

La *Sulpirida* reduce la ovulación compensadora pero incrementa la hipertrofia compensadora del ovario derecho en la rata hemiovariectomizada

LETRAS, Dulce*†, HANDAL, Anabella, DÍAZ, Alfonso' y MORÁN, José Luis

Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias

'Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas/ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México

Recibido Febrero 28, 2016; Aceptado Junio 20, 2016

Resumen

Se analizó el efecto de la microinyección (MI) del antagonista DA2: Sulpirida (SPD) dentro de la bursa ovárica de ratas cíclicas adultas hemicastradas (HX) del ovario derecho (OD) o del izquierdo (OI), con el propósito de estudiar su papel sobre la duración del ciclo estral (CE), la ovulación (número de ovocitos liberados: NOL), el desarrollo de la ovulación compensadora (OC) e hipertrofia compensadora del ovario (HCO) y la posible lateralidad funcional del receptor DA2. La MI de SPD se realizó a las 13:00h de los diferentes días del CE. La SPD prolongó la duración del CE cuando la MI se realizó en diestro-1, independientemente del ovario que permaneció in situ. Solo la MI en el día del diestro-1, indujo disminución del NOL y la OC cuando el OD permanece in situ, pero incrementó su HCO, lo que no ocurrió cuando el OI permanece in situ. Aparentemente, en el diestro-1 la función del receptor DA2 en los ovarios es necesaria para el control en la secreción de gonadotropinas. El receptor DA2 en el OD incide notablemente sobre los mecanismos que controlan la ovulación, la OC y la HCO, pero no en el OI.

Sulpirida, Receptor DA2, Hemiovariectomía, Ovulación Compensadora, Hipertrofia Compensadora, Rata Hembra

Abstract

We analyzed the effect microinjection (MI) of DA2 antagonist: Sulpiride (SPD) inside of ovarian bursa in adult cycling hemiovariectomized rats (HX) of right (RO) or left ovary (LO), and our propose was study his roll on estral cycle (EC), ovulation (number of ova shed: NOS), development of compensatory ovulation (CO) and ovarian compensatory hypertrophy (OCH), and explored laterally of DA2 receptor. All MI of SPD was performed at 13:00h in different estral cycle days. The SPD increases duration of EC, independently in situ ovary remaining. Just MI performed on diestrous-1 reduced NOS and CO over in situ RO however the OCH was increased, that none occurs when in situ is LO. Apparently in diestrous-1 day, receptor DA2 functionality is essential in the control gonadotrophin secretion. The DA2 receptor of RO markedly participates in control of ovulation, CO and OCH mechanisms nonetheless LO.

Sulpiride, DA2 Receptor, Hemiovariectomy, Compensatory Ovulation, Compensatory Hypertrophy, Female Rat

Citación: LETRAS, Dulce, HANDAL, Anabella, DÍAZ, Alfonso y MORÁN, José Luis. La *Sulpirida* reduce la ovulación compensadora pero incrementa la hipertrofia compensadora del ovario derecho en la rata hemiovariectomizada. Revista de Sistemas Experimentales. 2016, 3-7: 46-59.

*Correspondencia al Autor (Correo electrónico: dell985@hotmail.com)

†Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La regulación de las funciones del sistema reproductor en la hembra, es resulta de la interacción de diferentes hormonas secretadas por la adenohipófisis, los ovarios e incluso por otras glándula endocrinas (neurohipófisis, adrenales y timo), interrelación que ocurre durante el ciclo estral o menstrual (Conn, 1994; Feder, 1991; Fink, 1988) además de los efectos moduladores que ejerce el sistema nervioso por medio de la inervación hacia estos órganos (Bahr et al., 1974; Burden, 1978; Domínguez et al., 1989).

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).

La secreción de las gonadotropinas es regulada por la hormona hipotalámica liberadora de las gonadotropinas (GnRH), cuya secreción es controlada por diferentes sistemas de neurotransmisores (noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, ácido γ amino butírico, opioides, encefalinas, sustancia P, péptido intestinal vasoactivo-VIP-, angiotensina II) que ejercen sus efectos sobre las neuronas peptidérgicas localizadas principalmente en la región preóptica e hipotalámica anterior, así como en el hipotálamo medio (Freeman, 1988; Freeman, 1994; Kordon et al., 1994).

Según la información que se posee, la participación de los diversos sistemas de neurotransmisores en la regulación de la secreción de la GnRH varía durante el ciclo estral (Domínguez et al., 1982; Domínguez et al., 1985; Domínguez et al., 1987; Morán & Domínguez, 1995).

La noradrenalina es la principal catecolamina detectada en el tejido ovárico donde modula 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, 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. Se han evaluado los efectos fisiológicos de las catecolaminas ováricas, mediante el uso de antagonistas de sus receptores en los diferentes días del ciclo estral a distintas horas. En estos estudios, se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de receptores a dopamina resulta en la ausencia de ovulación, que depende del día del ciclo estral y la hora en el que se realizó (Domínguez et al 1987, Venegas et al., 2015), además de interrumpir el desarrollo folicular e incrementar la atresia folicular (Pastelín-Rojas, 2003; Ramírez-Ávila, 2001).

