



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EL SISTEMA COLINÉRGICO DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO
(NSQ) MODULA LAS FUNCIONES DE LOS OVARIOS,
VÍA LOS NERVIOS VAGO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. LETICIA MORALES LEDESMA.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.
DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN-MATZUMURA.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.**

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EL SISTEMA COLINÉRGICO DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

(NSQ) MODULA LAS FUNCIONES DE LOS OVARIOS,

VÍA LOS NERVIOS VAGO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.**

COMITÉ TUTOR:

DRA. LETICIA MORALES LEDESMA.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.

DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN-MATZUMURA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE, 2016

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

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 26 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna, **VIEYRA VALDEZ ELIZABETH** con número de cuenta **402103422** con la tesis titulada **"EL SISTEMA COLINÉRGICO DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (NSQ) MODULA LAS FUNCIONES DE LOS OVARIOS, VÍA LOS NERVIOS VAGO"**, bajo la dirección del Tutor Principal: **DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ**:

Presidente: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
Vocal: DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA
Secretario: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
Suplente: DRA. ERIKA MONSERRAT ESTRADA CAMARENA
Suplente: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 01 de agosto de 2016.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDÍ ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM** por permitir formarme en el programa y por los apoyos otorgados durante el mismo.

La realización del presente trabajo de investigación conto con el apoyo de la beca No. 294047/225398 durante el periodo 2012-2015, otorgado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**.

El presente trabajo de investigación fue apoyado por lo proyectos **UNAM-DGAPA-PAPIIT IN-217016** y **Beca CONACyT 236908**.

Mi más sincero agradecimiento al comité tutor:

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Por brindarme su apoyo y valioso tiempo en la realización y enriquecimiento de esta

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los miembros del jurado:

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Ana Lilia Cerda Molina

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Erika Monserrat Estrada Camarena

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Por sus valiosas contribuciones en la realización de esta investigación.

A la **Dra. Leticia**: Por su grandiosa amistad, enseñanzas de vida, porque siempre está dispuesta y al pendiente de todo lo necesario para concluir con proyectos como este y porque sé que puedo contar con usted como una amiga.

Al **Dr. Roberto**: Por sus críticas constructivas, apoyo y consejos brindados durante la realización de este estudio. Además, por su valiosa amistad y consejos.

Al **Dr. Pablo**: Por su valiosa amistad y su apoyo incondicional en todo momento en el transcurso de la realización de esta tesis.

A mis amigas y colegas **Rosa, Deyra y Gaby** porque siempre están ahí para lo necesario y porque esta amistad trasciende en los tiempos.

A todos mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción: *Azucena, Liz, Wendy, Misael, Rocio, Valeria, Dra. Paty*. Y en especial a *Noé, Carolina, Julio, Iván, David y Griss* por permitir transmitirles mis conocimientos y aprender de cada uno de ellos.

Dra. Esther y a la **Dra. Paty**, por la gran disponibilidad que tuvieron en todo momento por su confianza, apoyo incondicional y amistad.

Dra. Adrina, al **Dr. Román**, a la **Dra. Elizabeth** y al personal del bioterio de la FES Zaragoza por el cuidado de los animales utilizados en este estudio.

Gracias infinitas a todos por ser parte de este logro.

DEDICATORIA

A mi familia:

Siempre me he sentido maravillada por la hermosa familia que tengo, se han preocupado de mí desde el momento en que llegué a este mundo, me han formado para saber cómo luchar y salir victoriosa ante las diversas adversidades de la vida. Muchos años después, sus enseñanzas no cesan, y aquí estoy, con un nuevo logro exitosamente conseguido, mi proyecto de tesis de doctorado.

Quiero agradecerles por todo, no me alcanzan las palabras para expresar el orgullo y lo bien que me siento por tener una familia tan asombrosa.

A mis padres: Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo mantenido a través del tiempo. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ustedes que son todo para mí. Es un privilegio ser su hija. Son los mejores padres, los amo.

A mis hermanos: Quisiera poder expresarles todo lo que hay en mi corazón por ustedes. Sé que no es casualidad que Dios nos haya puesto en el mismo lugar para que nos acompañáramos los unos a los otros. Gracias hermanos por estar siempre en los instantes más fundamentales de mi vida y por apoyar a que nuestra familia salga cada día adelante. Los amo con todo mi corazón. A nuestra traviesa porque es la alegría y la fortaleza de nuestras vidas.

A mi amor: por su comprensión, aliento, fortaleza, amor, tiempo y espacio brindado para la realización de este estudio y porque en algún momento de nuestras vidas lleguemos a ser uno solo. Te amo

Cuanto mayor es la dificultad, mayor es la gloria.

Cicerón

En memoria de Mi Madre Lorenza.

28/Julio/2016

ESTRUCTURA DE LA TESIS

Esta tesis aborda la participación del sistema colinérgico del núcleo supraquiasmático (NSQ), en la regulación de la ovulación y la concentración en suero de hormonas esteroideas sexuales, así como la participación de los nervios vagos como una posible vía de comunicación entre el NSQ y los ovarios. La información se agrupó en secciones generales y en capítulos con temas específicos. La primera parte corresponde al marco teórico de esta tesis y la segunda al escrito aceptado para su publicación, dos que serán enviados a revistas para su publicación y el análisis general de los resultados obtenidos. El formato de los escritos atiende a las normas editoriales de cada revista.

El capítulo I incluye una investigación documental con las bases teóricas que dan sustento a esta investigación. En la tesis se plantearon cuatro objetivos, los cuales fueron cubiertos con la realización de tres artículos. Por esta razón, en el **capítulo II** se encuentran los resultados de los efectos del bloqueo del sistema colinérgico del NSQ a las 09.00 ó 19.00 h del diestro-1 o proestro, sobre las funciones ováricas. En el **capítulo III** se encuentran los resultados sobre los efectos de la estimulación del sistema colinérgico del NSQ a las 09.00 ó 19.00 h del proestro, sobre la ovulación y la secreción de hormonas esteroideas. En el **capítulo IV** se evaluó la participación del nervio vago en el animal con bloqueo o estimulación del sistema colinérgico del NSQ sobre las funciones del ovario. Finalmente, en el **capítulo V** incluye el análisis y la discusión general de los resultados obtenidos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	<i>i</i>
RESUMEN.....	<i>ii</i>
ABSTRACT.....	<i>iv</i>
CAPÍTULO I	
Introducción General.....	1
Planteamiento del Problema.....	21
Hipótesis.....	22
Objetivo General.....	23
Objetivos Particulares.....	23
CAPÍTULO II	
Unilaterally blocking the muscarinic receptors in the suprachiasmatic nucleus in proestrus rats prevents pre-ovulatory LH secretion and ovulation.....	24
CAPÍTULO III	
Effects of unilaterally microinjecting acetylcholine in the suprachiasmatic nucleus on ovulatory responses.....	54
CAPÍTULO IV	
Effects of the vagotomy on ovulation, progesterone and estradiol levels in rats with blockade or stimulation of the cholinergic system of the suprachiasmatic nucleus.....	67
CAPITULO V	
Discusión General.....	85
CONCLUSIONES GENERALES.....	93
PERSPECTIVAS.....	94
REFERENCIAS GENERALES.....	95

