

Efectos del bloqueo irreversible de los receptores dopaminérgicos del ovario sobre la ovulación espontánea de la rata adulta

VENEGAS-MENESES, Berenice †*, JUÁREZ ROBELO, Claudia Elvira, HANDAL-SILVA, Anabella, y MORÁN-PERALES, José Luis

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla / Departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción, Instituto de Ciencias

Recibido Abril 04, 2017; Aceptado Junio 25, 2017

Resumen

Se evaluaron los efectos de la microinyección (MI) de la N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), bloqueador irreversible de los receptores a dopamina (DA), dentro de las bursas ováricas sobre la ovulación espontánea (OE) en ratas hembra con ciclo estral (CE) regular de cuatro días de duración. A las 08:00, 13:00 y 20:00h de uno de cada día del CE, animales con CE regular recibieron una MI con 100 µg de EEDQ diluidos en 20 µL de etanol-agua 1:1 (vehículo). Los grupos testigo recibieron la MI con vehículo. Se registró la OE en la mañana del estro esperado buscando la presencia de ovocitos frescos en los oviductos. La MI con EEDQ realizada en el día del estro (EEDQ: 7/17 vs. Testigo: 14/16, $p<0.01$) y del diestro-1 (EEDQ: 3/12 vs. Testigo: 16/24, $p<0.001$) inhibieron la OE, lo que no ocurrió en los grupos tratados en el diestro-2 (EEDQ: 7/14 vs. Testigo: 13/16, ns) o en el proestro (EEDQ 12/12 vs. Testigo 14/14, ns). El reemplazo hormonal con GnRH o benzoato de estradiol (BE) reestableció la ovulación (EEDQ: 10/29 vs. GnRH+EEDQ 26/27 y BE+EEDQ 24/25 $p<0.0001$; Prueba de probabilidad exacta de Fisher). Durante la primera mitad del CE la DA ovárica juega un papel crítico en el control de la OE en la rata. Es probable que los receptores a DA del ovario activen las señales que conducen a la secreción de estrógenos.

EEDQ, Receptores a Dopamina, Ciclo Estral, Ovulación Espontánea, Rata Hembra

Abstract

We evaluated the effects microinjection (MI) of N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), a irreversible blocker of dopamine (DA) receptors, inside ovarian bursae on spontaneous ovulation (SO) in female adult rats that exhibited regular estral cycles (EC) four days long. At 08:00, 13:00 and 20:00h in one each EC day, groups of rats with regular EC received a single MI with 100 µg of EEDQ diluted in 20 µL of water-ethanol 1:1 (vehicle). Sham groups receive just vehicle MI. We registered the SO in the morning of estrous day expected with ova shed into oviducts. The EEDQ MI performed on estrous (EEDQ: 7/17 vs. Sham: 14/16, $p<0.01$) and diestrous-1 days (EEDQ: 3/12 vs. Sham: 16/24, $p<0.001$) SO were inhibited, although these don't occur in groups treated on diestrous-2 (EEDQ: 7/14 vs. Sham: 13/16, ns) or proestrous day (EEDQ 12/12 vs. Sham 14/14, ns). Hormonal replacement with GnRH or oestradiol benzoate (EB) was effective in ovulation reestablishment (EEDQ: 10/29 vs. GnRH+EEDQ 26/27 y EB+EEDQ 24/25 $p<0.0001$; Exact probability Fisher's test). In the rat, ovarian DA plays a critical role on ovulation control during EC first half. Probably that ovarian DA receptors turning on the signals that lead estrogen secretion.

EEDQ, Dopamine Receptors, Estral Cycle, Spontaneous Ovulation, Female Rat

Citación: VENEGAS-MENESES, Berenice, JUÁREZ ROBELO, Claudia Elvira, HANDAL-SILVA, Anabella, y MORÁN-PERALES, José Luis. Efectos del bloqueo irreversible de los receptores dopaminérgicos del ovario sobre la ovulación espontánea de la rata adulta. *Revista de Ciencias de la Salud*. 2017. 4-11: 11-23

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: moranperales@yahoo.com.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Las funciones del ovario dependen de la acción de las señales adenohipofisarias gonadotrópicas: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que actúan sobre los tejidos ováricos induciendo la producción de factores de crecimiento y diversas señales neuroquímicas como las catecolaminas (Bahr et al, 1974).

En el ovario se han detectado altas concentraciones de noradrenalina (Lawrence & Burden, 1980; Ojeda et al, 1989) y en menor cantidad de dopamina (Bahr et al, 1974; Bahr & Ben-Jonathan, 1985; Ben-Jonathan et al, 1982). Ambas podrían jugar un papel crucial en mecanismos neuroendocrinotróficos que participan en la regulación funcional de las más importantes funciones ováricas: la producción de gametos viables y la secreción de esteroides sexuales (Ojeda et al, 1989).