Por otra parte existe evidencia de asimetrías entre los ovarios, en ratas el ovario izquierdo ovula más ovocitos comparado con la gónada contralateral. La inervación que llega al ovario se encuentra lateralizada, el número de fibras nerviosas que recibe el ovario derecho es mayor que las del izquierdo (Klein & Burden, 1988). Sin embargo, no existe información acerca de asimetrías en el sistema dopaminérgico entre el ovario izquierdo y derecho.

Por lo anterior, el propósito del presente trabajo fue estudiar el papel del receptor dopaminérgico DA₂ del ovario en el modelo de la rata hemiovariectomizada sobre algunos parámetros reproductivos como la duración del ciclo estral, la ovulación, el desarrollo de la ovulación compensadora e hipertrofia compensadora del ovario y la posible lateralidad funcional del receptor DA₂ en la rata hemicastrada.

Materiales y Métodos

Se utilizaron 84 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 a las 19:00 h) y con libre acceso al agua y al alimento balanceado.

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: animales cíclicos) en la mañana del día del estro, estos animales fueron hemicastrados del ovario derecho o del izquierdo.

Técnica de la Hemovarietomía.

Entre las 09:00 y 10:00h del día del estro, se formaron dos grupos de animales con hemicastración derecha e izquierda. La técnica consistió en sedar a los animales con vapores de éter etílico y una vez sedados, los animales se colocaron sobre una tabla de disección; se rasuraron del costado derecho o izquierdo retirando el pelo de la zona intercostal, desde la región de las costillas inferiores hasta la región pélvica donde se pliega la pata derecha o izquierda. Se limpió la piel con solución antiséptica de clorhexidina 2% y luego se sometieron a una laparotomía que consistió en una incisión sagital de aproximadamente 1 cm sobre la piel y 0.5 cm del músculo abdominal.

Posteriormente, con ayuda de una pinza de punta fina, se exteriorizaron según el caso, el ovario derecho o el izquierdo que se disecó acompañado de su oviducto.

En el oviducto removido, se contó el número de ovocitos liberados; el ovario fue pesado en balanza de precisión y su peso expresado en miligramos/100 gramos de peso corporal. Al día siguiente de la hemiovariectomía se reanudaron los registros de frotis vaginales. Todos los animales hemicastrados que cumplieron al menos tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días fueron asignados a los siguientes grupos experimentales:

- 1) Grupo Control: formado por animales cíclicos hemiovariectomizados que se sacrificaron en la mañana del estro vaginal después de cuatro ciclos estrales completos luego de la hemicastración.
- 2) Grupos Testigo: formado por animales cíclicos hemiovariectomizados que a las 13:00 h del día del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro fueron sometidos a la laparotomía unilateral para realizar la microinyección de solución de ácido ascórbico 0.1% (vehículo; ver líneas más abajo).
- 3) Grupos con Sulpirida: animales cíclicos hemiovariectomizados que a las 13:00 h del día del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro fueron sometidos a la laparotomía unilateral para realizar la microinyección de solución sulpirida en ácido ascórbico 0.1% (ver líneas más abajo).

Técnica de la Microinyección dentro de la Bursa Ovárica.

Grupos de ratas cíclicas hemiovariectomizadas del ovario derecho o izquierdo se distribuyeron en dos grupos generales de animales hemicastrados y a las 13:00 h de uno de los diferentes días del ciclo estral fueron sedados nuevamente con vapores de éter etílico.

De modo semejante a lo realizado durante la técnica de hemicastración, el ovario remanente fue exteriorizado y sometido a la microinyección de sulpirida de la siguiente forma: se localizó la bursa ovárica y se inyectaron 200 µg de solución de sulpirida (disuelto en ácido ascórbico 0.1%) dentro de la bursa derecha o izquierda con una jeringa Hamilton. La microinyección se realizó con una bomba de perfusión nanomolar hasta infiltrar 20 µL de solución (2.12 µL/seg), seguida de 20 segundos de reposo antes de retirar la aguja del microinyector de la bursa. Los grupos testigo fueron sometidos al mismo procedimiento y recibieron 20 µL de ácido ascórbico 0.1% en solución salina isotónica (0.9%). Una vez realizada la microinyección, se limpió el campo quirúrgico con solución antiséptica de clorhexidina 2% y se devolvió el órgano a la cavidad peritoneal. Las heridas fueron suturadas con seda quirúrgica #00 y finalmente se colocó sobre la herida una gota de azul pío como cicatrizante.

Todos los animales fueron sacrificados en cámara de dióxido de carbono entre las 09:00-10:00 h de la mañana del primer estro vaginal observado.

A la autopsia, se disecó el ovario remanente y el oviducto. El oviducto fue inspeccionado para realizar el conteo directo de los ovocitos liberados y el ovario fue pesado en balanza de precisión de 0.1 ms y procesado para su análisis histológico de acuerdo al método de Luna (1975) (datos no incluidos en el análisis de resultados).

