



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Un análisis de los factores neuroendocrinos que explican los efectos de la
lesión unilateral del núcleo Supraquiasmático sobre la ovulación
espontánea**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CARLOS CAMILO SILVA MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
COMITÉ TUTOR: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
FACULTAD DE MEDICINA
DR. RUDOLF MARINUS BUIJS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 30 de noviembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SILVA MÉNDEZ CARLOS CAMILO** con número de cuenta **305158325** con la tesis titulada "Un análisis de los factores neuroendocrinos que explican los efectos de la lesión unilateral del núcleo Supraquiasmático sobre la ovulación espontánea", realizada bajo la dirección del **DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ**:

Presidente: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
Vocal: DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
Secretario: DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ
Suplente: DRA. JUANA ALBA LUIS DÍAZ
Suplente: DR. JOSÉ MIGUEL BETANCOURT RULE

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de enero de 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDÍ ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

A los apoyos recibidos para la realización de este proyecto:

Beca CONACyT para estudios de posgrado (No. 545620/294555)
Beca Mixta 2014-MZO2015 Movilidad en el Extranjero (290842)
Apoyo Económico PAEP Para Estancia de Investigación Internacional
University of Washington, Biology Department budget: 060496
Society for Neuroscience Housing Grant
DGAPA-PAPIIT No. IN 216015-1
DGAPA-PAPIIT No. IN 215513-3
CONACyT No. 236908

A los miembros del comité tutor

Dr. Roberto Domínguez Casalá
Dra. Carolina Escobar Briones
Dr. Rudolf Marinus Buijs

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mi hermano, todo lo que soy se los debo a ustedes.

A Angélica, Pamela, Georgina, Julio y Cintia, por su amistad y todo el apoyo que me han brindado desde que nos conocemos.

A Roberto, como dijiste, tu puerta se ve siempre cerrada pero está siempre abierta.

A Horacio, Jennifer, Miriam, Gideon, Audrey, Marta y Ángela, por una de las mejores experiencias de mi vida, por su amistad y por tantos buenos ratos.

A Su, Bill, Jackson y Stella, por abrirme las puertas de su familia.

Para Oralia y Gilberto, que donde estén, estén juntos.

ÍNDICE

1.	Introducción	1
1.1	La regulación de la secreción de GnRH	2
1.2	La comunicación entre el hipotálamo y los ovarios	4
1.3	El ARC y la retroalimentación inhibitoria	6
1.4	El AVPV y el cambio a la retroalimentación estimulante	8
1.5	El núcleo supraquiasmático y la regulación temporal de la secreción de GnRH	10
2.	Planteamiento del problema	18
3.	Hipótesis	20
4.	Objetivos	21
4.1	Objetivo general	21
4.2	Objetivos particulares	22
5.	Métodos y materiales	23
5.1	Animales	23
5.2	Grupos experimentales	23
5.3	Reemplazo hormonal	24
5.4	Sacrificio y autopsia	26
5.5	Análisis estadístico	27
6.	Resultados	28
6.1	Efecto de la lesión unilateral del SCN sobre la ovulación	28
6.2	Efecto de los tratamientos a nivel ovárico	32
6.3	Efecto del reemplazo hormonal con GnRH	34
6.4	Efecto del reemplazo hormonal con estradiol	37
7.	Análisis de los resultados	39
8.	Conclusiones	45
9.	Referencias	46
	Anexos	

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

- Figura 1.** Distribución de las neuronas GnRHérgicas en el encéfalo del ratón.
- Figura 2.** Patrón de expresión de la kisspeptina en el ARC y el AVPv.
- Figura 3.** Participación de las neuronas kisspeptinérgicas del AVPv y del ARC en la regulación de la neurona GnRHérgica.
- Figura 4.** Proyecciones AVPérgicas del SCN que inervan al AVPv.
- Figura 5.** La conexión VIPérgica entre el SCN y el POA.
- Figura 6.** Coordenadas utilizadas en las cirugías estereotáxicas.
- Figura 7.** Micrografías representativas de la operación simulada y la lesión unilateral del SCN.
- Figura 8.** Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales intactos o anestesiados con barbitúricos a las 09:00 h de cada etapa del ciclo estral.
- Figura 9.** Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN u operación simulada realizada en el estro o metaestro.
- Cuadro 1.** Porcentaje de animales con alteraciones del ciclo estral debidas a los tratamientos.
- Figura 10.** Alteraciones del ciclo estral observadas en animales con operación simulada o lesión unilateral del SCN realizada en estro o metaestro.
- Figura 11.** Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN u operación simulada realizada en el diestro o proestro.
- Figura 12.** Media \pm EEM del número de folículos con diámetro promedio $\geq 300 \mu\text{m}$ / animal y porcentaje de incidencia de atresia en los mismos.
- Figura 13.** Proporción de folículos con o sin antro / tratamiento (A) o sanos y atrésicos / tratamiento (B).
- Figura 14.** Proporción de folículos con antro sanos y atrésicos / tratamiento y etapa del ciclo estral.
- Figura 15.** Proporción de folículos sanos y atrésicos / tratamiento en las etapas del estro y metaestro.
- Figura 16.** Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con operación simulada realizada en el estro o metaestro, con o sin el reemplazo posterior de GnRH.
- Figura 17.** Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN realizada en el estro o metaestro, con o sin el reemplazo posterior de GnRH.
- Figura 18.** Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN realizada en el diestro o proestro, con o sin el reemplazo posterior de GnRH.

Figura 19. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con operación simulada realizada en el estro o metaestro, con o sin el reemplazo posterior de estradiol.

Figura 20. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN realizada en el estro, metaestro o diestro, con o sin el reemplazo posterior de estradiol.

Figura 21. Modelo propuesto sobre las interacciones del SCN con el POA y el AVPv que modulan la expresión del receptor a estrógenos y del receptor a kisspeptina.

RESUMEN

La ovulación es un proceso regulado por información hormonal y nerviosa. En el hipotálamo se encuentra la mayoría de las neuronas que sintetizan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), las terminales de estas neuronas se localizan en la eminencia media, donde liberan la GnRH en un sistema de capilares conocido como sistema porta hipotalámico-hipofisario, que la distribuye en el lóbulo anterior de la hipófisis. La GnRH estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas: la hormona estimulante de los folículos y la hormona luteinizante. Las gonadotropinas son secretadas en la circulación general por medio de la cual llegan a sus células blanco en los ovarios, donde estimulan la síntesis de hormonas esteroideas y la ovulación.

La actividad de las neuronas GnRHégicas depende de la influencia de otros grupos neuronales. Se ha mostrado que uno de los elementos imprescindibles para la secreción preovulatoria de GnRH es una señal nerviosa de naturaleza circadiana que induce la secreción de la neuro-hormona cuando converge con el incremento en la concentración de estradiol que resulta del crecimiento y diferenciación de los folículos ováricos. El núcleo Supraquiasmático (SCN), principal oscilador del sistema circadiano de los mamíferos, es indispensable en la generación de dicha señal circadiana.

La lesión unilateral del SCN, así como la sección de vías dorsales al mismo, resultan en el bloqueo de la ovulación en la rata. En el presente estudio mostramos que los ovarios de estos animales presentan gran cantidad de folículos preovulatorios y el reemplazo hormonal con GnRH restauró la ovulación en animales sometidos a los mismos tratamientos. Estos resultados permiten sugerir que ambos SCN son necesarios para que ocurra la secreción preovulatoria de GnRH y por tanto la ovulación, además de que son simétricos en su papel estimulante.

La inyección de benzoato de estradiol fue ineficaz para restablecer la ovulación de los animales con lesión unilateral del SCN. Animales tratados en las etapas anteriores al aumento natural en la concentración de estrógenos se vuelven acíclicos después de la cirugía. A partir de estos resultados se sugiere que los animales tratados en estro y metaestro no ovularon debido a que el hipotálamo perdió la sensibilidad a los estrógenos. Se concluye que el SCN y algunas fibras dorsales al mismo participan no solo en la estimulación de la secreción preovulatoria de GnRH, sino en la preparación del sistema para responder al aumento en la concentración de estrógenos. Se proponen dos posibles mecanismos, que no

son mutuamente excluyentes, para explicar los resultados de este estudio: el SCN y algunas fibras dorsales al SCN regulan la expresión de los receptores a estrógenos en el área anteroventral periventricular, la expresión de receptores a kisspeptina en el área preóptica o ambos. **Palabras clave: ovulación, núcleo Supraquiasmático, GnRH, estradiol, ciclo estral.**

ABSTRACT

Ovulation is regulated by hormonal and neural information. Most of gonadotropin releasing hormone (GnRH)-neurons are located at the hypothalamus. GnRH-terminals are located at the median eminence, where GnRH is released into a vessel system called the hypothalamic-pituitary portal system, which in turn delivers GnRH to the anterior lobe of the pituitary. GnRH promotes synthesis and release of the two gonadotropins: follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. Gonadotropins are released into the general circulation reaching their target cells at the ovary, stimulating steroid-hormone synthesis and ovulation.

GnRH-neuron activity depends on the influence of other neuronal groups. It has been shown that one pivotal element for GnRH preovulatory secretion is a neural and circadian signal that can only trigger GnRH release when it converges with the high estradiol levels product of follicular development. The Suprachiasmatic nuclei (SCN), main oscillator of the mammalian circadian system, is required for the generation of such a circadian signal.

Unilateral SCN lesions, as well as sham surgery blocks ovulation. We found a high number of preovulatory follicles at the ovaries of these animals and GnRH priming restores ovulation in animals displaying similar surgeries. These results suggest that both SCN are required for the preovulatory release of GnRH and hence ovulation, also that both SCN are symmetrical on its stimulant role.

Estradiol benzoate priming is not efficient inducing ovulation in treated animals. And animals with surgeries performed during the estrous cycle-stages before the natural rising in estradiol levels become acyclic after the procedure. These results allow us to conclude that animals treated on estrous or metaestrous did not ovulate due to a hypothalamic insensitivity to estradiol. We conclude that the SCN and some neural fibers above it not only participates stimulating the preovulatory GnRH release, but preparing the system to respond to the rise in estradiol levels which in turn triggers the GnRH surge. We propose two non-exclusive mechanisms in order to explain our results: SCN and neural fibers above it regulates estrogen receptor and/or kisspeptin receptor expression at the anteroventral periventricular area and preoptic area, respectively. **Keywords: ovulation, suprachiasmatic nucleus, GnRH, estradiol, estrous cycle**

INTRODUCCIÓN

La ovulación es un proceso regulado a través de mecanismos hormonales y nerviosos. En el encéfalo existen neuronas que sintetizan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), cuyos axones se prolongan a lo largo de la base del hipotálamo hasta la eminencia media. En la eminencia media, las terminales de las neuronas GnRHérgicas liberan la GnRH en un sistema de capilares denominado sistema porta hipotalámico-hipofisario; que la transporta al lóbulo anterior de la hipófisis. Los gonadotropos hipofisarios expresan el receptor para la GnRH y la unión de los mismos con su ligando estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas: la hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Las gonadotropinas son liberadas en la circulación general, por medio de la cual llegan al ovario. La LH y la FSH promueven el crecimiento y diferenciación de los folículos, la síntesis de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y estradiol) y proteicas (activina e inhibina). También estimulan el proceso inflamatorio que promueve la ruptura del folículo y la consecuente liberación del ovocito durante las primeras horas del estro ([Herbison, 2015](#)).

Se ha mostrado que la señal endocrina que da inicio a la ovulación es un aumento en la secreción de GnRH, que estimula la liberación masiva de LH en un evento conocido como “pico” preovulatorio de LH. Este proceso depende esencialmente de la conjunción de dos señales: el aumento en la concentración de estrógenos, que sucede como consecuencia del desarrollo de los folículos ováricos, y señales nerviosas que se originan, entre otras regiones, en el SCN del hipotálamo mediobasal. La actividad de las neuronas que sintetizan la GnRH es regulada, a lo largo de todo el ciclo estral, por la actividad de grupos neuronales ubicados en diversas regiones del encéfalo. La coordinación temporal que caracteriza a los ciclos reproductivos es producto de la convergencia de numerosas señales endocrinas y nerviosas que inciden en el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios ([Barbacka-Surowniak y col., 2003](#)).

A continuación se describe uno de los circuitos que han sido relacionados con la regulación de las neuronas GnRHérgicas. Éste es parte del sistema encargado de informar al hipotálamo que los folículos han alcanzado la madurez necesaria para ovular, y a su vez de estimular la secreción preovulatoria de GnRH/LH.

La regulación de la secreción de GnRH

Las neuronas que sintetizan la GnRH están dispersas en la base del encéfalo; principalmente en los bulbos olfatorios, la banda diagonal de Broca, el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT), el septo medial el área preóptica (POA), el área hipotalámica anterior (AHA) y el núcleo arqueado (ARC) (**Figura 1**) (Castañeyra-Ruiz *y col.*, 2013; Charli *y col.*, 1991; Herbison, 2015; Shivers *y col.*, 1983). En los roedores, como en el resto de los mamíferos no primates, la mayor parte de estas neuronas se encuentra en el POA y en el AHA (Castañeyra-Ruiz *y col.*, 2013; Herbison, 2008). En la rata hay aproximadamente 1500 células GnRHérgicas y la mayor parte de ellas envía proyecciones hacia la eminencia media (Silverman *y col.*, 1987).

La secreción de la GnRH sigue dos patrones distintos dependiendo de la etapa del ciclo estral ya que es regulada por múltiples elementos endocrinos y nerviosos, entre ellos, la retroalimentación de los estrógenos (Chapell, 2005; Freeman, 1994). Durante la mayor parte del ciclo, la secreción de GnRH es constante con la presencia de pulsos de baja amplitud cada 30 minutos. A este tipo de secreción se le denomina secreción tónica y cada pulso es seguido por pulsos de LH y estradiol (Chapell, 2005). Durante la tarde del proestro, la retroalimentación inhibitoria que ejerce el estradiol cambia a estimulante por un mecanismo que aún no ha sido esclarecido (Herbison, 2008). La liberación fásica de GnRH se aprecia como un aumento brusco en la frecuencia y amplitud de los pulsos, lo que resulta de la sincronización de la secreción de las neuronas GnRHérgicas localizadas en el POA. La liberación masiva de GnRH estimula un aumento brusco en la liberación de LH que culmina con la ovulación durante las primeras horas del estro (Maeda *y col.*, 2007). Se propone que la alternancia entre la retroalimentación estimulante e inhibitoria impide la presencia de señales erróneas que desencadenen el “pico” de LH antes de que los folículos ováricos hayan completado su maduración (Kriegsfeld y Silver, 2006; Maeda *y col.*, 2007).

Existen dos teorías para explicar cómo es que el mismo tipo de neuronas presenta dos patrones de secreción, lo que depende del ambiente estrogénico. Una de ellas se basa en la secreción pulsátil y espontánea que exhiben las neuronas GnRHérgicas, tanto en el animal entero (Hickok y Tischkau, 2010), como cuando son mantenidas en cultivo (Chappell *y col.*, 2003; 2009). Estas células presentan oscilaciones circadianas en la expresión de los genes reloj. Dichos genes están relacionados con la regulación de la expresión de otros genes con relevancia en los procesos fisiológicos locales. La inhibición transitoria de la expresión de los genes reloj disminuye la secreción de GnRH. De lo anterior se puede suponer que las neuronas que sintetizan la GnRH tienen un mecanismo inherente que mide el tiempo (posiblemente

permitiendo la sincronización de su actividad con la de otras neuronas del mismo tipo) y que dicho mecanismo está acoplado al aparato neurosecretor (Chappell y col., 2003; Ohkura y col., 2009). Las neuronas GnRHérgicas presentan una intrincada asociación dendro-dendrítica a través de aposiciones epápticas. Las espinas dendríticas juegan un papel preponderante en esta asociación, mismas que parecen ser la clave para la sincronización entre las neuronas GnRHérgicas *in vivo* (Campbell y col., 2009).

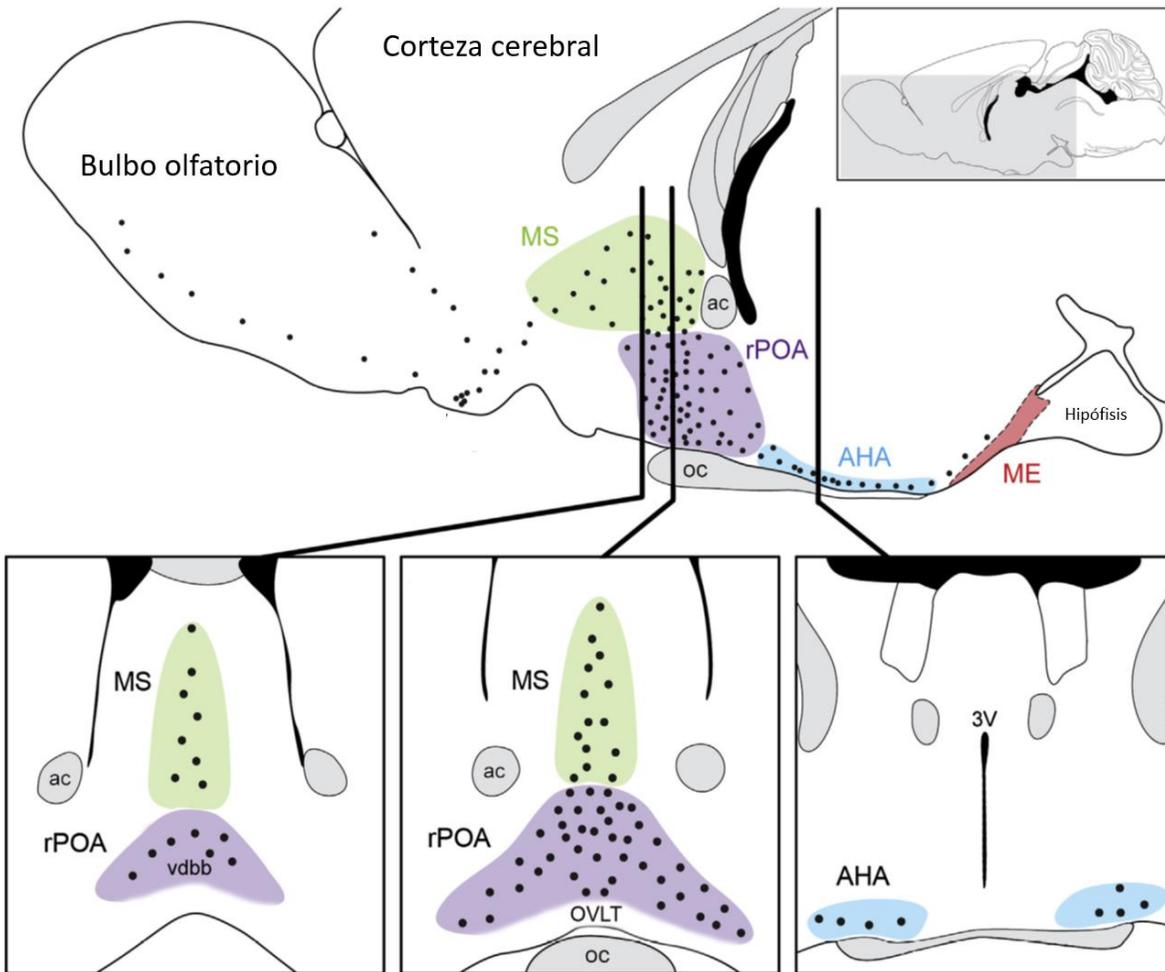


Figura 1. Distribución de las neuronas GnRHérgicas en el encéfalo del ratón. La imagen muestra la concentración predominante de estas neuronas (puntos negros) en el septo medial (verde), el área preóptica (morado) y el área hipotalámica anterior (azul) en un corte sagital (arriba) y cortes coronales (abajo). ME, eminencia media; ac, comisura anterior; 3V, tercer ventrículo; OC, quiasma óptico. Tomado y modificado de Herbison, 2015.

La otra teoría sobre la regulación de la secreción de la GnRH estipula que la actividad de las neuronas que la sintetizan es modulada por otros grupos neuronales. Estudios en los que se seccionaron las vías aferentes al POA (desaferentación) reportaron el bloqueo del pico preovulatorio de LH (Maeda y col., 2007; Ohkura y col., 2009; Phelps y col., 1976). Los resultados no se deben a la destrucción de las fibras que transportan

al péptido a la eminencia media pues después de la sección aún se observan los tractos inmunoreactivos a GnRH (Hoffman y Gibbs, 1982) y además se restaura la secreción de LH mediante la estimulación eléctrica del POA (Phelps y col., 1972). La desaferentación que secciona exclusivamente las vías que llegan al POA desde regiones caudales del hipotálamo altera también el ciclo estral, inhibe la ovulación e impide el engrosamiento de la pared uterina y la cornificación del epitelio vaginal (Kawakami y Terasawa, 1972).

La comunicación entre el hipotálamo y los ovarios

Si bien se han reportado células inmunoreactivas al receptor para estrógenos del tipo alfa ($ER\alpha$) (Helena y col., 2006) y beta ($ER\beta$) en el POA, su incapacidad para regular la secreción de LH después de la desaferentación concuerda con la ausencia específica de los primeros en las neuronas inmunoreactivas a GnRH (Herbison y Pape, 2001; Watson y col., 1992). Estos resultados apoyan la idea de que existen estructuras sensibles a los estrógenos fuera de las neuronas GnRHérgicas del POA que interpretan las señales provenientes de los ovarios y que posteriormente modulan la actividad de éstas últimas dependiendo de la concentración sérica del esteroide.

Los estrógenos son hormonas derivadas del colesterol y por tanto son liposolubles; generan respuestas celulares al unirse a sus receptores, ya sea del tipo α o β . Los estrógenos ejercen sus acciones por dos mecanismos diferentes, los genómicos y los no genómicos. En el caso de los primeros, la unión del ligando resulta en modificaciones alostéricas en la configuración del receptor que permiten el reclutamiento de factores de transcripción. Los complejos formados por el ER y su ligando forman dímeros que se unen al DNA en sitios altamente específicos, denominados elementos de respuesta a estrógenos (EREs), lo que facilita la acción de la polimerasa (O'Malley y Tsai, 1994).

