

## El bloqueo farmacológico de los receptores ováricos a la dopamina altera el ciclo estral y la ovulación en la rata adulta

GONZÁLEZ, Karla <sup>\*†</sup>, MORÁN, José Luis, HANDAL, Anabella y REYNOSO, Alejandro <sup>\*</sup>

*Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia / Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*

Recibido Febrero 25, 2016; Aceptado Junio 05, 2016

### Resumen

Se compararon los efectos de la microinyección (MI) de dos antagonistas dopaminérgicos (AD's): haloperidol (HLP) o N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) dentro de las bursas ováricas sobre la duración del ciclo estral (CE) hasta el siguiente estro vaginal (EV) y el número de ovocitos liberados (cuota ovulatoria: CO) en ratas hembra con CE regular. A las 13:00h de uno de cada día del CE, animales con CE regular recibieron una MI con 100 µg de HLP o EEDQ. Los grupos control recibieron MI con NaCl 0.09% o etanol-agua 1:1, respectivamente. Se midió la duración del CE y la CO hasta la mañana del siguiente EV. El CE en los grupos control no se modificó (CE: 4.6±0.4 días; n=32) pero la MI de los AD's lo prolongó (6.9±0.6 días vs. 4.6±0.4 días; \*p<0.01). La MI con HLP en los días de diestro, prolongó el CE hasta 11.0±0.7 días respecto al grupo control (\*p<0.001). El EEDQ redujo la CO comparado con el HLP (HLP: 10.5±0.6 ovocitos vs. EEDQ: 8.6±0.5 ovocitos; \*p<0.02). El bloqueo de los receptores a dopamina (RDA) inducido por HLP interrumpió las señales que controlan el CE pero no afectó la CO; en cambio, la MI con EEDQ disminuyó la CO pero no alteró la duración del CE. Los resultados muestran que los RDA del ovario participan en el control de la función ovárica y del CE (\* Prueba de U de Mann-Whitney).

**Haloperidol, EEDQ, Receptores a Dopamina, Ciclo Estral, Ovulación, Rata Hembra**

### Abstract

To compare the effects of microinjection (MI) for two dopaminergic antagonists (DA's): N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) or haloperidol (HLP) inside of ovarian bursae on estral cycle (EC) length to next vaginal estrous (VE) and ova shed (ovulatory quote; OQ) in female rats that exhibits regular EC. At 13:00h on one each day of EC, regular EC animals received a MI of 100 µg with HLP or EEDQ. Control groups received MI of NaCl 0.09% or ethanol-water 1:1 respectively. We valued EC length and OC to next VE morning. The EC length in control groups were not modified (EC length: 4.6±0.4 days; n=32) but the DA's MI prolonged its duration (6.9±0.6 days vs. 4.6±0.4 days; \*p<0.01). The HLP MI performed on diestrous days, prolonged EC duration since 11.0±0.7 days compared with control groups (\*p<0.001). EEDQ reduced the OQ compared to HLP group (HLP: 10.5±0.6 oocytes vs. EEDQ: 8.6±0.5 oocytes; \*p<0.02). The pharmacological blocking of dopamine receptors induced by HLP, disrupts control signaling of EC but not modifies CO; opposing, EEDQ MI diminished OQ but not modifies EC length. Those results shown that ovarian dopaminergic receptors participate on ovarian function and EC control (\* U of Mann-Whitney test).

**Haloperidol, EEDQ, Dopamine Receptors, Estral Cycle, Ovulation, Female Rat**

**Citación:** GONZÁLEZ, Karla, MORÁN, José Luis, HANDAL, Anabella y REYNOSO, Alejandro. El bloqueo farmacológico de los receptores ováricos a la dopamina altera el ciclo estral y la ovulación en la rata adulta. *Revista de Sistemas Experimentales*. 2016, 3-7: 27-45.

\*Correspondencia al Autor (Correo electrónico: karlagq469@hotmail.com)

†Investigador contribuyendo como primer autor.

## Introducción

Domínguez y colaboradores (1987) evaluaron los efectos de un antagonista dopaminérgico en diferentes fases del ciclo estral sobre la ovulación y la distribución de la población folicular de los ovarios de la rata adulta.

En este experimento se utilizaron ratas con ciclos regulares de cuatro días que fueron inyectadas con haloperidol (2.5 mg/kg de peso; i.m.), a las 13:00 horas del día estro, diestro-1, diestro-2 y proestro. Los animales se sacrificaron en el día del estro esperado.

El haloperidol bloqueó la ovulación cuando se administró en el estro y diestro-1 pero fue menos efectivo cuando se administró en el diestro-2 y en el proestro; la población folicular mostró alteraciones en el crecimiento de los folículos ováricos que dependieron del momento del bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico.

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.

Recientemente hemos re-evaluado la participación de la dopamina en la regulación del ciclo estral y la ovulación espontánea de la rata.

Venegas y colaboradores (2015), mostraron la existencia virtual de un sistema dopaminérgico local en el ovario de la rata adulta que participa de modo crítico en la regulación del ciclo estral y la ovulación espontánea, con papeles variables a lo largo del ciclo estral e incluso de acuerdo a la hora del día en que se analiza su función.

Sus resultados son altamente concordantes con las observaciones previas (Domínguez et al, 1987) y muestran claros efectos que antagonismo local en el ovario de los receptores a la dopamina incide directamente sobre el ciclo estral, es decir, la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas por una vía de comunicación que no es exclusivamente hormonal.

A partir de los resultados de este trabajo, podemos pensar que es muy probable que existan señales nerviosas que se generan desde el ovario y que alcanzan sitios al nivel central que coordinan y controlan el ciclo estral con la ovulación.

En relación a esto último, se sabe que el ovario recibe fibras nerviosas que ingresan por la médula y se distribuyen hacia la corteza hasta alcanzar el estroma ovárico y la teca folicular (Burden, 1985). Esta inervación proviene del plexo ovárico y del nervio ovárico superior (Lawrence & Burden, 1980).

Este último está íntimamente relacionado con el control de la esteroidogénesis ya que sus fibras alcanzan la teca externa de los folículos (Aguado, 2002). Otras fibras se introducen en el estroma ovárico y contactan con células intersticiales que indirectamente se relacionan con las células del cuerpo lúteo (Erickson et al, 1985; Erickson, 1995). La mayoría de sus fibras que viajan por el nervio ovárico superior provienen de las neuronas simpáticas post-ganglionares ubicadas en el ganglio celiaco (Klein & Burden, 1988).

La mayoría de las fibras que inervan los ovarios y que viajan por el nervio ovárico superior provienen de las neuronas simpáticas post-ganglionares ubicadas en el ganglio celiaco (Klein & Burden, 1988).

La noradrenalina se encuentra en altas concentraciones en el tejido ovárico donde se le atribuyen efectos moduladores en el crecimiento folicular y las funciones del cuerpo lúteo (Dissen et al 1993; Hsueh et al., 1984; Mayerhofer et al., 1997; Ojeda et al., 1989). Sin embargo, también se ha demostrado la presencia de dopamina y sus receptores en diferentes tejidos del ovario (Gay et al, 2004; King et al, 2005; Mayerhofer et al, 2000; Rey-Ares et al, 2007), pero su papel funcional en el tejido gonadal aún debe ser esclarecido.