Cálculo de la Ovulación Compensadora (OC). Para analizar el grado de OC en los animales hemicastrados sometidos a la microinyección de la sulpirida, los datos del número de ovocitos liberados (NOL) por el ovario extirpado y del remanente se incorporaron en la siguiente fórmula:

$$\%OC = \frac{NOL\ del\ Ovario\ Remanente - NOL\ del\ Ovario\ Extirpado}{NOL\ del\ Ovario\ Extirpado} \times 100 \quad (1)$$

Cálculo de la Hipertrofia Compensadora del Ovario (HCO). Para analizar el grado de HCO en los animales hemicastrados sometidos a la microinyección de la sulpirida, los datos del peso relativo (100 g/kg de peso corporal) del ovario extirpado y del remanente se incorporaron en la siguiente fórmula:

$$\%HCO = \frac{Peso\ Ovario\ Remanente - Peso\ del\ Ovario\ Extirpado}{Peso\ del\ Ovario\ Extirpado} \times 100 \quad (2)$$

Análisis Estadístico

Los resultados del conteo del número de ovocitos liberados, del total de días transcurridos desde la hemicastración hasta la autopsia, de los porcentajes de OC y de HCO fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; en aquellos en que se compararon pares de medias, se utilizó la U de Mann-Whitney. Los pesos corporales y de los ovarios fueron analizados por Análisis de Varianza Múltiple seguido de la prueba de Tukey. En todos los casos se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue menor o igual al 0.05

Resultados

Independientemente del ovario extirpado, el número total de días transcurridos desde el momento de la hemicastración hasta el día de la autopsia fue semejante entre los grupos hemiovariectomizados (HX) del ovario izquierdo (OI) o del derecho (OD) (HX-OI: 19.4±0.7 días vs HX-OD: 20.9±0.9 días; ns). El promedio de días transcurridos entre los diferentes grupos experimentales del presente trabajo fue de 20.2±0.6 días.

No se encontraron diferencias significativas en el peso corporal promedio de los animales utilizados en el estudio al momento de la HX ni en el momento de la autopsia (Tabla 1).

Hemiovariectomía	Peso Corporal (g) el Día de la HX	Peso Corporal (g) a la Autopsia
Ovario Izquierdo (N=42)	250.7±3.9	262.6±4.1
Ovario Derecho (N=42)	258.3±3.9	266.4±3.7

Tabla 1 Gramos del promedio peso corporal±e.e.m. de los animales con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración sometidos a la hemiovariectomía (HX) y que se sacrificaron en la mañana del estro vaginal observado entre las 09:00 y 10:00 h luego de recibir una microinyección de sulpirida o del vehículo

Ovulación Espontánea del Ovario Extirpado.

En los 42 animales a los que se les extirpó el ovario izquierdo (OI) en la mañana del estro luego que presentaron tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días, el OI ovuló un promedio 6.3±0.3 ovocitos. En el otro grupo de 42 animales cíclicos, el ovario derecho (OD) extirpado en la mañana del estro ovuló 7.2±0.3 ovocitos. El análisis estadístico mostró que el OD de un animal cíclico intacto ovula más que el OI (Tabla 2).

Se encontraron diferencias significativas tanto en el peso absoluto como en el peso relativo entre los ovarios extirpados de los 84 animales; el OD extirpado pesó menos en comparación al OI (Peso Absoluto: OI: 33.6±0.9 mg vs OD: 30.8±0.9 mg; p<0.04, prueba t de Student) (Tabla 2).

Hemiovariectomía	Número de Ovocitos Liberados	Peso Relativo del Ovario Extirpado (mg/100 g)
Ovario Izquierdo (N=42)	6.3±0.3	13.2±0.3
Ovario Derecho (N=42)	7.2±0.3*	12.2±0.3**

* p< 0.02 comparado con el ovario izquierdo (U de Mann-Whitney); ** p< 0.03 comparado con el ovario izquierdo (t de Student).

Tabla 2 Número de ovocitos liberados±e.e.m. de los animales con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración sometidos a la hemiovariectomía. Estos animales fueron destinados a los diferentes experimentos para recibir una microinyección de sulpiride o su vehículo dentro de la bursa ovárica remanente

Ovulación Espontánea del Ovario in situ Luego de la Microinyección de Sulpirida.

De modo general y al comparar con sus respectivos grupos testigo, no se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos liberados en los grupos con OI in situ que recibieron la microinyección con sulpirida a las 13:00 h en los diferentes días del ciclo estral y que se sacrificaron en la mañana del estro observado (OI in situ: Sulpirida: 14.7±0.7 ovocitos vs Testigo: 15.7±0.8 ovocitos, ns).

Sin embargo, en los grupos con el OD in situ y que recibieron una microinyección de sulpirida ovularon menos en relación a su vehículo (OD in situ: Sulpiride: 13.2±0.9 ovocitos vs Vehículo: 16.6±0.7 ovocitos; p<0.008, U Mann-Whitney) (Tabla 3).