ABREVIATURAS

- **ACh:** Acetilcolina
- **AChE:** Acetilcolinesterasa
- **AHA:** Área hipotalámica anterior
- **ARC:** Núcleo arcuato
- **AVP:** Arginina-vasopresina
- **AVPV:** Núcleo periventricular anteroventral
- **ChAT:** Acetilcolintransferasa
- **DBB:** Banda diagonal de Broca
- **DMV:** Núcleo dorsal motor del vago
- **FSH:** Hormona estimulante del folículo
- **GABA:** Ácido gama amino butírico
- **GHT:** Tracto genículo-hipotalámico
- **GnRH:** Factor liberador de la hormona luteinizante
- ***Kiss1*:** Gen que codifica para kisspeptina
- **LDTg:** Núcleo tegmental latero-dorsal
- **LH:** Hormonas Luteinizante
- **mAChR:** Receptor muscarínico
- **mPOA:** Área preóptica medial
- **nAChR:** Receptor nicotínico
- **NBM:** Núcleo basal magnocelular
- **NSQ:** Núcleo supraquiasmático
- **NTS:** Núcleo del tracto solitario
- **POA:** Área preóptica
- **POA-AHA:** Área preóptica hipotalámica anterior
- **PPTg:** Núcleo tegmental pedunculopontino
- **PVN:** Núcleo paraventricular del hipotálamo
- **RHT:** Tracto retino-hipotalámico
- **RP3V:** Región periventricular rostral del tercer ventrículo
- **SNC:** Sistema nervioso central
- **VAcHT:** Transportador vesicular de acetilcolina
- **VIP:** Péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

A partir de evidencias experimentales se propone que el sistema colinérgico y el núcleo supraquiasmático (NSQ) participan en la regulación de las funciones de los ovarios: ovulación y la secreción de hormonas esteroides. Además, que el NSQ se comunica con varios órganos por vías multi-sinápticas que incluyen al nervio vago.

En el presente estudio se evaluó la participación del sistema colinérgico del NSQ sobre la respuesta ovulatoria y la concentración de hormonas esteroides en suero mediante el análisis de: 1) Los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos presentes en el NSQ (por la micro-inyección de atropina) y 2) por la estimulación del sistema colinérgico del NSQ (por la micro-inyección de acetilcolina), en la mañana (09.00 h) o noche (19.00 h) de los días del diestro-1 o proestro.

Para analizar la participación del nervio vago en la comunicación del NSQ con los ovarios, se evaluaron los efectos de la sección unilateral del nervio vago en animales con previo bloqueo o estimulación del sistema colinérgico del NSQ, sobre las funciones ováricas.

Los resultados del estudio muestran que en el día del diestro-1 la micro-inyección de atropina a las 09.00 ó 19.00 h no modificó la ovulación. En cambio, la micro-inyección de atropina en el NSQ derecho a las 09.00 h del proestro, bloquea la ovulación (1/9 ovularon) y el pico pre-ovulatorio de la hormona luteinizante (LH), mientras que el tratamiento en el NSQ izquierdo bloqueó parcialmente la ovulación (8/14 ovularon) y la secreción de LH. La inyección de atropina a las 19.00 h del proestro no modificó la respuesta ovulatoria, mientras que las concentraciones de progesterona y estradiol fueron más bajas que las del grupo control. Con estos resultados sugerimos que la participación del sistema colinérgico del NSQ en la regulación de la ovulación y la secreción de LH, progesterona y estradiol es estimulante, asimétrica y varía en función de la hora y el día del ciclo estral.

La micro-inyección de acetilcolina a las 09.00 h del proestro en el NSQ derecho bloqueó la ovulación en el 50% de los animales tratados. Este resultado nos sugiere que la participación de la inervación colinérgica aferente a los NSQ sobre las funciones ováricas varía en función de la hora del día y es asimétrica.

En la mañana del proestro, la sección del nervio vago derecho en animales con bloqueo del sistema colinérgico del NSQ, resultó en la ovulación en 75% de los animales tratados. Con base en este resultado, proponemos que la información colinérgica que recibe el NSQ derecho en la mañana del proestro modula de manera estimulante los mecanismos que regulan la ovulación, por lo que sugerimos que la sección sub-diafragmática del nervio vago resultó en una sobre-estimulación aguda que llega al sistema nervioso central (SNC), al ovario y las adrenales. En el caso del SNC, esta sobre-estimulación al llegar a los núcleos hipotalámicos donde se localizan las neuronas GnRHérgicas, estimula la secreción de GnRH, de LH y la ovulación. Dado que la sección del nervio vago derecho restableció la ovulación en ambos ovarios, es posible que el nervio vago derecho forma parte de la vía multi-sináptica que comunica al NSQ derecho con ambos ovarios. Estos resultados apoyan la idea de que el nervio vago derecho es parte de la vía multi-sináptica de comunicación entre el NSQ y los ovarios.

En conjunto, los resultados del presente estudio nos sugieren que la inervación colinérgica aferente del NSQ modula las funciones de los ovarios y que el nervio vago derecho forma parte de la vía de comunicación nerviosa entre ambos.

Palabras clave: *núcleo supraquiasmático, sistema colinérgico, nervio vago, ovulación, progesterona, estradiol, LH.*

ABSTRACT

There is evidence that the cholinergic system and the suprachiasmatic nucleus (SCN) participates in the regulation of neuroendocrine mechanisms regulating ovulation: ovulation and steroids hormones secretion. In addition, the SCN communicates with multiple organs by multi-synaptic pathways including the vagus nerve.

In the present study, I evaluated the involvement of the cholinergic system of the SCN on the regulation of ovulation and steroid hormones secretion by analyzing 1. The effects of blocking the muscarinic receptors present in the SCN (by micro-injection of atropine). 2. And by stimulating the cholinergic system of the SCN (by micro-injection of acetylcholine) in the morning (09.00) or evening (19.00 h) of the days of diestrus-1 or proestrus.