El haloperidol es una butirofenona y antagonista con los receptores dopaminérgicos, es ampliamente utilizado en la terapia de pacientes con esquizofrenia aguda y crónica (Litter, 1988); por sus acciones neurolepticas, tranquilizantes y antipsicóticas también es efectivo en el tratamiento de pacientes con problemas conductuales severos como la hiperexcitabilidad explosiva y la hiperactividad, así como en aquellos casos clínicos caracterizados por actividad motora excesiva acompañada de desórdenes conductuales como: impulsividad, déficit de atención, agresividad, explosividad lábil e intolerancia a la frustración (Kudo & Ishizaki, 1999). Los análisis farmacocinéticos del haloperidol lo ubican como un antagonista muy potente de los receptores dopaminérgicos DA1 y DA2. Se ha mostrado que el haloperidol interactúa tanto con los receptores de los subtipos DA1 (con una potencia relativa en el orden de  $\mu\text{M}$ ) como con los del subtipo DA2 (con una potencia relativa en el orden de nM) (Cooper, et al 1996).

El haloperidol atraviesa la barrera hematoencefálica e interactúa con los dos tipos de receptores dopaminérgicos, por lo que se han podido estudiar sus efectos fisiológicos, bioquímicos y farmacológicos involucrados con las vías dopaminérgicas a nivel central y periférico.

En el sistema central actúa en los receptores DA1 y DA2 produciendo disminución en la actividad motora y con dosis elevadas provoca un estado de inmovilidad y catalepsia (Litter, 1988). A nivel periférico, la estimulación de los receptores DA1 produce vasodilatación renal, mesentérica y coronaria, en tanto que la estimulación de los DA2 determina la reducción de las descargas de noradrenalina (Cavero et al, 1982).

En humanos, se conocen con detalle los parámetros farmacocinéticos básicos y la disposición metabólica del haloperidol luego de la administración oral, intravenosa o intramuscular del haloperidol, así como aquellos relacionados con su degradación y eliminación. Se sabe que las enzimas involucradas en la biotransformación del haloperidol incluyen a la Citocromo P450 (CYP), la Carbonil reductasa y la Uridin difosfato glucosa glucuronosiltransferasa (Kudo & Ishizaki, 1999).

Por lo anterior, el haloperidol es un fármaco adecuado para los estudios experimentales que buscan analizar el papel funcional de la dopamina y sus receptores. Algunos antecedentes señalados en párrafos anteriores (Domínguez et al, 1987; Morán & Domínguez, 1995; Vengas, et al, 2015), permiten sugerir su uso en dosis fisiológicas adecuadas y con fundamento en los estudios del *binding* y de la farmacocinética de sus receptores (Kudo & Ishizaki, 1999; Uchida et al, 2007), ya que aparentemente afecta de modo claro la respuesta de los órganos donde la dopamina ejerce sus acciones biológicas.

Hemos observado que 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.

Además, 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 los animales.

Si bien estos efectos del haloperidol administrado subcutáneamente pudieron ser explicados por la interrupción de la secreción de gonadotropinas, el reemplazo hormonal fue ineficaz para restablecer de la función ovárica (Vargas-Torres, 2002), lo que nos permite suponer que el bloqueo farmacológico de la inervación dopaminérgica de los ovarios pudiera involucrar de manera directa los mecanismos que controlan la función ovárica.

En otros estudios, el implante unilateral con haloperidol a las 13:00 h en uno de los diferentes días del ciclo estral dentro del hipotálamo anterior disminuyó la tasa de ovulación en animales tratados en estro o diestro-1, lo que no ocurrió cuando los implantes se realizaron en diestro 2 o proestro los animales ovularon (Morán & Domínguez, 1995). Estos resultados permitieron sugerir que existe un sistema dopaminérgico en el hipotálamo anterior que participa en el control de la ovulación y, además que esta participación está lateralizada (Morán & Domínguez, 1997). La N-Etoxicarbonil-2 Etoxi-1,2-Dihidro Quinolina (EEDQ) es utilizado como agente acoplante en la síntesis de péptidos (Referencia 3478; Merck Index, 1976), sin embargo por sus propiedades farmacológicas se utiliza en investigación como antagonista de diversos neurotransmisores. Su fórmula empírica es  $C_{14}H_{17}NO_3$ , su peso molecular es de 247.29g/mol; soluble en dimetilsulfóxido y etanol-agua 1:1. En el SNC, posee actividad depresiva por lo que se utiliza como analgésico y tranquilizante en animales de experimentación.

Con base en estudios farmacológicos, se describe como una neurotoxina dopaminérgica y antagonista específico que se une de manera irreversible a receptores monoaminérgicos como los adrenérgicos, dopaminérgicos ( $DA_1$ ), muscarínicos y posiblemente serotoninérgicos (Gozlan et al, 1994; Martel et al, 1969; Weissman & Muren, 1971).

Lévesque & Di Paolo (1988) mostraron que en la rata ovariectomizada tratada con estradiol, la densidad de receptores dopaminérgicos en los cuerpos estriados se incrementa de manera significativa, mientras que la densidad del receptor  $DA_2$  en la adenohipófisis no se modifica. En este modelo, la administración periférica de EEDQ produjo un decremento del 80% en la densidad de receptores  $DA_1$  y  $DA_2$  en el estriado, con una posterior recuperación de la repoblación en el receptor  $DA_1$  pero no del  $DA_2$  en esta estructura cerebral. Por otra parte, tras el tratamiento con EEDQ, ocurrió un decremento del 50% de los receptores  $DA_2$  en la adenohipófisis. Estos resultados permitieron sugerir que el EEDQ puede producir efectos diferenciales cuando se une de modo irreversible al receptor  $DA_1$  respecto a lo que ocurre cuando bloquea al receptor  $DA_2$ . En este trabajo se puso de manifiesto que la sola administración de EEDQ en ratas sin tratamiento con estradiol no se modificaron las concentraciones plasmáticas de prolactina; en cambio, en animales que recibieron el estímulo esteroideogénico y que fueron tratadas con EEDQ, las concentraciones plasmáticas de prolactina se incrementan respecto a animales tratados con estradiol que no recibieron EEDQ.

Resultados de nuestro laboratorio, han mostrado que la microinyección intracerebral con EEDQ a las 13:00 h en el hipotálamo anterior de ratas adultas con ciclos regulares de cuatro días de duración indujo cambios en el patrón de la ciclicidad vaginal dentro de los cuatro ciclos estrales que siguen a la microinyección de la neurotoxina, se prolongó significativamente la duración del primer ciclo estral, lo que permitió sugerir que las señales dopaminérgicas centrales participan en la regulación del ciclo estral al afectar la secreción de gonadotropinas y de esteroides ováricos (Meléndez et al, 2002).