La fosforilación del ER unido a un ERE, aún en ausencia de su ligando, promueve la transcripción. Cabe mencionar que no todos los genes poseen EREs, por lo que las acciones genómicas de los ER también pueden ser mediadas por regiones conocidas como half-EREs, a las que se une la proteína nuclear SF-1, a la cual a su vez puede unirse el $ER\alpha$ pero no el $ER\beta$. Los complejos ER-ligando pueden afectar la síntesis de ARN, incluso si no existen EREs o half-EREs, mediante la interacción con complejos proteínicos formados por factores de transcripción que ya se encuentran asociados al DNA. Finalmente, existen $ER\alpha$ y $ER\beta$ asociados a la membrana celular que tras unirse a su ligando activan cinasas, lo que

modifica la función de otras proteínas citoplasmáticas que son fosforiladas. Este mecanismo es conocido como no genómico y media algunos de los efectos de los estrógenos que son tan rápidos que no dependen de la síntesis de proteínas (Björnström y Sjöberg, 2005; Pedram y col., 2014).

Los efectos celulares del estradiol sobre la secreción de GnRH/LH comenzaron a dilucidarse mediante los experimentos en que se mostró que los inhibidores de la síntesis de RNA y proteínas bloquean la liberación de LH (Shivers y col., 1983). Recientemente se mostró que los ratones que portan una mutación que impide la unión del ER α con los EREs no presentan el pico de LH ni son capaces de ovular, pero la secreción de LH aumenta en respuesta a la ovariectomía, por lo que se piensa que la retroalimentación estimulante depende totalmente del mecanismo genómico, mientras que la inhibitoria puede ser mediada por mecanismos no genómicos o por el ER β (Glidewell-Clenney y col., 2007).

La inyección de un antagonista del ER α bloquea el “pico” de LH, lo cual no ocurre cuando se inyecta un antagonista para el ER β (Roa y col., 2008). Estudios realizados en ratones *knockout* para el ER α o el ER β mostraron que todas las hembras ER $\alpha^{-/-}$ son infértiles cuando adultos, aunque el desarrollo de los folículos ováricos no se ve afectado. En cambio, el desarrollo folicular se altera en los animales ER $\beta^{-/-}$, pero la mayoría son capaces de ovular (Dupont y col., 2000; Glidewell-Clenney y col., 2007). Estos resultados concuerdan con la localización del ER β , que es más abundante en el ovario (células de la granulosa), mientras que el ER α se expresa en mayor proporción en el resto de los tejidos, incluido el sistema nervioso central (Hegele-Hartung y col., 2004).

Parece claro que el cambio de la retroalimentación inhibitoria a la estimulante depende de los mecanismos genómicos del ER α . En la búsqueda de las estructuras que median este proceso se han estudiado las regiones que expresan este tipo de receptor y que a su vez envían proyecciones hacia el POA. Simodian y colaboradores (1999) inyectaron un trazador retrogrado en el POA de ratas Wistar y observaron neuronas marcadas en las áreas anteroventral periventricular (AVPv) y preóptica periventricular (pePOA), así como en los núcleos hipotalámicos dorsomedial (DMN), ventromedial (VMN) y arqueado (ARC); mismas que también son inmunoreactivas al ER α . El orden en el que se mencionan estas regiones corresponde con la densidad de las proyecciones que envían al POA. Estos resultados concuerdan con los reportados en otras cepas de ratas (Chakraborty y col., 2003).

Recientemente se ha mostrado un interés particular en el estudio del ARC y el AVPv pues concentran las dos mayores poblaciones de neuronas que sintetizan kisspeptina, un péptido de 145 aminoácidos que es codificado por el gen *Kiss1* (Gottsch y col., 2004; Smith y col., 2006), y porque ambas

poblaciones tienen conexiones entre sí y con otras regiones encefálicas relacionadas con la reproducción (Yeo, 2013). La kisspeptina fue aislada en la placenta y nombrada originalmente metastina (Maeda *y col.*, 2007). Es el mayor inductor de la secreción de GnRH que se conoce (Matsui *y col.*, 2004) ya que incluso concentraciones tan bajas como 10^{-15} moles son efectivas para estimular su secreción (Caraty y Franceschini, 2008; Gottsch *y col.*, 2004). Poco después de su síntesis, el péptido es procesado por enzimas proteolíticas, lo que origina péptidos de diferentes longitudes que comparten los últimos 10 aminoácidos en el extremo C-terminal (Caraty y Franceschini, 2008; Roa *y col.*, 2011), mismos que concentran toda la actividad funcional de la molécula para estimular la secreción de GnRH (Gottsch *y col.*, 2004).

La kisspeptina se relacionó con la regulación de la reproducción al ser reconocida como el ligando endógeno del receptor GPR54. Los humanos y ratones con mutaciones en el gen que lo codifica presentan hipogonadismo hipogonadotrópico y son infértiles cuando son adultos (Gottsch *y col.*, 2004; Smith *y col.*, 2006) a pesar de que tienen el mismo número de neuronas GnRHérgicas que los animales sin la mutación (Dungan *y col.*, 2007). Cabe mencionar que la mayor parte de estas neuronas expresan el receptor GPR54 (Caraty y Franceschini, 2008).

El ARC y la retroalimentación inhibitoria

El ARC es una estructura sensible a los esteroides (Cone *y col.*, 2001). Dentro de sus límites se localiza una gran población de neuronas kisspeptinérgicas que también son inmunoreactivas al Era. Algunas de estas neuronas coexpresan la Neurocinina B, dinorfina, β -endorfina y neuropéptido Y (NPY) y envían proyecciones que terminan en aposición con las neuronas GnRHérgicas del POA (Kinoshita *y col.*, 2005; Mittelman-smith *y col.*, 2012; Simodian *y col.*, 1999). Como se describe en la **Figura 3**, estas neuronas parecen formar parte del mecanismo neuroendocrino que regula la retroalimentación inhibitoria, responsable de suprimir la secreción masiva de GnRH/LH durante la mayor parte del ciclo estral como se describe más adelante (Mittelman-smith *y col.*, 2012).

El ARC es sexualmente dimórfico pues las neuronas que sintetizan kisspeptina son más abundantes en la hembra que en el macho (Overgaard *y col.*, 2013; Xu *y col.*, 2012). La ovariectomía incrementa el número de células inmunoreactivas a kisspeptina (Smith *y col.*, 2005) y la inyección de estradiol disminuye la concentración de este péptido péptido y de su mensajero (Adachi *y col.*, 2007; Kinoshita *y col.*, 2005; Smith *y col.*, 2005) (**Figura 2**). La concentración de kisspeptina en el ARC fluctúa durante el

ciclo estral y tiene su acrofase (punto máximo) en los días del diestro, cuando la concentración de estrógenos es más baja que durante el pico preovulatorio del proestro, y su batifase (punto mínimo) coincide con la máxima concentración de estradiol (Smith y col., 2006b). El efecto de los estrógenos en el ARC no depende de los mecanismos genómicos del receptor, pues los mutantes cuyo ER α no puede unirse a los EREs sí presentan la supresión de las neuronas kisspeptinérgicas mediada por el aumento en la concentración de estradiol (Gottsch y col., 2009).

La inyección en el ARC de un virus que genera una secuencia antisentido a la kisspeptina decrece la concentración local del péptido, lo que resulta en la disminución de la frecuencia de los pulsos de GnRH y en alteraciones del ciclo estral (Beale y col., 2014). Esto mismo se observa al inyectar un antagonista selectivo de la kisspeptina. Es interesante notar que la inyección del mismo antagonista en el POA no tiene ningún efecto, por lo que se ha propuesto que el ARC es parte del generador de pulsos de GnRH y que modula su liberación en las terminales que la vierten en el sistema porta hipotalámico-hipofisario (Li y col., 2009; Ohkura y col., 2009). Existe evidencia de contactos axo-axonicos entre las neuronas kisspeptinérgicas del ARC y las terminales GnRHérgicas en la eminencia media (Xu y col., 2012), pero no de sinapsis verdaderas (Uenoyama y col., 2011). La inyección sistémica de kisspeptina induce la liberación de gonadotropinas y la ovulación, por lo que debe actuar en estructuras cercanas a los ventrículos o fuera de la barrera hematoencefálica (Matsui y col., 2004).

La destrucción selectiva de las neuronas kisspeptinérgicas del ARC que coexpresan neurocinina B y dinorfina (neuronas KNDY's) bloquea el aumento en la concentración de las gonadotropinas que normalmente se observa en animales ovariectomizados (Mittelman-smith y col., 2012). Las neuronas KNDY's solo se encuentran en el ARC y están conservadas evolutivamente. Los animales que no producen neurocinina B son fenotípicamente similares a los mutantes que no expresan el receptor de la kisspeptina (Lehman y col., 2010), por lo que se ha propuesto que esta subpoblación de neuronas kisspeptinérgicas es la que regula directamente las funciones reproductivas, mientras que otras parecen regular procesos distintos pues inervan exclusivamente estructuras límbicas (Yeo, 2013).

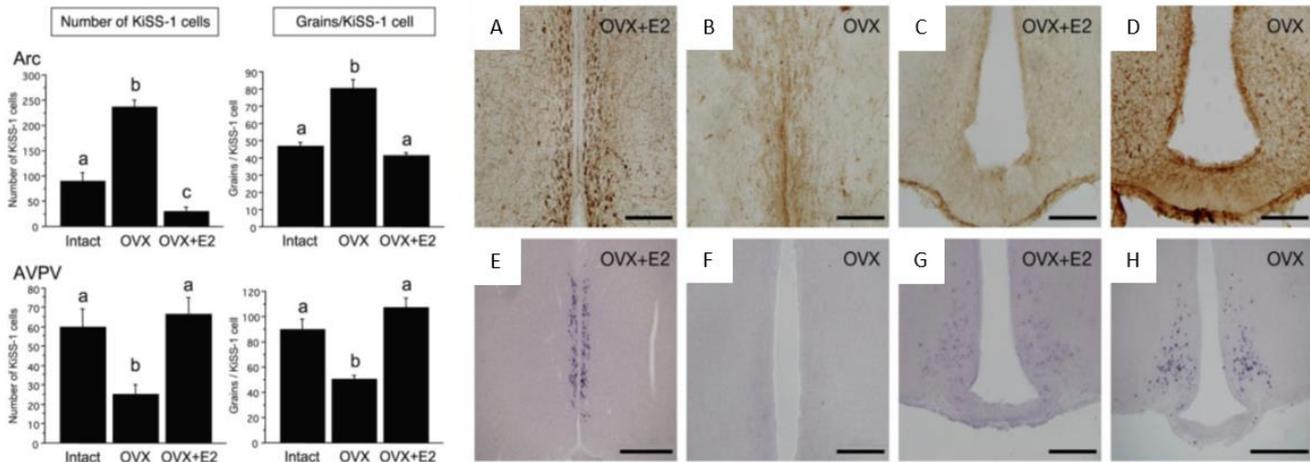


Figura 2. Patrón de expresión de la kisspeptina en el ARC y el AVPv. El panel de la izquierda (tomado y modificado de Smith y col., 2005) presenta el número de neuronas que expresan mensajero que codifica para la kisspeptina y el número de moléculas del mensajero en el ARC y AVPV de ratones intactos, ovariectomizados (OVX) y ovariectomizados con implantes de estradiol (OVX+E2); ambos parámetros evaluados mediante hibridación *in situ*. El panel de la derecha (tomado y modificado de Xu y col., 2012) presenta neuronas de animales OVX y OVX+E2 que son inmunoreactivas a la kisspeptina (AVPv: A y B, ARC: C y D) o que expresan su mensajero (AVPv: E y F, ARC: G y H).

El AVPv y el cambio a la retroalimentación estimulante

El AVPv es una estructura ovoide ubicada a ambos lados del tercer ventrículo (3V) y en estrecha aposición con la pared ventricular. En la rata se extiende en sentido rostro-caudal por 200-300 μm , desde la porción caudal del OVLT hasta la porción rostral del núcleo preóptico medial (MPN) (Simerly y col., 1985), por lo que originalmente recibió el nombre de núcleo preóptico anteromedial (Watson y col., 1995). Éste concentra neuronas que sintetizan leu-encefalina, colecistocinina, neurotensina y tirosina hidroxilasa y no hay información de neuronas positivas a GnRH (Simerly y Swanson, 1987). El AVPv parece tener una relación funcional en la regulación de la ovulación con la región inmediatamente caudal, el pePOA (Langub y Watson, 1992; Le y col., 1999). Las neuronas kisspeptinérgicas en ambas regiones forman un continuo (Roa y col., 2011) que se activa a la par que las neuronas del POA durante la secreción preovulatoria de GnRH (Le y col., 1999).

La concentración de esteroides sexuales durante la etapa perinatal es crucial en la diferenciación sexual que caracteriza al AVPv y al pePOA de la hembra (Simerly, 1991). Ambas estructuras ocupan un mayor volumen y presentan mayor densidad neuronal en el cerebro de las hembras (Hahn y Cohen, 2006; Simerly y col., 1985). La cantidad de somas y fibras inmunoreactivas a kisspeptina (Adachi y col., 2007; Overgaard y col., 2013), prodinorfina (Simerly, 1991) y dopamina (Simerly y col., 1985) es igualmente mayor, mientras que solo aquellas inmunoreactivas a proencefalina son más abundantes en el macho

(Simerly, 1991). La densidad de las neuronas inmunoreactivas a todos los neurotransmisores mencionados es también mayor en el pePOA de la hembra, que además contiene gran cantidad de neuronas dopaminérgicas (Le y col., 1999). Esta región es atravesada por un plexo metencefalinérgico que es igualmente dimórfico sexual y que inerva específicamente a las neuronas que expresan receptores a estrógenos (Langub y Watson, 1992) pero cuya función no se ha descrito.

El AVPV participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación; expresa el ER α , envía fibras al POA (Simodan y col., 1999) y su lesión bilateral inhibe el pico preovulatorio de LH (Barbacka-Surowniak y col., 2003). La inyección de un anticuerpo contra la kisspeptina en el AVPV inhibe el pico de LH y altera el ciclo estral, por lo que las neuronas kisspeptinérgicas que alberga modulan la actividad de las neuronas GnRHérgicas del POA (Adachi y col., 2007; Kinoshita y col., 2005). Por otro lado, la inyección de acylina, un antagonista de la GnRH, en la misma región inhibe la capacidad de la kisspeptina de estimular el pico de LH que se observa en los animales inyectados con el vehículo (Dungan y col., 2007; Gottsch y col., 2004).

A diferencia de lo que ocurre en el ARC, la activación de las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV es dependiente de altas concentraciones de estradiol, semejantes a las que se observan durante el cambio hacia la retroalimentación estimulante por la tarde del proestro (Adachi y col., 2007; Smith y col., 2006). La ovariectomía altera el ciclo estral y disminuye el número de células inmunoreactivas a kisspeptina en esta región (Smith y col., 2005); efecto semejante al obtenido mediante la inyección de antiestrógenos (Barbacka-Surowniak y col., 2003). La inyección de estradiol reestablece ambos parámetros a los valores observados en los controles, pero esto no ocurre en ratones que no expresan el ER α . Sólo el 30% de las neuronas kisspeptinérgicas, sin importar si se localizan en el AVPV o el ARC, expresan la isoforma β del receptor a estrógenos (Smith y col., 2005).

La inyección de un antagonista al ER α durante el proestro resulta en el bloqueo del efecto estimulante de la kisspeptina sobre la secreción de LH, lo que no ocurre si se bloquea el ER β . Este efecto opuesto al que se observa cuando se inyectan agonistas de los receptores en lugar de antagonistas (Roa y col., 2008). Como se mencionó anteriormente, los animales ER α ^{-/-} no presentan retroalimentación estimulante pues no hay un aumento en la secreción de LH. Recientemente se mostró que tampoco se da el característico incremento en el número de células inmunoreactivas a c-fos en el POA y el AVPV que ocurre en el animal intacto o en el mutante ER β ^{-/-}; resultado que prevalece cuando la mutación de los receptores a estrógenos solo se presenta en neuronas y no en todas las células (Wintermantel y col., 2006).

Otra clara diferencia entre el AVPV y el ARC es entonces que la señalización genómica mediada por el ER α es indispensable en el AVPV para modular la retroalimentación estimulante, lo que no ocurre en el ARC.

El número de células inmunoreactivas a kisspeptina en el AVPV durante la tarde del proestro es mayor que la observada en el resto del ciclo y altas concentraciones de estradiol incrementan la concentración intracelular de la kisspeptina y del mensajero que la codifica (**Figura 2**). La concentración de kisspeptina en la misma estructura tiene también su acrofase durante el proestro y su batifase en el diestro, opuesto a lo que ocurre en el ARC (Adachi y col., 2007; Smith y col., 2006b). La concentración de péptidos opioides en el AVPV es inversa a la de kisspeptina. Estos péptidos generalmente actúan de manera inhibitoria en las neuronas que expresan receptores a estrógenos por lo que se aprecia una regulación explícita sobre las neuronas que estimulan la secreción de GnRH (Simerly y col., 1996).

Las evidencias antes mencionadas muestran que el AVPV es una de las estructuras que median la retroalimentación estimulante de los estrógenos (**Figura 3**), pero poco se conoce sobre cómo las células sensibles a estrógenos transmiten la información a las neuronas GnRHérgicas. Estas últimas presentan una actividad eléctrica basal durante la retroalimentación inhibitoria, misma que incrementa dramáticamente cuando se da el cambio a la retroalimentación estimulante. Esto no se observa en los animales que no expresan el ER α o aquellos en que el receptor no puede unirse al DNA (Christian y col., 2008). Adicionalmente, la neurotransmisión GABAérgica aumenta durante el pico de LH y disminuye durante el resto del ciclo, otorgando al GABA un papel estimulante que no es frecuente. Es interesante notar que las neuronas GABAérgicas que envían información al POA se ubican en el AVPV y en otra estructura hipotalámica, el SCN, que parece ser clave para la regulación de la actividad de las neuronas GnRHérgicas, (Christian y Moenter, 2007).

El núcleo supraquiasmático y la regulación temporal de la secreción de GnRH

El incremento en la concentración de gonadotropinas que sucede al cambio en la retroalimentación estrogénica está ligado a un componente temporal que lo ancla a un momento particular del día. Las primeras evidencias al respecto provienen de los estudios en los que se bloquearon uno o más sistemas de neurotransmisión durante la tarde del proestro y se obtuvo un bloqueo de la secreción de LH y de la ovulación que dura 24 horas; presentándose al día siguiente a la misma hora (Everett, 1972; Everett y

Sawyer, 1950; Everett y col., 1949). A partir de ello se propuso que la liberación preovulatoria de gonadotropinas no depende únicamente del aumento en la concentración de estradiol, sino de su convergencia con información nerviosa permisiva que sigue un ritmo circadiano y que es, al menos en parte, catecolaminérgica y colinérgica.

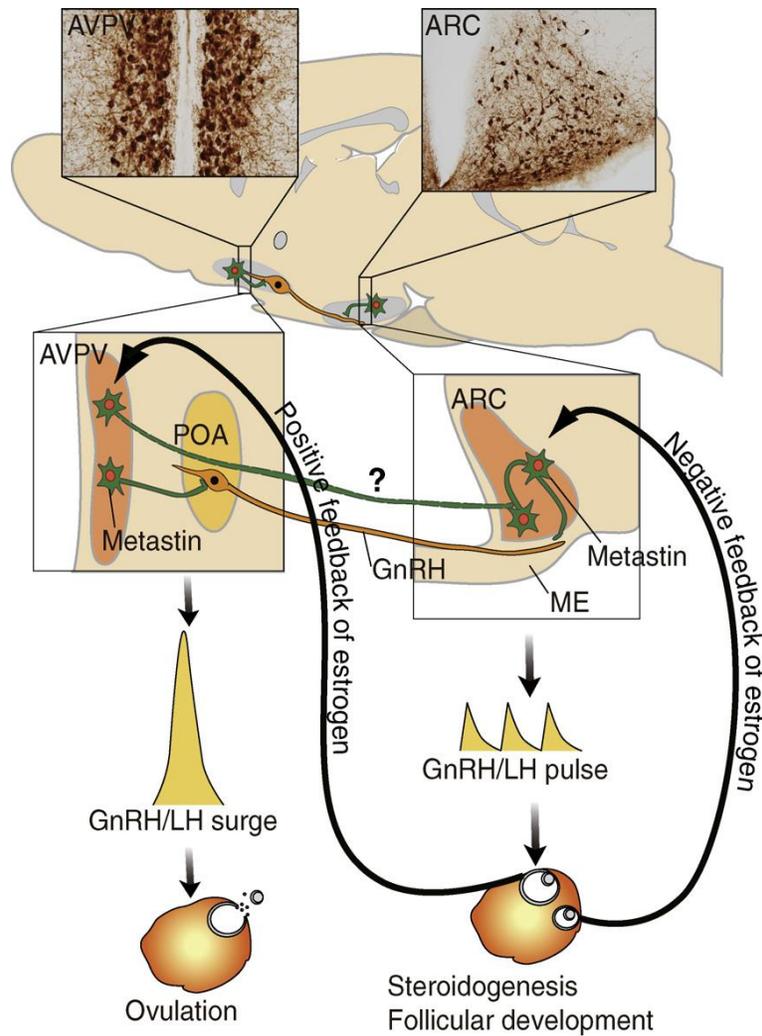


Figura 3. Participación de las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV y del ARC en la regulación de la neurona GnRHérgica. Se propone que las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV se activan en respuesta al incremento en la concentración de estradiol durante el proestro, estimulando la secreción preovulatoria de GnRH. Las neuronas del ARC responden a bajas concentraciones de estradiol modulando la liberación tónica de la GnRH directamente en la eminencia media (tomado y modificado de Ohkura y col., 2009).

