101.2 \pm 9.17$ ;  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn).

Aunque no se encontraron diferencias significativas en este parámetro, cuando se compararon por día del ciclo entre los grupos con la microinyección de ácido ascórbico o sulpirida en el diestro 2, proestro y estro (Figura 16).

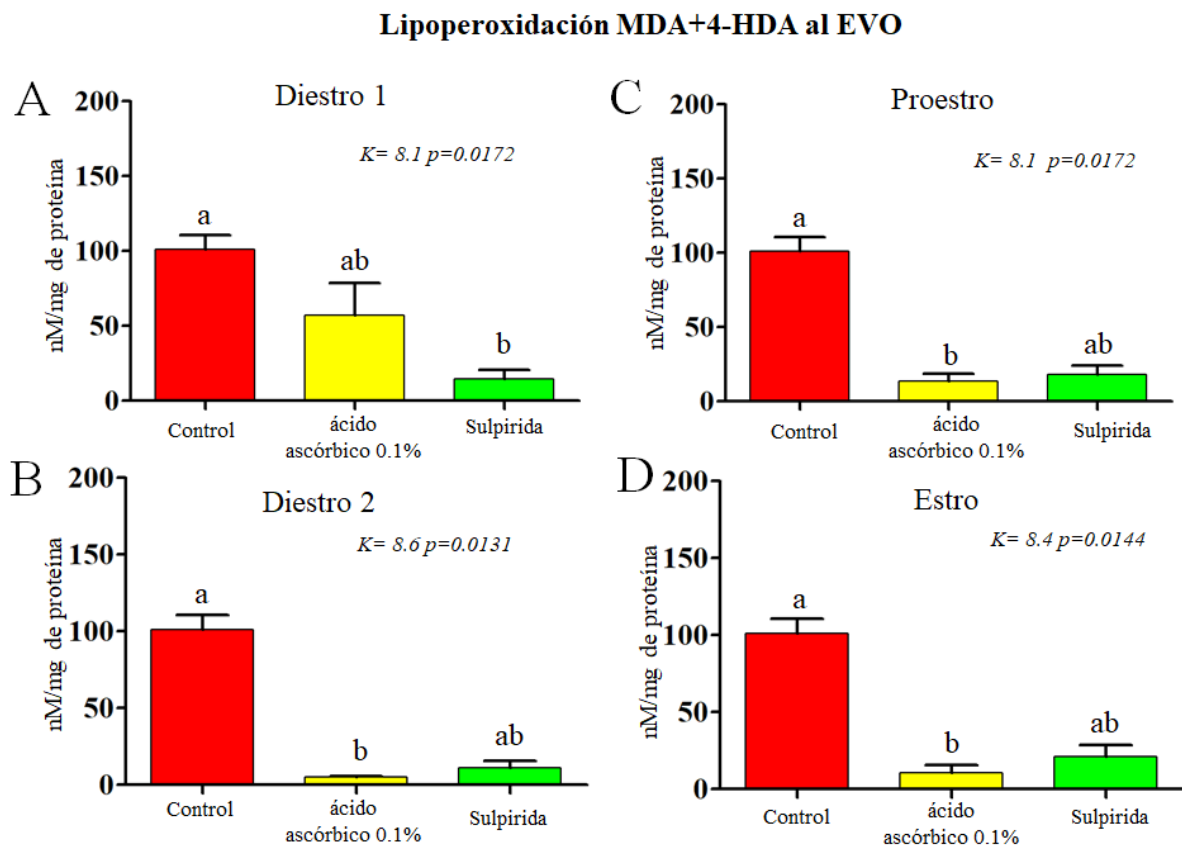


Figura 16. Medias  $\pm$  e.e.m de las concentraciones (nanomolas/miligramo de proteína) de los indicadores de liperoxidación (MDA: malondialdehído, 4-HDA: cuatro-hidroxi-alquenales) en homogenados de los ovarios de animales intactos y tratados con 20  $\mu$ L de ácido ascórbico 0.1% o 100  $\mu$ g/ovario de sulpirida a las 13:00 h, en los diferentes días del ciclo estral y sacrificados en el siguiente estro vaginal observado (EVO) (letras diferentes indican diferencia estadística con  $p \leq 0.05$ ; prueba de Kruskal-Wallis y *post hoc* de Dunn).

Por su parte, las concentraciones de ROS en los ovarios de los animales tratados con el ácido ascórbico sacrificados en la mañana del EVO mostraron niveles altos, pero en los grupos tratados con sulpirida, la concentración de ROS fue semejante a las del grupo control (Ácido Ascórbico:  $2740.1 \pm 558.5$  vs Sulpirida:  $216.5 \pm 20.7$  y Control:  $313.1 \pm 96.1$ ;  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis) (Figura 17).

### Especies Reactivas al Oxígeno al EVO

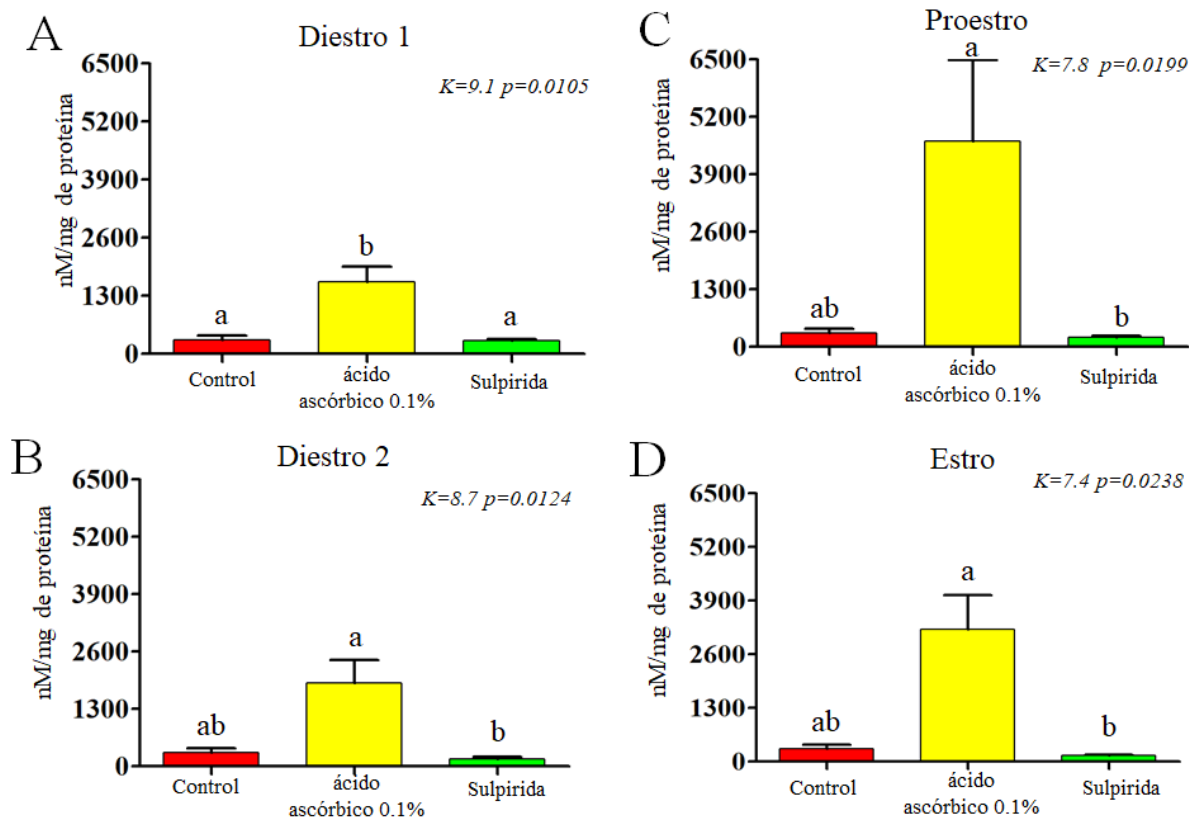


Figura 17. Medias  $\pm$  e.e.m de las concentraciones (nanomolas por miligramo de proteína) de las especies reactivas al oxígeno (ROS) en los ovarios de animales intactos, y animales tratados con ácido ascórbico 0.1% o sulpirida a las 13:00h en los diferentes días del ciclo estral y sacrificados hasta el estro vaginal observado (EVO). Análisis estadístico con Kruskal-Wallis y *post hoc* de Dunn. Letras diferentes indican diferencia estadística  $p \leq 0.05$ .

No obstante, el grupo de animales que fueron tratados con el ácido ascórbico o el antagonista, y sacrificados a las 24 horas, el grupo con ácido ascórbico y el grupo con sulpirida fueron semejantes en cualquier día que fue realizada la MIB, y se observó que fueron estadísticamente significativos el grupo control respecto a los grupos tratados con el ácido ascórbico o con la sulpirida en el día del diestro 1 y proestro, (Figura 18).

### Perfiles de Lipoperoxidación MDA+4-HDA

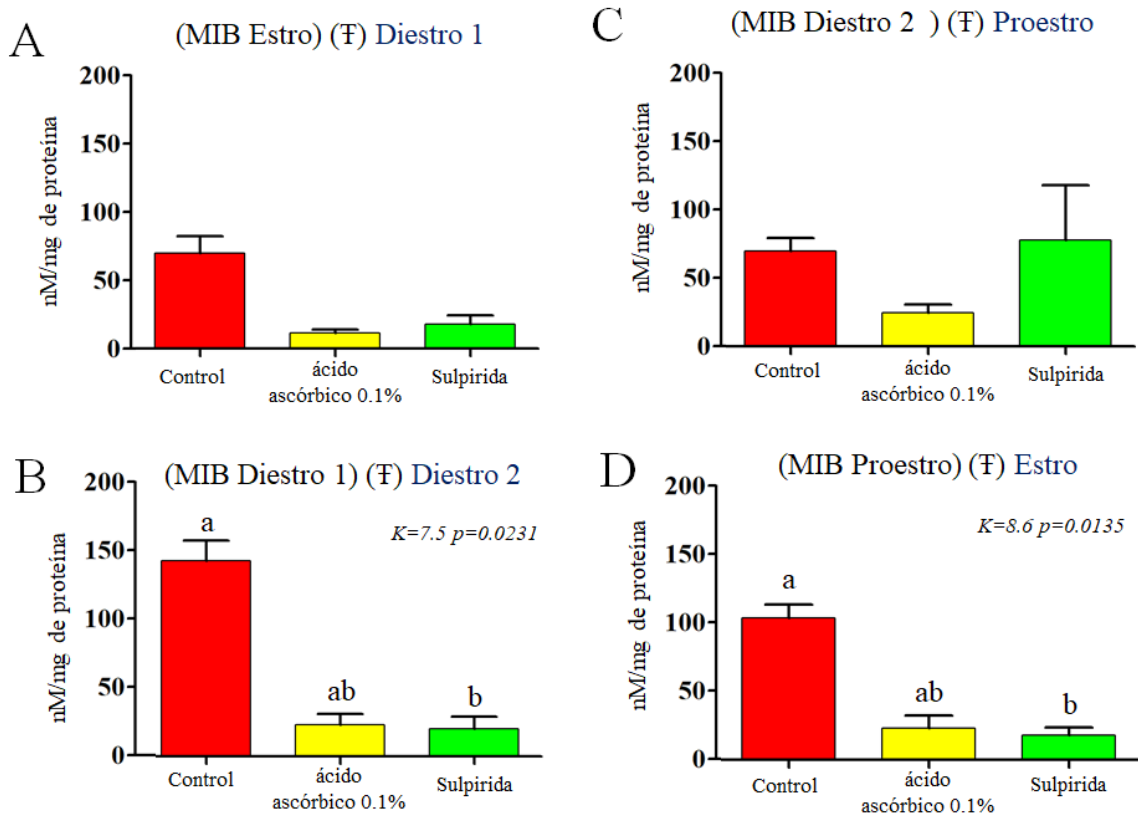


Figura 18. Medias  $\pm$  e.e.m de las concentraciones en nanomolas por miligramo de proteína de los indicadores de lipoperoxidación (MDA: malondialdehído, 4-HDA: cuatro-hidroxi-alquenes) en los ovarios de animales tratados con ácido ascórbico 0.1% o sulpirida a las 13:00h en los diferentes días del ciclo estral y sacrificados 24 horas después. Análisis estadístico con Kruskal-Wallis y *post hoc* de Dunn. Letras diferentes indican diferencia estadística  $p \leq 0.05$ . Microinyección en las bursas (MIB) F (autopsia).