En años recientes se ha incrementado el interés por analizar el papel funcional de la dopamina como una señal química presente en el ovario de la mujer y en los roedores. Las evidencias experimentales apuntan a considerar que la dopamina desempeña un papel estimulante en la integración de las señales neurocrinas, neuroendocrinas y endocrinas que controlan el ciclo reproductor y su coordinación con el evento ovulatorio (Domínguez et al, 1987; Morán & Domínguez, 1995; Venegas et al, 2015).

Justificación

Resultados de nuestro grupo, han mostrado que el bloqueo farmacológico sistémico o central de los receptores a la dopamina altera los mecanismos que conducen a la ovulación y con base en ello, podemos plantear que esta señal neuroquímica participa activamente en el control de las funciones ováricas. Existen evidencias de la presencia de dopamina y sus receptores en los tejidos ováricos pero el papel funcional de esta señal química aún no ha sido descrito (Rey-Ares et al, 2007).

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; Morán & Domínguez, 1995; Venegas et al, 2015).

Problema

Con el fin de comparar nuestros hallazgos antecedentes donde empleamos fármacos antagonistas-reversibles de los receptores dopaminérgicos (RDA1 y/o RDA2): haloperidol, SCH23390 o sulpiride, en el presente trabajo se analizaron los efectos del bloqueo irreversible de dichos receptores inducido por la microinyección del agente alquilante *N-Etoxicarbonil-2-Etoxi-1,2-Dihidro-Quinolona* (EEDQ) a las 8:00, 13:00 y 20:00h, dentro de las bursas ováricas y en los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta y se evaluaron sus efectos sobre la respuesta ovulatoria y la secreción de gonadotropinas, esta última estimada por los cambios en el patrón de ciclicidad vaginal.

Hipótesis

El bloqueo irreversible de los receptores a la dopamina inducido por la inyección local del antagonista dopaminérgico EEDQ dentro de las bursas ováricas afectará la ovulación espontánea de la rata adulta, lo que dependerá del día y de la hora del ciclo estral en que se realice el bloqueo farmacológico.

Objetivos

Objetivo General

Analizar los efectos del bloqueo irreversible de los receptores a la dopamina inducido por la inyección local del antagonista dopaminérgico EEDQ dentro de las bursas ováricas sobre la ovulación espontánea de ratas con ciclos estrales regulares de cuatro días de duración.

Objetivos específicos

- Analizar los efectos del bloqueo irreversible de los receptores a la dopamina inducido por la inyección local del antagonista dopaminérgico EEDQ dentro de las bursas ováricas sobre la secreción de gonadotropinas, estimada por el aspecto del frotis vaginal, a las 8:00, 13:00 y 20:00 h de los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta.
- Analizar los efectos del bloqueo irreversible de los receptores a la dopamina inducido por la inyección local del antagonista dopaminérgico EEDQ dentro de las bursas ováricas sobre la ovulación espontánea, a las 8:00, 13:00 y 20:00 h de los diferentes días del ciclo estral de la rata adulta.
- En los casos donde se observen modificaciones en la ovulación espontánea al bloqueo irreversible de los receptores dopaminérgicos de los ovarios, analizar los efectos del reemplazo hormonal de la señal hipotalámica (GnRH) u ovárica (estradiol) sobre la respuesta ovulatoria.

Marco Teórico

Las evidencias indican la probabilidad de que la dopamina desempeñe funciones muy importantes en el control de la ovulación espontánea. Los antecedentes que muestran los efectos del bloqueo sistémico de los receptores dopaminérgicos (RDA1 y/o RDA2) sobre el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, ponen de manifiesto el papel crítico que desempeña la dopamina en la función reproductiva de la hembra en relación con las vías de comunicación endocrina, neuroendocrina y neurocrina (Domínguez et al, 1987; Morán & Domínguez, 1995; Venegas et al, 2015).

Se ha detectado la presencia de dopamina y sus receptores en diferentes compartimentos ováricos, pero aún se discute su papel funcional en estos tejidos (Aguado, 2002; Aguado et al, 1982; Anesetti et al, 2001; Bodis et al, 1992; Bodis et al, 1993; D'Albora et al, 2002; Lara et al, 2001; Mayerhofer et al, 1997; Rey-Ares et al, 2007).

La dopamina participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad, así como en la comunicación neuroendocrina (Bahena-Trujillo, 2000). Otros trabajos en los que se ha 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.

La participación de señales neurales en la regulación de la ovulación puede ser explicada por efectos de las hormonas y mediados por neurotransmisores como las catecolaminas y neuropeptidos liberados localmente para influir en la respuesta de los tejidos ováricos a las gonadotropinas.