To analyze the participation of the vagus nerve in the communication of the SCN with the ovaries, I evaluated the effects of unilateral section of the vagus nerve in animals with previous blockade or stimulation of the cholinergic system of the SCN on ovarian functions.

The results of the study show that on the day of the diestrus-1, the blockade of muscarinic receptors in the SCN at 09.00 or 19.00 h did not modified the ovulation. Instead, the microinjection of the atropine in the right-SCN at 09.00 h of the proestrus, blocked ovulation (1/9 ovulated) and the pre-ovulatory luteinizing hormone (LH) peak levels, while this treatment in the left-SCN partially blocked ovulation (8/14 ovulated) and the LH secretion. The atropine injection at 19.00 h of the proestrus in either side of the SCN did not modify ovulation, while progesterone and estradiol levels were lower than the control group. Present results suggest that the cholinergic system of SCN has a stimulating role in regulating ovulation and LH, progesterone and estradiol secretion, which varies depending on the time and day of the estrous cycle, and presents asymmetry.

The stimulation of the SCN cholinergic system by micro-injecting acetylcholine at 09.00 h of proestrus in the right SCN blocked ovulation in 50% of treated animals. This result support the idea that the involvement of SCN cholinergic innervation on the regulation of ovarian functions varies depending on the time of day and is asymmetrical.

The section of the right vagus nerve in animals with blockade of the SCN cholinergic system, performed at 09.00 of proestrus, resulted in ovulation in 75% of treated animals. This result suggest that the cholinergic information received by the right SCN in the morning of proestrus, modulates the mechanisms regulating ovulation in a stimulatory way. Then, we suggest that the sub-diaphragmatic vagal nerve section resulted in an acute over-stimulation that reaches the central nervous system, the ovaries, adrenals and almost all sub-diaphragmatic organs. In the central nervous system, the overstimulation would reach the hypothalamic nuclei where GnRHergic neurons are located, resulting in increased secretion of GnRH, LH and ovulation. Since the section of the right vagus nerve restored ovulation in both ovaries, is possibility that the right vagus nerve is part of the multi-synaptic pathway connecting the right SCN with both ovaries. These results support the idea that the right vagus nerve is part of the multi-synaptic communication route between the SCN and ovaries.

Taken together, the results of this study suggest that the afferent cholinergic innervation of the SCN modulates the functions of the ovaries and that the right vagus nerve is part of the nerve pathway communication between them.

Key words: *suprachiasmatic nucleus, cholinergic system, vagus nerve, ovulation, progesterone, estradiol, LH.*

CAPÍTULO I

Introducción General

REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES DE LOS OVARIOS

Las funciones de los ovarios, la ovulación y secreción de hormonas esteroideas y proteínicas, son reguladas por señales neuroendocrinas que provienen del sistema nervioso central (SNC), la hipófisis, la tiroides, las adrenales, y del propio ovario (Choi y Smitz, 2014; Uchida y Kagitani, 2015). En el hipotálamo se secreta la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), la cual estimula la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés). La primera estimula el crecimiento, desarrollo, la maduración folicular y la síntesis de estradiol y la segunda induce la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la síntesis de progesterona y testosterona (Palermo, 2007; Richards y Pangas, 2010). La ovulación es el proceso por el cual el ovario libera hacia el oviducto uno o varios ovocitos capaces de ser fecundados. Para que se produzca la ovulación es necesario que, a determinada hora del día, el o los folículos pre-ovulatorios hayan alcanzado un grado de desarrollo y maduración necesarios para que el aumento brusco y el descenso de la concentración de LH, estimulen los cambios necesarios en el ovocito, la pared del folículo y de las células de la granulosa y de la teca interna, que conllevan a la expulsión del(os) ovocito II u ovocito secundario. El aumento en la liberación de LH es precedido por el incremento y la caída de las concentraciones de estradiol en plasma (Choi y Smitz, 2014).

Los mecanismos que regulan el aumento de la concentración de estradiol y LH previos a la ovulación incluyen la participación de varios sistemas de neurotransmisión, entre ellos el sistema colinérgico (Everett y col., 1949; Delgado y col., 2010; Cruz y col., 2015).

Las funciones de los ovarios también son reguladas por señales nerviosas que les llegan vía los nervios vago, los nervios ovárico superior y los nervios del plexo ovárico (Lawrence y Burden, 1980; Gerendai y col., 2000). Los somas de las neuronas que originan a los nervios vago se localizan en cuatro núcleos del bulbo raquídeo: el núcleo dorsal motor del vago (DMV, por sus siglas en inglés), el núcleo del tracto solitario (NTS, por sus siglas en inglés), el núcleo espinal del nervio trigémino y el núcleo ambiguo (Gerendai y col., 2000). Según Gerendai y colaboradores (2000) el nervio vago es una vía de comunicación entre el ovario y el hipotálamo. En el ganglio nodoso y en las células ganglionares de la raíz dorsal de los segmentos T10 a L2 de la médula espinal, se localizan los somas de las neuronas que inervan al ovario, vía el nervio vago (Burden y col., 1983). En los nervios vago hay fibras que contienen acetilcolina (ACh, por sus siglas en inglés), sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina,

somatostatina, gastrina o el péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés) (Klein y Burden, 1988).

Algunos estudios histológicos muestran que en el ovario hay fibras nerviosas que son positivas a la acetilcolinesterasa (AChE, por sus siglas en inglés), aunque no se ha probado que éstas provienen del nervio vago (Burden y Lawrence, 1978). Algunos autores describen la presencia de fibras que contienen marcadores característicos de las fibras sensoriales, probablemente de origen vagal, las que se localizan en la periferia de los folículos en crecimiento y se asocian con la vascularización ovárica (Dissen y Ojeda, 1999). Mayerhofer y Kunz, (2005) proponen que la ACh que proviene de la inervación extrínseca e intrínseca del ovario, llega a las células de la granulosa y al ovocito por difusión, ya que el folículo es un compartimiento celular avascular.

La información nerviosa originada en el SNC llega a los ovarios por varias vías multisinápticas. Diversos núcleos cerebrales contienen los somas neuronales cuyas fibras forman parte de esas vías multisinápticas que llegan a los ovarios y regulan sus funciones (Gerendai y col., 2005; 2009). El núcleo supraquiasmático (NSQ) es uno de los núcleos hipotalámicos que regula la actividad de diversos órganos por vías multi-sinápticas, entre ellos la glándula adrenal, hígado, páncreas, tejido graso, corazón y los ovarios (Bamshad y col., 1998; Gerendai y col., 2000; La Fleur y col., 2000; Buijs y Kalsbeek, 2001; Scheer y col., 2001; Kreier y col., 2002; Buijs, 2013; Leliavski y col., 2015).