Respecto a los análisis para las concentraciones de ROS, en el grupo control y el grupo con sulpirida fueron similares en cualquier día del ciclo, y nuevamente los grupos tratados con el ácido ascórbico tuvieron las concentraciones más elevadas comparadas con el grupo control y el grupo con sulpirida, algo muy similar a lo observado en la figura 17 (Ácido Ascórbico:  $1985.0 \pm 290.6$  vs Sulpirida:  $422.7 \pm 47.4$  y Control:  $343.7 \pm 40.1$ ;  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis) (Figura 19).



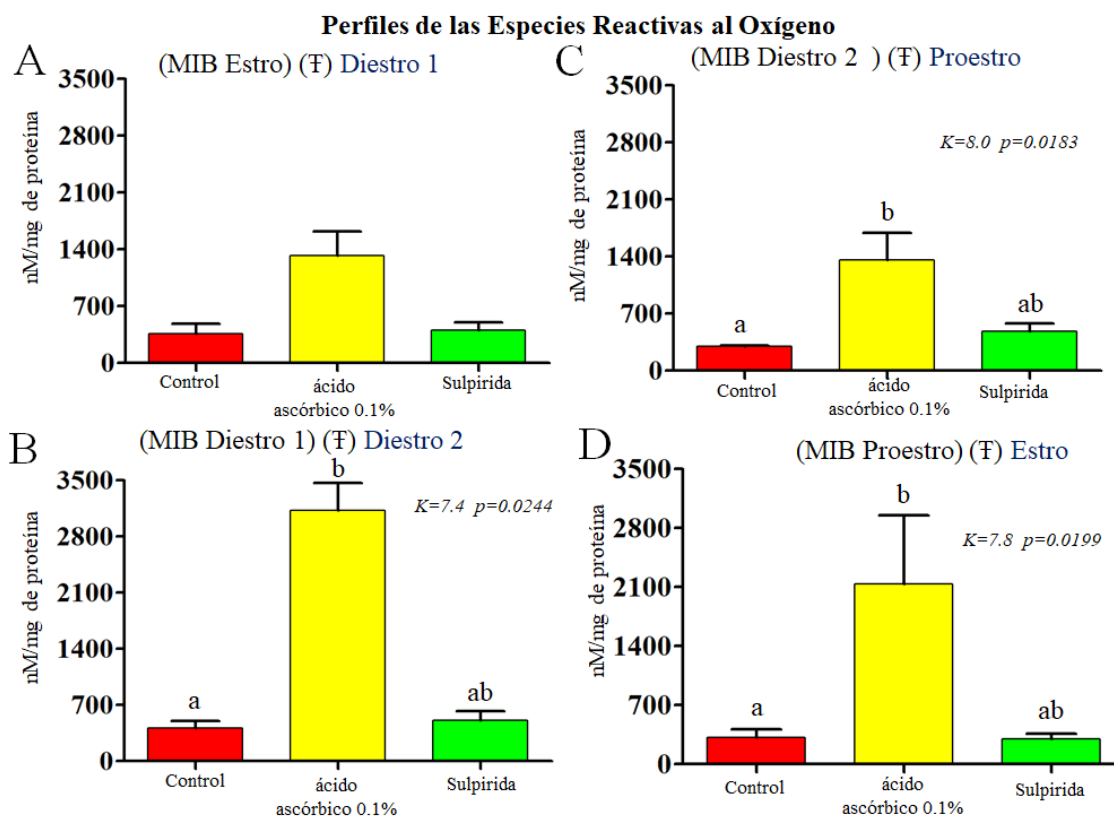


Figura 19. Medias  $\pm$  e.e.m de las concentraciones de especies reactivas al oxígeno en los ovarios de animales tratados con ácido ascórbico 0.1% o sulpirida a las 13h en las diferentes fases del ciclo estral y sacrificados 24 horas después). Análisis estadístico con Kruskal-Wallis y *post hoc* de Dunn. Letras diferentes indican diferencia estadística  $p \leq 0.05$ . Microinyección en las bursas (MIB) F (autopsia).

Dado que la MIB de sulpirida en la tarde del diestro 1 prolongó la duración del ciclo estral un día más, la MIB de sulpirida o ácido ascórbico fue evaluada en grupos de animales a las 24, 48, 72 y 90 horas después de la MIB.

Los indicadores de lipoperoxidación en animales tratados con el ácido ascórbico o con sulpirida en proestro, fueron mayores en el grupo tratado con el ácido ascórbico (48 horas) respecto al grupo tratado con sulpirida (72 horas). Para el grupo con sulpirida, las concentraciones de lipoperoxidación en el día del diestro 2, diestro 3, proestro y estro fueron similares (Figura 20).

En contraste, las concentraciones de ROS en animales tratados con sulpirida o con el ácido ascórbico en proestro fueron similares. Los grupos tratados con sulpirida, diestro 2 (24 horas) y diestro 3 (48 horas) tienen concentraciones de ROS similares (Figura 21).

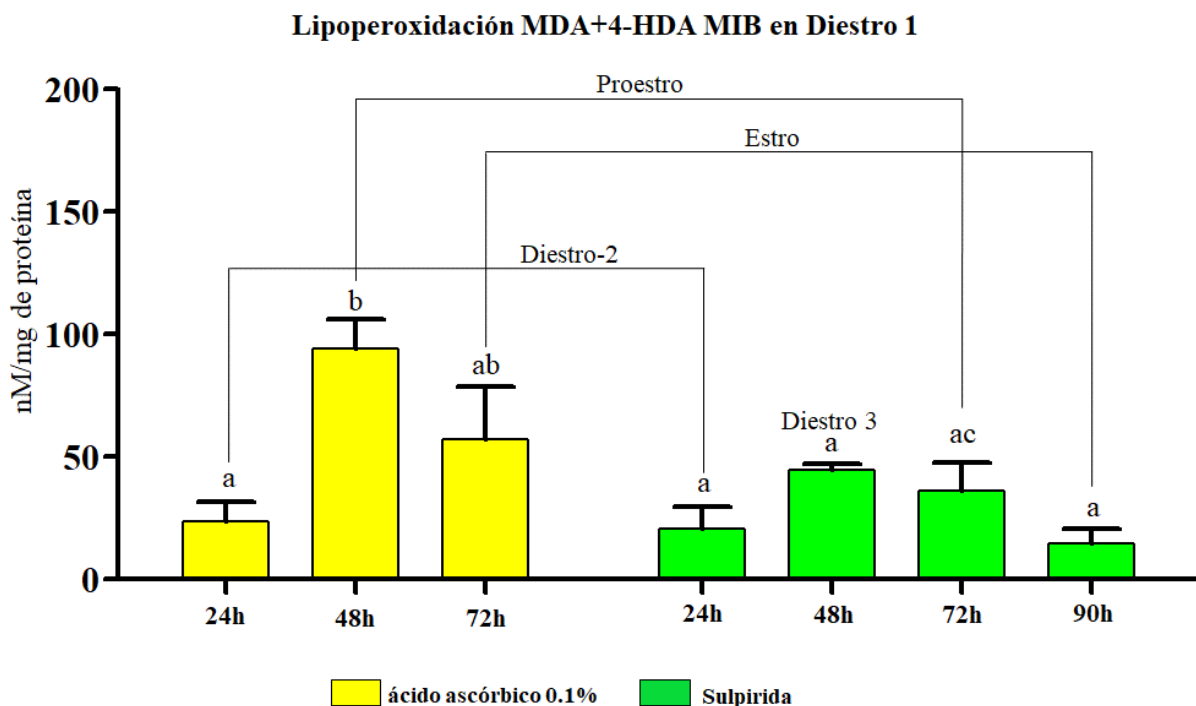


Figura 20. Medias  $\pm$  e.e.m de las concentraciones en nanomolas por miligramo de proteína de los indicadores de liperoxidación (MDA: malondialdehído, 4-HDA: cuatro-hidroxi-alquenes) en los ovarios, de animales a los que se les realizó la microinyección a las 13:00h en del diestro 1, con sulpirida o ácido ascórbico 0.1%, sacrificados 24 horas, 48 horas, 72 horas y 90 horas después de la MIB. Prueba U de Mann Whitney. Letras diferentes indican diferencia estadística  $p \leq 0.05$ . Microinyección en las bursas (MIB).

Se observó una similitud entre las concentraciones de liperoxidación y ROS en el grupo tratado con sulpirida, en los días del diestro 2 y diestro 3, con la aclaración de que los animales tratados con el antagonista en la tarde del diestro 1 se prolongó un día más el ciclo y se observaron concentraciones similares en dichos parámetros (Figuras 20 y 21).