El ovario recibe inervación abundante de naturaleza catecolaminérgica y peptidérgica que proviene principalmente del nervio ovárico superior y del plexo ovárico (Burden, 1978; Burden, 1985) y se ha postulado particularmente que noradrenalina tiene una influencia determinante sobre la esteroidogénesis y el desarrollo folicular (Dissen & Ojeda, 1999). Sin embargo, la presencia de receptores a la dopamina en diferentes compartimentos ováricos nos permite sugerir que pudiera desempeñar un rol importante en la regulación de las funciones del ovario. Se han encontrado niveles de dopamina en el fluido antral de folículos preovulatorios de primates (Bodis et al., 1993). D'Albora y colaboradores (2000; 2002) encontraron neuronas positivas para la enzima tirosina hidroxilasa en ovarios de rata.

En tejido ovárico equino se analizó y se encontró la presencia de los receptores de dopamina del tipo DA₁ y DA₂ (King et al., 2005). Se ha comprobado la expresión de receptores de dopamina en células de la granulosa y tecaes en humano como en rata (Rey-Ares et al, 2007).

De acuerdo a los antecedentes anteriores, no hay evidencias claras que describan el papel funcional de la dopamina presente en los ovarios. Los diferentes estudios que abordan el análisis del papel de la inervación ovárica sobre las funciones de la gónada se han enfocado en los sistemas noradrenérgicos y peptidérgicos (Ahmed et al, 1986; Aguado, 2002; Ben-Jonathan et al, 1982; Davoren & Hsueh, 1985; Des et al, 1985; 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, 1978; Burden, 1985; Curry et al, 1984a; Curry et al, 1984b; Lara et al, 1990).

Metodología de Investigación

Material Biológico

Se utilizaron 125 ratas hembras adultas de 90 a 120 días de edad de la cepa CII-ZV del Bioterio Claude Bernard, con pesos corporales de 200 a 250 gramos. Los animales fueron alojados en condiciones de 14 h luz / 10 h oscuridad (luces de las 05:00 a las 19:00 h) y con libre acceso a agua y alimento balanceado.

Registro del Ciclo Estral

Se realizó el registro del aspecto de los cambios del epitelio vaginal por medio de frotis obtenidos de la piel de la vagina; el registro se realizó diariamente entre las 9:00 y 10:00 h a lo largo del experimento. En el estudio, sólo se utilizaron animales que presentaron al menos tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro (animales cíclicos) y entonces fueron distribuidos en los diferentes grupos experimentales.

Grupos Experimentales

Todos los animales cíclicos fueron distribuidos en grupos experimentales por cada día del ciclo estral (grupos con histología vaginal en: diestro-1, diestro- 2, proestro o estro) y en tres horarios diferentes en cada día del ciclo estral (8:00, 13:00 y 20:00 h).

- Grupos con EEDQ. Ratas con ciclos estrales regulares a los que se les administraron 20 µL de solución de EEDQ (5mg/ml ovario; diluido en etanol+ solución de NaCl 0.9% 1:1: vehículo) dentro de cada bursa ovárica.
- Grupo Vehículo. Ratas con ciclos estrales regulares a los que se les administró solución salina dentro de cada bursa ovárica.
- Grupo Control. Animales cíclicos a los que se les realizó la laparotomía bilateral e inspección del ligamento que sostiene al útero sin exteriorizar los ovarios.

Preparación del Fármaco

De acuerdo a la información que proporciona la literatura, el EEDQ (Cat. 14983-7; Sigma Aldrich Inc.) se preparó a una concentración de 5mg/ml y para su dilución se utilizó una mezcla 1:1 de etanol 96% y solución salina 0.9% (Hess et al, 1988; Levant et al, 1997).

Preparación de Hormonas

- *Solución Stock de LHRH (40µg/ml)*: se pesaron 2 mg de GnRH sintética (LHRH, Cat. L-1898; Sigma Inc.) y se diluyeron en 10 ml de agua destilada; la solución se aforo a 50 ml.
- *Solución de GnRH sintética*: Se tomó 1 ml de solución stock y se aforó hasta 5 ml de agua destilada; la concentración de la solución resultante es de 8 µg/ml.

– Solución de Benzoato de Estradiol. De acuerdo a Everett y Sawyer (1949) se pesaron en balanza de precisión (0.1 mg) 20 mg de cristales de Benzoato de Estradiol (BE; Sigma Products Inc., Catálogo: B-8515, β -Estradiol 3-benzoate). Los cristales se disolvieron en 100 μ L de acetona seguido de la incorporación de 900 μ L de aceite vegetal de canola (Solución Stock a concentración final de: 20 mg/ml). Inmediatamente, se tomaron 10 μ L de la solución stock de BE y se aforó a 1 ml (1000 μ L) con aceite vegetal de canola puro (Solución Oleosa a concentración final de: 0.2 mg/ml). La solución oleosa de BE se guardó en frasco ámbar con sello de goma (cada mililitro de solución oleosa alcanza para 40 dosis recomendadas de BE de 10 μ g que equivalen a 100 u.i. de estrógeno por cada una).