¿De dónde proviene la información circadiana que limita el efecto estimulante de los estrógenos a unas pocas horas durante la tarde del proestro? A partir de la década de los 70 se obtuvieron las primeras evidencias de que el SCN es el oscilador central del sistema circadiano de los mamíferos. Este núcleo

hipotalámico recibe información sobre el estado del medio externo a través de prácticamente todos los sistemas sensoriales (Card y Moore, 1991; Moore y Lenn, 1972; Moore y col., 2000; Refinetti, 2006) y a su vez está conectado con el resto de los tejidos del cuerpo por medio de secreciones humorales, así como de proyecciones nerviosas directas o indirectas (Buijs, 1993; Buijs y col., 2003). Esta característica es imprescindible tomando en cuenta que la función del SCN, además de generar ritmos circadianos, es también sincronizarse con el medio externo y sincronizar a su vez a otros osciladores periféricos; lo que proporciona al sistema un orden interno congruente con el medio externo (Panda y Hogenesch, 2004).

La lesión bilateral del SCN elimina los ritmos de actividad locomotora, ingesta de agua y de secreción de corticosterona (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Sucker, 1972). Es posible restaurar los ritmos que desaparecen después de la cirugía si se trasplanta tejido del SCN de otro animal (Meyer-Berstein y col., 1999; Sollar y col., 1995). Este procedimiento solamente es efectivo en la restauración de aquellos ritmos que no son endócrinos, pues éstos últimos parecen depender de la integridad de vías nerviosas eferentes bien organizadas (Meyer-Berstein y col., 1999). Quizás la evidencia más contundente sobre la naturaleza del SCN como reloj central del sistema circadiano proviene del hecho de que los ritmos restaurados poseen el periodo endógeno del donador, incluso cuando la diferencia entre el periodo del donador y del receptor es de varias horas (Saitoh y col., 1991; Kaufman y Menaker, 1993).

Aunado a lo anterior, las neuronas del SCN presentan oscilaciones en su actividad eléctrica y metabólica que son independientes al medio externo. Esta característica es imprescindible en un reloj endógeno. Dichas oscilaciones se han mostrado *in vitro* (Bos y Mirmiran, 1990; Gillete, 1991; Newman, 1991; Prosser, 1998; Shibata y Moore, 1987) e *in vivo* (Meijer y col., 1996; Schwartz y col., 1980; 1983; Schwartz, 1991; Yamazaki y col., 1998) y son producto de una maquinaria molecular que opera a nivel celular, por lo que muchas de las neuronas del SCN son osciladores independientes. La sincronización neuronal es la que finalmente permite observar los ritmos tan robustos que caracterizan al SCN (Honma y col., 1998).

La maquinaria que explica la ritmicidad en las neuronas del SCN se encuentra activa en las células de prácticamente todos los tejidos del cuerpo (Prasai y col., 2011). Este descubrimiento permitió proponer que el sistema circadiano es un conjunto de osciladores periféricos que son sincronizados por el SCN, que funciona como puente de comunicación entre el medio interno y el externo (Brown y Azzi, 2013). De manera sobresimplificada, la maquinaria mencionada es un ciclo de expresión e inhibición de genes y está conformada por dos asas de retroalimentación, una estimulante y otra inhibitoria. Los genes que

conforman el asa estimulante son Clock y Bmal1 (*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput y Brain and Muscle ARNTL-like Protein*, respectivamente). A partir de ellos se sintetizan proteínas que forman heterodímeros en el citoplasma y que viajan al núcleo, donde se unen a secuencias E-box en los promotores de los genes que conforman el asa inhibitoria, *Period* (Per1, Per2 y Per3) y *Cryptochrome* (Cry1 y Cry 2), que funcionan como factores de transcripción. Una vez sintetizadas las proteínas PER y CRY forman heterodímeros que viajan de vuelta al núcleo, donde interfieren con la acción estimulante de CLOCK:BMAL1 y por ende inhiben su propia transcripción (Buhr y Takahashi, 2013; Dunlap, 2004).

Como se mencionó anteriormente, la secreción preovulatoria de gonadotropinas ocurre cuando se da la conjunción de una señal estrogénica y otra nerviosa que se presenta cada día a una hora particular. Esto mismo se observa de forma más clara en roedores ovariectomizados y con implantes que proveen estradiol de manera continua en concentraciones semejantes a las del proestro. Estos animales, en los que se ha eliminado el efecto inhibitorio de los estrógenos, presentan “picos” de LH todos los días a la misma hora y en estrecha relación de fase con el inicio de la actividad locomotora (Robertson y col., 2009; Seegal y Goldman, 1975; Stetson y col., 1981). Estos “picos” persisten en condiciones constantes y son acompañados por la activación de las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV (Robertson y col., 2009); otra evidencia de que el AVPV integra las señales endocrinas provenientes de los ovarios con aquellas nerviosas que provienen de otras regiones del cerebro, entre ellas el SCN.

El AVPV recibe proyecciones desde el SCN (de la Iglesia y col., 1995; Hahn y Coen, 2006) y envía fibras de regreso al mismo (de la Iglesia y col., 1999). Las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV, reciben sinapsis de fibras provenientes del SCN que transportan arginina vasopresina (AVP), pero no al péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Figura 4). Este tipo de sinapsis aumenta a la par de la concentración de estradiol y es predominantemente ipsilateral (Smarr y col., 2012; Vida y col., 2010). Williams y colaboradores (2011) mostraron que las células que reciben estas sinapsis expresan el receptor V1aR para AVP. Otro estudio que también mostró uniones semejantes mostró que la inyección de AVP incrementa la actividad eléctrica de las neuronas kisspeptinérgicas, lo que depende de la presencia de estradiol. La inyección previa de un antagonista del V1aR inhibe el aumento en la actividad eléctrica (Piet y col., 2015). Adicionalmente, en la rata, la inyección de AVP incrementa la amplitud del pico de LH, lo cual solo ocurre si se realiza por la tarde por lo que la sensibilidad del sistema a esta señal sigue un ritmo circadiano (Palm y col., 2001).

las fibras inmunoreactivas a sustancia P, colecistocinina, leu-encefalina, neurotensina, neuropéptido Y y dopamina β -hidroxilasa que inervan a las neuronas de esta región (Simerly y Swanson, 1987).

Por otro lado, la inyección de trazadores neuronales ha mostrado que las regiones noradrenérgicas A1 y A2 de la médula ventrolateral, el núcleo del tracto solitario (Simodian y col., 1999) y el SCN envían proyecciones a la mayoría de las estructuras que contienen neuronas GnRHérgicas (van der Beek y col., 1993; 1997a; van der Beek, 1996). De particular interés para el presente estudio es el conjunto de fibras inmunoreactivas al VIP que parten desde la porción ventrolateral del SCN hacia el POA. La lesión unilateral del SCN disminuye el número de somas inmunoreactivos a GnRH que reciben aferencias VIPérgicas en el POA ipsilateral (van der Beek y col., 1993). Dichas neuronas son las mismas que son inmunoreactivas a C-fos, un marcador de activación celular, durante el pico preovulatorio de GnRH (van der Beek y col., 1994). Estudios posteriores confirmaron que esta vía es predominantemente ipsilateral, con pocas fibras que inervan al POA contralateral (**Figura 5**) (de la Iglesia y col., 2003; van der Beek y col., 1997a). También se mostraron fibras que parten del POA y que hacen sinapsis en las neuronas del SCN (van der Beek y col., 1997b).

Cabe mencionar que los somas VIPérgicos del SCN que inervan a las neuronas en el POA permanecen inactivos durante la tarde del proestro (van der Beek y col., 1994). Estos resultados permiten suponer que la información VIPérgica que recibe el POA desde el SCN tiene un componente inhibitorio, y que dicha inhibición es suprimida al aumentar la concentración de estrógenos. Esta teoría concuerda con la inhibición de la secreción de gonadotropinas que resulta de la inyección intracerebroventricular de VIP (Weick y Stobie, 1995). Asimismo, la administración del péptido reduce el número de neuronas kisspeptinérgicas y GnRHérgicas que coexpresan c-fos durante la tarde del proestro (Kauffman y col., 2004). Es interesante notar que la AVP puede estimular la secreción de kisspeptina en todo momento, mientras que la misma kisspeptina sólo puede inducir la liberación de GnRH por la tarde y en presencia de estradiol (Williams y col., 2011). Parece entonces que el VIP actúa inhibiendo a la misma neurona GnRHérgica, confinando la liberación masiva de GnRH a la ventana crítica de tiempo descrita por Everett y Sawyer a mitad del siglo pasado (Kalsbeek y Fliers, 2013). Otra posibilidad es que la sensibilidad de estas neuronas se modifique de manera circadiana como se ha mostrado para el tratamiento con VIP y AVP en cultivos *in vitro* (Zhao y Kriegsfeld 2009).

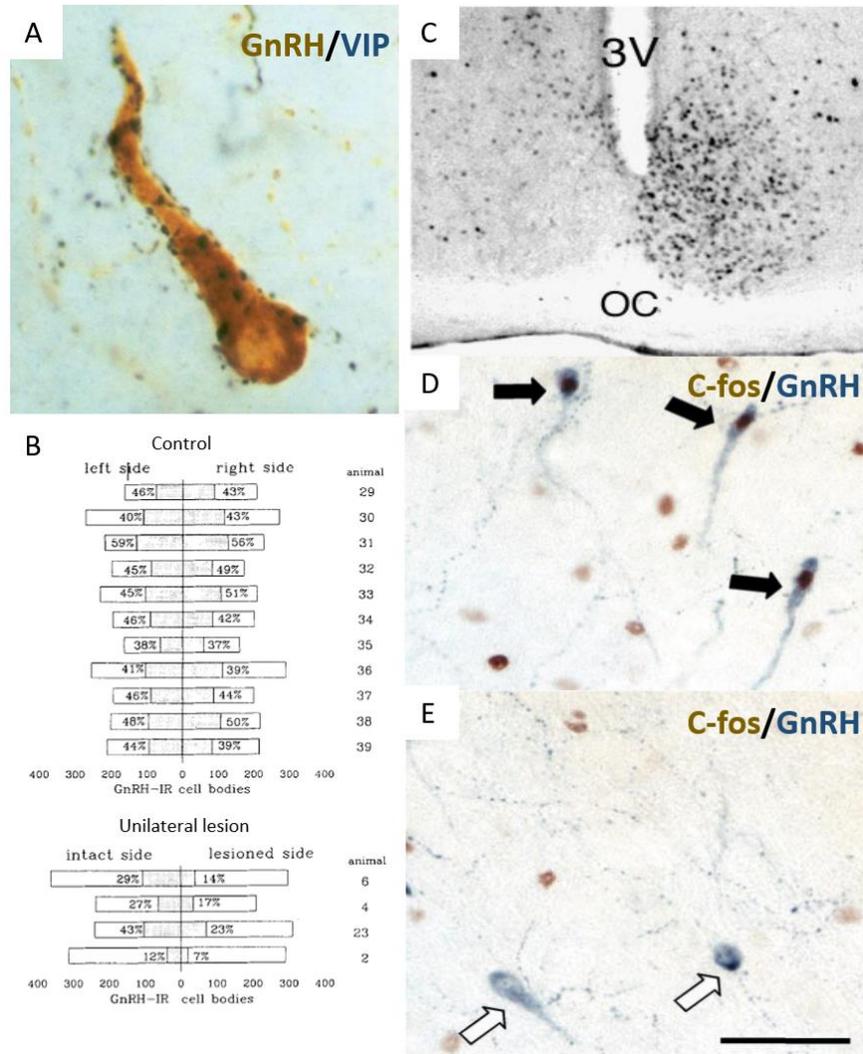


Figura 5. La conexión VIPérgica entre el SCN y el POA. Las neuronas GnRHérgicas del POA reciben aposiciones inmunoreactivas al VIP (A) que decrecen en el POA ipsilateral después de la lesión unilaeral del SCN (B). En el hámster, la actividad de ambos SCN se disocia en dos componentes separados por 180° tras la exposición prolongada a luz constante (C). Tras la activación de uno de los lados del SCN se da la activación de las neuronas GnRHérgicas del POA ipsilateral (flechas negras) (D), mientras que el circuito contralateral permanece inactivo (flechas blancas) (E) (tomado y modificado de van der Beek *et al.*, 1993; de la Iglesia *et al.*, 2003).

Los ratones *knockout* a VIP presentan ciclos estrales irregulares, liberan menos ovocitos y su SCN tiene menor actividad eléctrica, por lo que es probable que el péptido también participe de manera estimulante en la regulación de la secreción de GnRH (Loh *et al.*, 2014). Al menos *in vitro*, la administración de VIP a rebanadas coronales que contienen el POA, o sagitales que contienen parte del POA y del SCN, tiene un efecto estimulante, ya que incrementa la actividad eléctrica que depende de la presencia de estradiol en el medio de cultivo y de la hora del día (Christian *et al.*, 2008).

Las evidencias presentadas en esta sección permiten suponer un modelo simplificado en el cual el SCN envía señales vasopresinérgicas diarias al AVPV, mismas que son permisivas para la liberación de kisspeptina. Estas señales solo son efectivas cuando las células del kisspeptinérgicas del AVPV, que expresan el ER α , han integrado la información indicativa de la madurez de los folículos destinados a ovular, es decir, altas concentraciones de estradiol. En conjunto con la liberación de kisspeptina en las terminales ubicadas en el POA, las neuronas del AVPV envían una señal al SCN que tendría la función de indicar el momento en que se debe suspender la inhibición mediada por VIP.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen evidencias de que algunos de los circuitos nerviosos implicados en la regulación de las funciones ováricas son lateralizados y presentan asimetrías funcionales (Gerendai y Halász, 1997). Se ha descrito que el hipotálamo izquierdo de la rata hembra tiene un menor contenido de GnRH que el derecho (Harris y col., 1996). La desaferentación lateral del POA izquierdo, pero no del derecho, inhibe el comportamiento sexual (Yahr y Greene, 1992) e impide la hipertrofia compensatoria del ovario ipsilateral, lo que no ocurre cuando se desaferenta el hipotálamo derecho (Nance y col., 1983; 1984). Adicionalmente, se ha mostrado que el hipotálamo derecho es más sensible que el izquierdo a la acción de los estrógenos como inductores de la receptividad sexual (Roy y Lynn, 1987).

En el caso de los circuitos nerviosos en los que participa el SCN, y que están relacionados con la regulación de la secreción de GnRH, se ha mostrado la lateralización de las vías eferentes (de la Iglesia y col., 2003; van der Beek y col., 1993; 1997a; van der Beek, 1996), pero a la fecha no existen estudios que analicen las posibles asimetrías entre el SCN izquierdo y derecho en la regulación de la ovulación.

En un estudio previo mostramos que la lesión unilateral del SCN bloquea la ovulación de la rata sin importar el lado del SCN que es lesionado ni la etapa del ciclo estral en que se realiza la cirugía (Silva, 2013). Estos resultados nos permiten proponer que ambos lados del SCN son simétricos y necesarios en la señalización neuroendocrina que estimula la ovulación. El bloqueo de la ovulación observado en dicho estudio es acompañado por alteraciones del ciclo estral cuando los animales son tratados en el día del estro o del metaestro. Este hecho nos permite sugerir que el SCN interviene en la regulación de otros eventos, distintos a la secreción preovulatoria de GnRH, que son indispensables para la progresión del ciclo estral y por ende de la ovulación.

Partiendo de lo anterior nos preguntamos si el SCN está relacionado con la regulación de la sensibilidad del hipotálamo a los estrógenos, de la hipófisis a la GnRH o de los ovarios a las gonadotropinas. Las alteraciones en el ciclo estral que se observaron podrían entonces ser producto de problemas en la comunicación que se da entre los elementos del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y la falta de ovulación en estos mismos animales sería entonces producto de la interrupción de otros procesos, distintos a la salida de la señal permisiva que envía el SCN durante la tarde del proestro y que estimula la secreción de GnRH. Es posible que:

- 1) Al inicio del ciclo (estro y metaestro) el SCN esté relacionado con la regulación de la sensibilidad de los ovarios a las gonadotropinas.
- 2) Al final del ciclo (diestro y proestro) el SCN esté relacionado con la sensibilidad del hipotálamo a los estrógenos y de la hipófisis a la GnRH, así como con la estimulación de la secreción de GnRH.

En el presente estudio analizaremos los cortes histológicos de los ovarios de los animales tratados en el experimento anterior (Silva, 2013) con la finalidad de detectar anomalías en los folículos que pudieran deberse a alteraciones en la sensibilidad a las gonadotropinas. Posteriormente realizaremos el reemplazo de GnRH. Este experimento nos permitirá determinar si el bloqueo de la ovulación en ratas con lesión unilateral del SCN se debe a la supresión de esta señal; así como si la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH y la de los ovarios a las gonadotropinas se modifica como resultado de la lesión. Con la finalidad de determinar si la lesión del SCN afecta la sensibilidad que tiene el hipotálamo para integrar la información estrogénica que proviene de los ovarios, se realizó la inyección de benzoato de estradiol. Este tratamiento simula el aumento en la concentración de estrógenos que desencadena la secreción preovulatoria de GnRH por la tarde del proestro.

HIPÓTESIS

Dado que en la rata, la lesión unilateral del SCN realizada en estro y metaestro interfirió con el ciclo estral, pensamos que existe una alteración en el desarrollo de los folículos ováricos y entonces el análisis de la población folicular mostrará un aumento en la incidencia de atresia. Ratas con lesiones realizadas en las mismas etapas del ciclo serán incapaces de ovular cuando se les inyecte GnRH o estradiol.

Dado que la lesión unilateral del SCN realizada en el diestro y proestro interrumpió únicamente la secreción preovulatoria de GnRH, entonces se encontrará una gran cantidad de folículos preovulatorios sanos en los ovarios y por lo tanto la inyección de estradiol o de GnRH reestablecerá la ovulación.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos de la lesión unilateral del SCN, realizada a las 09:00 h de cada etapa del ciclo estral, sobre la sensibilidad del hipotálamo al estradiol, de la hipófisis anterior a la GnRH y del ovario a las gonadotropinas; así como analizar los cambios fisiológicos que se presentaron en los folículos ováricos destinados a ovular en el estro inmediato a la lesión.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Analizar si el SCN forma parte de los mecanismos que regulan la ovulación en etapas del ciclo estral diferentes al proestro, es decir, si participa en eventos neuroendocrinos distintos a la regulación de la secreción preovulatoria de GnRH
- 2) Describir la respuesta ovulatoria al reemplazo de la señal hipotalámica (GnRH) u ovárica (estradiol) en ratas con bloqueo de la ovulación espontánea producido por la lesión unilateral del SCN, realizada en cada etapa del ciclo estral.
- 3) Describir el efecto de la lesión unilateral del SCN, realizada en cada etapa del ciclo estral, sobre el desarrollo de los folículos ováricos destinados a ovular en el estro inmediato a la lesión.

MÉTODOS Y MATERIALES

1) Animales

En este estudio se utilizaron ratas hembras y vírgenes de tres a tres y medio meses de edad de la cepa CIIZ-V. Los animales se alojaron en jaulas acrílicas con acceso *ad libitum* al agua y alimento (Purina S.A., México). En la sala se mantuvo una temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de luz-oscuridad de 14/10 con las luces encendidas de las 05:00 hasta a las 19:00 h (GTM-6).

Se monitoreó el ciclo estral de las ratas mediante la toma diaria de exudados vaginales, realizados entre las 11:00 h y 12:00 h. Los frotis fueron teñidos con hematoxilina-eosina y analizados en un microscopio óptico OPTIPHOT-2 (Nikon Instruments Inc., USA). Únicamente se utilizaron aquellas que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días cada uno y que al día de la cirugía tuvieron una masa corporal de entre 230 y 260 gramos. Todos los tratamientos que se describen a continuación se realizaron entre las 09:00 h y las 10:10 h con grupos ($n=7$) en cada una de las 4 etapas del ciclo estral: estro, metaestro, diestro y proestro.

2) Grupos experimentales

2.1 Lesión unilateral del núcleo Supraquiasmático

Las ratas fueron anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de 25 mg/kg de pentobarbital sódico (Salud y Bienestar Animal S. A. de C. V., México) y fueron colocados en un aparato estereotáxico modelo 9000 (David Kopf Instruments, USA) con la barra de los incisivos ubicada a -5 mm. Se realizó una incisión de un centímetro de longitud en la piel y el músculo del centro de la cabeza, se limpió la porción expuesta del cráneo con una solución de peróxido de hidrogeno al 10% para visualizar fácilmente las suturas coronal y sagital. El punto en el que se intersectan ambas suturas, Bregma, fue utilizado como punto 0 de referencia a partir del cual se ajustaron las siguientes coordenadas para el SCN izquierdo: Antero-Posterior = -0.3, Medio-Lateral = +0.3, Dorso-Ventral = -9.1. Para el SCN derecho: Antero-Posterior = -0.3, Medio-Lateral = -0.5, Dorso-Ventral = -9.1 (**Figura 6**). Posteriormente se realizó una craneotomía de aproximadamente 2 mm de diámetro con una fresa de carburo #4 montada en un instrumento rotatorio DREMEL modelo 300 (Bosch Tool Corporation, USA) a 5000 rpm. A través de ella se insertó un electrodo TCZ con una punta de 0.5 mm de largo por 0.25 mm de diámetro y una longitud total de 100 mm (Radionics, USA).

Para generar la temperatura necesaria para destruir el SCN se utilizó un generador de radiofrecuencia modelo RFG4A (Radionics, USA) hasta que la punta del electrodo alcanzó una temperatura de 95 °C (aproximadamente 20 mV), la que se mantuvo por 15 segundos.