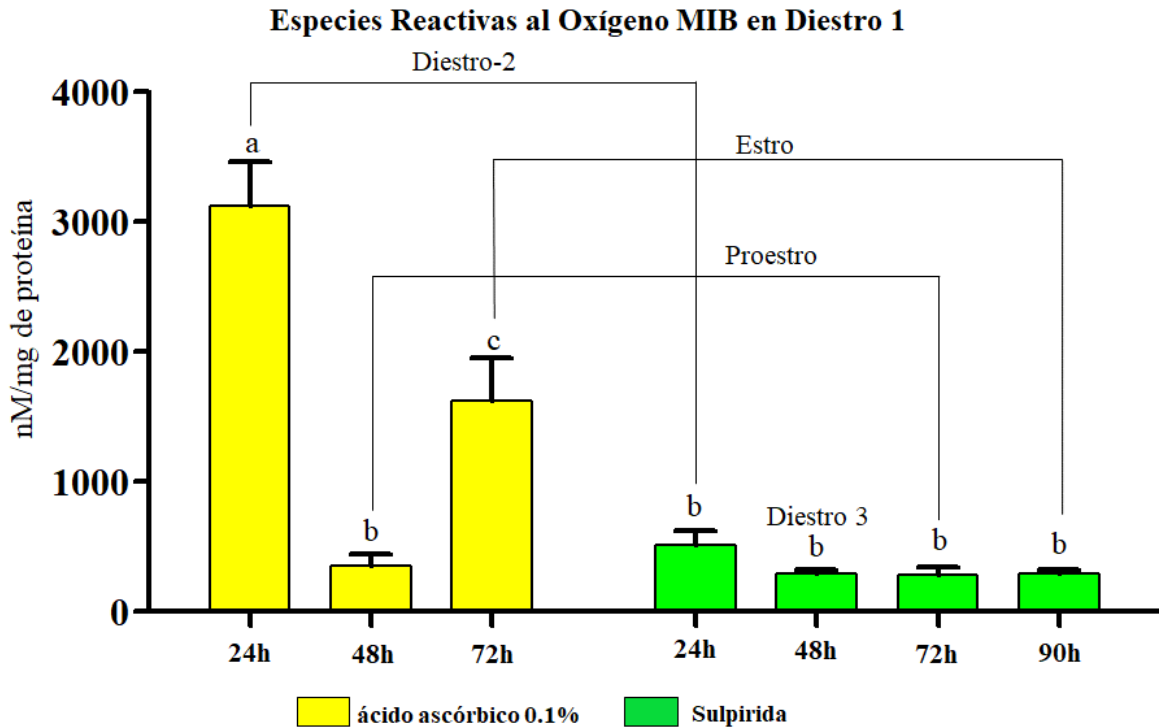


Figura 21. Medias  $\pm$  e.e.m de las concentraciones de especies reactivas al oxígeno en los ovarios, de animales a los que se les realizó la microinyección a las 13 horas en la fase del diestro 1, con sulpirida o ácido ascórbico 0.1%, sacrificados cada 24 horas, 48 horas, 72 horas, 90 horas después de la MIB. Prueba U de Mann Whitney. Letras diferentes indican diferencia estadística  $p \leq 0.05$ . Microinyección en las bursas (MIB).

## 9. DISCUSIÓN

### *Ovulación espontánea y duración del ciclo estral*

Los resultados obtenidos de estos experimentos demostraron el papel de los RDA2 sobre el ciclo estral y la ovulación, al ser afectada la duración del ciclo estral solo durante la tarde del diestro 1. Confirmamos que el RDA2 participa de manera diferente a lo largo del ciclo estral, donde su presencia es necesaria en el día del diestro 1 para la regulación temporal del ciclo estral, pero sin comprometer la cuota ovulatoria.

La microinyección con sulpirida indujo interrupción en señales que controlan la duración del ciclo estral afectando directamente las funciones endocrinas y neuroendocrinas del ovario y prolongando un día más el ciclo sin cambios en la cuota ovulatoria; esto no

ocurrió con los tratamientos en otros días del ciclo, en los cuales no se prolongó la duración del ciclo ni tampoco hubo cambios en la ovulación espontánea. Domínguez y colaboradores (1987) utilizaron un antagonista no selectivo de los receptores dopaminérgicos en ratas adultas cíclicas, con esto demostraron la importancia de las señales dopaminérgicas necesarias para que los mecanismos fisiológicos involucrados con la ovulación para ser llevados a cabo correctamente, ya que el antagonista administrado en el día del estro y el diestro 1 tuvieron efectos inhibitorios sobre la ovulación espontánea; estos resultados fueron interpretados en el sentido de que la participación de la dopamina tiende a ser más importante durante la primera fase del ciclo estral.

Resultados muy similares han sido reportados en nuestro laboratorio, realizando la administración local dentro del ovario, de antagonistas específicos para los RDA1 y RDA2: SCH23390, N-Etoxicarbonil-2-Etoxi-1,2 dihidroquinolina (EEDQ), haloperidol o sulpirida (Venegas y cols., 2015). Aún no se exploran los efectos del uso de los últimos dos antagonistas, ya que podrían incidir sobre el control de la descarga de prolactina desde la adenohipófisis; de ser así, actuarían inhibiendo al RDA2, alterando la descarga de las gonadotropinas y promoviendo la prevalencia del cuerpo lúteo al menos durante 24 horas más. En ese mismo estudio, la microinyección con SCH23390 afectó la ovulación únicamente en el día del diestro 1. Este resultado podría sugerir la posible interacción entre los diferentes receptores a la dopamina reportados en el ovario de la rata (Rey-Ares y cols., 2007), aunque existe escasa información que apoye esta hipótesis.

En el modelo de la rata adulta hemicastrada, se han realizado experimentos para estudiar la funcionalidad del RDA2 por medio de la microinyección de sulpirida en el ovario remanente (Letras y cols., 2016; Letras-Luna, 2018). Los hallazgos son consistentes con las observaciones de Venegas y colaboradores (2015), sin importar si el ovario extirpado es el derecho o el izquierdo, en este modelo, también la administración del antagonista prolongó un día más el ciclo estral cuando se realizó la microinyección de la sulpirida en la tarde del diestro 1 confirmando lo indispensable que resulta la señal dopaminérgica que se genera desde el ovario para que ocurra la ovulación espontánea en tiempo y forma. Resultados semejantes se han observado por el antagonismo sobre el RDA1 (Guzmán y cols., 2018).

En otro estudio, cuando se realizó la microinyección con un agente alquilante que actúa sobre ambos receptores: EEDQ, la cuota ovulatoria disminuyó en la mañana del estro vaginal esperado (Venegas y cols., 2017). Este agente altera la selección folicular afectando el desarrollo de estos folículos que debieron haber culminado en la ovulación, sugiriendo que los receptores dopaminérgicos están íntimamente ligados a los procesos endocrinos y mecanismos fisiológicos que culminan con la ovulación, y cuando se utilizó haloperidol el ciclo estral se prolongó significativamente, sólo cuando la microinyección se realizó en los días del diestro 1 y diestro 2, sin embargo la cuota ovulatoria no disminuyó (González y cols., 2016).

Debido a que los efectos ocurren durante el día del diestro 1, podemos confirmar que la dopamina desempeña una función indispensable durante la fase luteal del ciclo estral de la rata adulta. El bloqueo farmacológico del RDA2 en la tarde del diestro 1 desfasa el ciclo estral, posiblemente por sus efectos sobre el cuerpo lúteo, lo cual refleja alteraciones en el desarrollo folicular y la producción de estrógenos. El cuerpo lúteo prolonga el período en el cual secreta progesterona, prolongando así la fase luteal, resultando en un día más de diestro, se ha demostrado que los RDA2 se encuentran expresados en un mayor porcentaje comparado con los RDA1, tanto en células de la teca, células de la granulosa, pero sobre todo en el cuerpo lúteo (King y cols., 2005; Rey-Ares y cols., 2007). De esta manera se sugiere que el RDA2 tiene una función predominante durante la primera fase del ciclo estral, por lo cual la dopamina aparentemente tiene una función durante la primera mitad del ciclo estral.

### ***Sulpirida: lipoperoxidación y especies reactivas al oxígeno en los ovarios***

En el grupo de animales cíclicos intactos de manera general, se observó que los indicadores de lipoperoxidación presentan un ritmo con cambios a lo largo del ciclo estral, pero tal ritmicidad no se presentó en las concentraciones de las ROS. En un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo, se observó que efectivamente existe un patrón rítmico en la producción de MDA y 4-HDA durante el ciclo estral de la rata; las mediciones se realizaron a las 08:00, 14:00 y 20:00h del diestro-1, diestro-2, proestro y estro. Se observó una producción máxima de los indicadores de lipoperoxidación en el día del

diestro 2, día en el cual se pudieron apreciar las mayores concentraciones de MDA y 4-HDA, respecto a los otros días del ciclo estral; también se pudo apreciar que a lo largo de cada día del ciclo estral, los indicadores de lipoperoxidación presentan un patrón de ritmicidad circádica, que presenta rasgos diferentes en los cuatro días del ciclo (Flores-Bautista, 2018). En el presente trabajo, se confirmó que la mayor producción de MDA y 4-HDA ocurrió en el día del diestro 2, con diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan estas concentraciones respecto a las producidas en el diestro 1 y el proestro.

La administración local del antagonista de los RDA2 no modificó la producción de ROS en los ovarios. Saller y colaboradores (2014) mostraron que las concentraciones de dopamina presente en el fluido folicular de cultivos de células de la granulosa en mujeres con SOP son significativamente mayores respecto al de mujeres sin el síndrome. En este mismo trabajo, el cultivo de células foliculares de mujeres con el síndrome a las que se les agregó dopamina, mostró un incremento en las concentraciones de ROS en el medio detectables a partir de la primera hora del cultivo hasta las dos horas; la agregación de un inhibidor del transportador de dopamina al medio, como la nomifensina, inhibió la producción de ROS, tanto en el cultivo de células foliculares de mujeres con síndrome como en el de mujeres sanas. Estos resultados permitieron sugerir que la dopamina es una señal necesaria para la producción de ROS, que de acuerdo con el trabajo de Shkolnik y colaboradores (2010), su presencia es necesaria para que se activen mecanismos ováricos que conduzcan a la adecuada recepción de las señales gonadotrópicas y la ovulación. Por otra parte, la sobreexpresión de dopamina en las mujeres con SOP podría revelar que el descontrol de la señal dopaminérgica conduzca al desarrollo de patologías que afecten negativamente a la ovulación.

Los resultados mencionados anteriormente podrían deberse a lo siguiente: los estrógenos y la dopamina están estrechamente relacionados a nivel cerebral en procesos fisiológicos, como procesos cognitivos y patologías como Alzheimer o Parkinson (Almey y cols., 2015; Jacobs y D'Esposito, 2011; Johnson y cols., 2010; Sánchez y cols., 2010). Cersosimo y Benarroch (2015) describieron las acciones de los estrógenos en el SNC, el estradiol ejerce efectos moduladores sinápticos complejos en varios circuitos cerebrales, uno de ellos el sistema nigrostriatal, el estradiol modula la transmisión dopaminérgica en

esta vía, los receptores a estrógenos alfa y beta son expresados en neuronas de la sustancia negra *pars compacta* y en neuronas espinosas GABA-érgicas medianas del cuerpo estriado.

El estradiol aumenta la síntesis, liberación, y el recambio de dopamina, así como la expresión del transportador de dopamina y los RDA1 y RDA2 en el cuerpo estriado. El estradiol induce un aumento en el comportamiento motor no solo al aumentar la liberación de dopamina sino también al inhibir la absorción de dopamina por los astrocitos. Además, reduce las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L y la liberación de las neuronas espinosas GABA-érgicas medianas del cuerpo estriado. Alfinito y colaboradores (2015) utilizaron benzoato de estradiol en ratas ovariectomizadas y midieron catecolaminas, encontrando que los estrógenos aumentaban las concentraciones de dopamina y noradrenalina, pero no encontraron relación de los estrógenos con la actividad de la tirosina hidroxilasa, y atribuyen este aumento de dopamina, a una interacción entre los receptores a estrógenos alfa con una posible inhibición a el transportador de dopamina o a la actividad de la monoamino oxidasa A.