Todos estos antecedentes muestran algunos efectos del bloqueo sistémico de los receptores dopaminérgicos sobre el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y ponen de manifiesto el papel crítico que desempeña la dopamina en la función reproductiva de la hembra, en relación con las vías de comunicación neuroendocrinas, endocrinas y aparentemente, neurocrinas (Domínguez et al, 1987; Morán & Domínguez, 1995). Sin embargo, no existen evidencias claras de que el ovario utilice a la dopamina como un neurotransmisor clásico, o bien, como un neuromodulador.

Se ha detectado la presencia de dopamina y sus receptores en diferentes compartimentos ováricos, pero se discute su papel funcional en estos tejidos (Aguado et al, 1982; Anesetti et al, 2001; Bodis et al, 1992; Bodis et al, 1993; Lara et al, 2001; D'Albora & Barcia, 1996; D'Albora et al, 2000; Mayerhofer et al, 1997; Rey-Ares et al, 2007).

Otros estudios que han analizado el papel de la dopamina en la periferia postulan que actúa como un modulador de las funciones renales y cardiovasculares (Amneta et al, 2002) y es factible que en los ovarios desempeñe funciones semejantes.

Existe un creciente interés por dilucidar las causas de diferentes síndromes y patologías ováricas que producen infertilidad o cuadros de anovulación crónica, como la de tipo hiperandrogénico (por ejemplo: el síndrome del ovario poliquístico), aquellas causadas por desórdenes periféricos y las que se deben a disfunciones del eje SNC-hipotálamo-hipófisis (Yen, 1999a; Yen, 1999b; Yen 1999c). Si bien una parte de estos trastornos de la función reproductiva de la mujer son ocasionados por deficiencia en los mecanismos de emisión o recepción de señales humorales, otros podrían ser explicados por alteraciones en las señales nerviosas de ingreso y salida por los ovarios, aunque esto último no ha sido demostrado (Parra et al, 2007; Speroff et al, 1999).

Si la dopamina detectada en el ovario actuara como un modulador de las acciones de otros neurotransmisores, tal y como lo hacen la noradrenalina y el VIP (Dissen et al, 1993; Hsueh et al, 1984; Mayerhofer et al, 1997; Ojeda et al, 1989), y de las hormonas clásicas que participan en los mecanismos que regulan las funciones ováricas (Adashi & Hsueh, 1981; Aguado et al, 1982; Dyer & Erickson, 1985), ello explicaría los cambios sobre la respuesta ovulatoria y sus efectos sobre el desarrollo folicular observados en los estudios del bloqueo sistémico de los receptores a la dopamina señalados líneas arriba.

Sin embargo, no hay estudios que confirmen la presencia de dopamina en terminales sinápticas, tanto aquellas de origen extrínseco (Lara et al, 2001; Lawrence & Burden, 1980; Ojeda & Aguado, 1985; Ojeda & Skinner, 2006) como la proveniente de neuronas ováricas intrínsecas (D'Albora et al, 2000; D'Albora et al, 2002; Dees et al, 2006) y de las que aún desconocemos su papel funcional en las funciones ováricas.

Por otra parte, diferentes estudios han descrito los efectos de la denervación quirúrgica (Chávez et al, 1987; Cruz et al, 1986; Domínguez et al, 1989) o del bloqueo farmacológico de las influencias colinérgicas y catecolaminérgicas (Domínguez et al, 1982; Domínguez et al, 1985; Domínguez et al, 1987) sobre el desarrollo folicular y la ovulación de los ovarios derecho e izquierdo y permiten postular una virtual conexión entre las estructuras centrales que controlan la secreción de gonadotropinas y su influencia sobre la regulación de las funciones ováricas. Varios estudios apoyan la existencia de esta vía de comunicación directa entre las gónadas y el SNC, particularmente con el hipotálamo (Dissen & Ojeda, 1999; Fukuda et al, 1984; Gerendai et al, 1998; Mizunuma et al, 1983; Nance et al, 1983; Nance & Moger, 1982; Tóth et al, 2007).

De acuerdo a lo anterior, no hay evidencias claras que describan el papel funcional de la dopamina presente en los tejidos ovarios. 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 (Aguado, 2002; Ahmed et al, 1986; Ben-Jonathan et al, 1982; Burden, 1978; Davoren & Hsueh, 1985; Dees et al, 1985; Dees et al, 2006; Dissen & Ojeda, 1999; Mayerhofer et al, 1997; McNeill & Burden, 1987), funciones que se afectan sensiblemente cuando se modifican las influencias nerviosas que llegan al ovario (Burden, 1985; Curry et al, 1984a; Curry et al, 1984b; Lara, 1990).

Con base en todos estos antecedentes, particularmente en aquellos en los que se muestra que el bloqueo sistémico y central de los receptores a la dopamina sobre las funciones que conducen a la ovulación, podemos plantear que este mediador químico participa activamente en el control de las funciones ováricas.

Existen claras evidencias de la presencia de dopamina y sus receptores en los tejidos ováricos pero el papel funcional aún no ha sido descrito. Aparentemente, esta participación varía a lo largo del ciclo estral e incluso en el momento del día en que se analiza su función (Domínguez et al, 1987; Venegas et al, 2015). Por lo anterior, en el presente estudio se analizaron los efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos a las 13:00 horas, inducido por la microinyección de haloperidol o de EEDQ dentro de las bursas ováricas, en diferentes días del ciclo estral de la rata adulta, evaluando la respuesta ovulatoria y la duración del ciclo estral, estimada por los cambios en el patrón de ciclicidad vaginal. Determinar el papel funcional de la información dopaminérgica que está presente en los ovarios y que pudiera relacionarse con los mecanismos que controlan el desarrollo folicular y la ovulación de la rata adulta sería un avance notable en la investigación a nivel reproductivo.

### **Materiales y Métodos**

**Material Biológico:** Se utilizaron 64 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 horas luz / 10 horas oscuridad; luces de las 05:00 a las 19:00 horas) y con libre acceso al agua y al alimento balanceado.

**Frotis Vaginal:** 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 08:00 y las 09:00 horas. 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 experimentos

**Grupos Experimentales:** Todas las ratas cíclicas que mostraron 3 ciclos estrales regulares consecutivos fueron distribuidas en grupos experimentales por cada día del ciclo estral (4 hembras en diestro-1, diestro- 2, proestro o estro) un total de 16 por tratamiento para evaluar el efecto de cada fármaco con su respectivo control, realizando una microinyección bilateral de cada solución experimental (descripción líneas abajo).

**Grupos con Haloperidol:** 16 ratas hembra adultas con ciclos estrales regulares a las que se les administró 20 µl de solución de haloperidol (5mg/ml ovario; diluido en NaCl 0.9% vehículo) dentro de cada bursa ovárica.

**Grupos con EEDQ:** 16 ratas hembras adultas cíclicas a las que se les administró 20 µl de solución de EEDQ (5mg/ml ovario; diluido en etanol+ solución de agua destilada 1:1 vehículo) dentro de cada bursa ovárica.