La regulación que ejerce el NSQ sobre los órganos periféricos utiliza vías simpáticas y parasimpáticas. Buijs y Kalsbeek, (2001) han mostrado que las neuronas pre-autonómicas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN, por sus siglas en inglés) del hipotálamo proyectan vías simpáticas pre-ganglionares a la columna intermedio-lateral de la médula espinal (IML, por sus siglas en inglés), las cuales regulan la información simpática que llega a los órganos periféricos. Otras neuronas parasimpáticas del PVN proyectan neuronas hacia el DMV y al NTS. La información simpática generada por algunos órganos periféricos regresa a la médula espinal a nivel de los estratos I y V del asta dorsal y llegan al hipotálamo, por sus sinapsis en el núcleo parabraquial. La información sensorial vagal generada en los órganos periféricos llega al NTS, es enviada al DMV y alcanza al hipotálamo por vías directas o indirectas a través del núcleo parabraquial (Buijs, 2006; 2013). En la figura 1 se muestran estas vías de comunicación entre el NSQ y órganos periféricos.

Buijs y colaboradores (2014) mostraron que el NSQ se comunica de forma directa con el NTS, uno de los centros donde se integra la información sensorial (Travagli, 2007), los autores sugieren que ésta es una vía de comunicación directa entre el NTS y el NSQ que puede proporcionar una vía de regulación entre el NSQ y los órganos periféricos. Esta vía de comunicación neural es de tipo glutamatérgica lo que nos sugiere una vía excitatoria (Figura 1).

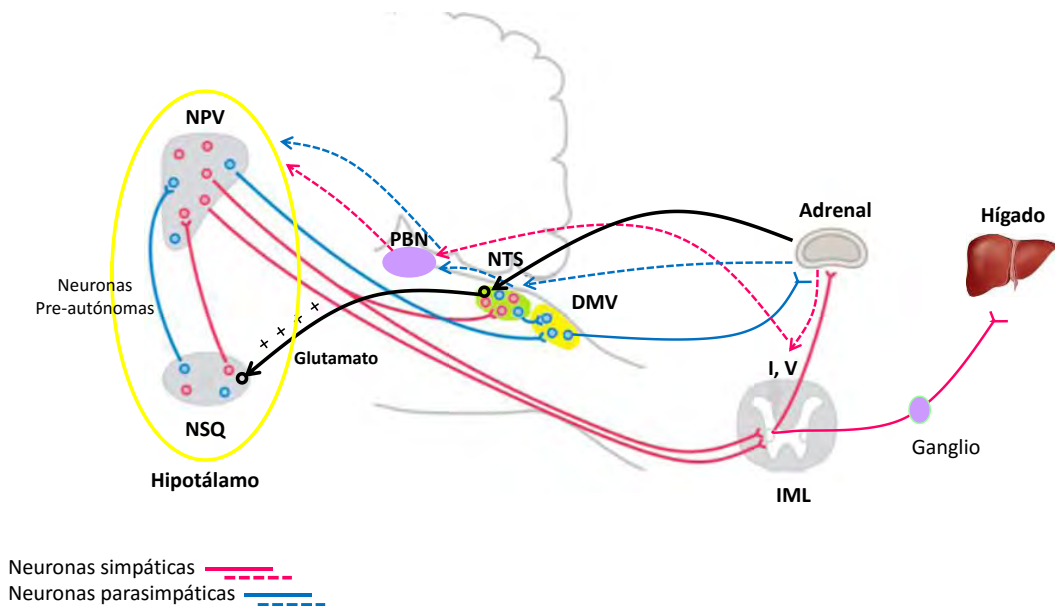


Figura 1. Regulación que ejerce el núcleo supraquiasmático (NSQ) sobre los órganos periféricos por medio de vías simpáticas y parasimpáticas. NTS (núcleo del tracto solitario), NPV (núcleo paraventricular), PBN (núcleo parabraquial), DMV (núcleo dorsal motor del vago), IML (columna intermediolateral de la médula espinal a nivel de los estratos I y V del asta dorsal). (A partir de la propuesta de Buijs, 2013, 2014).

NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (NSQ)

El núcleo supraquiasmático (NSQ) es una estructura bilateral que se localiza en la porción ventral del hipotálamo anterior, ventrolateral al tercer ventrículo y dorsal al quiasma óptico, y su funcionamiento es sincronizado por el ciclo luz-oscuridad (Aguilar-Roblero y col., 2004; Kriegsfeld y Silver, 2006). En el NSQ se localizan las neuronas que dan origen a los marcapasos centrales que controlan los ritmos fisiológicos y de comportamiento de los mamíferos (Engelberth y col., 2014), incluyendo las funciones reproductivas (de la Iglesia y col., 2003; Smarr y col., 2012; Loh y col., 2014).

En el NSQ de la rata se describen dos regiones: la ventrolateral o “core” y la dorsomedial o “shell”. En la rata, cada NSQ contiene aproximadamente 10,000 neuronas. En conjunto ocupan un volumen de aproximadamente $0.068 \pm 0.08 \text{ mm}^3$, donde la región dorsomedial ocupa un volumen de $0.0044 \pm 0.0004 \text{ mm}^3$ (57%) y la ventrolateral de $0.0024 \pm 0.0002 \text{ mm}^3$ (43%) (Van den pol, 1980; Moore, 2013).

La región del “core” se caracteriza por la presencia de células que contienen los siguientes neurotransmisores: VIP, ácido gama amino butírico (GABA, por sus siglas en inglés), péptido liberador de gastrina (GRP por sus siglas en inglés), sustancia P, neurotensina, encefalina, somatostatina, y colecistoquinina (Abrahamson y Moore, 2001).

Esta región recibe proyecciones procedentes de la retina por medio del tracto retino-hipotalámico (RHT, por sus siglas en inglés). Algunas neuronas de esta región, que expresan la calbindina (proteína reguladora del metabolismo del calcio intracelular), no expresan de manera espontánea una ritmicidad circadiana de los genes reloj, ni de los ritmos de actividad eléctrica (Hamada y col., 2004). La llegada de información luminosa por el RHT, a esta región, induce la expresión de los genes reloj y de la actividad eléctrica en estas células (Hamada y col., 2001). Las neuronas del “core” se comunican de manera unidireccional con las neuronas de la región del “shell” por medio de fibras que contienen VIP, GRP, sustancia P o GABA (Leak y col., 1999; Antle y Silver, 2005).