Markides y colaboradores (1998), demostraron que los estrógenos pueden afectar la producción de radicales libres en sentidos bastante opuestos, dependiendo de la estructura del estrógeno en cuestión, la dosis administrada y el órgano de estudio. Así, por un lado, el estradiol puede tener un efecto antioxidante al donar protones de su grupo fenólico, inhibiendo así la peroxidación de lipoproteínas plasmáticas, fundamentalmente las de baja densidad, mientras que, por otro lado, en órganos como riñón, útero, glándula mamaria, puede ayudar como prooxidante generando radicales libres, a través de la vía catecol-estrógenos; en este trabajo, no se mencionó en absoluto si existe relación entre los estrógenos y los sistemas antioxidantes.

En 2004, Kaya y colaboradores midieron lipoperoxidación a diferentes concentraciones de estradiol, a mujeres que recibieron una estimulación ovárica con gonadotropinas exógenas. Relatan como el estradiol pudo tener efectos inhibidores de la lipoperoxidación muy parecidos a los del alfa-tocoferol o el beta-caroteno, el estradiol protege tanto a la lipoproteína de baja densidad y a la lipoproteína de alta densidad de la oxidación, mientras los andrógenos no presentaron este comportamiento, la progesterona presentó un efecto contrario al de los estrógenos, favoreciendo la oxidación de las lipoproteínas. Todos estos

datos indican que los estrógenos a niveles fisiológicos tienen acciones antioxidantes sobre la lipoperoxidación.

Kheradmand y colaboradores en 2010, utilizaron grelina para medir su efecto en la actividad enzimática antioxidante en ovario de rata, midiendo niveles de lipoperoxidación por el contenido de TBARS por sus siglas en inglés, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) en el órgano, con base en la técnica descrita por Subbarao desde 1990, además de la técnica de Gérard-Monnier de 1998, ambas técnicas fueron utilizadas en la realización de los análisis bioquímicos de esta tesis.

Singh y colaboradores (2014), describieron y enfatizaron la eficacia de medir el MDA como un biomarcador utilizándolo de una manera muy amplia, para evaluar el estrés oxidativo en el campo biomédico de diferentes patologías. La lipoperoxidación es un fenómeno de cadena que resulta en la formación de varios compuestos activos que resultan en daño celular. El biomonitoreo del MDA se ha utilizado tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* es, por tanto, un punto clave para diversos patrones de enfermedades: hipertensión, diabetes, arterioesclerosis, insuficiencia cardíaca y cáncer. Así, diferentes experimentos respaldan el ensayo del MDA como una herramienta confiable para descubrir y analizar el estrés oxidativo en diversos procesos en el organismo.

El ácido ascórbico ha sido considerado como un agente antioxidante, que puede proteger al ovario contra la toxicidad y reduciendo las concentraciones de MDA y aumentando el glutatión, lo que promueve la función ovárica a favor. Esto fue comprobado por Arab y colaboradores (2018) en ratas hembra a las que les administraron ácido ascórbico a dosis de 200mg/kg, y posteriormente, Ishii y colaboradores (2019), lo administraron vía oral a dosis de 1.5g/L en ratones hembra después de su primer parto, la suplementación con este antioxidante resultó en una mayor tasa de producción de descendientes en su segundo parto, favoreciendo la homeostasis celular, y evitando daño en el tejido del útero causado por la gestación y el parto, en comparación del grupo de ratones hembra que no recibieron dicha suplementación.

El ácido ascórbico puede ayudar al desarrollo folicular incluso si es administrado durante un período largo, Abdollahifar y colaboradores (2019), utilizaron vitamina C (L-ascorbic acid; Sigma, St Lois, USA) 150mg/kg/día vía oral durante 33 semanas en ratones



hembra adultas, el volumen total que mostraron en el ovario, la corteza, médula y el cuerpo lúteo fue incrementando por la vitamina C, en comparación con los grupos control, al igual que los folículos primordiales, primarios, secundarios, y antrales fueron promovidos por la vitamina C.

Sin embargo, a ciertas dosis, tal vez el ácido ascórbico inhiba las funciones normales en el ovario, Capcarova y colaboradores (2015) utilizaron cultivos de células de la granulosa de gallina, a los cuales les administraron diferentes dosis de ácido ascórbico, como resultado, el ácido ascórbico no manifestó su potencial antioxidante, y a altas dosis disminuyó la actividad de la superóxido dismutasa. Eso explica el aumento de las concentraciones de lipoperoxidación y ROS en los grupos tratados con ácido ascórbico, la dosis utilizada en esta tesis tal vez no fue la adecuada, además de haber sido administrado directamente en la bursa ovárica, debido a que esta técnica realmente permite ser más específica a los receptores dopaminérgicos ováricos y evita que el fármaco tenga interacción con otros receptores dopaminérgicos localizados en otros órganos, por ello no se utilizó otra vía como en la de los estudios ya antes mencionados. Aunque la microinyección a través de las bursas ováricas con ácido ascórbico produce altas concentraciones de ROS, podemos inferir que el sistema antioxidante pudo equilibrar a las concentraciones normales. Por otro lado, los indicadores de lipoperoxidación fueron muy similares al grupo de animales tratados con sulpirida, por lo tanto, el daño a las membranas se pudo controlar por la presencia del antioxidante.

Ciani y colaboradores (2015) afirman que existe un efecto positivo por la presencia de ROS en concentraciones adecuadas en el ovario, ya que desempeñan una función importante de regulación a través de varias vías de señalización que ocurren durante el desarrollo folicular, la maduración del ovocito, durante la formación del cuerpo lúteo y durante el desarrollo placentario-embriionario. Wang y colaboradores (2017) reportaron que los macrófagos y leucocitos producen citosinas que difunden hacia el microambiente del fluido folicular; estas citosinas son una fuente importante para la generación de ROS y así ayudan a la culminación del desarrollo folicular y la biosíntesis de esteroides, así como también a la reacción de la monooxigenasa mediada por la P450, requerida para el proceso de esteroidegénesis (Fujii y cols., 2005). La generación de superóxido proveniente del

metabolismo mediado por NADPH en el ovario de ratón, aumenta durante la fase preovulatoria temprana en ratones hembra cíclicas y durante la fase luteal en hembras gestantes (Jain y colaboradores, 2000). Buck y colaboradores (2019) detectaron que la enzima NADPH oxidasa 4 es la fuente principal para generar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en cultivos de células de la granulosa-luteínica derivadas de fertilización humana *in vitro*, folículos ováricos en crecimiento de humana *in situ* y células tumorales de la granulosa humana en proliferación *in vitro*. Detectaron  $H_2O_2$  en el sobrenadante de células de la granulosa y en células tumorales de la granulosa. Los niveles de  $H_2O_2$  se redujeron significativamente por el bloqueador de la enzima NADPH oxidasa 4 llamado GKT137831.

El  $H_2O_2$  extracelular fue absorbido por las células de la granulosa, por acción de las acuaporinas (proteína de membrana encargada de transportar el agua a través de los compartimientos de las células). Una administración de  $H_2O_2$  aumentó la fosforilación de MAPK en células de la granulosa. Además, la reducción de la producción de  $H_2O_2$  con GKT137831 ralentizó la proliferación de células tumorales de la granulosa, por lo tanto identificaron a la NADPH y el  $H_2O_2$  como factores fisiológicos en la regulación de las funciones de células de la granulosa, aclarando que los mecanismos responsables de la generación de esta NADPH en folículos ováricos y señalización aún son desconocidos.

Standaert y Young (2007) describen que, en condiciones fisiológicas normales en el SNC, el metabolismo de la dopamina genera radicales libres por acción de la monoaminoxidasa A y la deshidrogenasa de aldehído, convirtiéndola en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) lo cual da como resultado la producción de  $H_2O_2$ . Spanos y colaboradores (2013) cuantificaron las fluctuaciones de  $H_2O_2$  y su modulación de la dinámica de la dopamina en el cuerpo estriado dorsal de rata un estudio del estrés oxidativo en enfermedad de Parkinson, encontraron que la concentración local de  $H_2O_2$  tanto en la liberación de dopamina provocada eléctricamente como en los niveles basales de dopamina.

Los aumentos de  $H_2O_2$  endógeno en el cuerpo estriado dorsal atenuaron la liberación de dopamina provocada eléctricamente, y también disminuyeron los niveles basales de dopamina en esta región del cerebro. Esto pone de manifiesto una relación entre el  $H_2O_2$  y la dopamina. Retomando lo mencionado anteriormente podría haber una relación estrecha de la dopamina con el  $H_2O_2$  en las gónadas, en este estudio.

Nuestros datos sugieren que el bloqueo de la señal dopaminérgica en el ovario provoca invariablemente, un retraso en las señales generadas desde las gónadas y que son detectadas al nivel central por sistemas de neuronas relacionadas funcionalmente con la producción de la GnRH, mismas que condicionan que la duración de un ciclo estral se incremente a cinco días.

Los estudios realizados recientemente por Letras-Luna (2018) sugieren que la dopamina podría estar involucrada en el balance óxido-reducción en el ovario de la rata.

Por medio del antagonismo a los RDA1 y RDA2, realizado a las 13:00h en el día del diestro 1 en ratas hemicastradas y sacrificadas cada cuatro horas, se observó que las concentraciones de indicadores de lipoperoxidación y nitritos se incrementaron significativamente a partir de las 4 horas de la microinyección respectiva de sulpirida y a partir de las 12 horas después de la administración de SCH23390, comparados con el grupo de animales intactos y con los que recibieron la microinyección del vehículo.

Por otra parte, el trabajo realizado por Flores-Bautista (2018) en ratas enteras con ciclos estrales regulares de cuatro días, demostró que existen fluctuaciones importantes en el sistema antioxidante de los ovarios, donde aparentemente los mecanismos redox son altamente eficaces durante la fase oscura, donde descienden significativamente las concentraciones de MDA, 4-HDA y nitritos, comparado con otros horarios de cada día del ciclo estral.

## **10. CONCLUSIONES**

1.- El bloqueo farmacológico de los RDA2, inducido por la microinyección con sulpirida, prolonga la duración del ciclo estral cuando se realiza en la tarde de diestro 1, pero no altera la cuota ovulatoria.

2.- El bloqueo a los RDA2 no modifica la producción de ROS, pero disminuye la de indicadores de lipoperoxidación en los ovarios en cualquier día del ciclo estral.

## **11. PERSPECTIVAS**

Se propone analizar la producción de ROS en diferentes horarios de cada uno de los días del ciclo estral y estudiar como se modificarían cuando se bloquean selectivamente los receptores dopaminérgicos a lo largo del ciclo estral. En nuestro estudio, la producción de ROS en los animales con microinyección de sulpirida en la tarde del diestro-1 indujo un desfase del ciclo estral que retrasó la ovulación un día completo, caracterizado por la presencia de un día de diestro vaginal adicional. Así nuestra pregunta de investigación ahora es conocer las causas por las que se incrementó la duración del ciclo estral, nuestros futuros estudios estarán centrados en el incremento de la vida de los cuerpos lúteos que por alguna razón o mecanismo debido a el antagonismo del RDA2 conlleva a mantener el efecto inhibitorio de la progesterona al nivel central.