2.2 Operación simulada

Se realizó el mismo procedimiento indicado para la lesión unilateral del SCN con la diferencia de que no se pasó corriente después de dirigir el electrodo hacia alguno de los SCN. El electrodo permaneció en el sitio el tiempo equivalente al que toma una lesión regular. En ambos procedimientos, la lesión y la operación simulada, se siguió el protocolo reportado por Wirtshafter y colaboradores (1979) para evitar el daño al seno sagital superior cuando se realizan cirugías con objetivos cercanos a la línea media del encéfalo. Cuando el daño fue inevitable se inspeccionó el cerebro durante la autopsia y se descartaron aquellos animales con hematomas subdurales.

Una vez finalizada la cirugía se selló la herida con clips quirúrgicos, se colocó a los animales en mantas calientes y se monitorearon hasta que se recuperaron de la anestesia. Posteriormente se colocaron en jaulas individuales ubicadas en su sala de procedencia y al día siguiente fueron agrupados nuevamente (con la finalidad de minimizar el estrés, solo se agruparon animales que recibieron el mismo tratamiento en la misma etapa y el mismo día).

2.3 Grupo de anestesia y animales intactos

Como grupos de comparación se utilizaron animales que únicamente fueron anestesiados y animales intactos sacrificados en el día del estro vaginal.

3) Reemplazo hormonal

3.1 Señal hipotalámica

Después de la cirugía, algunos animales fueron inyectados con 3.7 µg/Kg de LHRH-Gly sintética (Sigma-Aldrich Co., USA) por vía subcutánea (s.c.) a las 14:00 h del día del proestro esperado del ciclo estral en estudio. Esta inyección simula el aumento preovulatorio de GnRH que estimula la secreción de las gonadotropinas y por tanto de la ovulación. Este experimento nos permite determinar si el bloqueo de la ovulación observado tras la lesión unilateral del SCN se debió a la supresión de esta señal; así como si la

sensibilidad de la hipófisis a la GnRH y la de los ovarios a las gonadotropinas se modifica como resultado del tratamiento.

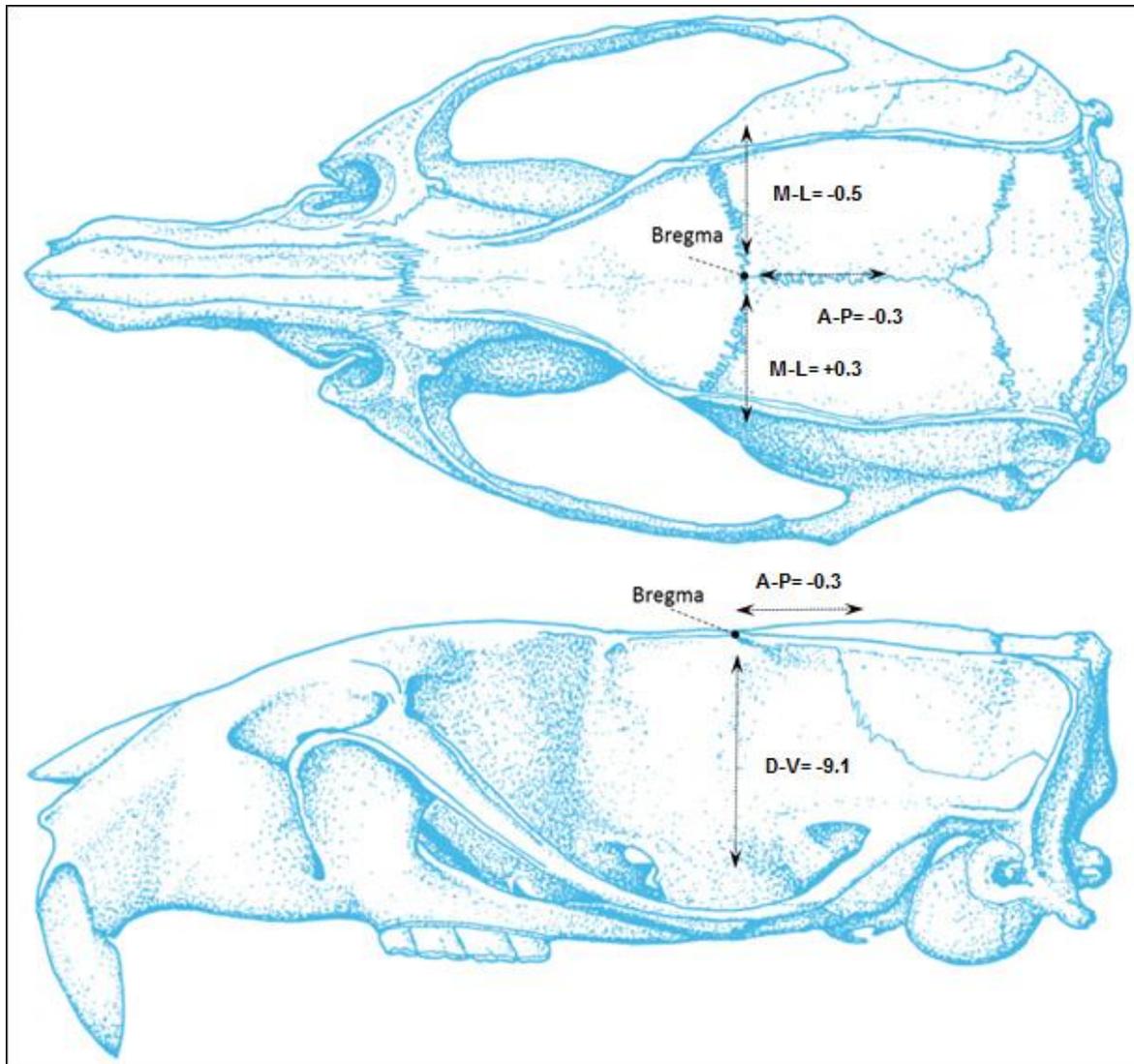


Figura 6. Coordenadas utilizadas en las cirugías estereotáxicas. Medio-Lateral (M-L), Antero-Posterior (A-P) y Dorso-Ventral (D-V) (Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 2004).

3.2 Señal ovárica

Otro grupo de animales fue inyectado con 10 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de benzoato de 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich Co., USA) s.c. a las 14:00 h del día correspondiente al diestro esperado. Este tratamiento simula el aumento en la concentración de estrógenos que desencadena la secreción preovulatoria de GnRH por

la tarde del proestro y permite determinar si la lesión del SCN afecta la capacidad del hipotálamo para integrar la información estrogénica que proviene de los ovarios.

4) Sacrificio y autopsia

La toma de exudados vaginales se reinició al día siguiente del tratamiento y los animales fueron sacrificados por decapitación a las 09:00 h del día del estro esperado del ciclo en que se realizó el tratamiento. Se removió el oviducto de cada ovario y bajo el microscopio de disección se cuantificó el número de ovocitos liberados al interior de cada uno. Este número se verificó después de procesar la muestra con hematoxilina-eosina.

Los ovarios fueron fijados en solución de Bouin, incluidos en parafina y finalmente se realizaron cortes en serie (cada 10 μm) para realizar el análisis de la población folicular de los animales que no recibieron reemplazo hormonal después de la cirugía. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina y fueron analizados con un ocular micrométrico (10X) al microscopio óptico. Se midieron los diámetros perpendiculares de todos folículos en los que estaba presente el núcleo y nucléolo del ovocito y únicamente se consideraron aquellos con un diámetro promedio igual o mayor a 300 μm . Estos mismos fueron divididos en sanos o atrésicos, considerando como signos de atresia folicular (Hirshfield y Midgley, 1978):

- a) Descamación de células de la granulosa al interior del antro.
- b) Engrosamiento de las tecas.
- c) Picnosis en el núcleo de las células de la granulosa.
- d) Alteraciones en el ovocito.

Se extrajo el encéfalo de cada animal y se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se realizaron cortes seriados de 60 μm de grosor en un criostato MICROM HM 505 N (Termo Fisher Scientific Inc., USA). Los cortes se tiñeron con violeta de cresilo (técnica de Nissl) para determinar la posición y el alcance de la lesión utilizando un microscopio óptico. Únicamente se utilizaron los datos provenientes de animales que mostraron una trayectoria correcta hacia el SCN objetivo o la lesión completa del SCN y que a la vez cumpliera los siguientes criterios (**Figura 7**):

- a) Sin daño o daño mínimo al quiasma óptico
- b) Sin daño al SCN contralateral

- c) Sin daño en el AVPv ipsi o contralateral
- d) Sin daño en el ARC ipsi o contralateral

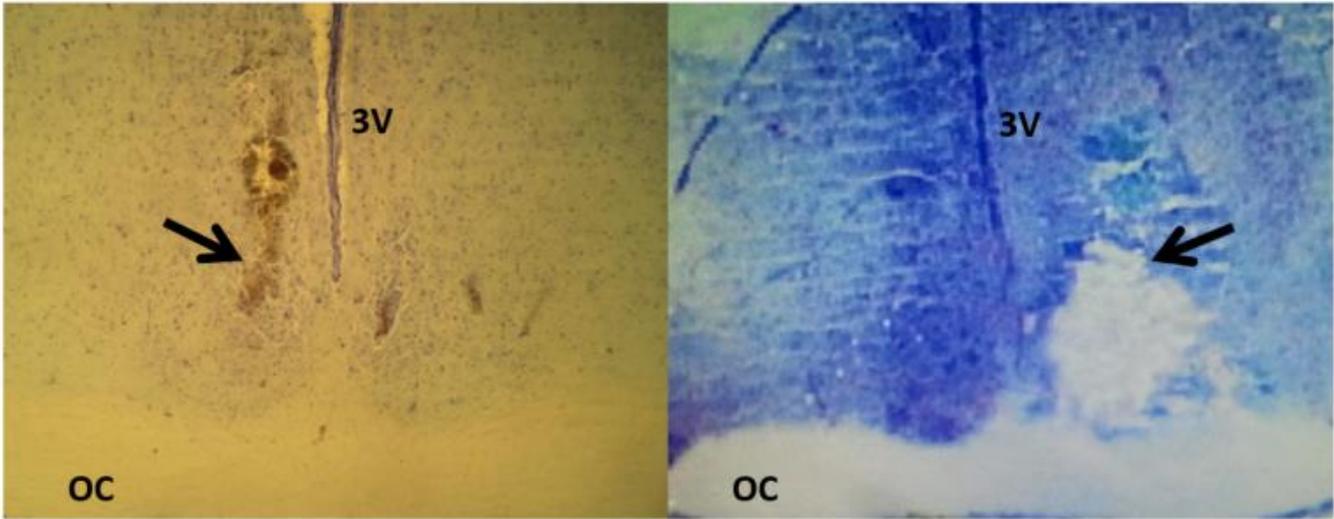


Figura 7. Micrografías representativas de la operación simulada y la lesión unilateral del SCN. El panel de la izquierda representa una operación simulada en el hemisferio derecho; la flecha indica la trayectoria del electrodo hacia el SCN. El panel de la derecha muestra la lesión del SCN izquierdo; la flecha indica el sitio dañado. OC, quiasma óptico; 3V, tercer ventrículo. Micrografías tomadas a 10X.

5) Análisis estadístico

El número de ovocitos liberados se expresó como aquellos liberados por ambos ovarios (OI+OD) y se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn, cuando fue necesario comparar dos grupos se realizó la prueba U de Mann-Whitney. El porcentaje de folículos atrésicos y sanos se analizó con la prueba de χ^2 (Chi cuadrada). Se calculó la tasa de animales ovulantes (TAO), definida como el número de animales de cada grupo que ovularon entre el número total de animales en el mismo grupo ($TAO = \# \text{ ovulantes} \div n$) y la proporción de animales que ovularon fue analizada con la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Fueron aceptadas como diferencias significativas aquellas en las que la probabilidad fue ≤ 0.05 . El programa estadístico utilizado fue Prism 6 versión 6.01 para Windows (GraphPad Software Inc. USA).

RESULTADOS

Efecto de la lesión unilateral del SCN sobre la ovulación

La inyección intraperitoneal de barbitúricos a las 09:00 h de cada etapa del ciclo estral no modificó el porcentaje de animales que ovulan en el estro inmediato, ni el número de ovocitos liberados (**Figura 8**), por lo que fue utilizado como grupo de comparación para los grupos experimentales. Como se muestra en la **Figura 9**, la operación simulada realizada en el estro o metaestro bloqueó la ovulación en la mayoría de los animales, pero no alteró el número de ovocitos liberados en aquellos animales que son capaces de ovular. El porcentaje de bloqueo es semejante para las cirugías realizadas en ambas etapas (estro: 71% vs. metaestro: 86%) y no dependen del hemisferio encefálico en que se realizan (estro: izquierdo 57%, derecho 86%; metaestro: izquierdo 100%, derecho: 74%).

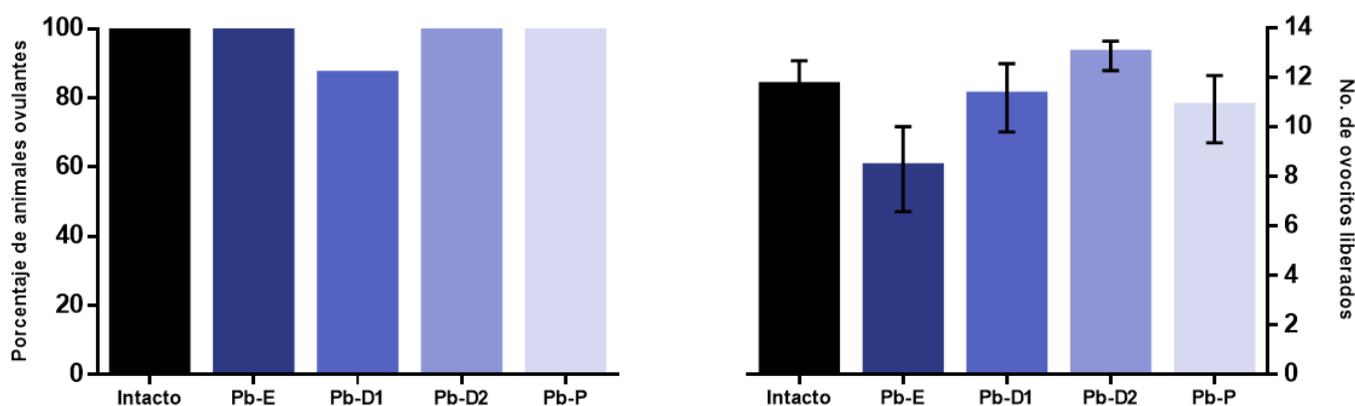


Figura 8. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales intactos o anestesiados con barbitúricos a las 09:00 h de cada etapa del ciclo estral. Anestesia con pentobarbital sódico (Pb) en estro (E), metaestro (D-1), diestro (D-2) o proestro (P).

La lesión unilateral del SCN tiene un efecto semejante al de la operación simulada (SCNI-E; SCND-E **Figura 9**). En la etapa del estro, la lesión del SCN izquierdo bloqueó la ovulación del 100% de los animales, mientras que la del derecho solo del 57%. Si bien se aprecia un efecto asimétrico, no es suficiente para ser estadísticamente significativo. En la etapa del metaestro, la lesión de cualquiera de los SCN bloquea la ovulación de todos los animales tratados. No existen diferencias significativas en el bloqueo de la ovulación que dependan de la etapa del ciclo en que se realizaron los tratamientos.

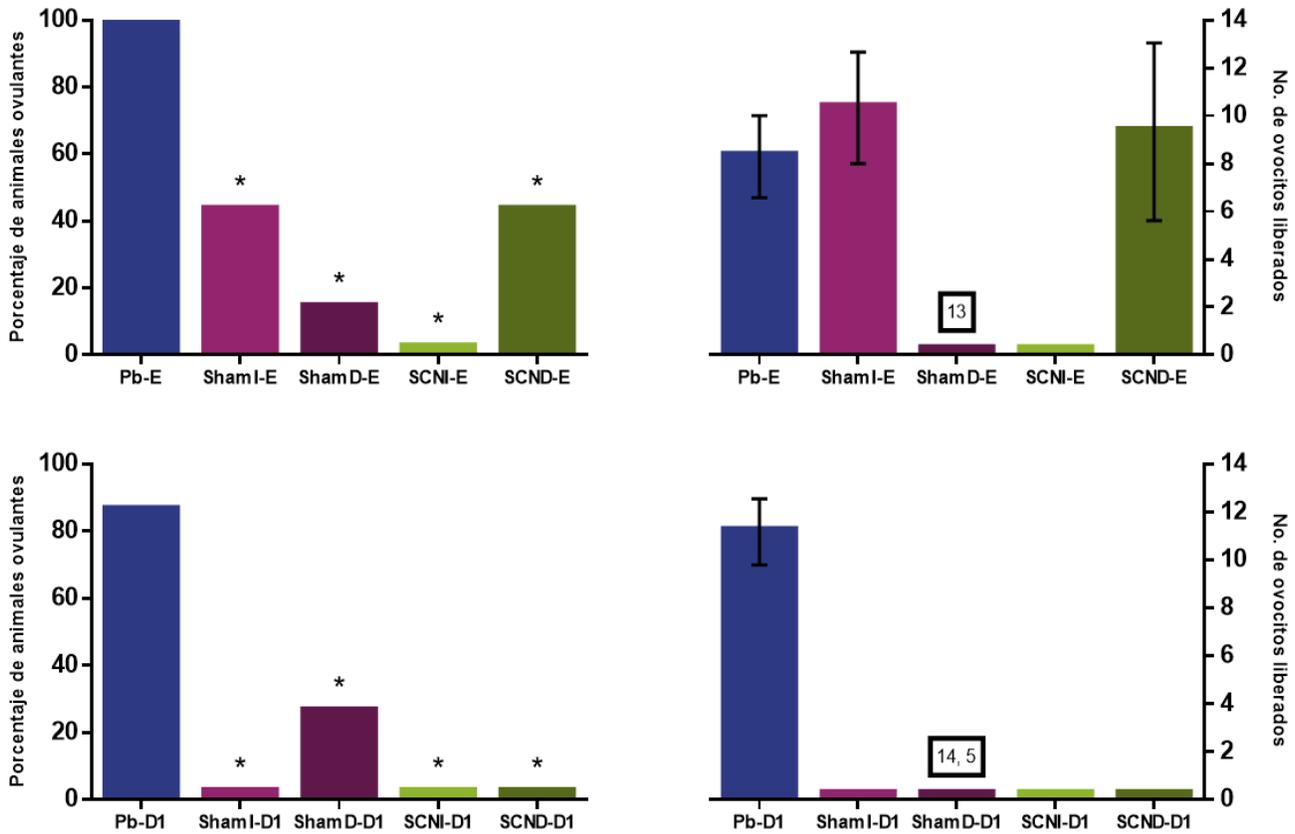


Figura 9. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN u operación simulada realizada en el estro o metaestro. En el panel superior se muestran los resultados de animales anestesiados (Pb-E), con operación simulada en el hemisferio izquierdo (ShamI-E) o derecho (ShamD-E), o con lesión del SCN izquierdo (SCNI-E) o derecho (SCND-E) en día del estro. El panel inferior muestra los resultados de animales con los mismos tratamientos pero realizados en el día del metaestro (D1). * $p \leq 0.05$ vs. Pb, □ número de ovocitos liberados cuando el número de incidentes no permitió realizar la prueba correspondiente.

El bloqueo de la ovulación fue acompañado por alteraciones del ciclo estral en 37 de los 56 animales tratados en estro y metaestro (ShamI, ShamD, SCNI y SCND), lo cual no depende del tratamiento que recibieron (**Cuadro 1**). Sumando el porcentaje de animales acíclicos producto de cada tratamiento obtenemos que el 86% de los animales tratados en el metaestro y el 46% de los tratados en estro mostraron dichas anomalías después de la cirugía.

La **Figura 10** representa la progresión de los dos ciclos previos al tratamiento y el ciclo en que se realizó la cirugía. El ciclo característico de los animales de esta cepa se describe en el panel A y las alteraciones que se observaron después de las cirugías en los paneles B-D. De los 37 animales con aciclicidad, 29 presentaron un exudado vaginal caracterizado por leucocitos durante 3 días consecutivos (B), lo que indica un alargamiento del metaestro-diestro. Dos animales presentaron un alargamiento de 24

horas en la etapa del proestro (C), mientras que 6 animales se volvieron acíclicos por el resto del estudio (D).

Cuadro 1. Porcentaje de animales con alteraciones del ciclo estral debidas a los tratamientos.

Grupo experimental / Etapa del ciclo	Estro	Metaestro	Diestro	Proestro
Sham-I	43	86	0	0
Sham-D	71	71	0	0
SCN-I	43	100	0	0
SCN-D	29	86	0	0

Operación simulada en el hemisferio izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D). Lesión del SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) n=7.