**Grupos Control:** Un grupo de 16 ratas hembras adultas cíclicas a las que se les administró 20 µl de solución de NaCl 0.9% dentro de cada bursa ovárica. Otro grupo de 16 ratas hembras adultas cíclicas a las que se les administró 20 µl de solución de etanol+ solución de agua destilada 1:1 dentro de cada bursa ovárica.

**Material de Laboratorio:** Máquina afeitadora con cuchillas del No. 40, mesa de disección, bomba de perfusión nanomolar conectada a un microinyector motorizado, jeringas Hamilton de 100µL, fuente de luz conectada a dos conductores de fibra óptica, solución de clorhexidina al 2%, éter etílico como sedante-anestésico, instrumental para microcirugía diverso: tijera iris de disección, tijera punta fina, pinzas hemostáticas, pinzas de disección de punta fina, sutura quirúrgica 4-0 y 2-0, bisturí, gasa quirúrgica estéril.

**Laparotomía Bilateral:** Una vez detectados los animales que cumplieron al menos tres ciclos estrales regulares consecutivos de cuatro días de duración, fueron asignados a sus respectivos grupos experimentales y a las 13:00h del diestro-1, diestro-2, proestro o estro fueron sedados con vapores de éter etílico y sometidos a una laparotomía bilateral, que consistió en una incisión quirúrgica dorso-lateral en la región pélvica al nivel del ovario, cortando piel y musculo. Se exteriorizó cada ovario y por medio de una bomba de perfusión nanomolar, se infiltraron a través de la bursa ovárica 20 µl de cada solución por ovario. Una vez realizada la microinyección, cada ovario fue reingresado a la cavidad peritoneal, se suturó el músculo y la piel con seda quirúrgica y se colocó un cicatrizante de uso veterinario.

A la mañana siguiente de la laparotomía, en todos los animales se reanudó el registro del ciclo estral hasta observar el signo del estro vaginal (estro vaginal observado) y realizar así la eutanasia en esa mañana.

**Eutanasia.** Todos los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 08:00-09:00 h de la mañana del primer estro vaginal observado. A la autopsia, se disecaron los ovarios y los oviductos. Los oviductos se inspeccionaron para realizar el conteo directo del número de ovocitos liberados y los ovarios fueron procesados para su análisis histológico del modo que se describe a continuación. Los ovarios fueron colocados en solución fijadora de böuin por 24 horas y posteriormente incluidos en bloques de parafina con el fin de contar el número de cuerpos lúteos frescos y observar cambios en el aspecto general de la histología ovárica (médula ovárica: vasos sanguíneos y vasos linfáticos; corteza: folículos, glándula intersticial y cuerpos lúteos).

### Conteo de Cuerpos Lúteos Frescos.

Además del conteo directo de los ovocitos liberados, también se realizó el conteo del número total de cuerpos lúteos frescos en cada ovario con el fin de comprobar el conteo directo en la mañana del estro vaginal observado. Las características que se tomaron en cuenta para considerar un cuerpo lúteo fresco fueron las siguientes:

1. Extravasación central de sangre en el cuerpo lúteo.
2. Presencia de cavidades rellenas de sangre.
3. Presencia de poblaciones celulares heterogéneas: las células de la
4. Granulosa luteinizadas tienen formas poligonales, de aspecto pálido y pueden ser grandes o chicas con núcleo y citoplasma bien definidos. Las células luteinizadas de la teca son más pequeñas que las del folículo.
5. Tamaño del cuerpo lúteo fresco aproximadamente de tamaño similar a un folículo preovulatorio.

### Análisis Estadístico.

Los resultados del conteo del número de días de duración del ciclo estral, el número de ovocitos liberados y el número de cuerpos lúteos frescos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; en los casos en los que compararon pares de medianas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney.

En todos los casos se consideraron estadísticamente significativas las diferencias cuya probabilidad fue menor o igual al 0.05. Para el análisis de los datos se utilizó el programa *StatGraph InStat versión 3.06* para Windows (Copyright 1992-2003; GraphPad Software Inc.).

### Resultados

No se observaron cambios significativos en la duración del ciclo estral entre los grupos control, por lo que reunidos en un solo grupo testigo mostraron una duración media de  $4.6 \pm 0.4$  días (N=32).

La microinyección en las bursas ováricas de los antagonistas de la dopamina (N=32) prolongó significativamente la duración del ciclo estral ( $6.9 \pm 0.6$  vs.  $4.6 \pm 0.4$  días;  $p < 0.01$ , U de Mann-Whitney) pero solo la microinyección con haloperidol realizada en los días Diestro-1 y Diestro-2 lo prolongó claramente respecto al testigo (haloperidol:  $11.0 \pm 0.7$  días vs. testigo:  $4.6 \pm 0.4$  días;  $p < 0.001$ , U de Mann-Whitney), lo que no ocurrió en los grupos tratados con EEDQ (Tabla 1).

En todos los casos, el número de cuerpos lúteos frescos contado en los cortes histológicos entre los diferentes grupos fue equivalente al del número de ovocitos liberados durante el conteo directo al analizar los oviductos de los animales tratados, por lo que en la tabla de resultados respectiva solo se indica el análisis de este último (Tabla 2).

Grupo	Salina	HLP	Et-Wat	EEDQ
Estro	4.0±0.0	4.8±0.3	4.0 ± 0.0	8.8 ± 2.4
Diestro-1	4.5±0.3	11.0±0.7 *	6.3 ± 2.0	7.4 ± 1.7
Diestro-2	6.3±2.3	11.0±1.5**	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
Proestro	4.0±0.0	5.0±0.6	6.5 ± 2.5	4.0 ± 0.0

\*  $p < 0.05$  vs. Control y todos los grupos en Estro y Proestro; \*\*  $p < 0.05$  vs. Todos los grupos en Estro y en Proestro (Kruskal-Wallis seguido de la Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn).

**Tabla 1** Media  $\pm$  e.e.m. de la duración (días) del ciclo estral de los animales que recibieron una microinyección bilateral con 20  $\mu$ l de una solución de Haloperidol (HLP) o EEDQ (5 mg/ml) dentro de las bursas ováricas (1.25  $\mu$ L/seg /ovario). Los grupos control recibieron la microinyección con 20  $\mu$ l NaCl 0.9 % (Salina) o Etanol-Agua (Et-Wat). Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del siguiente estro vaginal observado

El número de ovocitos liberados no se modificó significativamente en ninguno de los grupos experimentales.



Sin embargo, el análisis global de la cuota ovulatoria de los animales que recibieron la microinyección de los antagonistas dopaminérgicos reveló que existió una tendencia a que la cuota ovulatoria fuera relativamente mayor en los grupos que recibieron la microinyección de haloperidol en las bursas ováricas respecto a los que fueron tratados con EEDQ (haloperidol:  $10.5 \pm 0.6$  ovocitos vs. EEDQ:  $8.6 \pm 0.5$  ovocitos;  $p < 0.02$ , Prueba de U de Mann-Whitney) (Tabla 2).