Las neuronas de la región del “shell” expresan automáticamente a los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Per3* (son auto-rítmicas), y presentan ritmos de actividad nerviosa espontánea y auto-sostenida (Moore y Silver, 1998; Honma y col., 2004). La región del “shell” se caracteriza por la presencia de células que contienen arginina-vasopresina (AVP, por sus siglas en inglés) (Antle y Silver, 2005).

La inducción de la expresión de los genes *Per1* y *Per2* en el NSQ seguido de breves pulsos de luz, indica que la activación inicial del NSQ ocurre en la población de neuronas retino-recipientes de la región del “core” y más tarde llega al resto del NSQ (Hamada y col., 2001; Yan y Silver, 2002) (Figura 2).

Se denominan “genes reloj” aquellos que interactúan uno con el otro y forman un bucle de retroalimentación auto-regulatorio, en el que su ciclo de activación y represión tarda aproximadamente un día. En los mamíferos se han descrito al menos nueve genes reloj denominados: *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal1*, *Caseína cinasa Ie (CkIe)* y *Rev-Erb*. Este grupo de genes controla la actividad circadiana en todos los seres vivos (Reppert y Weaver, 2002).

Aferencias al núcleo supraquiasmático

El NSQ recibe aferencias que se originan en diversas regiones del cerebro y llegan a él por diferentes vías, de las cuales las más estudiadas son el RHT, el tracto genículo-hipotalámico (GHT, por sus siglas en inglés) y las fibras serotoninérgicas provenientes de los núcleos mesencefálicos del rafe (Figura 2) (Morin y Allen, 2006).

En la rata, el NSQ recibe proyecciones colinérgicas del cerebro anterior basal que incluye al núcleo basal magnocelular (NBM, por sus siglas en inglés), el tronco cerebral que incluye al núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPTg, por sus siglas en inglés) y al núcleo tegmental latero-dorsal (LDTg, por sus siglas en inglés) (Figura 2 y 3) (Bina y col., 1993).

Tracto retino-hipotalámico (RHT). Es la vía por la cual el NSQ recibe las señales luminosas. Las células ganglionares M-1 de la retina que sintetizan el foto-pigmento melanopsina y que son intrínsecamente fotosensibles [ipRGCs]), son las que transforman y transmiten la información luminosa al NSQ (Foster y col., 2007; Hughes y col., 2015). Estas células liberan neurotransmisores como el glutamato o el polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP) (Figura 2) (Reghunandanan y Reghunandanan, 2006).

La unión del glutamato al receptor NMDA (N-metil D-aspartato) en células del “core” produce la entrada de calcio a la célula (Reppert y Weaver, 2002), la fosforilación de la proteína CREB (cAMP response element binding), la cual interactúa con el elemento de respuesta al AMPc (CRE) resulta en la activación de la transcripción (expresión) de los genes reloj *Per1* y *Per2* (Antle y Silver, 2005).

En las neuronas del “shell” la ritmicidad endógena de estas células depende de un bucle auto-regulatorio de transcripción-traducción. Donde CLOCK y BMAL se dimerizan y se unen a la caja E en la región promotora de los genes Period (PER), Cryptochrome (Cry) y Rev-Erba, activando su transcripción. Cuando aumenta la concentración de PER y las proteínas Cry en el citoplasma, se dimerizan y se translocan al núcleo donde inhiben la actividad de CLOCK-BMAL, inhibiendo así su propia transcripción. Las neuronas del “shell” se comunican con otras estructuras cerebrales usando AVP y GABA como neurotransmisores (Antle y Silver, 2005).

Tracto genículo-hipotalámico (GHT). Algunas fibras colaterales del RHT proyectan bilateralmente a una región de los cuerpos geniculados laterales del tálamo llamada hojuela intergeniculada, a partir de la cual se origina el GHT (Figura 2) (Dibner y col., 2010). Según Aguilar-Roblero y colaboradores (2004), la hojuela intergeniculada junto con el tálamo paraventricular, son un relevo en la transmisión de información no fótica (ruidos, temperatura, neurotransmisores o movimiento) hacia el NSQ. A través de estas vías se posibilita que diversos estímulos puedan funcionar como sincronizadores de los ritmos circadianos. Las fibras nerviosas que conforman el GHT contienen neuropéptido Y (NPY, por sus siglas en inglés) como principal neurotransmisor (Biello y col., 1994), así como GABA (Lall y Biello, 2003) y encefalina (Figura 2) (Morin y Blanchard, 2001).

En la rata, las terminales nerviosas del GHT tienen una distribución uniforme en la zona “core” del NSQ (Morin y Allen, 2006). Los cambios de fase en los ritmos circadianos generados por el NSQ, producidos por estímulos no fóticos, son mediados por la liberación del NPY en las terminales del GHT que llegan al NSQ (Morin y col., 1992). La microinyección de NPY en el NSQ resulta en el cambio de fase de la actividad locomotora de hámsteres. Este efecto es bloqueado por la inyección de un antisuero para NPY, por lo que los autores sugieren que el NPY es uno de los estímulos no fóticos que regulan la actividad del NSQ (Biello y col., 1994). En algunas terminales sinápticas dentro del NSQ se co-localizan el GABA y NPY, donde la acción del NPY es independiente a la de GABA (Lall y Biello 2003).

Fibras serotoninérgicas provenientes de los núcleos mesencefálicos del rafe. En el NSQ de la rata se expresan los receptores a serotonina (5-HT) del subtipo 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C/2C} y 5-HT₇ (Figura 2) (Neumaier y col., 2001). La depleción de la 5-HT en el cerebro conduce a la disrupción de los ciclos sueño-vigilia y de la actividad locomotora de las ratas, lo que implica que la 5-HT regula la fase fótica del reloj circadiano (Nakamura-Osigo y col., 2012).

La lesión del rafe medio con la neurotóxina 5-7 dihidroxitriptamina, provoca avances de fase de la actividad locomotora, lo que nos sugiere que las proyecciones serotoninérgicas provenientes del rafe medio, regulan los ritmos circadianos (Meyer-Bernstein y Morin, 1996).