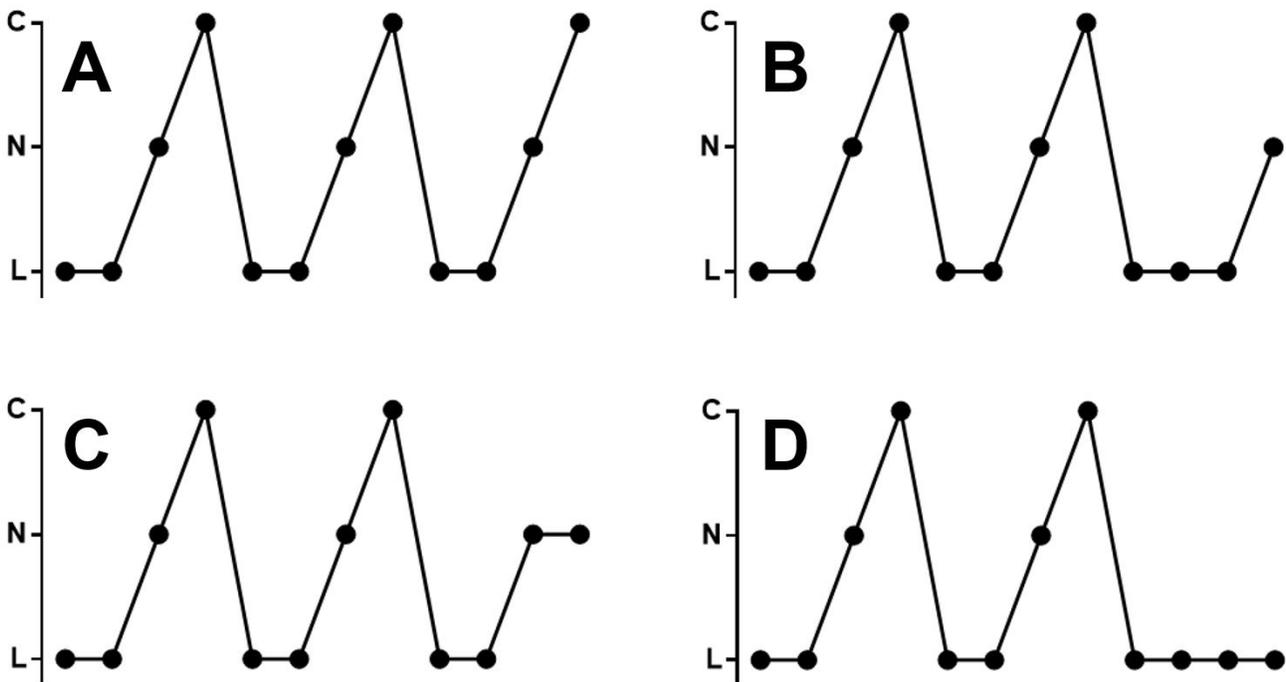


Figura 10. Alteraciones del ciclo estral observadas en animales con operación simulada o lesión unilateral del SCN realizada en estro o metaestro. El panel A muestra la progresión normal del ciclo estral, cada punto representa un día y el eje de ordenadas el tipo celular predominante en el exudado vaginal. La etapa del estro, caracterizada por la predominancia de células cornificadas (C) es seguida por los días del metaestro y diestro, en los que aparecen gran cantidad de leucocitos en el exudado (L). El proestro subsiguiente se caracteriza por la presencia mayoritaria de células nucleadas (N). Las alteraciones observadas se deben al alargamiento del ciclo, ya sea por la adición de un día al metaestro-diestro (B) o al proestro (C). Cierta porcentaje de los animales mostró aciclicidad permanente tras los tratamientos (D).

Al contrario de lo que ocurre en los animales tratados en estro y metaestro, las operaciones simuladas no tuvieron ningún efecto significativo sobre la tasa de animales ovulantes cuando se realizaron en el diestro o proestro (**Figura 11**). La lesión en el SCN izquierdo en el diestro, bloqueó la ovulación del 100% de animales, mientras que la del derecho del 86%. La lesión de cualquiera de los lados del SCN resulta en un bloqueo de la ovulación en el 86% de los animales cuando se realizan en el proestro. Aquellos animales que fueron capaces de ovular después de la lesión liberaron un número de ovocitos semejante al observado en los animales del grupo de anestesia. Las lesiones unilaterales que resultaron en falta de la ovulación, no modificaron el ciclo estral. Estos resultados muestran que en estas dos etapas no existen asimetrías funcionales entre ambos lados del SCN en su papel en la regulación de la ovulación.

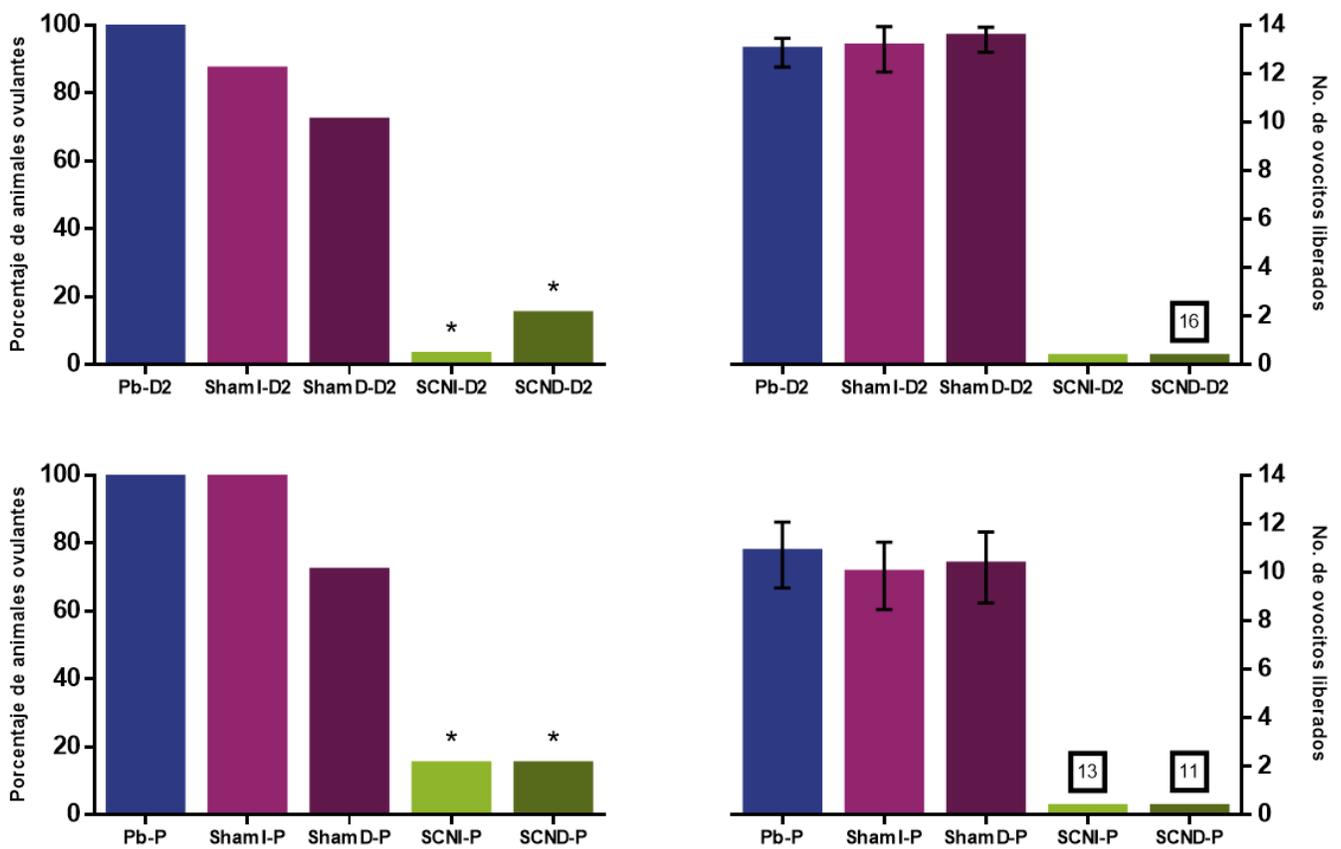


Figura 11. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN u operación simulada realizada en el diestro o proestro. En el panel superior se muestran los resultados de animales anestesiados (Pb-D2), con operación simulada en el hemisferio izquierdo (ShamI-D2) o derecho (ShamD-D2), o con lesión del SCN izquierdo (SCNI-D2) o derecho (SCND-D2) en día del diestro. El panel inferior muestra los resultados de animales con los mismos tratamientos pero realizados en el día del proestro (P). * $p \leq 0.05$ vs. Pb, □ número de ovocitos liberados cuando el número de incidentes no permitió realizar la prueba correspondiente.

Efecto de los tratamientos a nivel ovárico

En los ovarios de los animales que no ovularon, el número de folículos con diámetro promedio $\geq 300 \mu\text{m}$ por animal fue similar a los grupos intacto y Sham (**Figura 12**). Un resultado similar se obtuvo cuando se comparó el número de folículos en función del SCN lesionado (resultados no mostrados). No se observaron diferencias en la incidencia de atresia en estos folículos (**Figura 12**).

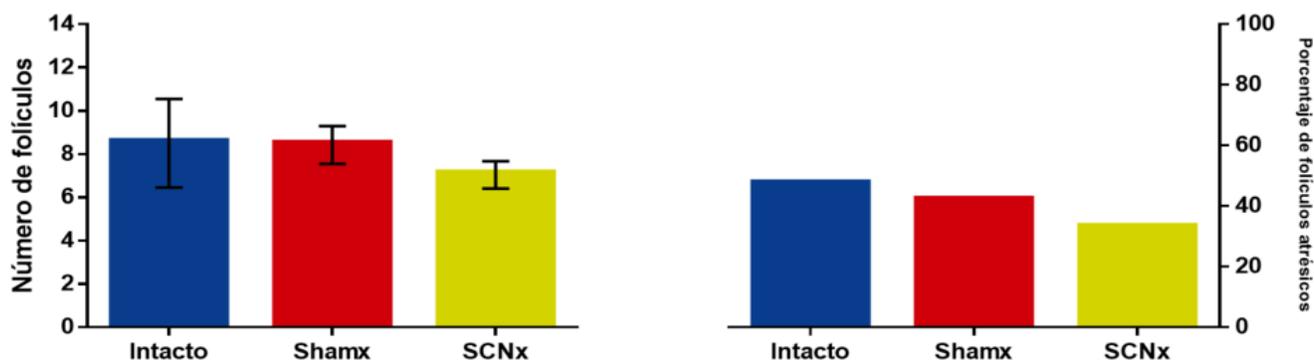


Figura 12. Media \pm EEM del número de folículos con diámetro promedio $\geq 300 \mu\text{m}$ / animal y porcentaje de incidencia de atresia en los mismos. Shamx y SCNx corresponden a la operación simulada y a la lesión unilateral del SCN, respectivamente, sin importar el hemisferio cerebral o la etapa del ciclo estral en que se realizó la cirugía.

En los ovarios de los animales tratados con la lesión unilateral del SCN o con la operación simulada, el número de folículos con antro fue mayor que en los animales intactos (**Figura 13A**). La lesión unilateral del SCN decrece el número de folículos atrésicos en comparación con los animales intactos o con operación simulada (**Figura 13B**). Este mismo patrón se conserva cuando se considera la incidencia de atresia separando los folículos en aquellos con antro o sin antro (resultados no mostrados). Al analizar la misma proporción separando los folículos en función de la etapa del ciclo estral en que se realizó el tratamiento, las diferencias descritas sólo se observaron en los animales tratados en diestro o proestro (**Figura 14**). Este patrón se conserva en los folículos sin antro (resultados no mostrados) y en aquellos con antro, es decir, los que pudieran haber ovulado en el ciclo inmediato a la cirugía.

En los animales con operación simulada derecha realizada en la etapa del estro, el número de folículos atrésicos fue mayor que en los animales tratados en el hemisferio contrario, mientras que en los animales tratados en metaestro ocurre lo opuesto (**Figura 15**). Este resultado tiene una correlación inversamente proporcional con el porcentaje de animales que ovularon después de los tratamientos, es decir, un mayor número de animales ovularon cuando se realizó la operación simulada izquierda en el día del estro y la derecha en el metaestro (**Figura 8**). No se encontraron diferencias significativas en el caso de las lesiones unilaterales del SCN realizadas en cualquiera de las etapas del ciclo.

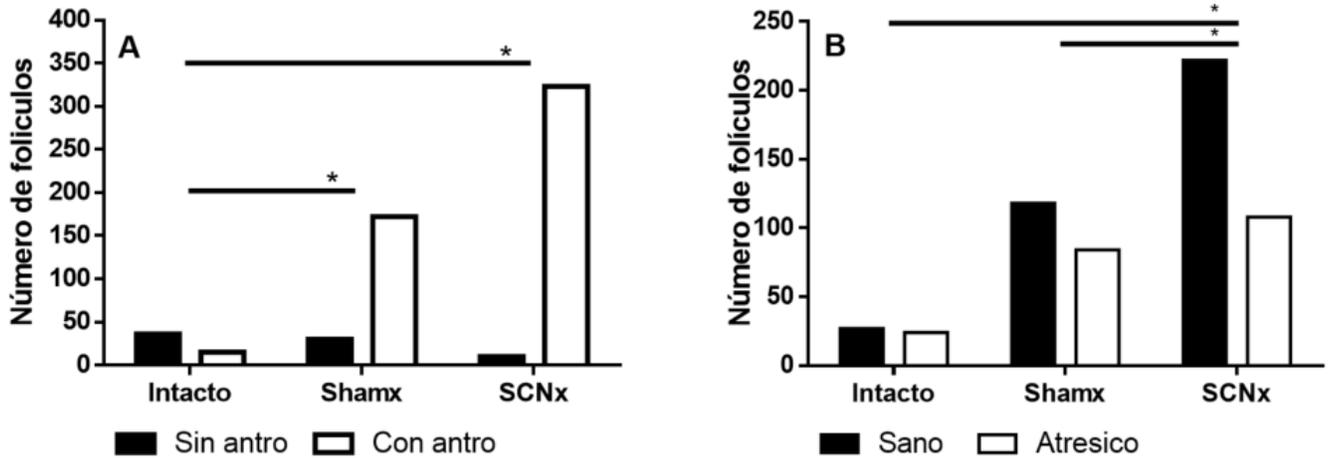


Figura 13. Proporción de folículos con o sin antro / tratamiento (A) y sanos o atrésicos / tratamiento (B). Shamx y SCNx corresponden a la operación simulada y a la lesión unilateral del SCN, respectivamente, sin importar el hemisferio cerebral o la etapa del ciclo estral en que se realizó la cirugía. Se grafica el total de folículos considerados por cada grupo de tratamientos. * $p \leq 0.05$ vs. el grupo indicado por la línea.

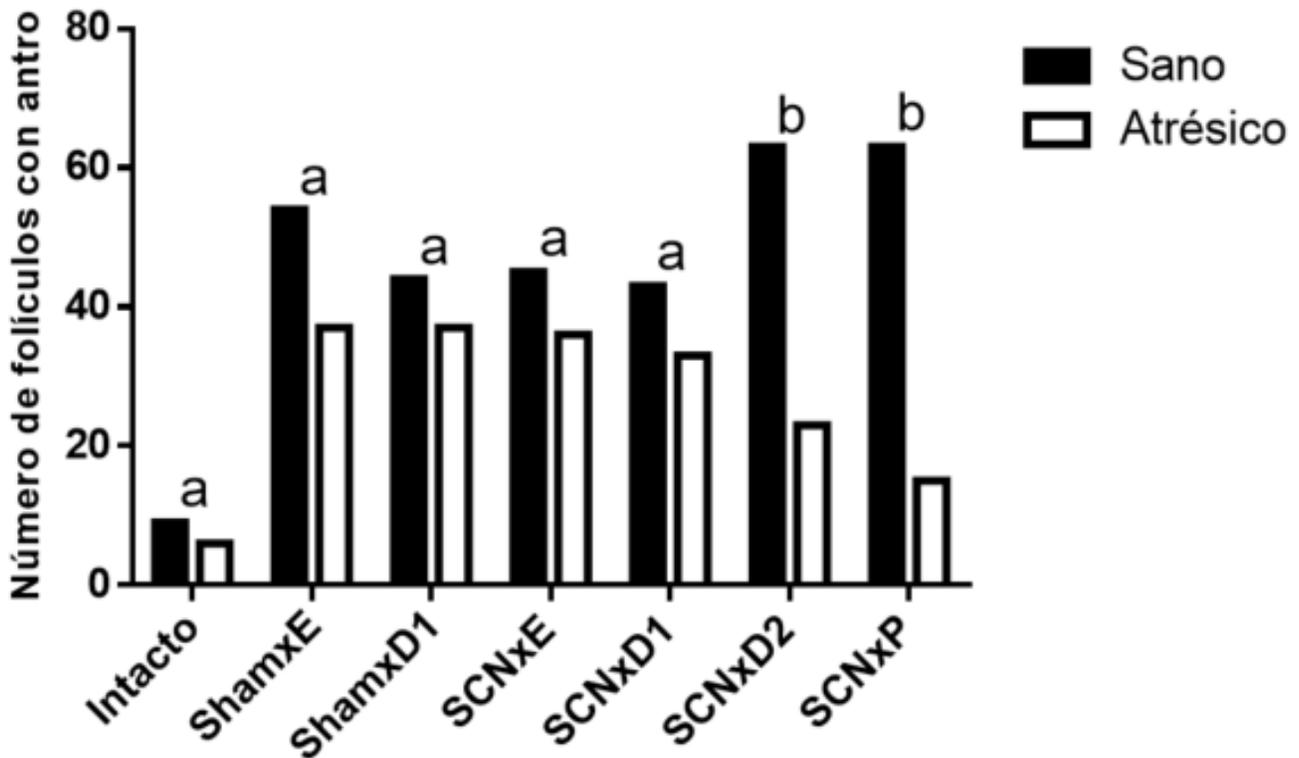


Figura 14. Proporción de folículos con antro sanos y atrésicos / tratamiento y etapa del ciclo estral. Shamx y SCNx corresponden a la operación simulada y a la lesión unilateral del SCN, respectivamente, sin importar el hemisferio cerebral en que se realizó la cirugía. Se grafica el total de folículos considerados por cada grupo de tratamientos. b $p \leq 0.05$.

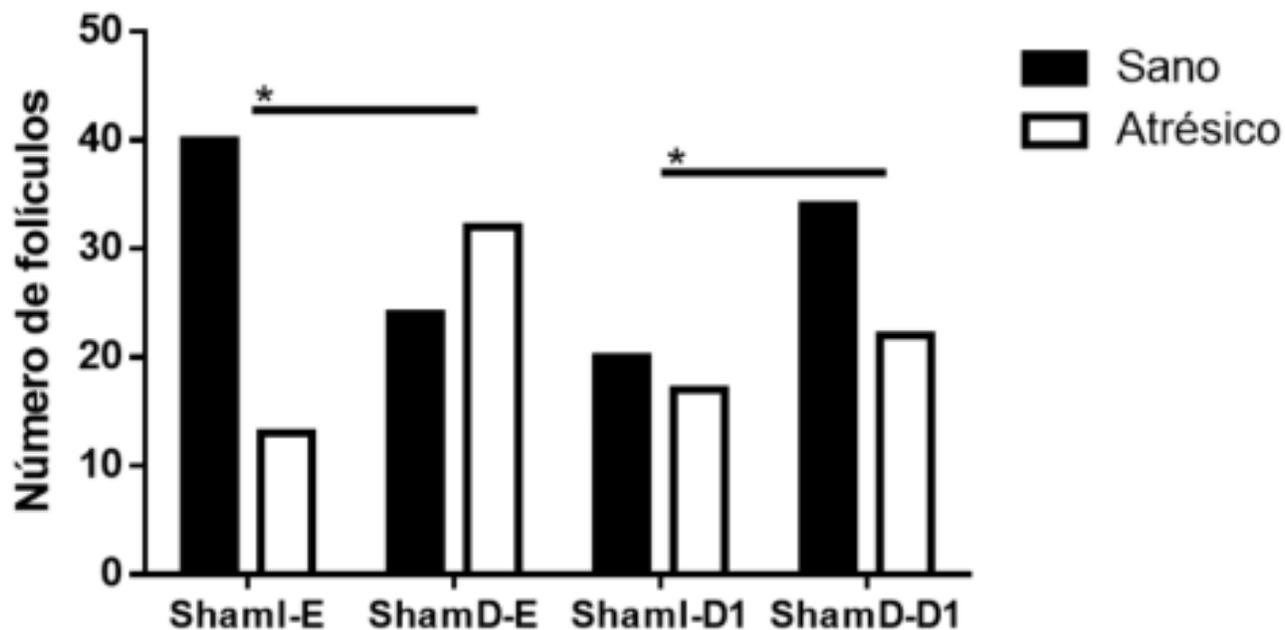


Figura 15. Proporción de folículos sanos y atrésicos / tratamiento en las etapas del estro y metaestro. Operación simulada en el hemisferio izquierdo (ShamI) o derecho (ShamD) realizadas en el estro (E) o metaestro (D1). Se grafica el total de folículos considerados por cada tratamiento. * $p \leq 0.05$ vs. el grupo indicado por la barra.

Efecto del reemplazo hormonal con GnRH

La mayor parte de los animales que fueron tratados replicando las cirugías que bloquearon la ovulación en el experimento anterior (lesión unilateral del SCN y operación simulada realizada en estro o metaestro) y que posteriormente recibieron una inyección subcutánea de GnRH ovularon en el día del estro predicho. La inyección de GnRH restableció la ovulación en los animales con operación simulada realizada en estro o metaestro; resultado que dependió del día y del hemisferio tratado (**Figura 16**). En la etapa del estro, únicamente el 20% de los animales no ovularon en cada tratamiento, mientras que en el metaestro el 20% y el 50% de los animales tratados en el hemisferio izquierdo o derecho, respectivamente, ovularon después de la inyección de GnRH. Este resultado no es estadísticamente significativo debido a que cerca del 20% de los animales del grupo control (anestesia) tampoco ovularon. El número de ovocitos liberados tiende a disminuir, pero el número de observaciones no permite realizar la prueba correspondiente.