Grupo	Salina	HLP	Et-Wat	EEDQ
Estro	$10.3 \pm 2.0$	$12.5 \pm 1.1$	$11.0 \pm 2.1$	$8.5 \pm 0.6$
Diestro-1	$8.8 \pm 0.8$	$10.5 \pm 1.0$	$11.0 \pm 0.9$	$8.6 \pm 0.6$
Diestro-2	$8.0 \pm 0.9$	$9.0 \pm 1.8$	$9.0 \pm 0.8$	$7.0 \pm 1.0$
Proestro	$10.5 \pm 2.9$	$10.0 \pm 0.4$	$11.0 \pm 0.8$	$10.3 \pm 1.0$

**Tabla 2** Media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de los animales que recibieron una microinyección bilateral con 20  $\mu$ l de una solución de Haloperidol (HLP) o EEDQ (5 mg/ml) dentro de cada una de las bursas ováricas (1.25  $\mu$ L/seg/ ovario). Los grupos control recibieron una microinyección con 20  $\mu$ l NaCl 0.9 % (Salina) o mezcla Etanol-Agua (Et-Wat). Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del siguiente estro vaginal observado

## Discusión

Los resultados del presente trabajo muestran que la microinyección bilateral del antagonista reversible del receptor a dopamina: haloperidol y del agente alquilante EEDQ dentro de las bursas ováricas produce efectos diferentes sobre la duración del ciclo estral y la ovulación en la rata adulta.

La microinyección con haloperidol induce interrupción en señales neuroendocrinas y endocrinas que controlan la duración del ciclo estral por afectar directamente las funciones endocrinas del ovario pero manteniendo sin cambios la cuota ovulatoria; en cambio, la microinyección bilateral de EEDQ dentro de las bursas ováricas, afecta los mecanismos que controlan la selección de los folículos que eventualmente deberían culminar su desarrollo y ovular, reflejándose así en una ovulación disminuida pero aparentemente sin afectar de modo significativo la secreción de gonadotropinas, estimada por la duración del ciclo estral.

Domínguez y colaboradores (1987) analizaron los efectos de la inyección sistémica con haloperidol, un antagonista de los receptores DA1 y DA2, en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días, a las 08:00, 13:00 y 21:00h de los diferentes días del ciclo estral. El haloperidol indujo efectos diferentes sobre la respuesta ovulatoria de los animales, en función del día del ciclo estral e incluso de la hora en que se administró. Consistentemente, este antagonista retrasó la ovulación espontánea cuando se inyectó en los días del estro y diestro-1, manteniendo este efecto inhibitorio hasta las 08:00h del diestro-2, para después no influir significativamente sobre la ovulación de los animales. Estos resultados permitieron sugerir que la dopamina es una señal necesaria para que los mecanismos fisiológicos que conducen a la ovulación se realicen correctamente durante la primera mitad del ciclo estral aunque la influencia del neurotransmisor/neuromodulador tienda a desaparecer durante la segunda mitad del ciclo estral.

Venegas y colaboradores (2015), evaluaron el papel de los receptores a la dopamina en el tejido ovárico. La microinyección de haloperidol o de antagonistas selectivos del receptor DA1: SCH23390 o DA2: Sulpiride dentro de las bursas ováricas, indujo efectos semejantes en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días cuando se antagonizan los receptores dopaminérgicos en los mismos horarios del trabajo previo (Domínguez et al, 1987). En ambos modelos se discute el posible efecto del haloperidol y de sulpiride sobre la facilitación de la secreción de prolactina al actuar al nivel del tallo hipofisiario, ya que ambos antagonizan potentemente al receptor DA2 e inhibiendo indirectamente la ovulación al interrumpir la secreción de gonadotropinas.

En cambio, la microinyección con SCH23390 afectó la ovulación únicamente en el día del diestro-1. Este último resultado es relevante ya que pone de manifiesto la posible interacción entre los diferentes receptores a la dopamina aunque aún falta analizar dicha interacción (Venegas et al, 2015).

Juárez-Robelo (2015) mostró que la microinyección bilateral de EEDQ dentro de las bursas ováricas en la rata adulta inhibe la ovulación dependiendo la hora y el día del ciclo estral en que administró el fármaco, además de afectar el número de ovocitos liberados por los ovarios de las ratas. Estos resultados permitieron sugerir que el receptor a la dopamina está íntimamente ligado a los procesos endócrinos y mecanismos fisiológicos que culminan con la ovulación.

Los resultados del presente estudio son congruentes con el reciente trabajo de Juárez-Robelo (2015), ya que el EEDQ como agente alquilante, se une al receptor dopaminérgico afectando su función sin antagonizarlo totalmente.

Por otra parte, el haloperidol si afectó significativamente la duración del ciclo estral, particularmente cuando fue administrado en los días del diestro-1 y diestro-2, prolongando el ciclo aunque no afectó el número de ovocitos liberados.

De acuerdo a lo observado en el presente trabajo y con los antecedentes de nuestro grupo investigación, podemos afirmar que existe un periodo crítico para que la señal dopaminérgica se integre a los mecanismos fisiológicos que conducen a la ovulación.

El análisis del papel de los receptores a la dopamina en el modelo experimental de la rata la postulan a la dopamina como una señal crucial al inicio del ciclo estral, es decir, durante la fase luteal, con un papel funcional que gradualmente se desvanece hasta que la fase folicular se instala.

Se han reportado efectos del EEDQ sobre otros receptores aminérgicos. Estos estudios, incluyen pruebas farmacológicas, conductuales y de tonicidad muscular que se afectan cuando se aplica este agente alquilante sistémicamente en la rata (Durcan et al, 1994; Kapur et al, 2000; Takahashi et al, 1998).

Durcan y colaboradores (1994), realizaron estudios de *binding* sobre el receptor adrenérgico *alfa-2* con EEDQ; sus datos revelaron una marcada afinidad del antagonista por este adrenoceptor. En este mismo trabajo, se realizaron pruebas con el sedante medetomidina, un agonista de los receptores *alfa-2* adrenérgicos sobre la actividad motriz de la rata.

La hipotermia inducida por el sedante se vio claramente disminuida cuando el EEDQ se administró 24 h antes de la sedación con medetomidina.

Estos resultados, además de mostrar que el receptor adrenérgico alfa-2 está relacionado con respuestas fisiológicas básicas (mantenimiento de la temperatura corporal), motrices y conductuales revelan que el agente alquilante no es totalmente selectivo a los receptores dopaminérgicos, sino que también se une a los receptores adrenérgicos.

En otro estudio de *binding*, Takahashi y colaboradores (1998) analizaron la relación entre los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos utilizando antipsicóticos como la clozapina y el sertindol en ratas wistar. Sus resultados revelaron alta afinidad del sertindol por el receptor *5-HT-alfa-2* pero escasa afinidad por los receptores dopaminérgicos, en cambio, la clozapina parece unirse con alta afinidad a ambos receptores; las pruebas conductuales revelaron que las acciones de la clozapina se ven reducidas con un tratamiento previo con EEDQ, que es administrado para proteger a los receptores dopaminérgicos.