Por otro lado, sería pertinente realizar otro estudio que permita explorar las consecuencias del tratamiento realizado a los ovarios con el antagonismo, es decir, si bien la cuota ovulatoria no se encuentra afectada, se desconoce el porcentaje de fertilidad de estos ovocitos, en experimentos piloto realizados en nuestro laboratorio, un grupo de ratas hembra adultas cíclicas tratadas con sulpirida o con el ácido ascórbico, posteriormente copularon con un macho, algunas hembras resultaron gestantes, el resto de las hembras tratadas presentaron tapón espermático en la citología vaginal y otras no, pero no quedaron gestantes. Esto abre un panorama a una serie de experimentos para responder las siguientes preguntas, ¿De qué manera el bloqueo a los receptores dopaminérgicos afecta la conducta sexual? ¿El antagonismo a los receptores dopaminérgicos tiene secuelas que afectan el porcentaje de la fertilidad de la hembra? ¿Qué tiempo tarda la hembra en recuperarse de estas alteraciones?

## 12. REFERENCIAS

- Abdollahifar, M.A., Azad, N., Sajadi, E., Mofarahe, Z.S., Zare, F., Moradi, A., Rezaee, F., Gholamin, M. y Abdi, S. (2019). Vitamin C restores ovarian follicular reservation in a mouse model of aging. *Anat Cell Biol*: Jun 52(2): 196-203.
- Aguado, L.I. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech* 59: 462-473.
- Aguado, L.I. y Ojeda, S.R. (1984). Prepubertal ovarian function is finally regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology* 114: 1845-1853.
- Agarwal, A. (2004). Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Soc Fertil J*, 9: 187-197.
- Agarwal, A., Gupta, S., Sekhon, L., Shah, R. (2008). Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, 10: 1375-1403.
- Agarwal, A., Sajal, G. y Suresh, S. (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*: 5: 18:325-332.
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B.J., Shaman, A. y Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 10: 49-57.
- Alfinito, P.D., Chen, X., Mastroeni, R., Pawlyk, A.C. y Deecher, D.C. (2009). Estradiol increases catecholamine levels in the hypothalamus of ovariectomized rats during the dark-phase. *Endocrine Pharmacology. European Journal of Pharmacology*: 616: 334-339.
- Al-Gubory, K.H., Fowler, P.A. y Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*, 42: 1634-1650.
- Almey, A., Milner, T.A. y Brake, W.G. (2015). Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females, *Hormones and Behavior*. Science Direct: 1-46. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2015.06.010.
- Ambrojo, K.S., Gardon Poggi, J.C. y Marzilla, C.M. (2018). Physiology and Metabolic Anomalies of Dopamine in Horses: A Review. Capítulo 5. IntechOpen. Dopamine - Health and Disease. pp.85-105.
- Angelucci, S., Ciavardelli, D., Di Giuseppe, F., Eleuterio, E., Sulpizio, M., Tiboni, G.M., Giampietro, F., Palumbo P. y Di Ilio, C. (2006). Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim Biophys Acta*, 1764: 1775-1785.

- Arab, S.A., Nikraves, M.R., Jalali M. y Fazel, A. (2018). Evaluation of oxidative stress indices after exposure to malathion and protective effects of ascorbic acid in ovarian tissue of adult female rats. *Electronic Physician*; Vol: 10:5:6789-6795. DOI: <http://dx.doi.org/10.19082/6789>.
- Bahr, J.M. y Ben-Jonathan, N. (1981). Preovulatory depletion of ovarian catecholamines in the rat. *Endocrinology* 108: 1815-1820.
- Bahr, J., Kao, L. y Nalbandov, A.V. (1974). The role of catecholamine and nerves in ovulation. *Biol Reprod* 1974; 10: 273-90.
- Barone, J.A. (1999). Domperidone: a peripherally acting dopamine 2-receptor antagonist. *Ann Pharmacother*; 33: 429-440.
- Beaulieu, J.M. y Gainetdinov, R.R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 63: 182-217.
- Behrman, H.R., Kodaman, P.H., Preston, S.L. y Gao, S. (2001). Oxidative stress and the ovary. *J Soc Gynecol Investig*, 8: S40-S42.
- Björklund, A. y Dunnett, S.B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *TRENDS in Neurosciences* Vol: 30; 5: 194-202.
- Boureau, Y.L. y Dayan, P. (2010). Opponency revisited: Competition and cooperation between dopamine and serotonin. *Neuropsychopharmacology*; 36(1): 1-24.
- Boutros, T, Chevet, E., Metrakos, P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/ MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev*, 60: 261-310.
- Borchert, A., Savaskan, N.E. y Kuhn, H. (2003). Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements. *J Biol Chem*, 278: 2571-2580.
- Braun, A.P. y Schulman, H. (1995). The multifunctional calcium/calmodulin dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol*; 57: 417-457.
- Bronzi, C.D., Vega O.A.S., Rodríguez, D., Rastrilla, A.M. Sosa, Z.Y. y Casais, M. (2015). Noradrenaline modulates the presence of gonadotropin-releasing hormone in ovary. The importance of its interrelation on the ovarian steroidogenesis and apoptosis on dioestrus II in rat. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 154: 39-46.
- Brown, M.D. y Sacks, D.B. (2009). Protein scaffolds in MAP kinase signaling. *Cell Signal*, 21: 462-469.

- Buck, T., Hack, C.T., Berg, D., Berg, U., Kunz, L. y Mayerhofer, A. (2019). The NADPH oxidase 4 is a major source of hydrogen peroxide in human granulosa-lutein and granulosa tumor cells. *Scientific reports*: 9:3585: 1-11.
- Burden, H.W., Leonard, M., Smith, C.P. y Lawrence, I.E. Jr. (1983). The sensory innervation of the ovary: a horse radish peroxidase study in the rat. *Anat Rec* 207: 623-627.
- Burton, G.J. y Jauniaux., E. (2010). Oxidative Stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25: 287–299.
- Caley, C.F. y Weber, S.S. (1995). Sulpiride: an antipsychotic with selective dopaminergic antagonist properties. *Ann Pharmacother*; 29: 152-160.
- Capcarova, M., Kolesarova, A., Kalafova, A., Bulla, J. y Sirotkin, A.V. (2015). Adding of ascorbic acid to the culture medium influences the antioxidant status and some biochemical parameters in the hen granulosa cells. *Endocr Regul*: Jul; 49(3): 119-125.
- Catalano, P.N., Bonaventura, M.M., Di Giorgio, N., Libertun, C. y Lux-Lantos, V.A. (2009). Participación de los receptores GABAB en la regulación del eje gonadotrófico: evaluación en ratones GABA<sub>BI</sub>. *Revista de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva*: 57-71.
- Cersosimo, M.G. y Benarroch, E.E. (2015). Estrogen actions in the nervous system: Complexity and clinical implications. *American Academy of Neurology*: 85; 1-12.
- Ciani, F., Cocchia, N., D'Angelo, D. y Tafuri, S. (2015). Influence of ROS on Ovarian Functions. En: *New Discoveries in Embryology*. Capítulo 3. Ed: Bin Wu. IntechOpen. October. pp. 41-73.
- Chabbert, B.N., Djakoure, C., Maitre, S.C. y Bouchard, P. (1998). Regulation of the human menstrual cycle *Front Neuroendocrinol*: 19:151.
- Chandra, A., Surti, N., Kesavan, S. y Agarwal, A. (2009). Significance of oxidative stress in human reproduction. *Arch Med*, 5: 528–542.
- Chaudhari, N., Dawalbhakta, M. y and Nampoothiri, L. (2018). GnRH dysregulation in polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 16:37:1-13.
- Chávez, R., Carrizosa, L. y Domínguez, R. (1991). Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in the adult rat. *Med Sci Res* 19: 41-42.
- Chávez, R., Sánchez, S., Ulloa-Aguirre, A. y Domínguez, R. (1989). Effects on oestrous cyclicity and ovulation of unilateral section of the vagus nerve performed on each day of the oestrous cycle in the rat. *J Endocrinol* 123: 441-444.

- Choi, E.J., Xia, Z., Villacres, E.C., y Storm, D.R. (1993). The regulatory diversity of the mammalian adenylyl cyclases. *Curr Opin Cell Biol*; 5: 269– 273.
- Chui, D.K., Pugh, N.D. y Walker, S.M. (1997). Follicular vascularity the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod*; 12: 191–196.
- Cindrova-Davies, T., Yung, H.W., Johns, J., Spasic-Boskovic, O., Korolchuk, S., Jauniaux, E., Burton, G.J., Charnock-Jones, D.S. (2007). Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. *Am J Pathol*, 171: 1168–1179.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E., y Roth, H.R. (1996). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, 7th ed. Oxford University Press, New York: 454-465.
- Cruz, M.E., Chávez, R. y Domínguez, R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Rev Invest Clín* 38: 167-171.
- Dennery, P.A. (2004). Role of redox in fetal development and neonatal diseases. *Antioxid Redox Signal*, 6: 147–153.
- Domínguez, R. y Cruz-Morales, S.E. (2011). The Ovarian Innervation Participates in the Regulation of Ovarian Functions. *Endocrinol Metabol Syndrome* S4:001.
- Domínguez, C. R., Gaitan, C. M., Mendez, S. A. y Ulloa-Aguirre, A. (1987). Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *Journal of Endocrinology* 113: 37-44.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82:47–95.
- Drolet, P., Bilodeau, L., Chorvatova, A., Laflamme, L., Gallo-Payet, N., Payet, M.D. (1997). Inhibition of the T-type Ca<sup>2+</sup> current by the dopamine D1 receptor in rat adrenal glomerulosa cells: requirement of the combined action of the G betagamma protein subunit and cyclic adenosine 3', 5' monophosphate. *Mol Endocrinol*; 11: 503–14.
- Erickson, G.F. (1995). The Ovary: Basic Principles and Concepts. En: *Endocrinology and Metabolism*. Capítulo 17. Eds. P. Felig, J.D Boxter & L.A Frohman. 3th Edition. McGraw-Hill. New York. pp. 973-1013.
- Espey, L.L y Lipner, T.M. (1994). Ovulation. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. E. Knobil & J.D. Neil. Capítulo 13, Raven Press, New York, pp. 725-780.
- Everardo, P.M., Santiago, M.L., Silva, C.C., Zárate, A., y García, C.A. (2011). The effects of unilateral or bilateral section of the vagus nerves to cyclic rats performed at 19.00h on spontaneous ovulation depend on the day of surgery. Program No. 713.02. Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience.