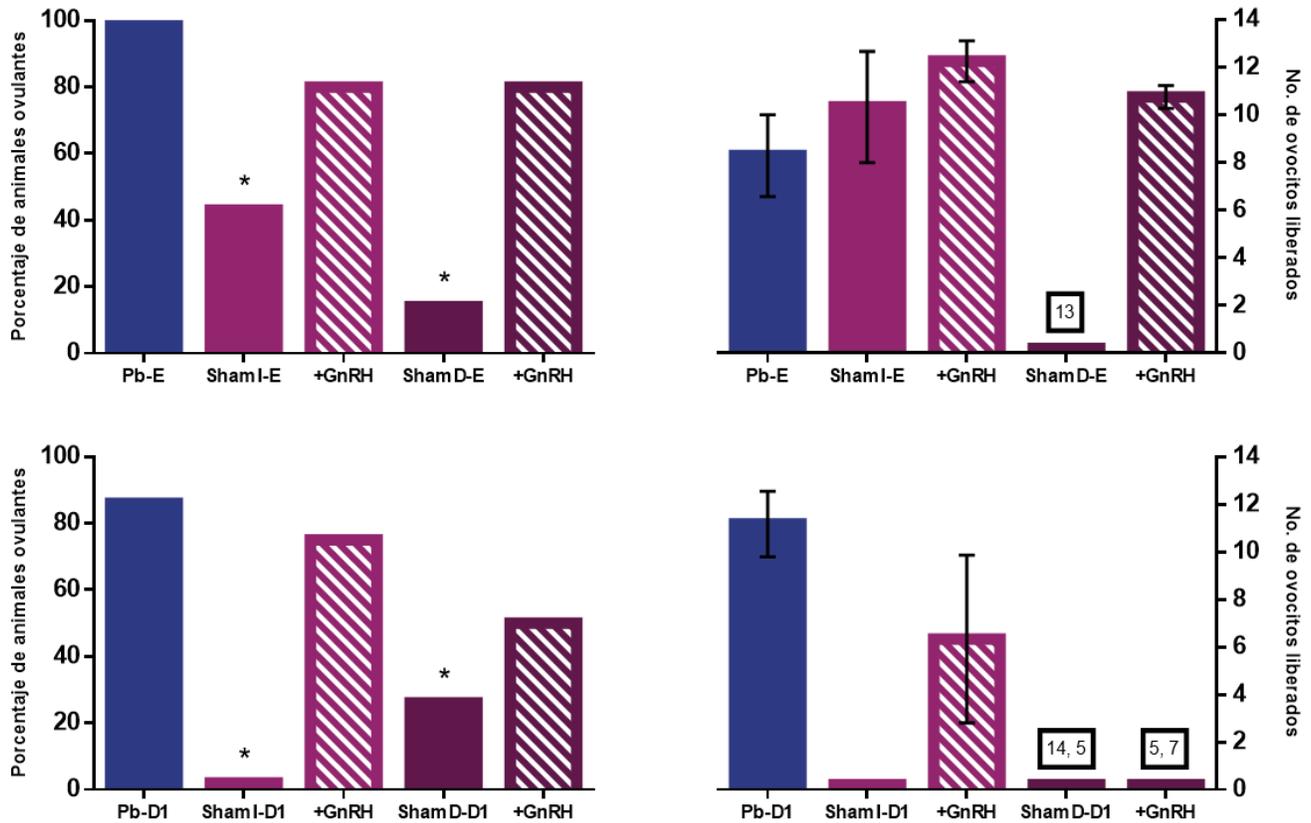


Figura 16. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con operación simulada realizada en el estro o metaestro, con o sin el reemplazo posterior de GnRH. En el panel superior se muestran los resultados de animales anestesiados (Pb-E), con operación simulada en el hemisferio izquierdo (Sham I-E) o derecho (Sham D-E) realizada en el estro, así como de animales con los mismos tratamientos que recibieron el reemplazo hormonal con GnRH (+GnRH) en el proestro inmediato. El panel inferior muestra los resultados de animales con los mismos tratamientos pero realizados en el día del metaestro (D1). * $p \leq 0.05$ vs. Pb, □ número de ovocitos liberados cuando el número de incidentes no permitió realizar la prueba correspondiente.

El tratamiento con GnRH restablece la ovulación de la mayoría de los animales que recibieron la lesión unilateral del SCN. El número de ovocitos que liberan es semejante al que liberan los animales del grupo de comparación. El 100% de los animales tratados en estro ovularon, mientras que 85% de los animales a los que se les lesionó el SCN izquierdo y 100% de aquellos a los que se les lesionó el derecho en el metaestro ovularon (**Figura 17**).

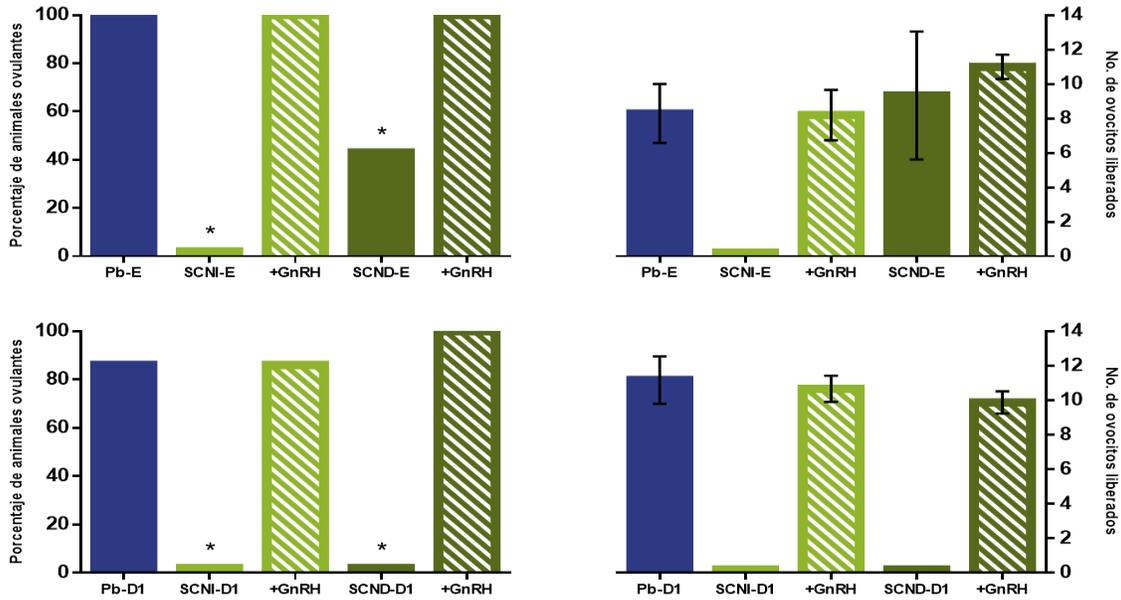


Figura 17. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN realizada en el estro o metaestro, con o sin el reemplazo posterior de GnRH. En el panel superior se muestran los resultados de animales anestesiados (Pb-E), con lesión del SCN izquierdo (SCNI-E) o derecho (SCND-E) realizada en el estro, así como de animales con los mismos tratamientos que recibieron el reemplazo hormonal con GnRH (+GnRH) en el proestro inmediato. El panel inferior muestra los resultados de animales con los mismos tratamientos pero realizados en el día del metaestro (D1). * $p \leq 0.05$ vs. Pb, □ número de ovocitos liberados cuando el número de incidentes no permitió realizar la prueba correspondiente.

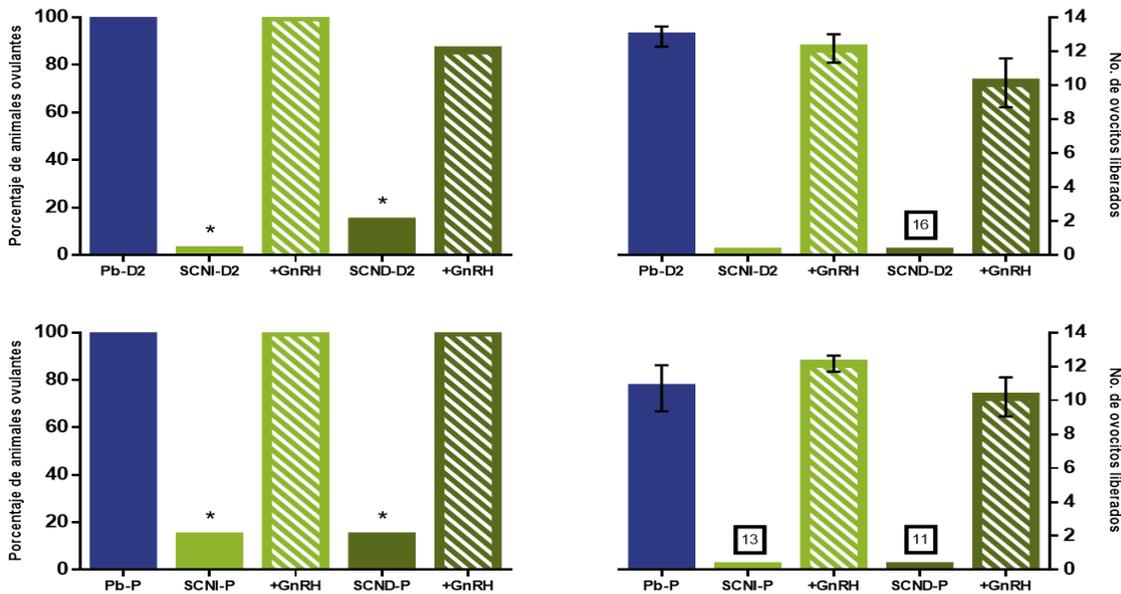


Figura 18. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN realizada en el diestro o proestro, con o sin el reemplazo posterior de GnRH. En el panel superior se muestran los resultados de animales anestesiados (Pb-D2), con lesión del SCN izquierdo (SCNI-D2) o derecho (SCND-D2) realizada en el diestro, así como de animales con los mismos tratamientos que recibieron el reemplazo hormonal con GnRH (+GnRH) en el proestro inmediato. El panel inferior muestra los resultados de animales con los mismos tratamientos pero realizados en el día del proestro (P). * $p \leq 0.05$ vs. Pb, □ número de ovocitos liberados cuando el número de incidentes no permitió realizar la prueba correspondiente.

En la etapa del diestro, la administración de la neuro-hormona restableció la ovulación en un 100% y 85% de los animales con lesión del SCN izquierdo y derecho, respectivamente. El mismo tratamiento restableció la ovulación de todos los animales tratados en proestro, esto sin importar el hemisferio en que se realizó la lesión (**Figura 18**). Cabe mencionar que el porcentaje de aciclicidad reportado en el **Cuadro 1** no se modificó de manera significativa, ni para los animales tratados en estro-metaestro ni para aquellos tratados en diestro-proestro.

Efecto del reemplazo hormonal con estradiol

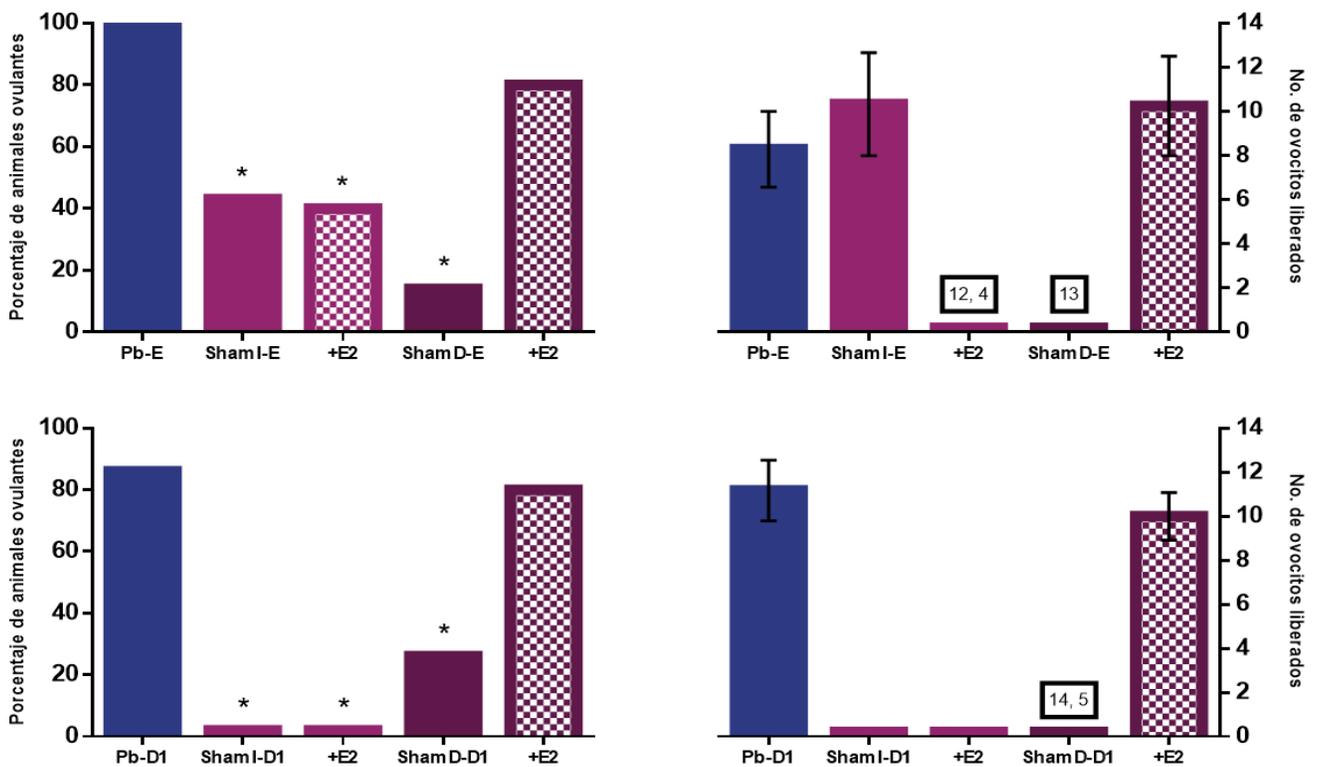


Figura 19. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con operación simulada realizada en el estro o metaestro, con o sin el reemplazo posterior de estradiol. En el panel superior se muestran los resultados de animales anestesiados (Pb-E), con operación simulada en el hemisferio izquierdo (Sham I-E) o derecho (Sham D-E) realizada en el estro, así como de animales con los mismos tratamientos que recibieron el reemplazo hormonal con estradiol (+E2) en el diestro inmediato. El panel inferior muestra los resultados de animales con los mismos tratamientos pero realizados en el día del metaestro (D1). * $p \leq 0.05$ vs. Pb, □ número de ovocitos liberados cuando el número de incidentes no permitió realizar la prueba correspondiente.

En los animales con operación simulada del lado izquierdo realizada en estro o metaestro, la inyección de estradiol no restableció la ovulación (estro: 40%, metaestro: 0%), lo que sí ocurrió en los animales tratados

en el hemisferio derecho (80%) (**Figura 19**). En el caso de la lesión unilateral del SCN realizada en estro, la inyección de benzoato de estradiol restableció la ovulación parcialmente (izquierdo: 65%, derecho: 50%). En los animales tratados en metaestro, el reemplazo hormonal es ineficaz para restaurar la ovulación (izquierdo: 0%, derecho: 20%). La inyección de benzoato de estradiol en animales tratados en el diestro restableció la ovulación únicamente en los animales tratados en el hemisferio derecho (derecho: 80%, izquierdo: 30%) (**Figura 20**). El porcentaje de animales que presentaron anomalías del ciclo estral es semejante al reportado en el **Cuadro 1**.

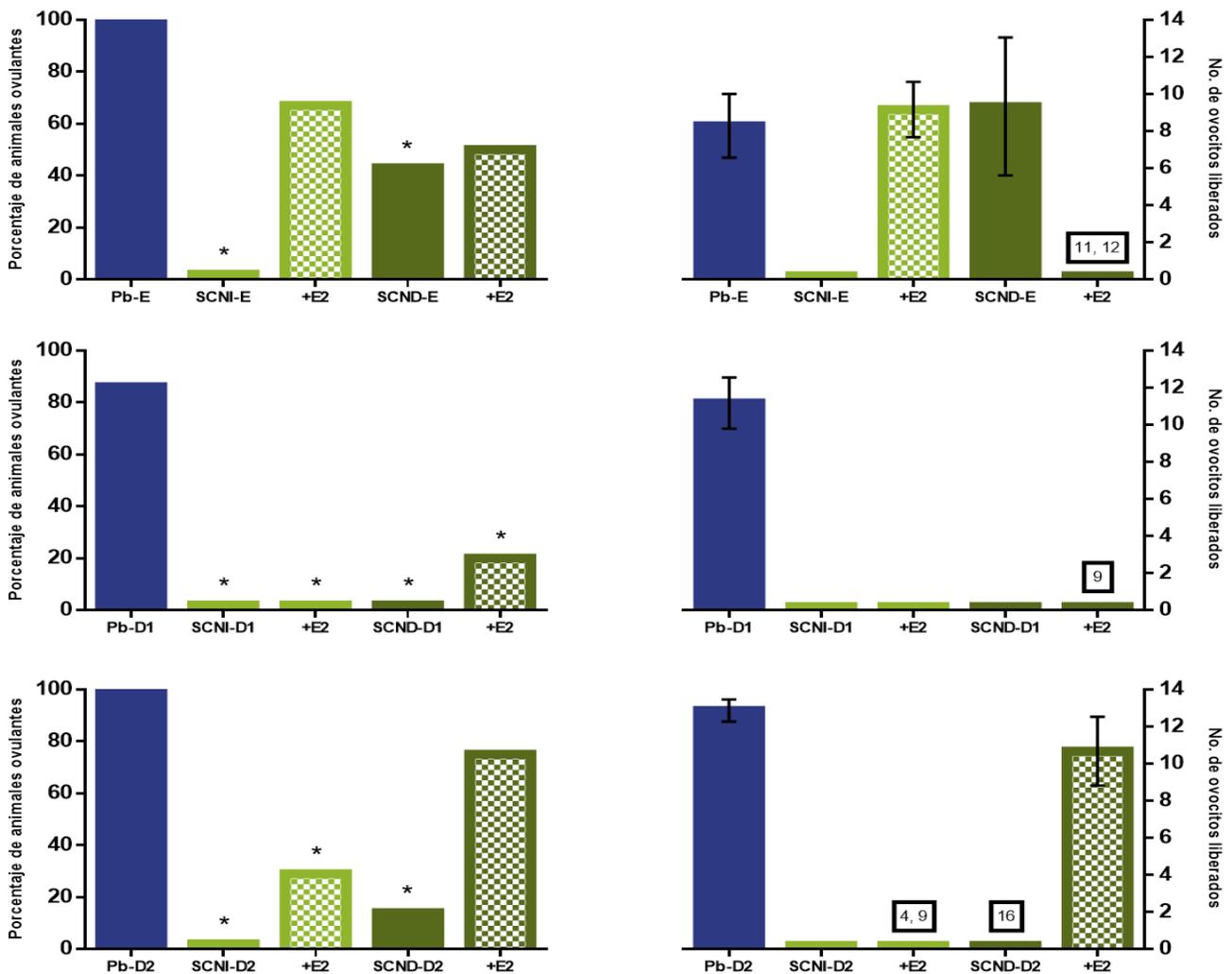


Figura 20. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm EEM del número de ovocitos liberados por animales con lesión unilateral del SCN realizada en el estro, metaestro o diestro, con o sin el reemplazo posterior de estradiol. En el panel superior se muestran los resultados de animales anestesiados (Pb-E) o con lesión del SCN izquierdo (SCNI-E) o derecho (SCND-E) realizada en el estro, así como de animales con el posterior reemplazo con estradiol (+E2) en el diestro inmediato. El panel del medio muestra los resultados de animales con los mismos tratamientos pero realizados en el metaestro (D1). El panel inferior muestra los resultados de animales tratados en el diestro (D2). * $p \leq 0.05$ vs. Pb, □ número de ovocitos liberados cuando el número de incidentes no permitió realizar la prueba correspondiente.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que para que los animales ovulen en la madrugada del día del estro, a las 09.00 h de cada día del ciclo estral es necesaria la participación de ambos SCN. También sugieren que el SCN participa en la regulación de otros mecanismos vinculados con la ovulación además de la secreción preovulatoria de la GnRH.

Los resultados sobre el efecto de la inyección de barbitúricos a las 09:00 h de cada etapa del ciclo estral sobre la ovulación concuerdan en general con los reportados por Domínguez y Smith (1974). En dicho estudio, los autores describen que es posible bloquear la ovulación mediante la inyección de barbitúricos en días diferentes al proestro. Se logra un máximo porcentaje de bloqueo inyectando el fármaco a partir del mediodía. Existen ciertas discrepancias entre los resultados obtenidos por Domínguez y Smith y los de este estudio, las cuales se pueden explicar por la diferencia en las dosis utilizadas, 50 mg/Kg en el caso de Domínguez y Smith y 25 mg/Kg en el presente.

Diversos estudios muestran la existencia de señales nerviosas que siguen un patrón diario que se presenta en cada día del ciclo estral (Domínguez y Smith, 1974; Domínguez y col., 1982; 1987). Dichas señales modulan procesos indispensables para la regulación de la ovulación en el estro inmediato. No es posible argumentar que se trate de señales circadianas, como se ha mostrado para el caso de aquella señal que se presenta por la tarde del proestro y que estimula la secreción preovulatoria de GnRH (Everett y Sawyer, 1950), pues no se han realizado estudios en condiciones constantes. Sin embargo, los resultados del presente estudio sugieren que el SCN es una de las estructuras involucradas en la generación de estas señales, ya que la lesión unilateral realizada a la misma hora y en las mismas etapas suprime la ovulación.

El bloqueo de la ovulación observado en animales con la operación simulada realizada en las etapas del estro y metaestro puede interpretarse de varias formas. Es posible que al bajar el electrodo hacia el SCN se hayan seccionado fibras dorsales al mismo que reciban o transmitan información entre las estructuras rostrales y caudales al SCN, que a su vez están relacionadas con la regulación de la ovulación. Por ello podría verse comprometida la comunicación entre el AVPv y el POA, que son rostrales, y el ARC y otros centros nerviosos caudales.

Otra posible interpretación es que el mismo electrodo dañe al POA o al AHA. La porción más caudal de la primera y la más rostral de la segunda se encuentran por encima del SCN (Paxinos y Watson,

2004) y es posible que la respuesta inmune del sistema nervioso ante el daño generado por el electrodo inhiba temporalmente la actividad de las neuronas GnRHérgicas del área. Esta opción parece menos probable pues el POA contralateral no se ve afectado y probablemente continúa funcionando. En el hámster, cuyo SCN izquierdo se ha disociado del derecho mediante la exposición prolongada a la luz constante, también se observa la activación asimétrica del POA ya que se presentan dos “picos” en la concentración de LH separados por 12 horas (de la Iglesia y col., 2003), que equivalen a la mitad de la concentración normal de la hormona (Kriegsfeld y Silver, 2006). En la rata, una concentración de LH equivalente a la mitad de la que normalmente se libera durante el “pico” preovulatorio es suficiente para inducir la ovulación (Gosden, 1976).