Al analizar la ovulación espontánea del ovario que permanece in situ respecto al día del ciclo en que se realizó la microinyección de sulpirida, se observó una tendencia a la reducción en el número de ovocitos liberados en los dos grupos tratados en el día del diestro-1 respecto a sus grupos testigo (Sulpirida: 12.1±0.7 ovocitos vs Testigo: 17.4±1.1 ovocitos; p<0.02, U de Mann-Whitney), diferencia que es significativa únicamente cuando el OD es el que permanece in situ.

De igual forma, solo en los grupos tratados con sulpirida en el diestro-1, la presencia del estro vaginal se retrasó significativamente, independientemente del ovario que permanece in situ (Tabla 3).

Al analizar la ovulación espontánea del OD in situ con relación a la fase del ciclo ovárico, en los grupos tratados con Sulpirida en los días de diestro, existió una clara tendencia a la disminución en el número de ovocitos liberados respecto a sus grupos testigo (Sulpirida: 12.2±1.4 vs Testigo: 18.5±1.1, p<0.03; U de Mann-Whitney), lo que no ocurrió en el grupo con OI in situ (Sulpirida: 13.5±1.3 vs Testigo: 14.7±1.0, ns).

Ovulación Compensadora (OC) del Ovario in situ.

Comparado con el testigo, no se encontraron diferencias significativas en el grado de OC del OI in situ en el grupo de animales en los que se realizó la microinyección de sulpirida a las 13:00 h en los diferentes días del ciclo estral (OI in situ: Sulpirida: 131.2±11.6 % vs Testigo: 148.9±12.9 %, ns).

En cambio, en el grupo donde la microinyección del antagonista dopaminérgico se realizó en el OD in situ, se observó una caída en el grado de OC en referencia al testigo (OD in situ: Sulpirida: 88.9±9.5 % vs. Vehículo: 129.8±9.1 %, p<0.02, U de Mann-Whitney) (Grafico 1).

Ovario In Situ	Grupo Experimental	Número de Ovocitos Liberados		Duración del Ciclo Estral (días)	
		Vehículo	Sulpiride	Vehículo	Sulpiride
Izquierdo	MIB Estro en	17.0±2.2	16.5±1.9	4.0±0.0	4.0±0.0
	MIB Diestro-1 en	14.7±1.0	13.5±1.3	4.0±0.0	5.0±0.0*
	MIB Diestro-2 en	14.5±2.3	14.3±0.9	4.0±0.0	4.0±0.0
	MIB Proestro en	16.5±0.5	14.5±1.6	4.0±0.0	4.0±0.0
	Control	14.5±0.7		4.0±0.0	
Derecho	MIB Estro en	14.8±0.5	14.8±1.1	4.0±0.0	4.0±0.0
	MIB Diestro-1 en	18.5±1.1	12.2±1.4 ^δ	4.0±0.0	5.0±0.0*
	MIB Diestro-2 en	16.2±1.1	12.0±0.8	4.0±0.0	4.0±0.0
	MIB Proestro en	16.7±1.1	13.8±3.1	4.0±0.0	4.0±0.0
	Control	15.1±0.9		4.0±0.0	

δ p<0.03 vs Vehículo; U de Mann-Whitney; * p<0.0001 vs todos; Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Tabla 3 Media del número de ovocitos liberados±e.e.m. y media de los días de duración del ciclo estral±e.e.m. en las ratas hemiovariectomizadas que al recuperar un patrón regular de ciclicidad vaginal recibieron una microinyección de sulpirida o su vehículo dentro de la bursa ovárica remanente

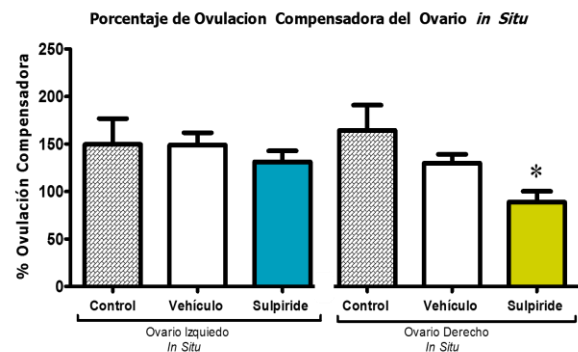


Gráfico 1 Media del porcentaje ovulación compensadora±e.e.m del ovario in situ de las ratas hemiovariectomizadas con un patrón regular de ciclicidad vaginal que fueron sometidas a una microinyección de sulpirida dentro de la bursa ovárica remanente.

*p<0.03 comparado con todos los grupos; Prueba de U de Mann-Whitney

Al analizar la OC del OD *in situ* con relación a la fase del ciclo ovárico, en los grupos tratados con sulpirida en los días de diestro, nuevamente se apreció una clara tendencia a la disminución en grado de OC respecto a sus grupos testigo (Sulpirida: 68.4±9.9 vs Testigo: 141.2±15.2, $p<0.002$; U de Mann-Whitney), lo que no ocurrió cuando en el grupo de animales con OI *in situ* (Sulpirida: 131.8±18.7 vs Testigo: 116.9±11.9, ns).