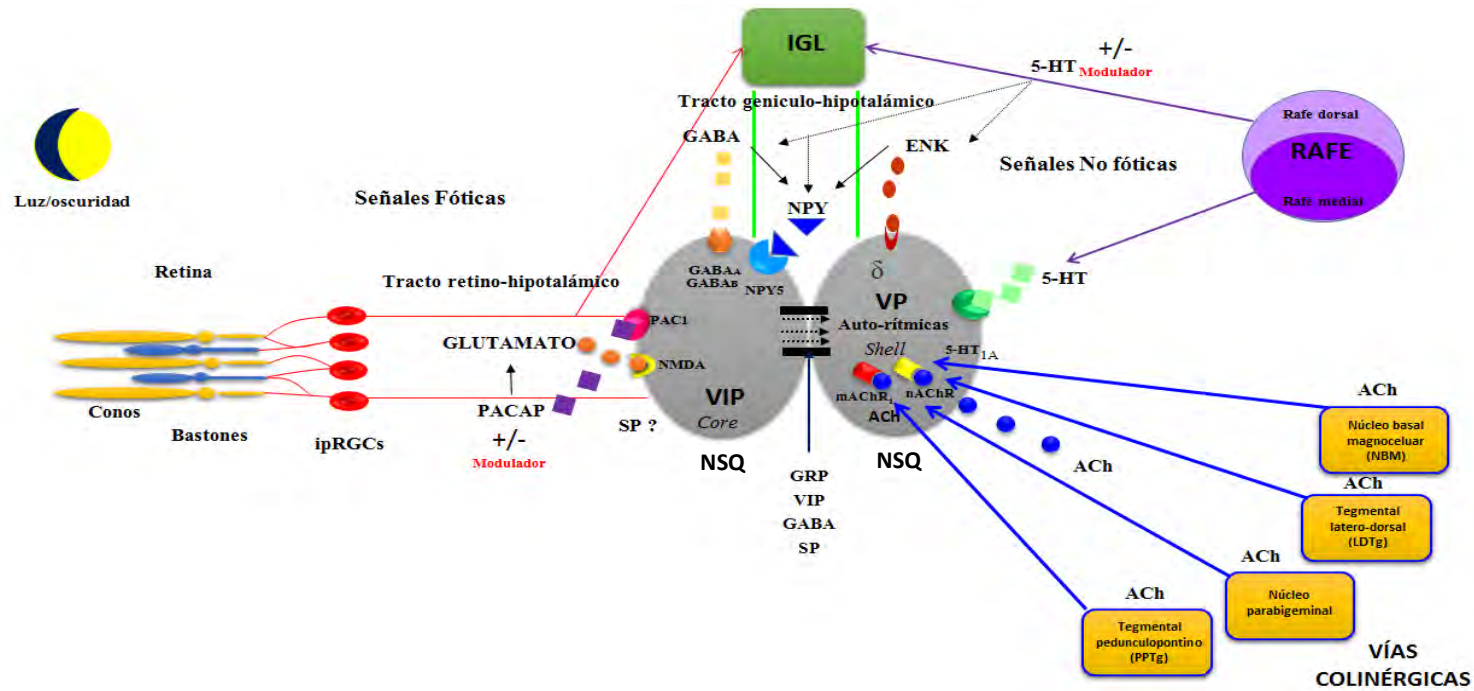


Figura 2. Regulación del núcleo supraquiasmático (NSQ) por medio del tracto retino-hipotalámico (RHT), del tracto genículo-hipotalámico (GHT), de las fibras serotoninérgicas provenientes de los núcleos mesencefálicos del rafe y de las **vías colinérgicas**. El NSQ recibe información lumínica a través de la retina. La retina está formada por neuronas fotorreceptoras (conos y bastones), las cuales detectan y transforman el estímulo luminoso en una señal eléctrica, esta señal es enviada a las células ganglionares fotorreceptoras o intrínsecamente fotosensibles (ipRGC), de las cuales se origina el RHT. El glutamato es el principal neurotransmisor de esta vía aferente y es regulado por el polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP) y la sustancia P (SP). El GHT se origina a partir de la hojuela intergeniculada (IGL), es una de las vías no fóticas que regulan al NSQ. El principal neurotransmisor de esta vía es el neuropéptido Y (NPY) así como el ácido gama amino butírico (GABA) y las encefalinas (ENK). La tercera vía más estudiada son los núcleos mesencefálicos del rafe dorsal y medial. La serotonina (5-HT) proveniente del rafe dorsal regula a la IGL y por tanto al NPY (Palus y col., 2013), mientras que la 5-HT que se origina en el rafe medio regula la actividad del NSQ. El NSQ recibe información colinérgica por medio del núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPTg), del tegmental latero-dorsal (LDTg), del parabigeminal y del núcleo basal magnocelular (NBM), la ACh que llega al NSQ actúa sobre los receptores muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChR) presentes en el NSQ. La región "core" del NSQ se comunica con la región "shell" a través de péptido liberador de gastrina (GRP), VIP, GABA y SP. PAC1, receptor a PACAP; NMDA, receptor a glutamato; GABA_A, GABA_B, receptores a GABA; δ , receptor a ENK, 5-HT_{1A}, receptor a 5-HT.

SISTEMA COLINÉRGICO

Se define al sistema colinérgico a aquel conjunto de neuronas que utilizan a la ACh como el principal neurotransmisor, la cual por su unión a receptores nicotínicos y muscarínicos interviene en un proceso muy integrativo como es la neurotransmisión. Además de las neuronas, muchos otros tipos celulares animales y vegetales sintetizan ACh (Wessler y Kirkpatrick, 2008).

En los mamíferos mantenidos en condiciones de luz-oscuridad existe un ritmo circádico en la actividad del sistema colinérgico, medido por la liberación de ACh, la actividad de la enzima que interviene en la síntesis, la acetil-colintransferasa (ChAT, por sus siglas en inglés) y en la degradación la AChE, así como la disponibilidad de los receptores muscarínicos libres (Hut y Van der Zee, 2011).

Debido a que la ACh es un neurotransmisor lábil y su vida media es de 2 minutos, resulta difícil cuantificar su concentración, razón por la cual, en los diversos estudios del sistema colinérgico se determina la expresión de la ChAT de la AChE y del transportador vesicular de ACh (VAChT, por sus siglas en inglés) encargado de transportar la ACh al interior de las vesículas sinápticas (Mayherofher y col., 2003).

Receptores muscarínicos (mAChR). Los receptores muscarínicos son de tipo metabotrópico, se encuentran ampliamente distribuidos en todo el organismo y con base en su localización y el subtipo de receptor activado, median funciones fisiológicas distintas como: potenciales excitatorios post-sinápticos en los ganglios simpáticos y parasimpáticos, la secreción glandular y la modulación de la frecuencia cardiaca (Caulfield y Birdsall, 1998; Patané, 2014).