Finalmente, el hecho de que algunos de los animales tratados en estro ovularon, mientras que todos los tratados en metaestro no, podría indicar que los efectos de la cirugía se deban a una respuesta ante el estrés. La corticosterona que secretan las glándulas adrenales en respuesta a estímulos estresantes tiene efectos inhibitorios sobre la secreción de hormonas hipotalámicas, hipofisarias y ováricas (Brann y Mahesh, 1991; Kalantaridou y col., 2004). Se ha observado que en la rata, la respuesta al estrés es diferente en función de la etapa del ciclo estral (Komesaroff y col., 1998; Lovick, 2012; Marcondes y col., 2001).

Lovick (2012), mostró que la sensibilidad al estrés aumenta al final del ciclo estral, lo que no concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio, pues se encontró una mayor sensibilidad a los tratamientos al inicio del ciclo (estro-metaestro). Esta explicación es poco probable pues la ovulación en los animales con el mismo tratamiento, pero realizado en el diestro y proestro no tiene efecto. Estos animales fueron tratados más cerca del día del sacrificio y en las etapas en que se reporta hipersensibilidad al estrés, por lo que un efecto producto del estrés debería ser más evidente en ellos. El hecho de que no todos los animales tratados en el estro ovularan puede interpretarse como diferencias en la respuesta individual de los animales al estrés (es improbable que se deba a diferencias en la cantidad de fibras seccionadas durante la cirugía). La mayor parte de los animales tratados al inicio del ciclo estral se volvieron acíclicos después del tratamiento, lo que no se observó en los animales tratados al final del ciclo. Esto concuerda con la idea de que existen señales nerviosas que se originan en el encéfalo y que regulan procesos relacionados con la actividad de los ovarios en días diferentes al proestro.

La lesión unilateral del SCN bloqueó la ovulación sin importar el lado lesionado o la etapa del ciclo estral en que se realizó. Con base en estos resultados se sugiere que se necesita de ambos SCN para que ocurra la ovulación. En animales con lesión bilateral incompleta del SCN, los ritmos eferentes que

dependen del SCN como son: el ritmo diario en la actividad locomotora (Pickard y Turek, 1985), en la temperatura central (Ruis y col., 2008), la secreción de melatonina y corticosterona (Reppert y col., 1981) o en el patrón del sueño (Eastman y col., 1984), permanecen normales.

El mismo tipo de lesión parcial que destruye menos del 75% del SCN, no resulta en el bloqueo de la ovulación (Brown-Grant y Raisman, 1977; Raisman y Brown-Grant, 1977). Estos autores concluyen que el porcentaje de neuronas del SCN que permanecen activas después de la lesión son suficientes para regular las señales necesarias para la progresión del ciclo estral y la ovulación. En nuestro estudio, la eliminación completa de uno de los SCN (50%) bloqueó la ovulación.

Existen ciertas diferencias entre ambos experimentos que pueden explicar las discrepancias observadas. Al intentar realizar una lesión bilateral se dañan ambos hemisferios, dejando intacto cierto porcentaje de ambos SCN. En este estudio se eliminó completamente uno de los SCN, dejando al otro intacto. Los circuitos relacionados con la regulación de la ovulación en los que participa el SCN son lateralizados, por lo que es posible que los resultados publicados por Brown-Grant y Raisman (1977) dependan del número y tipo de neuronas que sobreviven a la lesión en cada SCN y que envían una señal estimulante hacia el POA ipsilateral y por tanto activan ambos circuitos. En nuestro experimento solo uno de los SCN es capaz de hacerlo y entonces la actividad estimulante del SCN es de tipo cuantitativa y no cualitativa. Por ello, es posible especular que para la regulación de la ovulación es necesaria la integridad de un número mínimo de neuronas del SCN en cada hemisferio, o bien, que existen subregiones dentro del SCN que son indispensables para la regulación de la ovulación. En este último caso, se necesitaría la integridad de las mismas regiones en ambos hemisferios. El presente estudio comprendió animales tratados en cada etapa del ciclo estral y sacrificados en el estro inmediato, mientras que Brown-Grant y Raisman realizaron todas las cirugías durante el diestro y sacrificaron a los animales entre 14 y 28 días después de la cirugía. Es importante denotar el tiempo de evaluación pues es posible que los resultados reportados por estos autores se deban a la compensación homeostática del sistema o a la reinervación de estructuras afectadas por la lesión.

En el presente estudio, la falta de ovocitos en los oviductos no puede explicarse por un adelanto en el momento de la ovulación; ya que los ovarios de esos animales mostraron la presencia de los ovocitos en folículos grandes y preovulatorios sin signos de atresia, lo cual indica que la señal neuroendocrina necesaria para desencadenar la ovulación no se presentó en el momento adecuado. Este resultado, en primera instancia, está de acuerdo con la idea general de que el SCN (y en este caso vías dorsales al

mismo) modulan la secreción de GnRH, que a su vez estimula el “pico” preovulatorio de LH que induce la ovulación.

En los animales intactos, la proporción de folículos y la incidencia de atresia son semejantes a las descritas por (Hirshfield y Midgley, 1978) en la rata, con un mayor número de folículos con antro (preovulatorios) en el diestro y proestro. La aparente disminución en la incidencia de atresia que resulta de la lesión unilateral del SCN no debe ser interpretada como tal, ya que la diferencia proviene de los animales tratados en diestro y proestro, animales en los que el tiempo de evolución fue considerablemente menor. Tomando en cuenta la tasa de desarrollo folicular, en la que los folículos crecen de 300 μm a más de 600 μm en solo 2-3 días, y que hasta 99% de ellos se vuelven atrésicos en este lapso, es posible que si se permitiera a los animales evolucionar un tiempo semejante se obtendría una tasa de atresia semejante sin importar la etapa en que se realiza el tratamiento.

Considerando que los animales no ovularon por la ausencia de una señal preovulatoria que desencadena la secreción de GnRH/LH, se realizó el reemplazo de esta hormona y se encontró que induce la ovulación en prácticamente todos los animales, por lo que el SCN regula la secreción preovulatoria de GnRH. Adicionalmente, el tratamiento también muestra que la actividad secretora de la hipófisis anterior, así como su sensibilidad a la GnRH no se modifica luego de la lesión del SCN, lo mismo ocurre con la sensibilidad de los ovarios a las gonadotropinas.

Si la lesión unilateral del SCN impide la secreción de GnRH/LH y la ovulación, inmediatamente surge la siguiente pregunta: ¿por qué no se liberó la GnRH necesaria para conducir la ovulación? Es posible, que como se ha reportado previamente, el SCN envíe una señal estimulante por la tarde del proestro. Los resultados del reemplazo de la señal estrogénica por la inyección de benzoato de estradiol en la tarde del diestro, muestran que también se necesita la presencia de ambos SCN para que el hipotálamo detecte el aumento en la concentración de estradiol.

Con base en los resultados obtenidos, se propone que el SCN y algunas de las vías dorsales al mismo participan en la regulación de la expresión del ER α en el AVPv. Ante la falta de la estimulación de esos receptores el hipotálamo no puede interpretar la señal ovárica indicativa de que los folículos han madurado y por tanto no se envía ninguna señal al SCN remanente que a su vez resulte en la estimulación de la secreción de la GnRH. Además, que el SCN también participa en la regulación de la expresión del receptor GPR54 en el POA. De ser así, el hipotálamo detecta el aumento en la concentración de estradiol y envía una señal al SCN, el cual estimula la secreción de kisspeptina por parte de las neuronas del AVPv,

lo que no induce la secreción de GnRH. En la **Figura 21** se presenta el modelo que explicaría la regulación que ejerce el SCN sobre la expresión del ER α y del GPR54 propuesta en este estudio.

La falta de respuesta ovulatoria al reemplazo de la señal ovárica (benzoato de estradiol) en los animales con lesión unilateral del SCN tiene otra posible explicación. La cuantificación de la concentración sérica de estradiol de los animales que no ovularon en el primer experimento mostró un aumento de aproximadamente el doble al día del sacrificio (resultados no mostrados). Es posible que no haya ocurrido el decremento natural en la concentración de estrógenos que ocurre en el proestro (Freeman, 1994), mismo que permite la secreción preovulatoria de GnRH/LH. Si la concentración de estradiol permaneció constante es probable que por sí misma inhibiera la secreción de GnRH al actuar como un anticonceptivo. En este caso podemos suponer que el SCN es indispensable para regular la actividad esteroidogénica del ovario.

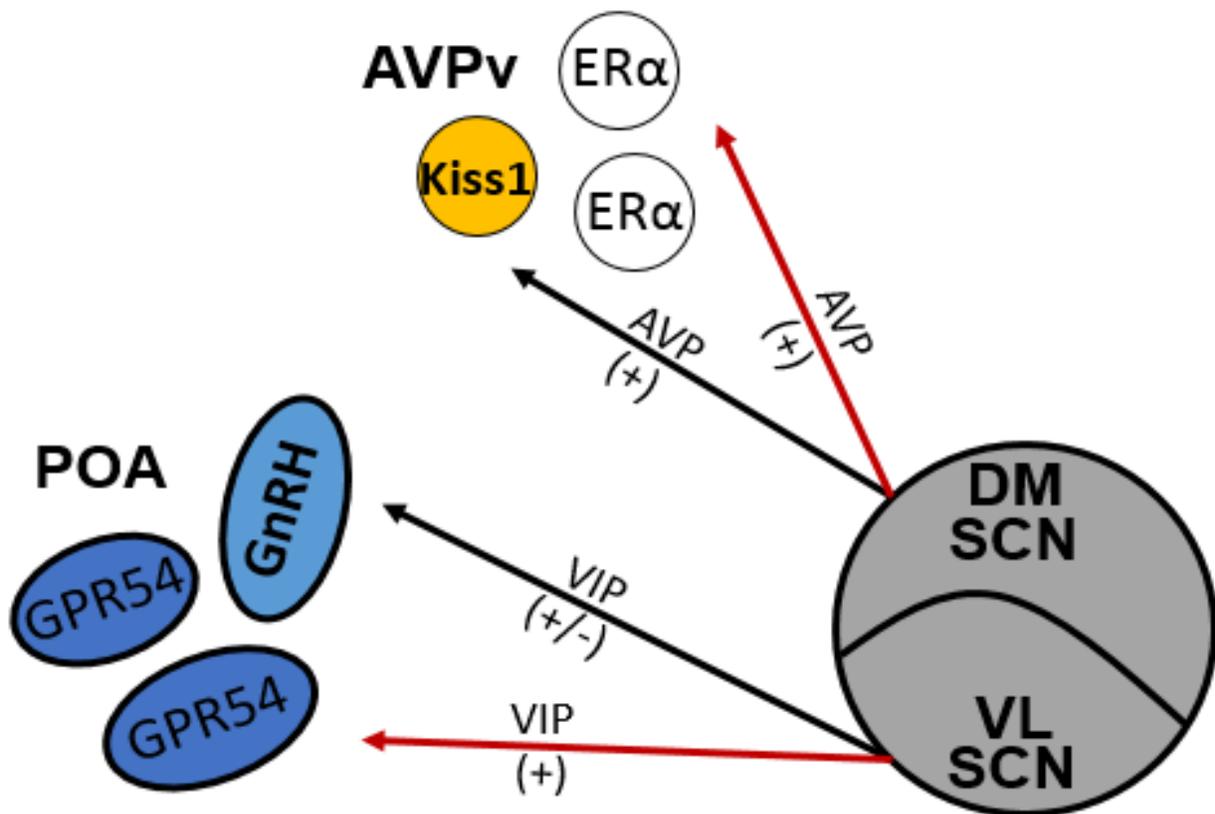


Figura 21. Modelo propuesto sobre las interacciones del SCN con el POA y el AVPv que modulan la expresión del receptor a estrógenos y del receptor a kisspeptina. Como se muestra en flechas rojas, se propone que la porción ventrolateral (VL) del SCN estimula la expresión del receptor a kisspeptina (GPR54) en el POA a través de fibras que transportan péptido intestinal vasoactivo (VIP), mientras que la porción dorsomedial (DM) estimula la del receptor a estrógenos (ER α) en el AVPv a través de fibras que transportan arginina-vasopresina (AVP). Las flechas negras muestran el efecto de dichos neurotransmisores sobre la regulación de la secreción de la GnRH por neuronas del POA y de kisspeptina por neuronas del AVPv.

El SCN se conecta de manera directa o indirecta con las regiones del encéfalo de las cuales se originan los nervios simpáticos y parasimpáticos que inervan al ovario (Buijs y col., 2003). Yoshikawa y colaboradores (2009) muestran que el nervio ovárico superior no forma parte de las vías que mantienen sincronizado al oscilador ovárico con aquel en el SCN y concluyen que la comunicación entre el SCN y el ovario es mediada por las gonadotropinas. Dicho estudio no aborda el papel de la inervación parasimpática del ovario, mediada por el nervio vago. Dado que solo se evaluó la capacidad de sincronización, no se aborda la idea de que información circadiana proveniente del SCN module la secreción de esteroides sexuales por parte de la gónada. Es posible entonces que al lesionar un SCN se interrumpa la coordinación que existe entre ambos osciladores.

Tomando en conjunto los resultados de este estudio, se propone que el SCN modula la capacidad del hipotálamo para responder al aumento en la concentración de estrógenos, que regula la actividad secretora de los ovarios, o ambas. Con la finalidad de esclarecer estas dudas es importante cuantificar la concentración de estradiol en el suero de los animales tratados en este estudio. Posteriormente sería necesario analizar el efecto de la inactivación transitoria del SCN sobre la expresión de los receptores mencionados con la finalidad de determinar si existen cambios en el patrón de expresión que dependan de la interferencia de la actividad neuronal en el SCN.

CONCLUSIONES

1. Existen estructuras dorsales al SCN que, durante el estro y metaestro, son necesarias para la progresión del ciclo estral y para la regulación de la ovulación.
2. Se requiere de ambos SCN para la regulación del ciclo estral, la secreción preovulatoria de GnRH y la ovulación.
3. Ambos lados del SCN son simétricos y estimulantes en la regulación de los procesos antes descritos.
4. El SCN regula otros procesos, en adición a su papel en la regulación de la secreción preovulatoria de GnRH, que son indispensables para la ovulación.

REFERENCIAS

- Abizaid** A, Mezei G, Horvath TL. 2004. Estradiol enhances light-induced expression of transcription factors in the SCN. *Brain Research* (1-2): 35-44.
- Adachi** S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Ssugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. 2007. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in the estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *The Journal of Reproduction and Development* 53(2): 367-378.
- Barbacka-Surowiak** G, Surowiak J, Stoklosowa S. 2003. The involvement of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. *Reproductive Biology* 3(2): 99-129.
- Beale** KE, Kinsey-Jones JS, Gardiner JV, Harrison EK, Thompson EL, Hu MH, Sleeth ML, Sam AH, Greenwood HC, McGavigan AK, Dhillon WS, Mora JM, Li XF, Franks S Bloom SR, O'Bryne KT, Murphy KG. 2014. The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female rats. *Endocrinology* 155(3): 1091-1098.
- Buhr** ED, Takahashi JS. 2013. Molecular components of the mammalian circadian clocks. p. 3-27. *In* Merrow M, Kramer A (eds.) *Handbook of Experimental Pharmacology 217: Circadian Clocks*. Springer. GER.
- Björnström** L, Sjöberg M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology* 19(4): 833-842.
- Bos** NP, Mirmiran M. 1990. Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 511(1): 158-162.
- Brown** SA, Azzi A. 2013. Peripheral circadian oscillators in mammals. p. 45-66. *In* Merrow M, Kramer A (eds.) *Handbook of Experimental Pharmacology 217: Circadian Clocks*. Springer. GER.
- Buijs** RM. 1996. The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. p. 229-240. *In* Buijs RM, Kalsbeek A, Romijn HJ, Pennartz CMA, Mirmiran

M (eds.) Progress in Brain Research Vol. 111: Hypothalamic integration of circadian rhythms. Elsevier. NED.

Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. 2003. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *The Journal of Endocrinology* 177(1): 17-26.

Campbell RE, Gaidamaka G, Han SK, Herbison AE. 2009. Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(26): 10835-10840.

Caraty A, Franceschini I. 2008. Basic aspects of the control of GnRH and LH secretions by kisspeptin: potential applications for better control of fertility in females. *Reproduction in Domestic Animals* 43 (suppl 2): 172-178.

Card JP, Moore RY. 1991. The organization of visual circuits influencing the circadian activity of the suprachiasmatic nucleus. p. 51-74. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic Nucleus the Mind's Clock*. Oxford University Press. USA.

Castañeyra-Ruiz L, González-Marrero I, Castañeyra-Ruiz A, González-Toledo JM, Castañeyra-Ruiz M, de Paz-Carmona H, Castañeyra-Perdomo A, Carmona-Calero EM. 2013. Luteinizing hormone-releasing hormone distribution in the anterior hypothalamus of the female rats. *International Scholarly Research Network Anatomy*. Disponible solo en línea: doi: 10.5402/2013/870721.

Chakraborty TR, Hof PR, Gore AC. 2003. Stereologic analysis of estrogen receptor alpha (ER alpha) expression in rat hypothalamus and its regulation by aging and estrogen. *The Journal of Comparative Neurology* 466(3): 409-421.

Chappell PE. 2005. Clocks and the black box: circadian influences on gonadotropin-releasing hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology* 17(2): 119-130.

Chappell PE, Goodall CP, Tonsfeldt KJ, White RS, Bredeweg E, Latham KL. 2009. Modulation of gonadotrophin-releasing hormone secretion by an endogenous circadian clock. *Journal of Neuroendocrinology* 21(4): 339-345.

Chappell PE, White RS, Mellon PL. 2003. Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *The Journal of Neuroscience* 23(35): 11202-11213.

Charli J, Ponce G, Joseph-Bravo P. 1991. Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. p. 57-81. *In* Domínguez R (ed.) *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Miguel Ángel Porrúa. MEX.

Christian CA, Glidewell-Kenney C, Jameson JL, Moenter SM. 2008. Classical estrogen receptor alpha signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. *Endocrinology* 149(11): 5328-5334.

Christian CA, Moenter SM. 2007. Estradiol induces diurnal shifts in GABA transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons to provide a neural signal for ovulation. *The Journal of Neuroscience* 27(8): 1913-1921.

Christian CA, Moenter SM. 2008. Vasoactive intestinal polypeptide can excite gonadotropin-releasing hormone neurons in a manner dependent on estradiol and gated by time of day. *Endocrinology* 149(6): 3130-3136.

Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 5: S63-S67.

de la Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL. 1995. The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH. *Neuroreport* 6(13): 1715-1722.

de la Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL. 1999. Oestrogen receptor-alpha-immunoreactive neurons project to the suprachiasmatic nucleus of the female Syrian hamster. *Journal of Neuroendocrinology* 11(7): 481-490.

de la Iglesia HO, Meyer J, Schwartz WJ. 2003. Lateralization of circadian pacemaker output: activation of left- and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. *The journal of Neuroscience* 23(19): 7412-7414.

- Domínguez R**, Gaitán CM, Méndez SA, 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. *Endocrinology* 113(1): 37-44.
- Dungan HM**, Gottsh ML, Zeng H, Gragerov A, Bergmann JE, Vassilatis DK, Clifton DK, Steiner RA. 2007. The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 27(44): 12088-12095.
- Dupont S**, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, Chambon P, Mark M. 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127(19): 4277-4291.
- Everett JW**. 1972. Positive feedback of ovarian steroids in rats and monkeys. *Acta Endocrinologica. Supplementum* 166: 145-148.
- Everett JW**, Sawyer CH. 1950. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 47(3): 198-218.
- Everett JW**, Sawyer CH, Markee JE. 1949. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 44(3): 234-250.
- Freeman ME**. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle in the rat. p. 613-658. *In*: Knobil E, Neil JD (eds.). *Physiology of Reproduction*. Raven. USA.
- Gerendai I**, Halász B. 1997. Neuroendocrine asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18(3): 354-381.
- Gillete MU**. 1991. SCN electrophysiology *in vitro*: rhythmic activity and endogenous clock properties. p. 125-143. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.
- Glidewell-Kenney C**, Hurley LA, Pfaff L, Weiss J, Levine JE, Jameson JL. 2007. Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(19): 8173-8177.

Gosden RG, Everett JW, Tyrey L. 1976. Luteinizing hormone requirements for ovulation in the pentobarbital-treated proestrous rat. *Endocrinology* 99(4):1046-1053.

Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, Seminara S, Clifton DK, Steiner RA. 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145(9): 4073-4077.

Gottsch ML, Navarro VM, Zhao Z, Glidewell-Kenney C, Weiss J, Jameson JL, Clifton DK, Levine JE, Steiner RA. 2009. Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 29(29): 9390-9395.

Hahn JD, Coen CW. 2006. Comparative study of the sources of neuronal projections to the site of gonadotrophin-releasing hormone perikarya and to the anteroventral periventricular nucleus in female rats. *The Journal of Comparative Neurology* 494(1): 190-214.

Harris JA, Guglielmotti V, Bentivoglio M. 1996. Diencephalic asymmetries. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 20(4): 637-643.

Hegele-Hartung C, Siebel P, Peters O, Kosemund D, Müller G, Hillisch A, Walter A, Kraetzschmar J, Fritzscheier K. 2004. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America* 101(14): 5129-5134.