Procedimiento Quirúrgico para la Microinyección

1. Para la realización de la laparotomía bilateral se utilizó una máquina afeitadora con cuchillas del No. 40, una mesa de disección, una bomba de perfusión nanomolar conectada a un microinyector motorizado, una jeringa Hamilton de 100 μ L, una fuente de luz conectada a dos conductores de fibra óptica, solución de clorhexidina 2% (CLH 2%), material quirúrgico diverso (una tijera iris de disección, una tijera punta fina, una pinza hemostática, dos pinzas de disección de punta fina, seda quirúrgica #00, bisturí, gasa quirúrgica estéril).
2. Todos los animales fueron sedados con éter y una vez inmovilizados, se les rasuró el área ventral lateral de ambos lados, desde la pierna hasta la primera costilla en ambos lados del cuerpo.
3. Los animales afeitados se colocaron en posición de costado sobre su lado izquierdo en una cama plana limpia y desinfectada con espray de solución CLH 2% y se estableció el campo quirúrgico.
4. Se inició la cirugía laparoscópica tomando como referencia la última costilla y el punto de flexión de la pierna.
5. Se limpió la piel con gasa saturada con CLH 2% y se realizó una incisión de aproximadamente 0.5 cm sobre la piel.
6. Con la ayuda de una pinza hemostática, la fisura sobre la piel se expandió y se removió la grasa subcutánea empleando una tijera quirúrgica de punta fina.
7. Con la maniobra anterior, se localiza el músculo abdominal en la región más cercana al ovario y se realiza un corte quirúrgico de aproximadamente 2mm hasta atravesar peritoneo.
8. Con ayuda de una pinza hemostática, se amplió la herida con el fin de ubicar la grasa blanca que rodea al ovario y el útero.
9. Se prepara y calibra la bomba de perfusión nanomolar para que se inyecten 20 μ L de solución de EEDQ o del vehículo.
10. Con una pinza de punta fina, se jaló la grasa y se exteriorizó el ovario izquierdo y se procedió a realizar la microinyección.
11. Para realizar la microinyección se empleó una bomba de perfusión nanomolar conectada a una jeringa Hamilton de 100 μ L y una aguja hipodérmica del No. 25; se sujetó firmemente la bursa ovárica izquierda con una pinza fina y se dirigió la punta de la aguja hasta ingresar a través de la pared de la bursa al espacio entre el tejido ovárico y esta última; se realizó la microinyección de 20 μ L de EEDQ o del vehículo a una velocidad de 1.25 μ L/seg dentro de la bursa ovárica (Figura 1).
12. Antes de retirar la aguja del microinyector, se dejó reposar durante 20 segundos el tejido; se rehidrató el ovario con espray de CLH 2% y se devolvió a la cavidad corporal el ovario y los tejidos exteriorizados.
13. Se realizó la sutura de la incisión sobre el músculo abdominal con seda quirúrgica #00 y un punto en cruz; se limpió la herida con gasa saturada con CLH 2%.

14. Se sutura la incisión de la piel con seda quirúrgica #0 con 2 puntos sencillos y se limpió la herida con gasa saturada con CLH 2%.
15. Finalmente, se colocan una gota de azul piritánico como cicatrizante.
16. Este proceso se repite de la misma forma para la microinyección del EEDQ o del vehículo en el ovario derecho.
17. El registro del ciclo estral se reanudó a la mañana siguiente hasta el día de la eutanasia (estro esperado).

Procedimiento de Eutanasia y de Autopsia

Entre las 9:00 – 10:00 h de la mañana del estro esperado y previa sedación en cámara de vapores de isoflorano, todos los animales fueron sacrificados por decapitación. A la autopsia, se disecaron los oviductos, los ovarios y el útero. En cada oviducto se buscaron los signos de ovulación con ayuda de un estereomicroscopio y todos los casos donde se observaron signos de ovulación, se contó el número de ovocitos liberados (NOL). La tasa de animales ovulantes (TAO) se analizó empleando la siguiente fórmula:

$$TAO = \frac{\text{No.de ratas que evaluaron}}{\text{No.de ratas en el grupo}} \times 100 \quad (1)$$

Los ovarios y el útero fueron pesados en balanza de precisión de 0.1 mg y los datos se expresaron en miligramos/100 gramos peso corporal. En todos los casos se registró la tasa de útero distendido (TUD) como índice de la alteración de la secreción de estrógenos se analizó utilizando la siguiente fórmula:

$$TUD = \frac{\text{No.de ratas con utero distendido}}{\text{No.de ratas en el grupo}} \times 100 \quad (2)$$

El aspecto de frotis vaginal de los animales fue utilizado como índice de la eventual modificación de la secreción de gonadotropinas y esteroides ováricos (Sánchez y Domínguez 1995). La tasa de estro vaginal (TEV) se analizó de la siguiente forma:

$$TEV = \frac{\text{No.de ratas en estro vaginal}}{\text{No.de ratas en el grupo}} \times 100 \quad (3)$$