Con base en su estructura molecular y su afinidad a los diversos antagonistas, los receptores se clasifican en cinco subtipos (mAChR₁-mAChR₅) (Taylor y Brown, 1999). Los receptores muscarínicos pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G y su estimulación resulta en una gran variedad de acciones intracelulares, lo que depende del tipo de proteína G a la que se encuentren acoplados (Terawaki y col., 2015). Los receptores mAChR₁, mAChR₃ y mAChR₅ están acoplados a la proteína G_{q/11} y G₁₃, y su estimulación resulta en el incremento intracelular de la fosfolipasa C. El resultado inmediato es la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en trifosfoinositol (IP₃), el cual estimula la salida de calcio intracelular desde el retículo endoplásmico.

El segundo producto es el diacilglicerol que, a su vez, activa a la proteincinasa C (van Koppen y Kaiser, 2003).

La estimulación de los receptores colinérgicos mAChR₂ y mAChR₄ inhiben la formación del adenosin monofosfato cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés), activan canales de K⁺ y reducen la entrada de iones de Ca²⁺ a través de canales dependientes de voltaje, efectos mediados por proteínas G (G_{a/i}, G_{a/o} y G_{i/o}) (van Koppen y Kaiser, 2003).

Receptores nicotínicos (nAChR). Existen dos tipos de receptores nAChRs (Nirthanan y Gwee, 2004): 1) Los musculares que se encuentran en la parte post-sináptica en la placa neuromuscular y 2) los neuronales están ampliamente distribuidos en el SNC y periférico, son los principales mediadores de la transmisión sináptica en los ganglios y, por lo tanto, son moléculas clave para el procesamiento de información neuronal en el sistema nervioso autónomo (DeBiasi, 2002). Su presencia se describe en diferentes tejidos no-nerviosos como el epitelio intestinal, el endotelio pulmonar, el tejido adiposo, el epitelio oral, el endotelio vascular, en queratinocitos, en útero, en testículo, en vejiga urinaria, etc. (Kawashima y Fujii, 2008).

Los nAChR son miembros de la super familia de canales iónicos activados por ligandos, y su estimulación resulta en un rápido incremento de la permeabilidad celular al Na²⁺ y Ca²⁺ y cambio en el potencial de la membrana, lo que resulta en una respuesta celular inmediata (Picciotto y col., 2001).

Los nAChR tienen una estructura pentamérica que consiste en subunidades α y β homoméricas. Existen dos tipos de receptores nicotínicos, los que se encuentran en la unión neuromuscular y los que se encuentran en el cerebro. Los receptores nicotínicos presentes en la unión neuromuscular están constituidos por cinco subunidades; dos $\alpha 1$, una $\beta 1$, una γ , y una δ . Los sitios de unión a la ACh se encuentran en las subunidades α , que tienen dos residuos de cisteína, próximos entre sí y necesarios para el reconocimiento del agonista (Picciotto y col., 2001). Los receptores que se encuentran en el cerebro están constituidos por subunidades α y β ; pueden existir siete subunidades α y tres β , las cuales forman múltiples combinaciones (DeBiasi, 2002).

SISTEMA COLINÉRGICO DEL NSQ

El sistema colinérgico central modula la actividad de las neuronas en el NSQ. Las neuronas que sintetizan ACh se encuentran en mayor cantidad en la región del “shell” (Figura 3). Estas neuronas son activadas por la información lumínica que llega por medio del RHT, por lo que se sugiere que las neuronas colinérgicas transmiten información fótica al NSQ (Jiang y col., 1997; Hut y Van der Zee, 2011).

En la rata, la inervación colinérgica que llega al NSQ es más densa en la región del “shell” que en el “core”. En el hámster, las neuronas colinérgicas pueden encontrarse en la parte anterior del NSQ, en contraste con el del ratón que no presenta cuerpos celulares colinérgicos (Hut y Van der Zee, 2011). En el NSQ del ratón hembra, la actividad de las enzimas ChAT y de la AChE son bajas en comparación con otras regiones del cerebro, como el cuerpo estriado o la banda diagonal de Broca (Gordon y Finch, 1984).

Las neuronas del NSQ expresan receptores nAChR (Hut y van der Zee 2011; Gannon y col., 2014) y mAChR₁-mAChR₅ (Van der Zee y col., 1991; 2004; Yang y col., 2010) (Figura 3). En el NSQ de ratas adultas y hámsteres existe una abundante presencia del ARNm de la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico ($\alpha 7$ -nAChR) (O’Hara y col., 1998, 1999; Gannon y col., 2014). La ACh y su metabolito, al unirse a la subunidad $\alpha 7$ del nAChR, regulan la excitabilidad de las neuronas del NSQ (Yang y col., 2010).

Diversos estudios han mostrado que el NSQ es regulado por el sistema colinérgico.

In vitro, la aplicación de carbacol (agonista colinérgico muscarínico) durante la noche subjetiva (momento del día en el cual el individuo está dormido), retrasa la actividad de disparo de las neuronas del NSQ por seis horas. La aplicación de un antagonista nicotínico no selectivo, no tiene ningún efecto sobre el retraso que provoca el carbacol, sin embargo, la aplicación de atropina (antagonista colinérgico no selectivo) o de pirenzepina (antagonista selectivo mAChR₁) reestablece la actividad de disparo de las neuronas del NSQ, por lo que los autores sugieren que el sistema colinérgico, regula la actividad de las neuronas del NSQ vía los receptores muscarínicos, específicamente vía el mAChR₁ (Liu y Gillette, 1996).

In vivo, la estimulación colinérgica del NSQ por la micro-inyección de carbacol, dos horas antes de la noche subjetiva, resultó en un desfase en la actividad locomotora de los ratones, lo cual sugiere que el sistema colinérgico regula los ritmos de comportamiento (Buchanan y Gillette, 2005).

Yang y col. (2010), mostraron en estudios *in vitro* que la aplicación de carbacol en el NSQ de ratas de 17-26 días de edad, inhibe la actividad de disparo del 55% de las neuronas estudiadas, estimula el 21% y el 24% no responden. La aplicación de muscarina produce efectos similares, mientras que la de nicotina no tiene efectos. Por lo que sugirió que el sistema colinérgico, a través de sus múltiples receptores muscarínicos y canales iónicos, modula la excitabilidad de las células del NSQ.