Kapur y colaboradores (2000) analizaron el índice de ocupación del receptor DA-2 utilizando los antagonistas dopaminérgicos EEDQ, haloperidol y raclopride en ratas Sprague-Dawley. Este estudio reveló que el haloperidol se une con una afinidad mayor que el raclopride al receptor DA-2, pero el raclopride mostró mayores índices de ocupación que el EEDQ.

A pesar de las evidencias que muestran al EEDQ como un antagonista menos selectivo y relativamente inespecífico en cuanto a su interacción con los receptores a dopamina, su unión irreversible al receptor dopaminérgico lo ubican como una herramienta experimental adecuada para el estudio de diversas funciones cerebrales y fisiológicas por sus efectos prolongados cuando ocupa a los receptores dopaminérgicos e incluso otros.

Por último, es necesario comentar que el uso de los animales para experimentación debe ajustarse a lineamientos y normas que vigilan el bienestar animal. Nuestro país cuenta con la Norma Oficial Mexicana (NOM) 062-ZOO-1999 y en ella se establecen los criterios para minimizar al máximo el sufrimiento, dolor, estrés, disconfort y cualquier estímulo nocivo que afecte la calidad de vida del animal de experimentación.

Las organizaciones internacionales que pugnan por los derechos de los animales que se utilizan para fines experimentales y de carácter estrictamente científico proponen que las instituciones o dependencias en las que se trabaja con animales de experimentación (roedores, lagomorfos, cerdos, primates no-humanos e incluso otra clase de mamíferos y aves) cuenten con un comité de bioética que se encargue de normar, vigilar e incluso sancionar a aquellos que en nombre de la ciencia infrinjan deliberadamente dolor y sufrimiento a los animales.

Los argumentos que esgrimen tales organizaciones pro-derechos de los animales se centran en que un organismo sujeto a manipulaciones dolorosas o estresantes, arrojan o reflejan resultados poco objetivos o difíciles de interpretar. Por tanto, es aparentemente razonable mantener y ofrecer las mejores condiciones de vida en los organismos sujetos a experimentación.

La NOM-062-ZOO-1999 es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer y uniformar las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio que deben cumplir las personas físicas o morales relacionadas en todos los campos con este tipo de animales.

Es aplicable a los bioterios y/o establecimientos que manejen los siguientes animales: roedores: rata, ratón, cobayo, hámster y jerbo; lagomorfos: conejo; carnívoros: perro y gato; primates: primates no-humanos; porcinos: cerdo doméstico.

En el presente trabajo se buscó en todo momento ajustarse a dicha norma, sin embargo, uno de los principales problemas que enfrentamos para analizar el mecanismo que conduce a la ovulación en la rata tiene que ver con la influencia que el sistema nervioso tiene sobre el mecanismo de la ovulación, ya que existe evidencia que algunos anestésicos inyectables de uso veterinario interrumpen las señales neuroendocrinas y endocrinas que regulan la función del eje hipotálamo-adenohipósis-ovario y en el momento de iniciar nuestros experimentos no se contaba con un sistema adecuado ni condiciones de infraestructura física suficiente para el suministro de anestésicos inhalables más seguros como: halotano, isoflourano, enflurano, metoxiflourano, dietiléter, óxido nitroso, entre otros (Shibutani, 2000).

El uso del éter etílico como sedante, está justificado y fundamentado en múltiples trabajos donde se buscan efectos sedantes de acción ultracorta.

Sin embargo, la NOM-062-ZOO-1999 no recomienda su uso por considerarlo peligroso por sus propiedades explosivas o inflamatorias (punto de inflamabilidad:  $-45^{\circ}\text{C}$ ; punto de auto-ignición:  $170^{\circ}\text{C}$ ) aunque no está prohibido por la norma de acuerdo a sus propiedades sedantes ¿Por qué recurrir a un sedante/anestésico como el éter etílico de corta duración, pero efectivo para deprimir las sensaciones dolorosas?

Los argumentos se centrarían en la explicación de que todas las funciones del sistema endocrino requieren como mediador al sistema nervioso (Guyton & Hall, 2006), el estudio de la fisiología reproductiva de la hembra está forzosamente relacionada con la función neuroendocrina del hipotálamo como mediador de la descarga preovulatoria de las gonadotropinas, mismas que al actuar sobre las gónadas inducen el desarrollo folicular y la ovulación (Freeman, 1988, 1994, 2006; Guyton & Hall, 2006).

Por otra parte, existen numerosas pruebas experimentales que postulan que las principales funciones de los ovarios: la secreción de esteroides sexuales y la liberación de gametos viables, son moduladas por las señales nerviosas sensoriales y autonómicas que ingresan a la glándula por ramas nerviosas provenientes de diversos ganglios y plexos del Sistema Nervioso Periférico (Burden, 1985; Dissen et al, 1993; Lawrence & Burden; 1980; Mayerhofer et al, 1997; Strauss III & Williams, 2009).

El papel de la información nerviosa en el control de las funciones endócrinas del ovario es un factor crítico, por tanto el uso de un anestésico conlleva el riesgo potencial de afectar indirectamente la secreción de gonadotropinas y por tanto la función ovárica.

Con base en esto último, planteamos la siguiente pregunta: ¿Qué hacer para estudiar el papel de estas señales nerviosas que inervan a los ovarios y que afectan su funcionamiento si tenemos que confrontar el compromiso ético del buen y mejor trato hacia los animales de experimentación e infringir en ellos el menor dolor posible?

Existen evidencias claras que el efecto de anestésicos comunes como el pentobarbital sódico inyectado en la tarde del proestro es capaz de bloquear la ovulación en la mañana del estro al inhibir la descarga hipotalámica de la GnRH y con ello suprimir el pico preovulatorio de las gonadotropinas que precede a la ovulación (Domínguez & Smith, 1974). Por todo lo anterior, se vuelve un compromiso ineludible realizar pruebas piloto que permitan utilizar los mejores y más adecuados agentes anestésicos/sedantes para minimizar el dolor y el sufrimiento pre- y postoperatorio en los animales de experimentación y que no enmascaren y/o afecten la objetividad del análisis de los resultados y datos experimentales.

### Conclusiones

- 1) El bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos inducido por el haloperidol en los días del diestro, induce interrupción en señales cruciales que controlan la duración del ciclo estral al afectar directamente las funciones endocrinas del ovario, aunque no se afecta la cuota ovulatoria.
- 2) El bloqueo farmacológico de los receptores dopaminérgicos inducido por el agente alquilante EEDQ afecta los mecanismos que controlan la selección de los folículos que deberían alcanzar la madurez óptima, lo que se refleja en una cuota ovulatoria disminuida, sin afectar significativamente la duración del ciclo estral.