- Faletti, A.G. (2009). Leptina y función ovárica. Revista SAEGRE - Volumen XVI - N° 2 – agosto: 5-14.
- Fawcett, D.W. (1995). Sistema reproductor femenino. En: Tratado de Histología. Mc-Graw Hill-Interamericana. 12a Ed. New York, pp. 885-904.
- Finkel T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. J Cell Biol 194:7–15.
- Floran, B., Floran, L., Sierra, A. y Aceves, J. (1997). D2 receptor mediated inhibition of GABA release by endogenous dopamine in the rat globus pallidus. Neurosci Lett 1997; 237:1-4.
- Flores-Bautista M.C. (2018). Identificación de los receptores dopaminérgicos del ovario a lo largo del ciclo estral de la rata: efectos del antagonismo específico sobre su expresividad. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, BUAP.
- Flores, D.M., Ortega-Camarillo, C. Rosales-Torres, A.M., Baiza-Gutman, L.A. y Hicks, J.J. (2001). El óxido nítrico como principal efector del sistema de la Interleucina-1 en la ovulación. Gac Méd Méx Vol.137; 4: 291-302.
- Freeman, M.E. (1988). The ovarian cycle of the rat. En: “Physiology of Reproduction”. 1st Edition. Vol.II. Capítulo 45. Eds. E. Knobil & J. Neill. Raven Press, New York, pp. 1893-1928.
- Freeman, M.E. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: “Physiology of Reproduction”. Vol. II. Capítulo 46. Eds. E. Knobil & J.D. Neill. Raven Press. New York. pp. 613-658.
- Freeman, M.E. (2006). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: “Knobil & Neill’s Physiology of Reproduction”. Vol. II. Capítulo 46. Eds. J.D. Neill. Chapter 43. 3a edición. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 2327-2388.
- Fujii, J., Iuchi, Y. y Okada, F. (2005). Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. Reprod Biol Endocrinol, 3:43.
- Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J.C. y Chaudier, J. (1998). Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. Chem. Res.Toxicol.199811101176-1183 Publication Date: September, DOI: <https://doi.org/10.1021/tx9701790>.
- Gerendai, I., Tóth, I.E., Boldogkoi, Z. y Halász, B. (2009). Recent findings on the organization of central nervous system structures involved in the innervation of endocrine glands and other organs: observations obtained by the transneuronal viral double-labeling technique. Endocrine 36: 179-188.

- Gibert-Rahola, J. y Micó, J.A. (2009). Fármacos antipsicóticos. En: Farmacología Básica y Clínica Velázquez. Capítulo 17. 18ª ed. Editorial Médica Panamericana. China. pp 291-304.
- Glass, M. y Felder, C.C. (1997). Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: Evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 1997; 17(suppl 14):5327-33.
- González, K., Morán, J.L., Handal, A. y Reynoso, A. (2016). El bloqueo farmacológico de los receptores ováricos a la dopamina altera el ciclo estral y la ovulación en la rata adulta. *Revistas Experimentales*. Junio; Vol.3 No.7: 27-45. ECORFAN RENIECYT
- González, S., Rangel-Barajas, C., Peper, M., Lorenzo, R., Moreno, E., Ciruela, F., Borycz, J., Ortiz, J., Lluís, C., Franco, R., McCormick, P.J., Volkow, N.D., Rubinstein, M., Floran, B. y Ferre, S. (2012). Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol Psychiatry*, 17:650-662.
- Greiner, M., Paredes A., Rey-Ares V., Saller S., Mayerhofer A. y Lara H. (2008). Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 149:4988- 4996.
- Guerin, P. (2001). OS and protection against ROS in the preimplantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, 7:175–189.
- Guzmán-Herrera, N., Sánchez-García, O., Handal-Silva, A., Morán- Perales, J.L. (2018). Dopaminergic receptor type 1 antagonism in rat ovarian tissue: effects on ovulation and ovarian compensatory hypertrophy. *Journal Multidisciplinary Science UTSOE*. V(X):12-27 (ISSN: 2395-860X LATINDEX). LATINDEX RENIECYT.
- Hafez, B. y Hafez, E.S.E (2000a). Reproductive cycles. En: *Reproduction in Farm Animals*. Capítulo 4. 7ª Edición. pp. 55-67.
- Hafez, B. y Hafez, E.S.E (2000b). Reproductive cycles. En: *Reproduction in Farm Animals*. Capítulo 5. 7ª Edición. pp. 68-81.
- Hall, J.E. (2019). Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle. En: *Reproductive Endocrinology*. Capítulo 7. 8ª Edición. Yen & Jaffe's. pp. 149-166.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186:1–85.
- Hanada, T., Uchida, S., Hotta, H. y Aikawa, Y. (2011). Number, size, conduction, and vasoconstrictor ability of unmyelinated fibers of the ovarian nerve in adult and aged rats. *Auton Neurosci*; 164: 6–12.

- Harvey, A.J, Kind, K.L. y Thompson, J.G. (2002). REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, 123:479–486.
- Hernández-López, S., Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H *et al.* (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca<sup>2+</sup> currents and excitability via a novel PLC [beta] 1-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci* 20: 8987–8995.
- Irani, K. (2000). Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*, 87:179–183.
- Ishii, N., Homma, T., Lee, J., Mitsunashi, H., Yamada, K., Kimura, N., Yamamoto, Y. y Fujii, J. (2019). Ascorbic acid and CoQ<sub>10</sub> ameliorate the reproductive ability of SOD1-deficient female mice. *Biology of Reproduction*: 149: August. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz149>.
- Jackson, D.M. y Westlind-Danielsson, A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther*; 64: 291–370.
- Jain, S., Saxena, D., Kumar, G.P. y Laloraya, M. (2000). NADPH dependent superoxide generation in the ovary and uterus of mice during estrous cycle and early pregnancy. *Life Sci*, 66:1139-1146.
- Jacobs, E. y D’Esposito, M. (2011). Estrogen shapes Dopamine-dependent cognitive processes: Implications for Women’s Health. *The Journal of Neuroscience*, April; 31 (14):5286–5293.
- Johnson, M.L., Ho, C.C., Day, A. E., Walker, Q.D., Francis, R. y Kuhn, C.M. (2010). Oestrogen receptors enhance Dopamine neurone survival in rat midbrain. The Authors. *Journal Compilation Blackwell Publishing Ltd. Journal of Neuroendocrinology*: 22, pp. 226–237.
- Jones, K.L, King, S.S., Griswold, K.E., Cazac, D. y Cross, D.L. (2003) Domperidone can ameliorate deleterious reproductive effects and reduced weight gains associated with fescue toxicosis in heifers. *J Anim Sci*; 81: 2568–74.
- Jones, K.L., King, S.S., Iqbal, M.J. (2004). Endophyte-infected tall fescue diet alters gene expression in heifer luteal tissue as revealed by interspecies microarray analysis. *Mol Reprod Dev*; 67: 154–61.
- Jozwik, M., Wolczynski, S. y Szamatowicz, M. (1999). Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod*; 5:409–413.
- Kamata, H, Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H. y Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*, 120:649–661.

- Kaya, H., Sezik, M., Ozkaya, O., Dittrich, R., Siebzehnruhl, E. y Wildt, L. (2004). Lipid Peroxidation at Various Estradiol Concentrations in Human Circulation during Ovarian Stimulation with Exogenous Gonadotropins. New York. *Horm Metab Res*: 36; pp. 693-695.
- Kehrer, J.P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149:43–50.
- Kheradmand, A., Alirezaei, M. y Birjandi M. (2010). Ghrelin promotes antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in the rat ovary. *Regulatory Peptides*: 162; 84–89.
- Kiapekou, E., Zapanti, E., Mastorakos, G. y Loutradis, D. (2010). Update on the role of ovarian corticotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci* 1205: 225-229.
- King, S.S., Campbell, A.G., Dille, E.A., Roser, J.F., Murphy, F.F., Jones, K.L. (2005). Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domestic Animal Endocrinology*. 28 (2005) 405–415.
- Klein, C.M. y Burden, H.W. (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating rat ovary. *Neuroscience letters*. 85:217-222.
- Lara, H.E., Porcile, A., Espinoza, J., Romero, C., Luza, S.M. y Fuhrer, J. (2001). Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine*. 2001; 15: 187–92.
- Lawrence, I.E y H.W. Burden (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the ovary. *Anat Rec* 196:51-59.
- Lefkowitz, R.J. y Shenoy, S.K. (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308:512-517.
- Letras, D., Handal, A., Díaz, A., y Morán, J.L. (2016). La Sulpirida reduce la ovulación compensadora pero incrementa la hipertrofia compensadora del ovario derecho en la rata hemiovariectomizada. *Revista de Sistemas Experimentales. ECORFAN-Bolivia*. Junio; Vol.3 No.7: 46-59.
- Letras-Luna, D.E. (2018). Papel de los receptores dopaminérgicos del ovario sobre el ciclo estral y la ovulación en el modelo de la rata adulta hemicastrada. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, BUAP.
- Liochev, S.I. (1999). The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst*, 36:1–39.
- Liu, L., Trimarchi, J.R. y Keefe, D.L. (2000). Involvement of mitochondria in oxidative stress induced cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod*, 62:1745–1753.
- Liu, L.X., Monsma, Jr.F.J., Sibley, D.R. y Chiodo, L.A. (1996). D2L, D2S, and D3 dopamine receptors stably transfected into NG108-15 cells couple to a voltage-dependent potassium current via distinct G protein mechanisms. *Synapse*; 24:156–64.

- Maeda, K., Ohkura, S. y Tsukamura, H. (2000). Physiology of reproduction. En: The Laboratory Rat. Chapter 9. Eds. G. J. Krinke. Academic Press. London, pp. 145-176.
- Maiorino, M., Bosello, V., Ursini, F., Foresta, C., Garolla, A., Scapin, M., Sztajer, H. y Flohe L. (2003). Genetic variations of gpx-4 and male infertility in human. *Biol Reprod*, 68:1134–1141.
- Markides, C.S.A., Roy, D. y Liehr, J.G. (1998). Concentration Dependence of Prooxidant and Antioxidant Properties of Catecholestrogens. *Archives of Biochemistry and Biophysics*: Vol. 360; 1, December: 105–112, Article No. BB980934.
- Martín, L.M., A. Caño y J. F. Navarro (1996). Efectos de la administración de dosis altas de sulpiride sobre la conducta agonística en ratones machos. *Psicothema*, ISSN 0214 – 9915.
- Maruyama, T., Kitaoka, Y. y Sachi, Y. (1997). Thioredoxin expression in the human endometrium during the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod*; 3:989–993.
- Mattioli, M., Barboni, B., Gioia, L., y Lucidi, P. (1999). Nerve growth factor production in sheep antral follicles. *Domest Anim Endocrinol*; 17:361–71.
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N. y Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Reprod and Development*. 58:44-50.
- Matsui, M., Oshima, M. y Oshima, H. (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol*; 178: 179–185.
- Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiro, M.M. y Eppig J.J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296:2178-2180.
- Matsuzawa, A. e Ichijo, H. (2008). Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1780:1325–1336.
- McEwen, B.S. (2001). Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol*; 91:2785.
- MacKenzie, R.G., VanLeeuwen, D., Pugsley, T.A., Shih, Y.H., Demattos, S., Tang, L., Todd R.D. y O'Malley, K.L. (1994). Characterization of the human dopamine D3 receptor expressed in transfected cell lines. *Eur J Pharmacol*, 266:79-85.
- Meiser, J., Weindl, D., Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling: CCS*. 17 (11):34.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M. y Caron, M.G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189–225.