Reemplazo Hormonal

En aquellos grupos experimentales en los que se observaron cambios significativos en la TAO, se aplicaron los siguientes tratamientos hormonales:

- RH de la Señal Hipotalámica. Grupos con microinyección bilateral del EEDQ se les administró una dosis única de GnRH sintética (3.7 µg/Kg de peso; i.m.) a las 14:00 hrs del proestro esperado y los animales fueron sacrificados a la mañana siguiente entre las 09:00 y 10:00h.
- RH de la Señal Ovárica. Grupos con microinyección bilateral del EEDQ se les administró una dosis única de BE (10 µg/animal; i.m.) a las 14:00 hrs del diestro-2 esperado y los animales fueron sacrificados en la mañana del estro esperado entre las 09:00 y 10:00h.

En todos los casos, el procedimiento de autopsia se realizó de la forma indicada líneas arriba y se buscó la presencia del NOL en los oviductos y se estimó la TAO.

Análisis Estadístico

Todos los datos de las tasas de animales ovulantes, de estro vaginal y de útero distendido se analizaron usando la Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher. Los resultados del conteo del número de ovocitos liberados 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. En todos los casos, se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias que fueron iguales o menores a 0.05.



Figura 1 Fotografía que muestra la manera en que se realizó la microinyección de la solución del fármaco dentro de la bursa ovárica de los animales cíclicos

Resultados

Efectos de la microinyección del vehículo en diferentes días y horas del ciclo estral sobre la TEV, la TUD y la TAO

Los efectos de la microinyección del vehículo a las 08:00, 13:00 y 20:00 h en uno de los diferentes días del ciclo estral no modificó la TEV en la mañana del estro esperado entre los distintos grupos (Vehículo: 31/40 vs. Control: 28/30, ns) ni respecto a los animales control. En cuanto a la presencia de los signos de distensión del útero, cómo índice de alteración de la secreción de estrógenos, no se encontraron diferencias en la TUD entre los grupos que recibieron la microinyección del vehículo y los controles con laparotomía bilateral en ninguno de los días del ciclo estral (Control: 4/30 vs. Vehículo 7/40, ns).

Los resultados anteriores se correlacionaron directamente con la TAO, ya que tampoco se observaron cambios significativos en la respuesta ovulatoria de los animales tratados con el vehículo respecto a los animales del grupo control. Los efectos de la microinyección del vehículo a las 08:00, 13:00 y 20:00 h en uno de los diferentes días del ciclo estral no modificó la TAO en la mañana del estro esperado (Vehículo: 30/40 vs. Control: 27/30, ns) en ninguno de los grupos ni respecto a los animales del grupo control.

Tomando en cuenta lo anterior, se decidió reunir los datos de la TEV, TUD y de la TAO en un solo grupo testigo para los análisis posteriores.

Efectos de la microinyección de EEDQ en diferentes días y horas del ciclo estral sobre la TEV, la TUD y la TAO

Los efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos inducido por la microinyección del EEDQ sobre la TEV mostraron diferencias que dependieron de la hora y de la fase del ciclo estral en que se realizó el bloqueo farmacológico de los receptores a la dopamina. De manera general, se observó que la TEV en los animales tratados con EEDQ es menor respecto a los grupos testigo (Testigo 57/70 vs. EEDQ 32/51; $p < 0.04$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher); esta diferencia es notoriamente clara cuando la inyección de EEDQ se realiza en los días del estro y del diestro 1 (EEDQ: 11/29 vs. Testigo: 30/40; $p < 0.001$), lo que no ocurrió cuando se bloquearon los receptores dopaminérgicos en el diestro 2 o proestro (EEDQ: 21/26 vs. Testigo: 27/30, ns).

Por otra parte, existe una notable ausencia del signo del estro vaginal en los animales tratados con el EEDQ a las 13:00h durante la primera mitad del ciclo estral (EEDQ: 1/9 vs. Testigo: 14/15, $p < 0.0001$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher). Sin embargo, solo en el grupo tratado a las 13:00 del día del diestro 1 mostró ausencia significativa del estro vaginal respecto a su grupo testigo.

No se encontraron diferencias significativas en la TUD en los animales tratados con EEDQ en los diferentes días del ciclo estral ni en los distintos horarios, sin embargo, de manera global se observó mayor frecuencia en este signo en los animales tratados con el antagonista comparado con el grupo testigo (EEDQ: 19/55 vs. Testigo: 8/70; $p < 0.003$, Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

El análisis de la TUD respecto a la hora de la microinyección mostró un incremento en los animales tratados con el antagonista a las 08:00h (EEDQ 08:00: 7/20 vs Testigo: 0/20, $p < 0.01$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher), lo que no ocurrió en los grupos tratados a las 13:00 h (EEDQ 13:00: 5/19 vs Testigo: 4/29, ns) o a las 20:00 h (EEDQ 20:00: 6/16 vs Testigo: 4/21, ns).