### Referencias

- Adashi, E.Y. & Hsueh, A.J.W. (1981). Stimulation of  $\beta$ -adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 108: 2170-2178.
- Ahmed, C.E., Dees, W.L. & Ojeda, S.R. (1986). The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118: 1682-1689.
- 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., Petrovic, S.L. & Ojeda, S.R. (1982). Ovarian  $\beta$ -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 11: 1124-1132
- Amneta, F., Ricci, A., Tayebati, S.K. & Zaccheo, D. (2002). The peripheral dopaminergic system: morphological analysis, functional and clinical applications. *Ital J Anat Embryol* 107:145-67.
- Anesetti, G., Lombide, P., D'albora H. & Ojeda, S.R. (2001). Intrinsic neurons in the human ovarii. *Cell Tissue Res* 306: 231-237.
- Ben-Jonathan, N., Braw, R.H., Laufer, N., Reich, R., Bahr, J.N. & Tsafirri, A. (1982). Norepinephrine in graafian follicles is depleted by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 110:457-461.
- Bodis, J., Bognár, Z., Hartmann, G., Török, A., Csaba, I. (1992). Measurement of noradrenaline, dopamine and serotonin contents in follicular fluid of human graafian follicles after superovulation treatment. *Gynecol Obstet Invest* 33:165-7.
- Bodis, J., Tinneberg, H.R., Török, A., Cledon, P., Hanf, V. & Papenfuss, F. (1993). Effect of noradrenaline and dopamine on progesterone and estradiol secretion of human granulosa cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* 129:165-168.

- Burden, H.W. (1978). Ovarian Innervation. En: *The Vertebrate Ovary, Comparative Biology*. Ed. R.E Jones. Plenum Press. New York, pp. 615-338
- Burden, H.W. (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: *Catecholamines As Hormone Regulators*. Eds. N. Ben Jonathan, J.M. Bahr & R.I. Weiner. Sero Symposia Publications. Raven Press. New York, pp. 262-278.
- Cavero, J., Massingham, R. & Lefevre-Borg, F. (1982). Peripheral dopamine receptors, potential targets for a new class of antihypertensive agents. Part I: Subclassification and functional description. *Life Sci* 31:939-948.
- Chávez, R., Cruz, M.E. & Dominguez, R. (1987). Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *Journal Endocrinology* 113:397-401
- Cooper, J. R., Bloom, F.E & Roth, R.H. (1996). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 7th Edition. Oxford University Press. New York. pp 293-251.
- Cruz, M.E., Chávez, R. & Domínguez, R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *La Revista de Investigación Clínica* 38:167-171
- Curry, T.E., Lawrence, I.E. & Burden, H.W. (1984a). Effect of ovarian sympathectomy on follicular development during compensatory ovarian hypertrophy in the guinea pig. *J Reprod Fert* 71: 39-44
- Curry, T.E., Lawrence I.E. & Burden, H.W. (1984b). Ovarian sympathectomy in the guinea pig: effects on follicular development during the prepuberal period and following exogenous gonadotrophin stimulation. *Cell Tissue Res* 236: 593-596.
- Davoren, J.B. & Hsueh A.J.W. (1985). Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod* 33: 37-52
- D'Albora, H., Lombide, P. & Ojeda, S.R. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovarii: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 300: 47-56
- D'Albora, H., Anesetti, G., Lombide, P., Dees, W.L. & Ojeda, S.R. (2002). Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech* 59:484-489.
- D'Albora, H. & Barcia, J.J. (1996). Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosci Lett* 205:65-67
- Dees, W.L., Kozlowski, G.P., Dey, R. & Ojeda, S.R. (1985). Evidence for the existence of substance P in the pre-puberal rat ovary. II. Immunocytochemical localization. *Biol Reprod* 33:471-476.
- Dees, W.L., Hiney, J.K., Mcartur, N.H., Johnson, G.A., Disse, G.A & Ojeda, S.R. (2006). Origin and ontogeny of mammalian ovarian neurons. *Endocrinology* 147: 3789-3796.
- Dissen, G.A., Dees, W.L. & Ojeda, S.R. (1993). Neuronal and neurotrophic control of ovarian development. En: *The Ovary*. Eds. E.Y. Adashi & P.C.K. Leung. Raven Press. New York, pp 1-19.

Dissen, G.A. & Ojeda, S.R. (1999). Ovarian innervation. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. E. Knobil & J. D. Neill. Academia Press. New York, pp.583-589.

Domínguez, R., Cruz, M.E. & Chávez, R. (1989). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: "Growth Factors and the Ovary". Eds. A.N. Hirshfield. Plenum Press. New York. pp.321-325

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

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

Domínguez, R. & Smith, E.R. (1974). Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology* 14:212-223.

Domínguez, C, R. Zipitria, D., Riboni, L. & Revilla, R (1985). Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation throughout the oestrous cycle of the rat. *J Interdis Cycle Res* 16: 285-294.

Durcan, M.J., Morgan, P.F., Van Etten, M.L. & Linnoila, M. (1994). Covariation of  $\alpha 2$ -adrenoreceptor density and function following irreversible antagonism with EEDQ. *Br. J. Pharmacol* 112:855-860.

Dyer, C.A. & Erickson, G.F. (1985). Norepinephrine amplifies human chronic gonadotrophin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology* 116: 1645-1652.

Erickson, G.F, Magoffin, D.A., Dyer, C.A & Hofeditz, C. (1985). The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev* 6: 371-399.

Erickson, G.F. (1995). The Ovary: Basic Principles and Concepts. En: *Endocrinology y Metabolism*. Capítulo 17. Eds. P. Felig, J.D Boxter & L.A Frohman. 3th Edition. McGraw-Hill. New York. pp 973-1013.

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. 3th edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 2327-2388

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

- Gay E.A., J.D. Urban, D.E. Nichols, G.S. Oxford & B.R. Mailman (2004). Functional Selectivity of D2 Receptor Ligands in a Chinese Hamster Ovary hD2L Cell Line: Evidence for Induction of Ligand-Specific Receptor State. *Molecular pharmacology* 0026-895X/04/6601-97-105
- Gerendai, I., Tóth, I.E., Boldogkői, Z., Medceczky, I. & Halász, B. (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technic. *Neuroendocrinology* 68: 244-256.
- Gozlan, H., Laponte, A.M., Thibault, S., Schechter, L.E., Bolaños, F. & Hamon, M. (1994). Differential effects of EEDQ on various 5-HT receptor binding sites in the rat brain. *Neuropharmacology* 33:423-431.
- Guyton, A.C. & Hall, J.E. (2006). Pituitary hormones and their control by the hypothalamus. En: "Textbook of Medical Physiology". 11th Edition. Eds. A.C. Guyton and J.E. Hall. Unit XIV. Chapters 74, 75 and 81. Elsevier Saunders. Philadelphia Pag. 918-929
- Hsueh, A.J.W., Adashi, E.Y., Jones, P.B.C. & Welsh, T.H. (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocrine Rev* 5: 76-127.
- Juárez-Robelo, C.E. (2015). Análisis de los efectos de la microinyección de EEDQ en la bursa ovárica de ratas adultas cíclicas en los diferentes días y horas del ciclo estral sobre la ovulación espontánea. Tesis Profesional. Biología, BUAP.
- Kapur, S., Barsoum, S.C. & Seeman, P. (2000). Dopamine D2 receptor blockade by Haloperidol: 3H-Raclopride reveals much higher occupancy than EEDQ. *American College Neuropsychopharmacology* 23:5:595-598.
- Kebabian, J.W. & Calne, D.B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- King, S.S., Campbell, A.G., Dille, E.A., Roser, J.F., Murphy, L.L. & Jones, K.L. (2005). Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domest. Anim. Endocrinol.* 28 (4), 405-415. Doi:10.1016/j.domaniend.2005.02.001
- Klein, J.T. & H.W. Burden (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating rat ovary. *Neuroscience Letters* 85:217-222
- Kudo, S & Ishizaki, T. (1999). Pharmacokinetics of haloperidol: an update. *Clin Pharmacokinet* 37: 435-456.
- LARA, H.E, Mcdonald, J.K., AHMED, C.E. & OJEDA, S.R. (1990). Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and functioning rats. *Endocrinology* 127:2199-2209.
- Lara, H.E., Porcile, A., Espinoza, J., Romero, C., Luza, S.M., Fuhrer, J., Miranda, C. & Roblero, B.L. (2001). Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine* 15:187-192.
- Lawrence, I.E & Burden, H.W. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the ovary. *Anat Rec* 196:51-59.
- Lévesque, D. & Di Paolo, T. (1988). Dopamine receptor reappearance after irreversible receptor blockade: effect of chronic estradiol treatment of ovariectomized rats. *Adv Exp Med Biol* 235:121-136
- Litter, M. (1988). Farmacología Especial. En: Farmacología Experimental y Clínica. 7ª Edición. 2ª Parte. Sección I: Farmacología del Sistema Nervioso. El Ateneo, Buenos Aires. pp 179-429.