Al comparar la OC del OD con relación al día del ciclo en que se realizó la microinyección de sulpirida, solo el grupo tratado con el antagonista en el día del diestro-1 mostró cierta tendencia a disminuir el grado de OC respecto a su testigo (Tabla 4).

Hipertrofia Compensadora del Ovario (HCO) *in situ*.

El análisis del peso de los ovarios que permanecieron *in situ*, se observaron algunas diferencias significativas en el desarrollo hipertrófico en la gónada remanente. Aparentemente, la microinyección del Sulpiride en el día del estro indujo un incremento significativo en el peso del ovario, sin observarse cambios significativos en los grupos tratados en los otros días del ciclo estral (Tabla 5). Sin tomar en cuenta el día del ciclo en que se realizó la microinyección del sulpiride, el análisis del grado de HCO en los animales de los diferentes grupos, sólo cuando el OD permanece *in situ* ocurrió un incremento significativo en el grado de HCO respecto a su grupo testigo y a los grupos con OI *in situ* (Gráfico 2).

No se encontraron diferencias significativas en el grado de HCO cuando el OI permanece *in situ* en el grupo de animales en los que se llevó a cabo la microinyección del antagonista respecto al testigo (Sulpirida: 56.4±6.4 % vs Testigo: 57.4±5.5 %, ns).

En contraste, cuando la microinyección del antagonista dopaminérgico se realizó en el OD *in situ*, el grado de HCO se incrementó significativamente respecto a su testigo (Sulpirida: 78.4±4.8 % vs Vehículo: 57.6±4.7 %, $p<0.003$; U de Mann-Whitney).

Ovario <i>In Situ</i>	Grupo Experimental	Ovulación Compensadora (Media del Porcentaje)	
		Vehículo	Sulpiride
Izquierdo	MIB en Estro	169.7±34.9	162.0±30.6
	MIB en Diestro-1	134.0±16.5	106.4±20.4
	MIB en Diestro-2	129.7±13.5	126.1±13.5
	MIB en Proestro	162.0±8.0	130.5±24.6
	Control	149.5±27.1	
Derecho	MIB en Estro	104.5±6.7	104.7±15.3
	MIB en Diestro-1	156.7±26.2	70.0±18.1 ^δ
	MIB en Diestro-2	125.7±15.3	66.7±11.2
	MIB en Proestro	132.5±15.5	122.3±42.4
	Control	164.3±26.6	

^δ $p<0.03$ comparado con el vehículo; U de Mann-Whitney.

Tabla 4 Media del porcentaje de ovulación compesandora±e.e.m en las ratas hemiovariectomizadas que al recuperar un patrón regular de ciclicidad vaginal fueron sometidos a una microinyección de sulpirida dentro de la bursa ovárica remanente a las 13:00 h del Estro, Diestro-1, Diestro-2 o Proestro

Si se toma en cuenta el día del ciclo en que se realizó la microinyección de la sulpirida, el análisis estadístico revela la existencia de diferencias entre los grupos tratados con el antagonista.

Sin embargo, solo en el grupo tratado en el día del diestro-1 se observó un incremento relativo en el grado de HCO cuando el OD permanece *in situ* respecto al testigo y al mismo grupo con el OI *in situ* (Tabla 6 y Gráfico 2).

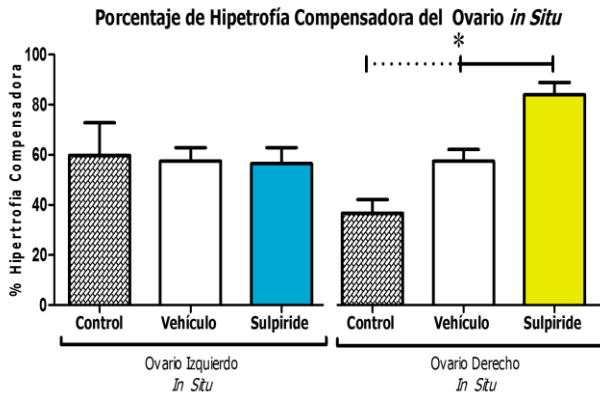


Gráfico 2 Media del porcentaje de hipertrofia compensadora±e.e.m del ovario in situ de las ratas hemiovariectomizadas con un patrón regular de ciclicidad vaginal que fueron sometidas a una microinyección dentro de la bursa ovárica

*p<0.01 comparado con su grupo vehículo; Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn; *p<.0001 comparado con el grupo control, prueba de U Mann-Whitney)

Ovario In Situ	Grupo Experimental	Peso relativo (mg/100g)	
		Vehículo	Sulpiride
Izquierdo	MIB en Estro	20.4±0.6	20.6±1.9
	MIB en Diestro-1	21.1±1.4	17.5±0.9
	MIB en Diestro-2	20.2±2.4	23.5±0.7
	MIB en Proestro	21.3±1.5	21.0±2.4
	Control	17.8±0.9	
Derecho	MIB en Estro	16.6±0.4	23.9±0.8 *
	MIB en Diestro-1	18.4±0.6	22.4±1.6
	MIB en Diestro-2	20.2±0.7	22.7±1.6
	MIB en Proestro	21.7±0.8	20.8±0.2
	Control	16.9±0.8	

*p<0.02 respecto a su grupo vehículo (Análisis de varianza seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer).