Al analizar los datos de manera global, la microinyección de EEDQ dentro de las bolsas ováricas disminuyó la TAO (EEDQ: 29/55 vs. Testigo: 57/70, $p < 0.001$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher). Sin embargo, la respuesta ovulatoria dependió de la hora, de la fase del ciclo ovárico y del día del ciclo estral en que se realizó la microinyección (Tabla 1).

Con base en la hora en que se realizó la microinyección del antagonista, la administración de EEDQ realizada a las 13:00h disminuyó la TAO comparado con su grupo testigo (EEDQ: 7/19 vs Testigo: 25/29, $p < 0.005$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher), lo que no se observó cuando la microinyección del antagonista se realizó en otro horario (08:00h: EEDQ = 11/20 vs. Testigo = 17/20, ns; 20:00h: EEDQ = 11/16 vs. Testigo = 15/21, ns).

En lo referente a la fase del ciclo, la microinyección de la solución de EEDQ a las 13:00h realizada durante la primera mitad del ciclo estral, es decir en los días del estro y diestro-1, bloqueó de manera absoluta la ovulación espontánea, (EEDQ: 0/9 vs. Testigo: 13/15, $p < 0.0001$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher); esta diferencia es incluso significativa cuando se compara con las microinyecciones del antagonista realizadas en la mañana o en la noche (13:00h: 0/9 vs. EEDQ a las 08:00: 5/12 y 20:00h: 5/8, $p < 0.05$ y 0.01 , respectivamente; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

Grupos	Día del Ciclo Estral			
	E	D1	D2	P
Horario	8:00h			
Testigo	4/4	5/8	4/4	4/4
EEDQ	5/8	0/4	2/4	4/4
Horario	13:00h			
Testigo	6/7	7/8	6/8	6/6
EEDQ	0/5*	0/4*	3/6	4/4
Horario	20:00h			
Testigo	4/5	4/8	3/4	4/4
EEDQ	2/4	3/4	2/4	4/4

* $p < 0.02$ comparado con su grupo Testigo; prueba de Probabilidad Exacta de Fisher

Tabla 1 Efecto de la microinyección de 20 μ L de EEDQ (5mg/ml) disuelto en etanol+solución salina (1:1) de dentro de la bolsa ovárica derecha e izquierda de ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días (estro, diestro-1, diestro-2 y proestro) sobre la tasa de animales ovulantes. La microinyección del EEDQ se realizó a las 08:00, 13:00 o 20:00 h en los diferentes días del ciclo estral. Todos los animales se sacrificaron entre las 09:00 y 10:00 h de la mañana del estro esperado.

El bloqueo absoluto de la ovulación espontánea observado en los grupos tratados con EEDQ a las 13:00 de la primera mitad del ciclo estral es diferente comparado con las microinyecciones realizadas durante la segunda mitad del ciclo estral, es decir en los días del diestro-2 y proestro, (EEDQ a las 13:00h del estro y del diestro-1: 0/9 vs. EEDQ a las 13:00h del diestro-2 y del proestro: 7/10, $p < 0.01$; Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

Efectos de la Microinyección de EEDQ en Diferentes Días y Horas del Ciclo Estral Sobre el Número de Ovocitos Liberados

Los datos recabados en diferentes épocas trabajando con la Cepa CII-ZV que se cría en el Bioterio *Claude Bernard* de la BUAP, nos muestran que el total del NOL en un animal intacto con ciclos regulares de cuatro días de duración descarga una cuota de 11.7 ± 0.3 ovocitos.

Cuando se comparó este dato con el total del NOL en los grupos control con laparotomía bilateral y los grupos con microinyección del vehículo, en los diferentes días y horas del ciclo estral, no se observaron diferencias significativas en la cuota ovulatoria (Animales Cíclicos Intactos (N=26): 11.7 ± 0.3 ovocitos vs. Control con Laparotomía Bilateral (N=27): 13.2 ± 0.5 ovocitos o Vehículo (N=30): 11.5 ± 0.5 ; ns).

Tomado en cuenta este resultado, se decidió reunir los datos del NOL por ambos ovarios en un solo grupo testigo. El análisis global de los efectos de la microinyección bilateral del EEDQ en las bursas ováricas mostro una reducción significativa del NOL global respecto al testigo (EEDQ (n=29): 8.8 ± 0.6 ovocitos vs Testigo (57): 11.7 ± 0.5 ; $p < 0.0004$, Prueba de U de Mann-Whitney).