Helena CV, de Oliveira Poletini M, Sanvitto GL, Hayashi S, Franci CR, Anselmo-Franci JA. 2006. Changes in alpha-estradiol receptor and progesterone receptor expression in the locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. *The Journal of Endocrinology* 188(2): 155-165.

Herbison AE. 2008. Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Research Reviews* 57(2): 277-287.

Herbison AE. 2015. Physiology of the adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. *In* Plant TM y Zeleznyk AJ. (eds.) *Knobill and Kneill's Physiology of Reproduction*. 4th edition. Academic Press. USA. Press. USA.

- Herbison** AE, Pape JR. 2001. New evidence for estrogen receptors in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology* 22(4): 292-308.
- Hickok** JR, Tischkau SA. 2010. In vivo circadian rhythms in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology* 91(1):110-120.
- Hirshfield** AN, Midgley AR. 1978. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction* 19(1): 597-605.
- Hoffman** GE, Gibbs FP. 1982. LHRH pathways in the rat brain: “deafferentation” spares a sub-chiasmatic LHRH projection to the median eminence. *Neuroscience* 7(8): 1979-1993.
- Honma** S, Shirakawa T, Katsuno Y, Namihira M, Honma K. 1998. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neuroscience Letters* 250(3): 157-160.
- Kalsbeek** A, Fliers E. 2013. Daily regulation of hormone profiles. p. 185-226. *In* Merrow M, Kramer A (eds.) *Handbook of Experimental Pharmacology 217: Circadian Clocks*. Springer. GER.
- Kauffman** AS, Sun Y, Kim J, Khan AR, Shu J, Neal-Perry G. 2014. Vasoactive intestinal peptide modulation of the steroid-induced LH surge involves kisspeptin signaling in young but not in middle-aged female rats. *Endocrinology* 155(6): 2222-2232.
- Kaufman** CM, Menaker M. 1993. Effect of transplanting suprachiasmatic nuclei from donors of different ages into completely SCN lesioned hamsters. *Journal of Neural Transplantation & Plasticity* 4(4): 257-265.
- Kawakami** M, Terasawa E. 1972. Acute effect of neural deafferentation on timing of gonadotropin secretion before proestrus in the female rat. *Endocrinologia Japonica* 19(5): 449-459.
- Kinoshita** M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K. 2005. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146(10): 4431-4436.
- Kriegsfeld** LJ, Silver R. 2006. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Hormones and Behavior* 49(5): 557-574.

- Langub** MC Jr., Watson RE Jr. 1992. Estrogen receptive neurons in the preoptic area of the rat are postsynaptic targets of a sexually dimorphic enkephalinergic fiber plexus. *Brain Research* 573(1): 61-69.
- Le** WW, Berghorn KA, Rassnick S, Hoffman GE. 1999. Periventricular preoptica area neurons coactivated with luteinizing hormone (LH)-releasing hormone (LHRH) neurons at the time of the LH surge are LHRH afferents. *Endocrinology* 140(1): 510-519.
- Lehman** MN, Coolen LM, Goodman RL. 2010. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151(8): 3479-3489.
- Li** XF, Kinsey-Jones JS, Cheng Y, Knox AM, Lin Y, Petrou NA, Roseweir A, Lightman SL, Milligan SR, Millae RP, O'Byrne KT. 2009. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One* 4(12): e8334.
- Loh** DH, Kuljis DA, Azuma L, Wu Y, Truong D, Wang HB, Colwell CS. 2014. Disrupted reproduction, estrous cycle, and circadian rhythms in female mice deficient in vasoactive intestinal peptide. *Journal of Biological Rhythms* 29(5): 355-369.
- Maeda** K, Adachi S, Inoue K, Ohkura S, Tsukamura H. 2007. Metastin/kisspeptin and control of estrous cycle in rats. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 8(1): 21-29.
- Matsui** H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. 2004. Peripheral administration of the metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320(2): 383-388.
- Meijer** JH, Watanabe K, D  tari L, Schaap J. 1996. Circadian rhythm in light response in suprachiasmatic nucleus neurons of freely moving rats. *Brain Research* 741(1-2): 352-355.
- Merchenthaler** I, Lane MV, Numan S, Dellovade TL. 2004. Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocutochemical analyses. *The Journal of Comparative Neurology* 473(2): 270-291.
- Meyer-Bernstein** EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN, Bittman EL. 1999. Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140(1): 207-218.

Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE. 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144(5): 2055-2067.

Mittleman-Smith MA, Williams H, Krajewski-Hall SJ, Lai J, Ciofi P, McMullen NT, Rance NE. 2013. Arcuate kisspeptin/neurokinin B/Dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. *Endocrinology* 153(6): 2800-2812.

Moore RY, Eichler VB. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research* 42(1): 201-206.

Moore RY, Lenn NJ. 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 146(1): 1-14.

Moore RY, Weis R, Moga MM. 2000. Efferent projections of the geniculate leaflet and the ventral lateral geniculate nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 420(3): 398-418.

Nance DM, Bhargava M, Myatt GA. 1984. Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Research Bulletin* 13(5): 651-655.

Nance DM, White JP, Moger WH. 1983. Neural regulation of the ovary: evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control. *Brain Research Bulletin* 10(3): 353-355.

Newman GC. 1991. SCN metabolic activity *in vitro*. p. 157-176. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.

Ohkura S, Uenoyama Y, Yamada S, Homma T, Takase K, Inoue N, Maeda K, Tsukamura H. 2009. Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. *Peptides* 30(1): 49-56.

O'Malley BW, Tsai MJ. 1994. Molecular pathways of steroid receptor action. *Biology of Reproduction* 46(2): 163-167.

Overgaard A, Tena-Sempere M, Franceschini I, Desroziers E, Simonneaux V, Mikkelsen JD. 2013. Comparative analysis of kisspeptin immunoreactivity reveals genuine differences in the hypothalamic Kiss1 systems between rats and mice. *Peptides* 45(1): 85-90.

- Palm IF**, van der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A. 2001. The stimulatory effect of vasopressin on the luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats is time-dependent. *Brain Research* 901(1-2): 109-116.
- Panda S**, Hogenesch JB. 2004. It's all in the timing: many clocks, many outputs. *Journal of Biological Rhythms* 19(5): 374-387.
- Paxinos G**, Franklin KB. 2012. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2nd edition. Elsevier Academic Press. CHN.
- Paxinos G**, Watson C. 2004. *The rat brain in stereotaxic coordinates: the new coronal set*. 5th edition. Elsevier Academic Press. CHN.
- Pedram A**, Razandi M, Lewis M, Hammes S, Levin ER. 2014. Membrane-localized estrogen receptor α is required for normal organ development and function. *Developmental cell* 29(4): 482-490.
- Phelps CP**, Krieg RJ, Sawyer CH. 1976. Spontaneous and electrochemically stimulated changes in plasma LH in the female rat following hypothalamic deafferentation. *Brain Research* 101(2): 239-249.
- Piet R**, Fraissenon A, Boehm U, Herbison AE. 2015. Estrogen permits vasopressin signaling in preoptic kisspeptin neurons in the female mouse. *The Journal of Neuroscience* 35(17): 6881-6892.
- Prasai MJ**, Pernicova I, Grant PJ, Scott EM. 2011. An endocrinologist's guide to the clock. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96(4): 913-922.
- Prosser RA**. 1998. *In vitro* circadian rhythm of the mammalian suprachiasmatic nuclei: comparison of multi-unit and single-unit neuronal activity recordings. *Journal of Biological Rhythms* 13(1): 30-38.
- Refinetti R**. 2006. Receptors. p. 387-443. *In Refinetti R (ed.) Circadian physiology*. 2nd edition. CRC Press. USA.
- Roa J**, Navarro VM, Tena-Sempere M. 2011. Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments. *Biology of Reproduction* 85(4): 650-660.
- Roa J**, Vigo E, Castellano JM, Gaytan F, Navarro VM, Aguilar E, Dijcks FA, Ederveen AG, Pinilla L, van Noord PI, Tena-Sempere M. 2008. Opposite roles of estrogen receptor (ER)- α and ER β in the

modulation of luteinizing hormone responses to kisspeptin in the female rat: implications for the generation of the preovulatory surge. *Endocrinology* 149(4): 1627-1637.

Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS. 2009. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150(8): 3664-3671.

Roy EJ, Lynn DM. 1987. Asymmetry in responsiveness of the hypothalamus of the female rat to estradiol. *Physiology and Behavior* 40(2): 267-269.

Saitoh Y, Matsui Y, Nihonmatsu I, Kawamura H. 1991. Cross-species transplantation of the suprachiasmatic nuclei from rats to Siberian chipmunks (*Eutamias sibiricus*) with suprachiasmatic lesions. *Neuroscience Letters* 123(1): 77-81.

Schwartz WJ. 1991. SCN metabolic activity *in vivo*. p. 144-156. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.

Schwartz WJ, Davidsen LC, Smith CB. 1980. *In vivo* metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 189(1): 157-167.

Schwartz WJ, Reppert SM, Eagan SM, Moore-Ede MC. 1983. *In vivo* metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Research* 274(1): 184-187.

Seegal RF, Goldman BD. 1975. Effects of photoperiod on cyclicity and serum gonadotropins in the Syrian hamster. *Biology of Reproduction* 12(2): 223-231.

Shibata S, Moore RY. 1987. Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research* 34 (1): 311-315.

Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW. 1983. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. *Nature* 304(5924): 345-347.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 388(4): 507-525.

Silva CC. 2013. Respuesta ovulatoria a la lesión del núcleo supraquiasmático a las 9:00 h en cada etapa del ciclo estral de la rata adulta. Tesis de Licenciatura para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Silverman J, Jhamandas J, Renaud LP. 1987. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 7(8): 2312-2319.

Simodian SX, Spratt DP, Herbison AE. 1999. Identification and characterization of estrogen receptor α -containing neurons projecting to the vicinity of the Gonadotropin-Releasing Hormone perikarya in the Rostral Preoptic Area of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 411(2): 346-358.

Simerly RB. 1991. Prodynorphin and proenkephalin gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the rat: sexual differentiation and hormonal regulation. *Molecular and Cellular Neurosciences* 2(6): 473-484.

Simerly RB, Swanson LW. 1987. The distribution of neurotransmitter-specific cells and fibers in the anteroventral periventricular nucleus: implications for the control of gonadotropin secretion in the rat. *Brain Research* 400(1): 11-34.

Simerly RB, Swanson LW, Gorski RA. 1985. The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. *Brain Research* 330(1): 55-64.

Simerly RB, Young BJ, Carr AM. 1996. Co-expression of steroid hormone receptors in opioid peptide-containing neurons correlates with patterns of gene expression during the estrous cycle. *Brain Research. Molecular Brain Research* 40(2): 275-284.

Smarr BL, Gile JJ, de la Iglesia HO. 2013. Oestrogen-independent circadian clock gene expression in the anteroventral periventricular nucleus in the female rats: possible role as an integrator for circadian and ovarian signals timing the luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroendocrinology* 25(12): 1273-1279.

Smarr BL, Morris E, de la Iglesia HO. 2012. The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of *Kiss1* and luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 153(6): 2839-2850.

Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. 2006. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 131(4): 623-630.

Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146(9): 3686-3692.

Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. 2006b. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 26(25): 6687-6694.

Sollar PJ, Kimble DP, Pickard GE. 1995. Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic heterografts. *The Journal of Neuroscience* 15(3 pt 2): 2109-2122.

Stetson MH, Watson-Whitmyre M, Dipinto MN, Smith SG. 1981. Daily luteinizing hormone release in ovariectomized hamsters: effect of barbiturate blockade. *Biology of Reproduction* 24(1): 139-144.

Stephan FK, Sucker I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(6): 1583-1586.

Uenoyama Y, Inoue N, Pheng V, Homma T, Takase K, Yamada S, Ajiki K, Ichikawa M, Okamura H, Maeda KL, Tsukamura H. 2011. Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of rats: implications of axo-axonal regulation of GnRH release. *Journal of Neuroendocrinology* 23(10): 863-870.

van der Beek EM. 1996. Circadian control of reproduction in the female rat. p. 295-320. *In* Buijs RM, Kalsbeek A, Romijn HJ, Pennartz CMA, Mirmiran M (eds.) *Hypothalamic integration of circadian rhythms*. Progress in Brain Research Vol. 111. Elsevier. NED.

van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, Van der Hurk R, Buijs RM. 1997a. Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *The journal of Comparative Neurology* 384(4): 569-579.

van der Beek EM, van Oudheusden HJ, Buijs RM, van der Donk HA, van der Hurk R, Wiegant VM. 1994. Preferential induction of c-fos immunoreactivity in vasoactive intestinal polypeptide-innervated

gonadotropin-releasing hormone neurons during a steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology* 134(6): 2636-2644.

van der Beek EM, Wiegant VM, van der Donk HA, van der Hurk R, Buijs RM. 1993. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat. *Journal of Neuroendocrinology* 5(2): 137-144.

van der Beek EM, Wiegant VM, van Oudheusden HJ, van der Donk HA, van den Hurk R, Buijs RM. 1997b. Synaptic contacts between gonadotropin-releasing hormone-containing fibers and neurons in the suprachiasmatic nucleus and perichiasmatic area: an anatomical substrate for feedback regulation? *Brain Research* 755(1): 101-111.

Vida B, Deli L, Hrabovszky E, Kalamantianos T, Caraty A, Coen CW, Lipisits Z, Kalló I. 2010. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *Journal of Neuroendocrinology*. 22(9): 1032-1039.

Watson RE, Langub MC, Engle MG, Maley BE. 1995. Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Research* 689(2): 254-264.

Watson RE, Langub MC, Landis JW. 1992. Further evidence that most luteinizing hormone-releasing hormone neurons are not directly estrogen-responsive: simultaneous localization of luteinizing hormone-releasing hormone and estrogen receptor immunoreactivity in the guinea-pig brain. *Journal of Neuroendocrinology* 4(3): 311-317.

Weick RF, Stobie KM. 1995. Role of VIP in the regulation of LH secretion in the female rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19(2): 251-259.

Williams WP 3rd, Jarjisian SG, Mikkelsen JD, Kriegsfeld LJ. 2011. Circadian control of kisspeptin and gated GnRH response mediate preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 152(2): 595-606.

Wintermantel TM, Campbell RE, Porteous R, Bock D, Gröne HJ, Todman MG, Korach KS, Greiner E, Pérez CA, Schütz G, Herbison AE. 2006. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52(2): 271-280.

- Wirtshafter** D, Asin K, Kent EW. 1979. Simple technique for midline stereotaxic surgery in the rat. *Physiology & Behavior* 23(2): 409-410.
- Xu** Z, Kaga S, Mochiduki A, Tsubomizu J, Adachi S, Sakai T, Inoue K, Adachi AA. 2012. Immunocytochemical localization of kisspeptin neurons in the rat forebrain with special reference to sexual dimorphism and interaction with GnRH neurons. *Endocrine Journal* 59(2): 161-171.
- Yahr** P, Greene SB. 1992. Effects of unilateral hypothalamic manipulations on the sexual behaviors of rats. *Behavioral Neuroscience* 106(4): 698-709.
- Yamazaki** S, Kerbeshian MC, Hocker CG, Block GD, Menaker M. 1998. Rhythmic properties of the hamster suprachiasmatic nucleus *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* 18(24): 10709-10723.
- Yeo** SH. 2013. Neuronal circuits in the hypothalamus controlling gonadotrophin-releasing hormone release: the neuroanatomical projections of kisspeptin neurons. *Experimental Physiology* 98(11): 1544-1549.
- Zhao** S, Kriegsfeld LJ. 2009. Daily changes in GT1-7 cell sensitivity to GnRH secretagogues that trigger ovulation. *Neuroendocrinology* 89(4): 448-457.

La Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C.

Otorga la presente

Constancia

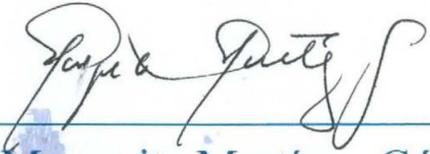
A CC Silva, DP Benítez, J Monroy, ME Ayala, A Flores, R Domínguez.

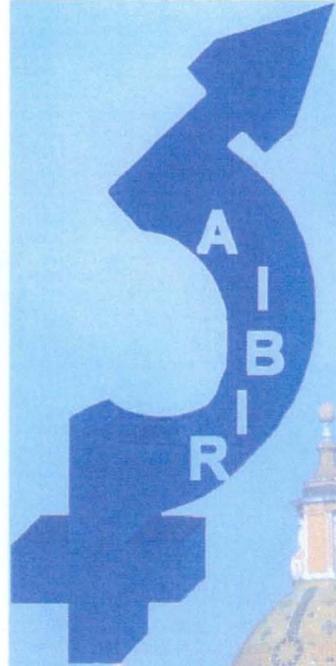
Por la presentación del cartel:

El núcleo supraquiasmático izquierdo no es igual que el derecho en la regulación de la ovulación

En la XXXVIII Reunión Anual de la AIBIR, llevada a cabo en la ciudad de Cholula, Pue., del 11 al 14 de junio del 2013

Dr. Jose Ramón Eguibar Cuenca
Presidente


Dra. Margarita Martínez Gómez
Secretaria





Neuroscience 2015

June 24, 2015

Dear Carlos Silva,

Thank you for submitting a scientific abstract for [Neuroscience 2015](#) (October 17-21, Chicago, IL). Your abstract, "The suprachiasmatic nuclei, asymmetries and the involvement on non-proestrous events in the regulation of ovulation," has been accepted into the program and is scheduled in the session listed below. Session placement is final and cannot be changed. You have received this e-mail because you are listed as the first/presenting author of this abstract. Please share with co-authors as needed, as they will not receive an acceptance e-mail.

Session Type: Poster

Session Number: 168

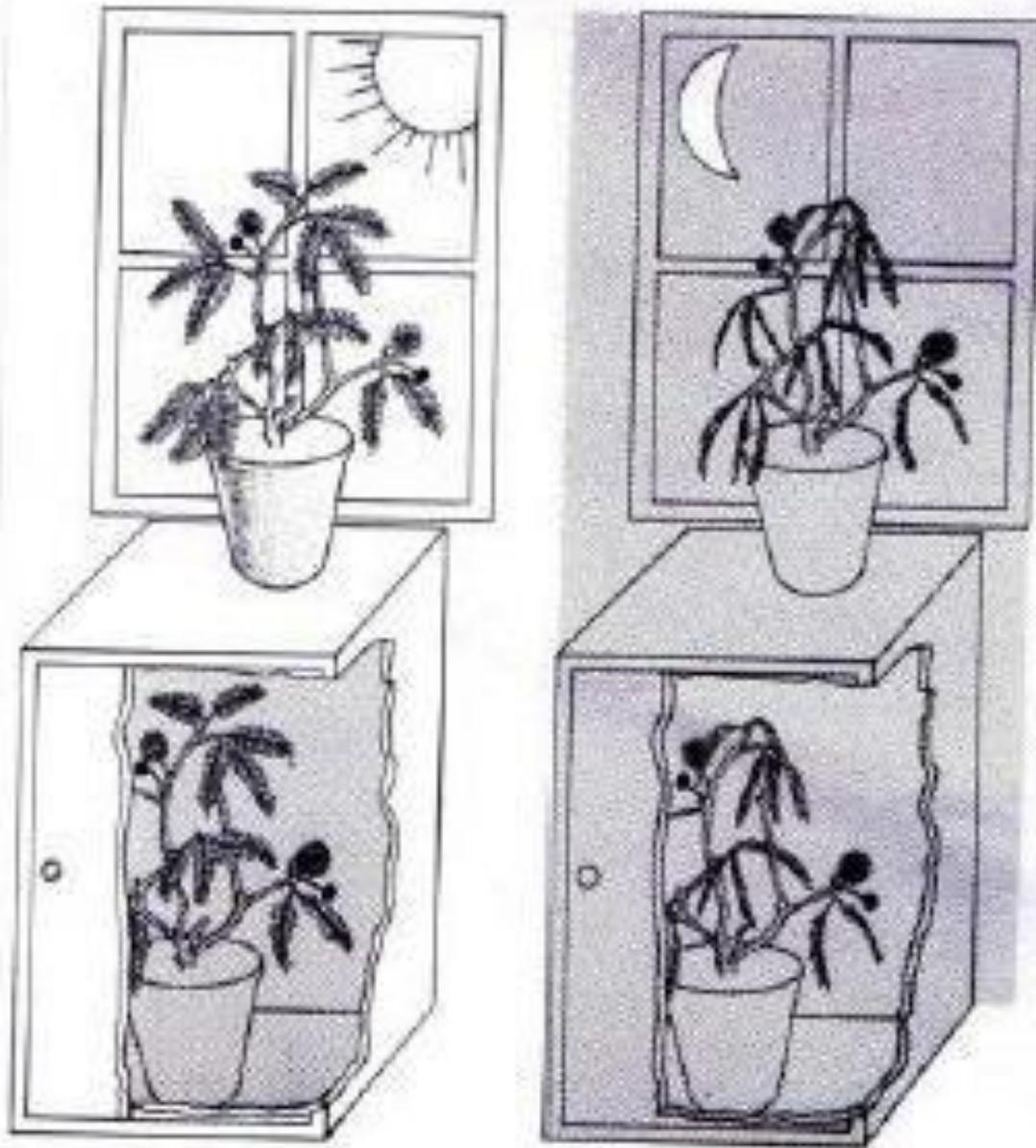
Session Title: Suprachiasmatic Nucleus Anatomy, Physiology, and Neurochemistry

Date and Time: Sunday Oct 18, 2015 8:00 AM - 12:00 PM

Location: McCormick Place: Hall A

Abstract Control Number: 2961

Within each four-hour session, abstracts are given a specific one-hour presentation time. In late July, you will receive another e-mail that will inform you of your specific one-hour presentation time and number. It will also allow you to request audiovisual equipment and provide [links for preparing your poster](#).



“...the beauty of science comes from the unexpected findings that change the focus of the things, that allows to link concepts and to understand what before couldn't be understood.”

Menaker M.