Tabla 5 Media de los pesos relativos±e.e.m del ovario in situ de las ratas hemiovariectomizadas con un patrón regular de ciclicidad vaginal que fueron sometidas a una microinyección de sulpirida dentro de la bursa ovárica remanente a las 13:00 h del Estro, Diestro-1, Diestro-2 o Proestro

Ovario In Situ	Grupo Experimental	Hipertrofia Compensadora (Media del Porcentaje)	
		Vehículo	Sulpiride
Izquierdo	MIB en Estro	54.7±4.5	56.2±8.2
	MIB en Diestro-1	60.5±10.4	32.5±7.2
	MIB en Diestro-2	53.0±17.9	78.2±5.6
	MIB en Proestro	61.5±11.5	59.0±17.7
	Control	59.7±13.1	
Derecho	MIB en Estro	36.0±3.0*	95.7±6.7
	MIB en Diestro-1	50.7±4.8	83.5±12.9 ^δ

	MIB en Diestro-2	65.2±6.4	86.0±12.8
	MIB en Proestro	77.7±6.9	70.5±1.7
	Control	36.7±5.4	

*p<0.004 comparada a su grupo con microinyección de sulpiride; prueba de Kruskal Wallis y p<0.03 comparada con el grupo tratado en mismo día del ciclo con ovario derecho *in situ* (U de Mann-Whitney)
^δ p<0.03 comparado con el grupo tratado en mismo día del ciclo con ovario izquierdo *in situ* y su grupo con vehículo (U de Mann-Whitney).

Tabla 6 Media de porcentaje de hipertrofia compensadora±e.e.m del ovario in situ de las ratas hemiovariectomizadas con un patrón regular de ciclicidad vagina que fueron sometidas a una microinyección de sulpirida dentro de la bursa ovárica remanente a las 13:00 h del Estro, Diestro-1, Diestro-2 o Proestro

Discusión de Resultados

En la rata adulta la capacidad ovulatoria es asimétrica, es decir, un ovario ovula más que el otro (Domínguez et al., 2003), en nuestros resultados se encontró que el ovario derecho ovula casi un ovocito más en relación al izquierdo, hecho que se correlaciona directamente con la disminución en el peso de la gónada derecha respecto a la izquierda. Al momento de la ovulación el ovario derecho pierde más masa y volumen al ovular más reflejándose en un menor peso al compararlo con el ovario contralateral.

Independientemente de la gónada extirpada, en los grupos de ratas con microinyección de sulpiride en el ovario izquierdo o derecho en el día del diestro-1, la presencia del estro vaginal se retrasó 24 horas en todos los animales pero el 100% de los animales ovuló en la mañana del primer estro observado luego de la microinyección del antagonista. Resultados recientes de nuestro laboratorio, muestran consistentemente que en el animal entero, el bloqueo de los receptores dopaminérgicos por microinyección bilateral de diferentes antagonistas dopaminérgicos (haloperidol, EEDQ, SCH23390 o sulpiride) durante el diestro-1 afecta significativamente la ovulación espontánea (Venegas et al., 2015).

Lo que nos permite sugerir que la dopamina y sus receptores durante el diestro-1 son indispensables para que los mecanismos que conducen a la ovulación espontánea acompañados de la presencia del estró vaginal se desarrollen de manera normal.

Si la dopamina ovárica 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 sus receptores. Sin embargo, no hay estudios que confirmen la presencia de dopamina en terminales sinápticas, tanto aquellas de origen extrínseco (Lara et al., 2002; 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 los ovarios.

En este contexto, los sistemas educativos privados que cobran dinero por sus servicios prestados, enfrentan muchas dificultades para responder de forma efectiva a las demandas de una sociedad cada vez más compleja y desigual, debido al costo que representa para los padres de familia el estudio de sus hijos. De manera que no se garantiza el debido acceso a las diferentes etapas y modalidades de educación a menos que existan entidades subsidiadas por el Estado que tengan cobertura sobre la población menos favorecida.

En términos generales, se observó que la ovulación compensadora del ovario derecho disminuyó significativamente en los animales tratados con el antagonista de los receptores DA2 sin afectar la del ovario izquierdo. Estos resultados nos permiten sugerir que el ovario derecho de la rata queda afectado pese a que en el animal entero, el ovario derecho ovula más que el izquierdo.

Por otra parte, al analizar de modo general nuestros datos, el grado de hipertrofia compensadora del ovario derecho es significativamente mayor que la del izquierdo.