Al analizar este parámetro respecto a la fase del ciclo ovárico, la disminución en el NOL en los grupos tratados con EEDQ sigue siendo significativa (EEDQ 1ª Mitad del Ciclo: 8.2 ± 0.9 , EEDQ 2ª Mitad del Ciclo: 9.2 ± 0.8 vs Testigo: 11.7 ± 0.5 ; $p < 0.05$, Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn).

Así mismo, se observaron diferencias en el NOL en función de la hora del día en que se realizó la microinyección del EEDQ; el NOL de los animales tratados a las 08:00 h fue significativamente menor respecto al testigo (EEDQ 08:00h: 7.1 ± 0.7 ovocitos vs Testigo: 11.7 ± 0.5 ovocitos; $p < 0.001$ Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn), sin cambios significativos a las 13:00 y 20:00 h (EEDQ 13:00h: 10.5 ± 1.3 ovocitos y EEDQ 20:00h: 9.2 ± 0.9 ovocitos vs Testigo: 11.7 ± 0.5 ovocitos, ns). Sin embargo, al analizar el NOL en función del día del ciclo estral y de la hora entre los grupos testigo y con microinyección del EEDQ dentro de las bursas ováricas, estas diferencias no se revelaron en el análisis integral de la ovulación.

Efectos de la Microinyección de EEDQ en Diferentes Días y Horas del Ciclo Estral Sobre el Peso de los Ovarios y del Útero

No se observaron cambios significativos en el peso de los ovarios, en la masa ovárica ni en el peso del útero de los animales que fueron tratados con la microinyección de la solución de EEDQ dentro de las bursas ováricas.

Efectos del Reemplazo Hormonal en los grupos tratados con EEDQ

En aquellos grupos donde se observó una TAO menor o igual al 50%, se realizó el reemplazo de la señal hipotalámica con GnRH sintética o el reemplazo de la señal ovárica con BE. En los diferentes grupos tratados con GnRH o BE se observó una recuperación significativa de la TAO (EEDQ: 14/39 vs. EEDQ+GnRH: 26/27 o EEDQ+BE: 24/25; $p < 0.0001$, Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

Discusión de Resultados

Los resultados del presente trabajo muestran que la microinyección bilateral de la neurotoxina dopaminérgica: EEDQ dentro de las bursas ováricas en la rata adulta inhibe la ovulación con efectos que dependen de la hora y del día del ciclo en que se administró el fármaco. Incluso, se observan tendencias muy claras de que la neurotoxina afecta el número de ovocitos liberados por los ovarios de estos animales.

Resulta de particular interés el hecho de que el EEDQ inhiba la respuesta ovulatoria en los animales tratados de manera diferencial cuando se administra durante la primera mitad del ciclo estral y gradualmente desaparezcan a lo largo de la segunda mitad del ciclo estral.

Domínguez y colaboradores (1987) analizaron los efectos de la inyección sistémica con haloperidol, un antagonista de los receptores DA₁ y DA₂ utilizado en la neuropsiquiatría como ansiolítico, en ratas adultas con ciclos estrales regulares de cuatro días y 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.

El antagonista retrasó invariablemente 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.

Se ha detectado la presencia de dopamina y los receptores DA₁ y DA₂ en diferentes compartimentos ováricos, pero en esos estudios no se aclara su posible papel funcional en el tejido ovárico (Mayerhofer et al, 1997; Rey-Ares et al, 2007). Venegas y colaboradores (2015), han recientemente evaluado 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: Sulpirida 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 la Sulpirida 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 pausable interacción entre los diferentes receptores a la dopamina, aunque aún falta analizar dicha interacción.

Los resultados del presente trabajo son congruentes con esos datos, ya que el EEDQ como agente alquilante se une al receptor dopaminérgico y afecta su funcionamiento, pero no lo “antagoniza” totalmente. Sin embargo, los días críticos para que la señal dopaminérgica se integre a los mecanismos fisiológicos que conducen a la ovulación son los mismos: estro y diestro-1, con efectos que gradualmente desaparecen durante el diestro-2 para ya no afectar la ovulación durante el proestro.

Se han reportado efectos del EEDQ sobre receptores serotoninérgicos (Gozlan et al., 1994) y adrenérgicos (Alder et al., 1985), por lo que es probable que otros receptores ováricos estén participando en las señales que regulan la ovulación, ya que la microinyección de antagonistas no selectivos y selectivos producen efectos diferenciales en la respuesta ovulatoria cuando se administran en diferentes días y en diferentes horas del ciclo estral (Venegas, 2015).

Por último, las fallas ovulatorias observadas en aquellos grupos experimentales tratados con el EEDQ se resolvieron satisfactoriamente con el reemplazo de las señales hipotalámica u ovárica, restableciendo satisfactoriamente la ovulación. Aparentemente, el bloqueo inespecífico de los receptores dopaminérgicos en el ovario afecta los mecanismos neuroendocrinos que determinan la secreción preovulatoria de la GnRH.