- Molina, P.E. (2013). Female reproductive system. En: "*Endocrine Physiology*". Capítulo 9. Eds. Molina P.E., 4a Ed. McGraw-Hill Medical. USA. pp. 213-248.
- Morán, C., Franco, A., Morán, J.L., 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.
- Morán, C., Morales, L., Quiroz, U. y Domínguez, R. (2000). Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rat on the follicular growth. *J Endocrinol* 166: 205-211.
- Mouatassim, S., Guerin, P. y Menezo, Y. (1999). Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod*; 5:720–725.
- Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K. y Ichijo, H. (2007). Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol*, 40:1–6.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ojeda, S.R. y Lara, H.E. (1989). Role of the Sympathetic Nervous System in the Regulation of Ovarian Function. En: *The Menstrual Cycle and its Disorders*. Eds. K. M. Pirke W. Wuttke U. Schweiger. Germany pp. 26-32.
- Orsi, N.M., Gopichandran, N., Leese, H.J., Picton, H.M. y Harris, S.E. (2005). Fluctuations in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction*, 129:219–228.
- Palomo, T. (1991). Bases neuroquímicas de la esquizofrenia, *Farmacología del SNC*, 5:5-16.
- Pastelín, C.F., Rosas, N. H., Morales-Ledesma, L., Linares, R., Domínguez, R. y Morán C. (2017). Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. *Journal of Ovarian Research* 10:18.
- Pastelín-Rojas, C. (2003). Efectos del bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico durante la segunda mitad del ciclo estral sobre la función ovárica de la rata adulta. Tesis Profesional. Biología, BUAP.
- Pardal, R., Ortega-Sáenz, P., Durán, R. y López-Barneo, J. (2007). Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell*; 131(2):364-377.
- Paszkowski, T, Traub, A.I. y Robinson, S.Y. (1995). Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta*; 236:173–180.

- Payer, A.F. (1978). Ultrastructural study of the nerve plexus accompanying the ovarian artery and vein in the rat. *Anat Rec.*; 190: 47–63.
- Perkins, A.V. (2006). Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 46:77–83.
- Piomelli, D. (1993). Arachidonic acid in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol*; 5: 274–80.
- Prasad, S., Tiwari, M., Pandey, A.N., Shrivastav, T.G. y Chaube, S.K. (2016). Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. Prasad et al. *Journal of Biomedical Science* 23:36
- Ramírez-Ávila, B. (2001). Efectos de la administración secuencial de GnRH sobre la ovulación en ratas adultas con bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico. Tesis Profesional. Biología, BUAP.
- Rangel-Barajas, C., Coronel, I. y Florán, B. (2015). Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging and Disease*. Vol. 6, Number 5; 349-368.
- Rey-Ares., V., Lazarov, N., Berg, D., Berg, U., Kunz, L. y Mayerhofer, A. (2007). A dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 5:40-49.
- Richards, J. S. y Pangas, S.A. (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clinical Invest.* 4: 963.
- Riley, J.C. y Behrman, H.R. (1991). Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc Soc Exp Biol Med*; 198:781–791.
- Ruder, E.H., Hartman, T.J. y Goldman, M.B. (2009). Impact of oxidative stress on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009, 21:219–222.
- Sabuncu, T., Vural, H. y Harma, M. (2001). Oxidative stress in polycystic ovary syndrome and its contribution to the risk of cardiovascular disease. *Clin Biochem*; 34:407–413.
- Saller, S., Kunz, L., Berg, D., Berg, U., Lara, H., Urra, J., Hecht, R., Pavlik, R., Thaler, C.J. y Mayerhofer, A. (2014). Dopamin in human follicular fluid is associated with cellular uptake and metabolism-dependent generation of reactive oxygen species in granulosa cells: implications for physiology and pathology. *Human Reproduction* 29(3):555-567.
- Sánchez-Criado, J.E. (1999). Fisiología del ovario. En: *Fisiología humana*. Capítulo 75. Eds. J.A.F. Tresguerres. McGraw Hill-Interamericana. Madrid, pp. 1020-1031.
- Sánchez, M.G., Bourque, M., Morissette, M. y Di Paolo, T. (2010). Steroids Dopamine Interactions in the Pathophysiology and Treatment of CNS Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*: 16: 43–71.

- Seeman, P. y Van Tol, H.M.H. (1993). Pharmacology of dopamine receptor. *Curr Op Neurol Neurosur* 6: 602-608.
- Sharma, R.K. y Agarwal, A. (2004). Role of reactive oxygen species in gynecologic diseases. Review article. *Reprod Med Biol*, 3:177–199.
- Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D. y Dekel, N. (2011). Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:1462–1467.
- Singh, Z., P. Karthigesu, I., Singh, P. y Kaur, R. (2014). Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies: a Review. *Iranian J Publ Health*, Vol. 43, Suppl. No.3, Oct 2014: 7-16.
- Smith, M. S., Freeman, M. E., y Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*; 96: 219–226.
- Soule, S.G. y Jacobs, H.S. (1995). Prolactinomas: present day Management. *British Journal of Obstetrics Gynaecology* 1995; Vol; 102: 178-181.
- Spanos, M., Gras-Najjar, J., Letchworth, J.M., Sanford, A.L., Toups, J.V. y Sombers, L.A. (2013). Quantitation of Hydrogen Peroxide fluctuations and their modulation of Dopamine dynamics in the rat dorsal striatum using fast-scan cyclic voltammetry. *ACS Chem. Neurosci*; 4, pp. 782–789 DOI:dx.doi.org/10.1021/cn4000499.
- Standaert, D.G. y Young, A.B. (2007). Tratamiento de los trastornos degenerativos del sistema nervioso central. En: *Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Capítulo 20. Eds. José Rafael Blengio Pinto, Jorge Orizaga Samperio, Ana María Pérez Tamayo Ruiz. 11ª ed. McGraw Hill, Colombia, pp. 527-546.
- Stephenson, A., Owman, C., Sjoberg, N.O., Sporrang, B. y Walles, B. (1981). Comparative study of the autonomic innervation of the mammalian ovary, with particular regard to the follicular system. *Cell Tissue Res* 1981; 215: 47–62.
- Strauss J.F y Williams C.J. (2009). The Ovarian Life Cycle. En: *Reproductive Endocrinology*. Capítulo 8. 6th. Edición. Yen & Jaffe's. pp. 155-190.
- Subbarao, K.V., Richardson, J.S., Ang, L. (1990). Autopsy samples of Alzheimer's cortex show increase peroxidation in vitro. *J Neurochem*; 55: 342–355.
- Sugino, N., Karube-Harada, A., Sakata, A. (2002). Nuclear factor-kappa B is required for tumor necrosis factor-alpha-induced manganese superoxide dismutase expression in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*; 87:3845–3850.
- Sugino, N., Karube-Harada, A. y Taketani, T. (2004). Withdrawal of ovarian steroids stimulates prostaglandin F2alpha production through nuclear factor-kappaB activation via



oxygen radicals in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation. *J Reprod Dev*; 50:215-225.

- Sutton, M.L., Gilchrist, R.B. y Thompson, J.G. (2003). Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, 9, 35-48.
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.A., Nairn, A.C. y Greengard, P. (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 269–296.
- Tamate, K., Sengoku, K. e Ishikawa, M. (1995). The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *J Obstet Gynaecol*; 21:401–409.
- Taraskevich, P.S. y Douglas, W.W. (1990). Dopamine (D2) or gamma-aminobutyric acid (GABA<sub>B</sub>) receptor activation hyperpolarizes rat melanotrophs and pertussis toxin blocks these responses and the accompanying fall in  $[Ca^{2+}]_i$ . *Neurosci Lett*;112:205–9.
- Toth, I., Banczerowski, P., Boldogkői, Z., Tóth, J., Szabó, A., Halász, B. y Gerendai, I. (2008). Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary : A double viral tracing study. *Brain Research Bulletin* 77(5): 306-311.
- Toth, I., Wiesel, O., Boldogkői, Z., Bálint, K., Tapaszi, Z., y Gerendai, I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microscopy research and technique* 70(8): 710-718.
- Uchida, S. (2015). Sympathetic regulation of estradiol secretion from the ovary. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 187:27–35.
- Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H., Hanada, T. y Aikawa, Y. (2005). Cutaneous Mechanical Stimulation Regulates Ovarian Blood Flow via Activation of Spinal and Supraspinal Reflex Pathways in Anesthetized Rats. *Jpn J Physiol*; 55: 265–77.
- Uchida, S., Kato, Y., Hirano, K., Kagawa, Y. y Yamada, S. (2007). Brain neurotransmitter receptor-binding characteristics in rats after oral administration of haloperidol, risperidone and olanzapina. *Life Sciences* 80: 1635-1640.
- Van Blerkom, J., Antczak, M. y Schrader, R. (1997). The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod*; 12:1047–1055.
- Vargas-Torres, L.A. (2002). Efectos del bloqueo farmacológico de la información dopaminérgica sobre el ciclo estral de la rata: análisis de los mecanismos que inhiben la función de los ovarios. Tesis Profesional. Biología, BUAP.

- Venegas-Meneses, B., Juárez-Robelo, C.E., Handal-Silva, A, Morán-Perales, J.L. (2017). Efectos del bloqueo irreversible de los receptores dopaminérgicos del ovario sobre la ovulación espontánea de la rata adulta. *Revista de Ciencias de la Salud* 4(11): pp.11-23. ECORFAN RENIECYT.
- Venegas, B., Padilla, J.F., Juárez C.E., Morán, J.L., Morán, C., Rosas Murrieta, N.H., Handal, A. y Domínguez, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptor on ovulation. *Endocrine International Journal of Basic and Clinical Endocrinology*. DOI: 10.1007/s12020-015-0636-4
- Wagstaff, A.J., Fitton, A. y Benfield, P. (1994). Sulpiride a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in schizophrenia. *Drug Evaluation. CNS Drugs* 2 (4): 313-333.
- Wang, S., He, G., Chen, M., Zuo, T., Xu, W. y Liu, X. (2017). The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. *Hindawi. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Weiner, N. y Molinoff, P. B. (1994). Catecholamines. En: *Basic Neurochemistry*. Capítulo 12. Eds. G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers & P. B. Molinoff. Raven Press, New York. pp. 211-281.
- Williams, C.J. y Erickson, G.F. (2012). *Morphology and Physiology of the Ovary*. NCBI Bookshelf. A service of the National Library of Medicine, National Institutes of Health . 1-38 URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
- Yan, Z., Song, W.J. y Surmeier, J. (1997). D2 dopamine receptors reduce N-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat neostriatal cholinergic interneurons through a membrane-delimited, protein-kinase-C insensitive pathway. *J Neurophysiol* 77: 1003–1015.
- Yen, S.S.C. (1999). Polycystic ovary syndrome (hyperandrogenic chronic anovulation). En: *Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. 4th. Edition. Chapter 17. W.B. Saunders Co. Philadelphia, pp. 436-477.
- Yilmaz, M., Bukan, N. y Ayyaz, G. (2005). The effects of rosiglitazone and metformin on oxidative stress and homocysteine levels in lean patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*; 20:3333–3340.
- Zhang, X., Zhang, L., Huo, S., Wang, J. y Cui, S. (2010). Neonatal superior ovarian nerve transection inhibits follicle development by enhancing follicular atresia and suppressing granulosa cell proliferation in rats. *Reprod Fertil Dev* 22: 1148-1158.
- Zaworski, P.G., Alberts, G.L., Pregoner, J.F., Im, W.B., Slightom, J.L. y Gill, G.S. (1999). Efficient functional coupling of the human D3 dopamine receptor to G(o) subtype of G proteins in SH-SY5Y cells. *Br J Pharmacol*, 128:1181-1188.
- Zeng, C., Zhang, M., Asico, L.D. Eisner, G.M. y Jose, P.A. (2007). The dopaminergic system in hypertension. *Clinical Science*; 112(12):583-597.