Es decir, el ovario derecho desarrolla menor ovulación compensadora pero incrementa significativamente su peso. En diversos estudios, se mostraron que los ovarios de la rata están inervados de manera asimétrica (Gerendai et al., 1995, Gerendai et al., 1998, Thot et al., 2007); además, hemos observado que la incorporación del trazador en neuronas True Blue en el ganglio celiaco es significativamente mayor cuando se inyectó en la bursa del ovario izquierdo comparado con lo que ocurrió con la inyección del trazador en la del ovario derecho (Morán et al., 2005; Morán et al., 2009).

Aparentemente, las conexiones están distribuidas de manera asimétrica: en el ovario izquierdo, se proyectan de manera ipsi- y contralateral pero en el ovario derecho son únicamente conexiones ipsilaterales (Morán et al., 2005). Se sabe que el número de fibras nerviosas que recibe el ovario derecho es mayor que las del izquierdo (Klein & Burden, 1988). Sin embargo, Toth y colaboradores (2007) demostraron que el ovario izquierdo manda más información neural al SNC que el ovario derecho.

La inervación ovárica del sistema autónomo influye en el desarrollo de la hipertrofia compensadora del ovario y de la ovulación compensadora del ovario remante.

Chávez y colaboradores (1987) mostraron que existen diferencias por la denervación por sección del nervio vago en ratas cíclicas enteras respecto a aquellas que son hemiovariectomizadas; en animales enteros, la sección del nervio vago izquierdo resulta en la disminución en la tasa de animales ovulantes respecto al grupo sham, mientras que la sección del nervio vago derecho no modifica la tasa de animales ovulantes.

La sección de ambos nervios vago en ratas con hemiovariectomía derecha (ovario izquierdo in situ) redujo el grado de hipertrofia compensadora.

En el mismo trabajo, se describió que la sección del nervio vago izquierdo induce diferentes efectos que dependen del ovario que permanece in situ: la vagotomía izquierda realizada a ratas hemicastradas del ovario derecho (OI in situ) resulta en el incremento de la tasa de ovulación, de la hipertrofia compensadora del ovario y del número de ovocitos liberados, mientras que el mismo procedimiento para el ratas con ovariectomía izquierda (OD in situ) resulta en la disminución de los mismos parámetros (Chávez et al., 1987).

Estos resultados permiten sugerir que los ovarios se rigen de manera asimétrica y los datos del presente trabajo parecen indicar que el sistema dopaminérgico de ovario actúa de igual manera, regulando el desarrollo de la hipertrofia compensadora y la ovulación compensadora del ovario derecho in situ de manera diferente a lo que hace en el ovario izquierdo in situ.

Si se toma en cuenta el día del ciclo en que se realizó la microinyección del sulpiride, nuevamente los cambios más significativos ocurren en los grupos de animales tratados a las 13:00 h del día del diestro-1, donde se apreció una disminución en la ovulación compensadora y un aumento en la hipertrofia compensadora del ovario derecho con microinyección del antagonista dopaminérgico comparada con los demás grupos experimentales.

En trabajos recientes, el análisis del papel funcional de los receptores dopaminérgicos en los ovarios de ratas enteras adultas han mostrado de modo consistente, que este día del ciclo estral es particularmente crítico para el desarrollo de los eventos endócrinos y neuroendócrinos que conducen a la ovulación espontánea, ya que el bloqueo selectivo y genérico de los receptores a la dopamina en ambos ovarios resulta en la falla ovulatoria (Venegas et al., 2015). Por lo tanto, en el diestro-1 la dopamina y la interacción con los receptores de tipo DA2 regula el desarrollo de la hipertrofia compensadora y la ovulación compensadora del ovario in situ de manera asimétrica.

Finalmente, es pertinente considerar la posibilidad de haber empleado una dosis subumbral de sulpirida que no haya sido suficiente para mostrar con mayor claridad la influencia del receptor DA2 sobre la ovulación compensadora y la hipertrofia compensadora del ovario. Llama nuestra atención que los efectos de la dosis utilizada de la sulpirida en el día del estro son perceptibles en el grado de hipertrofia compensadora del ovario derecho pero no así en su ovulación compensadora, como lo observado en los grupos tratados con el antagonista en el día del diestro-1. La dosis empleada corresponde a lo observado al elaborar la curva dosis-respuesta en ratas cíclica enteras (datos no mostrados).

El desarrollo de la hipertrofia compensadora del ovario supone el concomitante incremento en la masa ovárica y con ello el incremento de receptores a dopamina, lo que nos lleva a plantear la posibilidad de que la dosis de sulpiride empleada en el presente trabajo haya sido insuficiente para bloquear la totalidad de los receptores tipo DA2.

Agradecimientos

Agradecemos al MVZ Carlos Escamilla Weinmann, director del Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a todo su personal, su muy apreciable apoyo en el suministro y alojamiento de los animales de experimentación utilizados en el presente trabajo.