Martel, R.R., Berman, R. & Belleau, B. (1969). Pharmacology of N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ). *Can J Physiol Pharmacol* 47:909-912.

Mayerhofer, A., Dissen, G.A, Costa, M.E. & Ojeda, S.R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 178: 3320-3329.

Mayerhofer, A. Fritz, S., Grunert, R., Sanders, S.L., Duffy, D.M., Ojeda S.R. & Stouffer, R.L. (2000). D-1 Receptor, DARPP-32 and PP-1 in the primate corpus luteum and luteinized granulosa cells: evidence for phosphorylation of DARPP-32 by dopamine and human chorionic gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (12), 4750-4757. Doi: 10.1210/jcem.8512.7084  
Mcneill, D.L. & BURDEN, H.W. (1987). Neuropeptides in sensory perykarya projecting to the ovary. *Am J Anat* 179: 269-276

Meléndez, E., Morán, C. & Morán J.L. (2002). Efectos de la microinyección de EEDQ en el hipotálamo anterior sobre el ciclo estral de la rata. Resumen. XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Colima, Col. C-238; 2002.

Mizunuma, H., De Palatis, L.R. & Mccann, M. (1983). Effect of unilateral orchidectomy on plasma FSH concentration: Evidence for direct neural connection between testes and CNS. *Neuroendocrinology* 37:291-296

Morán, J.L. & Domínguez, A. (1995). Effects of the unilateral implant of haloperidol at the preoptic-anterior hypothalamic area, ovulation. *Endocrine* 3:399-401

Morán, J.L. & Domínguez, A. (1997). Differences in the sensitivity of the right and the left side of the preoptic anterior hypothalamic area to the effect of a unilateral implantation of haloperidol, performed on the day of estrous, on spontaneous ovulation. *Med Sci Res* 25: 465-466.

Nance, D.M. & Moger, W.H. (1982). Ipsilateral hypothalamic deafferentation blocks the increase in serum FSH following hemicastration. *Brain Research Bulletin* 8:299-302

Nance, D.M., White, J.P. & Moger, W.H. (1983). Neural regulation of the ovary: Evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control. *Brain Research Bulletin* 10:353-355

NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Senasica, Dirección General de Salud Animal. SAGARPA.

Ojeda, S.R., Lara, H. & Ahmed, C.E. (1989). Potential relevance of vasoactive intestinal peptide to ovarian physiology. *Seminar in Reproductive Endocrinology* 7: 52-60.

Ojeda, S. & Skinner, M. (2006). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. J.D. Neill. 3th. Edition. Academic Press. San Diego, pp. 2061-2126.

Parra, C., Fiedler J.L., Luna, S.L., Greiner, M., Padmanabhan, V. & Lara, H. (2007). Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrous cycle and in the development of estradiol valerate-induced polycystic ovary. *Reproduction* 133:147-154.

Pastelín-Rojas, C.F. (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.

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.

Rey-Ares, V., Lazarov, N., Berg, D., Berg, U., Kunz, L. & Mayerhofer, A. (2007). A dopamine receptor repertoire of human granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 5:40-49

Shibutani, M. (2000). Anesthesia, artificial ventilation and perfusion fixation. En: *The Laboratory Rat*. Chapter 26. Eds. G. J. Krinke. Academic Press. London, pp. 511-522.

Speroff, L., Glass, R.H. & Kase, N.G. (1999). Anovulation and the polycystic ovary. En: *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6th. Edition. Eds. L. Speroff, R.H. Glass & N.G. Kase. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, pp. 487-521.

Strauss Iii, J.F. & Williams, C.J. (2009). The synthesis and metabolism of steroid hormones. In: "Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management", Eds. Jerome F. D. Strauss & R.L. Barbieri, 6<sup>th</sup> Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia, pp. 155-190.

Takahashi, Y., Kusumi, I., Ishikane, T., Matsubara, S. & Koyama, T. (1998). In vivo occupation of dopamine D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, and serotonin (5-HT) 2A receptors by sertindole in the rat brain. *Journal of Psychiatry & Neuroscience* 23 (3): 157-162.

The Index Merck, Merck and Co., Inc. Whitehouse Station, NJ. 1996.

Tóth, I.E., Wiesel, O., Boldogkői Z., Bálint K., Tapaszi Z. & Gerendai, I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microsc Res Tech* 70: 710-718

Uchida, S., Kato, Y., Hirano, K., Kagawa, Y. & Yamada, S. (2007). Brain neurotransmitter receptor-binding characteristics in rats after oral administration of haloperidol, risperidone and olanzapina. *Life Sciences* 80: 1635-1640.

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, B., Padilla, J.F., Juaréz, C.E., Morán, J.L., Morán, C., Rosas, N.H., Handal, A. & Domínguez, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptor on ovulation. *Endocrine*. DOI 10.1007/s1220-015-0636-4.

Weissman, A. & Muren, J.F. (1971). Depressant 1,2-dihydroquinolines and related derivatives. *J. Med. Chem.* 14(1):49-53.

Yen, S.S.C. (1999a). 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.

Yen, S.S.C. (1999b). Chronic anovulation caused by peripheral endocrine disorders. En: *Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management*. 4th. Edition. Chapter 18. W.B. Saunders Co. Philadelphia, pp. 479-508.

Yen, S.S.C. (1999c). Chronic anovulation due to CNS-Hypothalamic-Pituitary dysfunction. En: Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. 4th. Edition. Chapter 19. W.B. Saunders Co. Philadelphia, pp. 510-560.

.