### **13. ANEXOS**

#### **14. PUBLICACIONES (Participaciones en Congresos)**

##### **Efectos De La Sulpirida Sobre El Ciclo Estral De La Rata**

**González Quiroz Karla Nayelly<sup>1,2</sup>, Cuevas Romero Estela<sup>1</sup>, Morán Perales José Luis<sup>2</sup>**

**Centro Tlaxcala Biología de la Conducta-UATx<sup>1</sup>, Instituto de Ciencias-BUAP<sup>2</sup>**

**Contacto: Teléfono Celular: 2481023148; Correo-e: qvf15quima@gmail.com**

La secreción ovárica de esteroides sexuales forma parte de una serie de eventos integrativos que el sistema nervioso central (SNC) controla para asegurar la reproducción sexual. La dopamina (DA) es un neurotransmisor clásico del grupo de las catecolaminas que desempeña múltiples funciones en el SNC, algunas de ellas están relacionadas con el control de la secreción de la hormona hipotalámica liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y las gonadotropinas. En los tejidos de la corteza ovárica de la mujer y de la rata se han detectado diferentes subtipos de receptores a la DA (RDA). En la rata adulta, se han realizado 2 tipos de bloqueo a los RDA, uno sistémico y el otro a nivel del hipotálamo, inducido por la administración de haloperidol (un bloqueador reversible de los RDA tipo 1 y tipo 2) interrumpe señales endocrinas y neuroendocrinas que conducen a la ovulación, con efectos que dependen de la etapa del ciclo estral en que dichos receptores son bloqueados. De igual forma, la microinyección de diferentes antagonistas de la DA (haloperidol, sulpirida, SCH23390) dentro de las bursas ováricas fue capaz de inhibir la ovulación en la rata al interrumpir la descarga preovulatoria de GnRH, con efectos que además dependen del día y la hora del ciclo estral en que se realiza la microinyección local de estos fármacos.

Se conoce poco sobre el papel modulador y la interacción entre los RDA sobre el control de las funciones ováricas; sabemos que el RDA tipo 2 presenta un periodo

de influencia mayor sobre el control del ciclo estral y la ovulación que el RDA tipo 1; por ello el propósito del presente trabajo es analizar el papel funcional de la información dopaminérgica mediada por el RDA tipo 2 del ovario y su relación con los mecanismos que controlan la secreción de esteroides sexuales, del ciclo estral y la ovulación en el modelo de la rata adulta.

Por lo tanto se analiza y evalúa los efectos que el antagonista de los RDA tipo 2 (Sulpirida) administrado dentro de las bursas ováricas, tiene sobre la duración del ciclo estral y la ovulación en el siguiente estro vaginal.

Para ello a las 13:00 horas de los diferentes días del ciclo estral (diestro-1, diestro-2, proestro y estro) en grupos de ratas que exhibieron previamente tres ciclos estrales regulares consecutivos con 4 días de duración fueron sometidos a laparotomía dorso-bilateral a nivel de la región inguinal para exteriorizar los ovarios y realizar una microinyección dentro de cada bursa ovárica con 20  $\mu$ L de Sulpirida (10 $\mu$ g/ $\mu$ L); de modo semejante, los grupos testigo recibieron la microinyección con el vehículo (ácido ascórbico 0.1%). La eutanasia se realizó entre las 09:00-10:00 horas de la mañana del siguiente estro vaginal observado, se registró la duración del ciclo estral, como indicador biológico de la secreción de gonadotropinas y de esteroides ováricos, así como el conteo de número de ovocitos liberados.

Como resultados encontramos que únicamente el grupo tratado con sulpirida en el Diestro-1, se prolongó significativamente el ciclo estral, es decir, retrasaron la presencia del estro vaginal por un día (Sulpirida (n=7): 4.9 $\pm$ 0.1 vs. Vehículo (n=7): 4.1 $\pm$ 0.1; p<0.03, U de Mann-Whitney) lo que no ocurrió en los grupos tratados con el antagonista en los otros días del ciclo (Diestro-1 (n=7): 4.8 $\pm$ 0.2 vs. Otros Días (n=18): 4.0 $\pm$ 0.0; p<0.0002, U de Mann-Whitney) ni entre los grupos testigo (Diestro-1 (n=7): 4.8 $\pm$ 0.2 vs. Vehículo en otros Días (n=18): 4.1 $\pm$ 0.1; p<0.001, U de Mann-Whitney) (Tabla 1).

Estos resultados muestran que existe una participación diferencial del RDA tipo 2

respecto al día del ciclo estral en que se analiza su funcionamiento y la integración de señales endocrinas y neuroendocrinas que conducen a la ovulación cíclica en la rata adulta, donde aparentemente existe una relación antagónica entre la secreción de progesterona, es decir, la función del cuerpo lúteo y el RDA tipo 2. Queda por estudiar los cambios moleculares y bioquímicos inducidos por el bloqueo selectivo del RDA tipo 2.

Asimismo el bloqueo de los RDA tipo 2 en el día del Diestro-1, inducido por sulpirida, interrumpe las señales que controlan la duración del ciclo sin afectar la cuota ovulatoria.

Tabla 1. Número de ovocitos liberados $\pm$ e.e.m. y duración del ciclo estral (días) $\pm$ e.e.m. de las ratas que presentaron un patrón regular de ciclicidad vaginal y que recibieron una microinyección (MIB) 20 $\mu$ L de sulpirida (10 $\mu$ g/ $\mu$ L) o del vehículo (ácido ascórbico 0.1%) a las 13:00h del Estro, Diestro-1, Diestro-2 o Proestro.				
Grupo Experimental	Número de Ovocitos Liberados		Duración del Ciclo Estral (días)	
	Vehículo	Sulpirida	Vehículo	Sulpirida
MIB en Estro	12.1 $\pm$ 1.4	13.3 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.0
MIB en Diestro-1	12.8 $\pm$ 0.7	12.8 $\pm$ 0.9	4.1 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.1*
MIB en Diestro-2	12.8 $\pm$ 1.2	10.8 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
MIB en Proestro	11.8 $\pm$ 0.8	11.5 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
* p<0.001 comparado con todos los grupos (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn)				

23rd BIOLOGICAL BASES OF BEHAVIOUR  
INTERNATIONAL COURSE

XXIII

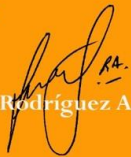
Otorga la presente  
CONSTANCIA

A Karla Nayelly González Quiroz, Estela Cuevas Romero y José Luis Morán Perales  
Por su participación con el cartel *Efectos de la sulpirida sobre el ciclo estral de la rata*

XXIII Curso Internacional Bases Biológicas de la Conducta  
Impartido del 2 al 5 de Octubre, con una duración de 40 horas.

Tlaxcala, Tlax.; a 5 de Octubre de 2018.

  
Dra. Margarita Martínez Gómez

  
Dr. Jorge Rodríguez Antolín



## **18.- LA SULPIRIDA EN EL DIESTRO-1 DESFASA EL CICLO ESTRAL DE LA RATA PERO NO AFECTA EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS.**

González Quiroz KN<sup>1, 2</sup>, Cuevas Romero E<sup>1</sup>, Sánchez García O<sup>2</sup>, Handal Silva A<sup>2</sup>, Suastegui García WA<sup>2</sup>, Venegas Meneses B<sup>3</sup>, Morán Perales JL<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Centro Tlaxcala Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala,

<sup>2</sup>Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias;

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Existe un mecanismo intrínseco en los ovarios donde la dopamina participa de modo crucial en la integración de señales neuroendocrinas y endocrinas que regulan el ciclo reproductor y que controlan la ovulación en la rata. La administración local de antagonistas selectivos de los receptores dopaminérgicos dentro de las bursas ováricas, inhibe la ovulación espontánea en la mañana del estro esperado por interrumpir la descarga preovulatoria de la GnRH, lo que depende del día del ciclo estral en que se realiza el bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico ovárico de la rata. Se analizó el efecto del bloqueo de los receptores dopaminérgicos D2 por medio de la microinyección (MI) dentro de las bursas ováricas del antagonista dopaminérgico sulpirida, evaluado sobre la duración del ciclo estral y el número de ovocitos liberados. Se utilizaron 50 ratas de la cepa CII-ZV con ciclo estral regular de cuatro días (ratas cíclicas); 25 ratas cíclicas recibieron una MI con 20  $\mu$ L de solución de sulpirida (10  $\mu$ g/ $\mu$ L) dentro de las bursas ováricas en ambos ovarios, a las 13:00 h de los diferentes días del ciclo estral. Como grupos testigo, se utilizaron 25 ratas cíclicas a las que se les realizó MI con 20  $\mu$ L de ácido ascórbico 0.1% (vehículo). Los animales se sacrificaron en la mañana del estro vaginal después de la MI. La sulpirida en el diestro-1 retrasó el estro vaginal un día (Sulpirida (n=7): 4.9 $\pm$ 0.1 días vs. Vehículo (n=7): 4.1 $\pm$ 0.1 días; p<0.03, U de Mann-Whitney) lo que no ocurrió en los grupos tratados con el antagonista en los otros días del ciclo (Sulpirida en los Otros Días (n=18): 4.0 $\pm$ 0.0 días) ni respecto a los grupos testigo (todos los grupos con vehículo (n=25): 4.1 $\pm$ 0.1 días; p<0.0001, Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn). No se observaron cambios en el número de ovocitos liberados entre los grupos. Los resultados indican que en la tarde del diestro-1, el receptor dopaminérgico ovárico tipo 2 participa en los mecanismos neuroendocrinos y endocrinos que controlan el ciclo estral de la rata al afectar la secreción de los esteroides sexuales y consecuentemente de las gonadotropinas.

**Categoría del primer autor: M**



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




**OTORGA LA PRESENTE  
CONSTANCIA A**

**Karla Nayelly González Quiroz**

**Por la presentación del trabajo en cartel:**

**LA SULPIRIDA EN EL DIESTRO-1 DESFASA EL CICLO ESTRAL DE LA RATA PERO  
NO AFECTA EL NÚMERO DE OVOCITOS LIBERADOS**

**durante la XLIV Reunión Anual del AIBIR que se llevó a cabo del  
26-29 de mayo del 2019. Oaxaca, Oax.**



**Dra. Angélica Trujillo Hernández  
PRESIDENTE**



**Dra. Carolina Morán Raya  
SECRETARIA**