Referencias

Adashi, E.Y. & A.J.W. Hsueh (1981). Stimulation of β -adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 108: 2170-2178

Aguado, L.I., S.L. Petrovic & S.R. Ojeda (1982). Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 11: 1124-1132

Bahr, J.M., L. Kao & A.V. Nalbandov (1974). The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biol Reprod* 10: 273-282

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. Serono Symposia Publications. Raven Press. New York, pp. 262-278

Conn, M. (1994). The molecular mechanism of gonadotrophin-releasing hormone action in the pituitary. En: *Physiology of Reproduction*. 2th Edition. Vol. 1. Chapter 32. eds. E. Knobil & J. Neill. Raven Press. New York, pp 1815-1832

Chávez, R., M.E. Cruz & R. Domínguez (1987). Differences in the ovulation rate of right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: effect of ipsi- and contralateral vagus nerves on the remaining ovary. *J Endocrinol* 113: 397-401
Endocrinology 99:728-735.

D'albora H., P. Lombide & S.R. Ojeda (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 300: 47-56

D'albora, H., G. Anesetti, P. Lombide, W.L. Dees & S.R. Ojeda (2002). Intrinsic neurons in the mammalian ovary. *Microsc Res Tech* 59:484-489

Dees, W.L, J.K.Hiney, N.H. McArthur, G.A. Johnson, G.A. Disse & S.R. Ojeda (2006). Origin and ontogeny of mammalian ovarian neurons. *Endocrinology* 147: 3789-3796

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

Domínguez, C. R., Riboni, L., Zipitria, 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, C. R., Gaitán, C. M., Méndez, 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, R. Morales L. & Cruz M.E. (2003) Ovarian Asymmetry. *ARBS Anu Rev Biomed Sci* 5.95 104

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

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

Feder, H.H. (1981). Estrous cyclicity in mammals. En: "Neuroendocrinology of Reproduction: Physiology and Behavior". Sección III. Capítulo 10. Eds. N.T. Adler. Plenum Press. New York & London. pp 279-308

Fink, G. (1988). Gonadotropic secretion and its control. En: "Physiology of Reproduction". 1th Edition. Vol. I. Capítulo 32. Eds. E. Knobil & J. Neill. Raven Press, New York, pp 1349-1377

Freeman, M.E. (1988). The ovarian cycle of the rat. En: "Physiology of Reproduction". 1th 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

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., Z.S. Csaba, Z. Voko & V. Csernus (1995). Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53 299-305

Gerendai, I., I.E. Thot, Z. Boldogkoi, I. Medveczky & B. Halasz (1998). Neural labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology* 68 244-256.

Hsueh, A.J.W., E.Y. Adashi, P.B.C. Jones & T.H. Welsh (1984). Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5: 76-127.

King, B. F., J. H. Britt, K. L. Esbenshade, W. L. Flowers & J. J. Ireland (1995). Evidence for a local role of inhibin or inhibin α subunits in compensatory ovarian hypertrophy. *Journal of reproduction and fertility* 104,291-295

Klein, J.T. & H.W. Burden (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating rat ovary. *Neuroscience Letters* 85:217-222

Kordon, C., S.V. Drouva, G. Martínez De La Escalera & R.I. weiner (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *The Physiology of Reproduction*. 2th. Edition. Vol. I. Capítulo 27. Eds. E. Knobil & J. Neill. Raven Press. New York, pp.1621-1681

Lara, H.E., M. Dofman, M. Venegas, S.M. Luza, S.L. Luna, A. Mayerhofer M.A. Guimaraes, E. Rosa, A.A. Silva & V.D. Ramírez (2002). Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary durin normal estrous cycle and the polycystic ovary syndrome: studies on norepinephrine release. *Microsc Res Tech* 59:495-502

Lawrence, I.E & H.W. burden (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the ovary. *Anat Rec* 196:51-59

Mayerhofer, A., G.A Dissen, M.E Costa & S.R. Ojeda (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., S. Fritz, R. Grünert, S. L. Sanders, D.M. Duffy, S.R. Ojeda & R.L. Stouffer (2000). D1-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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 0021-972X/00

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

Morán, C., F. Zarate, J. L. Morán, A. Handal & R. Domínguez (2009). Lateralization of the connections of the ovary to the celiac ganglia in juvenile rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7:50 doi:10.1186/1477-7827-7-50.

Ojeda, S. & L. Aguado (1985). Adrenergic control of the pubertal ovary: involvement of local innervation and circulating catecholamines. *Serono Symposia Publications*. Raven Press. New York

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

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

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

Toth I.E., O. Wiesel, Z. Boldogkoi, K. Balint, Z. Tapaszi & I. Gerendai (2007). Predominance of supraespal innervation of the left ovary. *Mycrosc ResTech* 70:710-718.

Venegas, B., Padilla, J.F., Juarez C.E., Moran, J.L., Moran, C., Rosas Murrieta, N.H., Handal, A. Dominguez, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptor on ovulation. *Endocrine*. DOI 10.1007/s12020-015-0636-4. Original Article *Endocrine* December 2015, Volume 50, Issue 3, pp 783-796; first online: 30 May 2015