Misma que ocasionaría la ausencia de la secreción de gonadotropinas y con ello, la inhibición de la producción de los estrógenos, imprescindibles para que el efecto feedback estimulante en el hipotálamo anterior se lleve a cabo.

Conclusiones

Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que:

1. La microinyección bilateral de la neurotoxina dopaminérgica: EEDQ dentro de las bursas ováricas en la rata adulta inhibe la ovulación con efectos que dependen de la hora y del día del ciclo en que se administró el fármaco.
2. La microinyección bilateral de la neurotoxina dopaminérgica: EEDQ dentro de las bursas ováricas en la rata adulta disminuyó el número de ovocitos liberados.
3. La microinyección bilateral de la neurotoxina dopaminérgica: EEDQ dentro de las bursas ováricas durante la primera mitad del ciclo estral afecta los mecanismos endocrinos y neuroendocrinos que determinan la descarga preovulatoria de la GnRH al nivel del hipotálamo anterior y, en consecuencia, una baja producción de estrógenos, lo que conduce a la falla ovulatoria.

Referencias

Ahmed, C.E., W.L. Dees & S.R. Ojeda. (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., 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.

Alder, C. H., Meller, E., And Goldstein, M. (1985). Recovery of a 2-adrenoceptor binding and function after irreversible inactivation by EEDQ. *Eur. J. Pharmacol.* 116:175-178.

Amneta, F., A. Ricci, S.K. Tayebati & D Zaccheo. (2002). The peripheral dopaminergic system: morphological analysis, functional and clinical applications. *Ital J Anat Embryol* 107:145-67.

Anesetti, G., P. Lombide, H. D'albora & S.R. Ojeda. (2001). Intrinsic neurons in the human ovarii. *Cell Tissue Res* 306: 231-237.

Bahena-Trujillo, R., Flores, G., Arias, J.A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. Revisión. *Rev Biomed* 11:39-60.

Bahr, J., & Ben-Jonathan, N. (1985). Elevated Catecholamines in Porcine Follicular Fluid before Ovulation. *Endocrinology* 117(2), 620-623.

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

Ben-Jonathan, N., R.H. Braw, N. Laufer, R. Reich, J.N. Bahr & A. Tsafiriri (1982). Norepinephrine in graafian follicles is depleted by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 110:457-461.

Bòdis J., Bognàr 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. *GynecolObstet Invest* 33:165-7.

- Bódis 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. *Serono Symposia Publications*. Raven Press. New York, pp. 262-278.
- 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., 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., P. Lombide & S.R. Ojeda (2000). Intrinsic neurons in the rat ovarii: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* 300: 47-56
- Des, 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.
- Dissen, A.G. & Ojeda, S.R. (1999). Ovarian innervation. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. E. Knobil & J. D. Neill. Academia Press. New York, pp.583-589.
- 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. *J. of Endocr* 113: 37-44.
- Gozlan, H. Laponte, A.M., Thibault, S., Schechter, L.E., Bolaños, F. & Hamon, M. (1994). Differential effects of N-ethoxycarbonyl - 2 - ethoxy - 1, 2-dihydroquinoline (EEDQ) on various 5-HT receptor binding sites in the rat brain. *Neuropharmacology* 33:423-431
- Hess, E., Norman, A. & Creese, I. (1988). Chronic Treatment with Dopamine Receptor Antagonists: Behavioral and Pharmacologic Effects on D1 and D2 Dopamine Receptor. *The J. of Neuroscience*. 8(7):2362.
- 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. *Dom. Anim. Endocr.* 28,405-415.
- Lara, H.E., A. Porcile, J. Espinoza, C. Romero, S.M. Luza, J. Fuhrer, C. Miranda & Bl. Roblero (2001). Release of norepinephrine from human ovary: coupling to steroidogenic response. *Endocrine* 15: 187-192.
- Lara, H.E, J.K. McDonald, C.E. Ahmed & S.R. Ojeda (1990). Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and functioning rats. *Endocrinology* 127:2199-2209.

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

Levant, B., Vansell, N. (1997). In Vivo Occupancy of D2 Dopamine Receptors by Nafadotride. *Neuropsychopharmacology*. 17(2):68.

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.

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

McNeill, D.L. & Burden, H.W. (1987). Neuropeptides in sensory perykary projecting to the ovary. *Am J Anat* 179: 269-276.

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

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.

Venegas, B., Padilla, J.F., Juárez C.E., Moran, J.L., Moran, C., Rosas Murrieta, N.H., Handal, A. Domínguez, R. (2015). Effects of ovarian dopaminergic receptor on ovulation. *Endocrine*. DOI 10.1007/s12020-015-0636-4

Agradecimientos

Nuestro Cuerpo Académico (CA-090) agradece al MVZ Francisco Ramos Collazo, director del Bioterio *Claude Bernard* de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, médico asignado al cuidado del bienestar de nuestros animales de experimentación, todas las facilidades y atenciones para el desarrollo del proyecto.