La destrucción del NBM por la micro-inyección de ácido quinolínico (agente citotóxico), resulta en la disminución del número y tamaño de neuronas VIP y AVP en el NSQ, lo que se correlaciona con la cantidad de aferencias colinérgicas destruidas. Los autores sugieren que la ACh regula de manera directa la actividad metabólica de las neuronas del NSQ (Madeira y col., 2004).

La estimulación del LDTg y PPTg del ratón C57BL/6J provoca el aumento de la secreción de ACh y glutamato en el NSQ, además la estimulación de éstos núcleos colinérgicos modifica los ritmos circadianos del comportamiento (actividad locomotora). Los autores sugieren que la interrupción de la señalización colinérgica desde el tronco encefálico puede mediar la actividad neuronal NSQ (Abbott y col., 2013).

Gannon y col., (2014), mostraron que en el hámster, el bloqueo de los receptores nAChR α 7 a nivel sistémico provocó retrasos de fase inducidos por la luz y avances en los ritmos de actividad locomotora, por lo que sugieren que la información colinérgica que llega al NSQ ejerce sus efectos moduladores de la luz sobre los marcapasos, vía receptores nicotínicos.

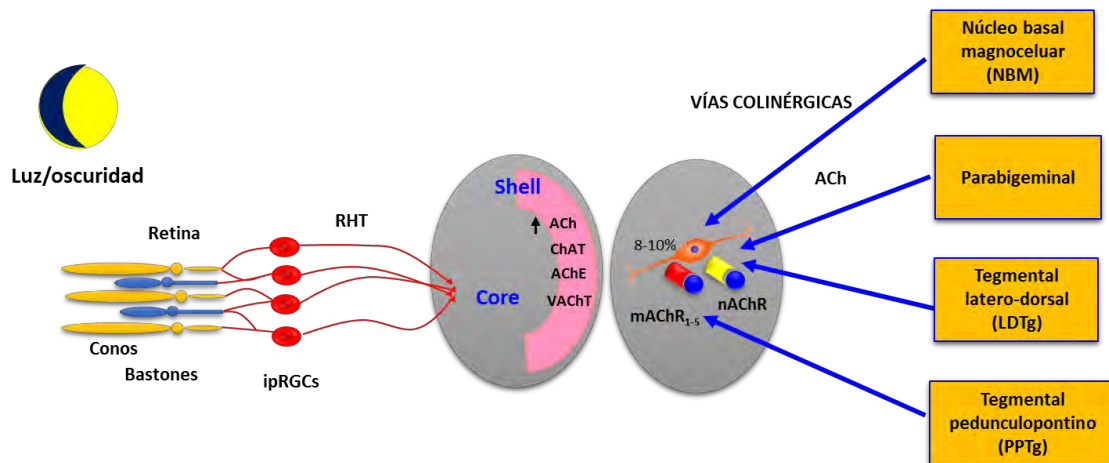


Figura 3. El sistema colinérgico del NSQ recibe información lumínica por medio del tarcto retinohipotalámico (RHT) y estimula la liberación de acetilcolina (ACh) por las neuronas del NSQ. El NSQ presenta neuronas colinérgicas de tipo bipolar. En la región “shell” se presenta la mayor concentración de ACh y de las enzimas encargadas de las síntesis (AChT), degradación (AChE), así como el transportador vesicular de ACh (VAcHT). Del 8 al 10% de las neuronas presentes en el NSQ son de tipo colinérgico y la mayoría de las neuronas no-colinérgicas presentan receptores muscarínicos (mAChR) y nicotínicos (nAChR). El NSQ es regulado por núcleos de naturaleza colinérgica (NBM, parabigeminal, LDTg, PPT).

MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GnRH POR EL NSQ

La regulación de la secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides sexuales, así como del desarrollo, la maduración folicular y la ovulación, dependen de la frecuencia y amplitud de los pulsos de secreción de la GnRH (Clarkson y Herbison, 2006; Ojeda y col., 2006). El NSQ proyecta fibras nerviosas hacia áreas que contienen neuronas secretoras de GnRH (van der Beek y col., 1999; de la Iglesia y col., 2003; Kriesgfeld y Silver, 2006) y se considera que estas vías nerviosas podrían ser una ruta por la cual el NSQ regula la secreción de GnRH y la ovulación (van der Beek y col., 1999; de la Iglesia y col., 2003; Smarr y col., 2012, Piet y col., 2015).

El NSQ regula de manera directa la secreción de GnRH por vías nerviosas VIPérgicas y AVPérgicas

El NSQ regula a las neuronas GnRHérgicas por medio de sus proyecciones directas al área preóptica (POA, por sus siglas en inglés), al área hipotalámica anterior (AHA, por sus siglas en inglés), a la banda diagonal de Broca (DBB, por sus siglas en inglés), y al área preóptica medial (mPOA, por sus siglas en inglés) (van der Beek y col., 1997; de la Iglesia y col., 1999; Mahoney y Smale, 2005).

Uno de los mecanismos directos que regula la actividad de las neuronas GnRHérgicas se da a través de proyecciones VIPérgicas, provenientes de la región “core” del NSQ (Figura 4). En la rata adulta, las neuronas VIPérgicas del NSQ hacen contacto mono-sináptico con las neuronas GnRHérgicas localizadas en POA, AHA, en la parte media de la DBB y en la región del órgano vasculoso de la lámina terminal, donde el 35% de las neuronas GnRHérgicas están en aposición con terminales VIPérgicas (Mahoney y Smale, 2005). Según van der Beek y col. (1997), la conexión entre las neuronas del NSQ-GnRH explica la influencia circádica en la regulación de los ciclos reproductivos, así como la regulación de la secreción de GnRH.

La AVP es otro de los neurotransmisores que regulan de manera directa la secreción de GnRH (Figura 4) (Palm y col., 1999; Funabashi y col., 2000; Miller y col., 2006; Owen y col., 2013). Las neuronas AVPérgicas localizadas en la región “shell” del NSQ (Moore y col., 2002) producen una señal nerviosa diaria que envía el NSQ la que, junto a otras, marca el momento en el que se produce el aumento preovulatorio de la LH en la tarde del proestro (Palm y col., 1999; Funabashi y col., 2000). La lesión del NSQ disminuye la concentración de LH en suero. Cuando a estos mismos animales se les micro-inyecta

AVP en el área mPOA, incrementa la LH (Palm y col., 1999). En co-cultivos que contiene tejido del NSQ y POA, la liberación de AVP y GnRH se produce al mismo tiempo (Funabashi y col., 2000).

La expresión de AVP en el NSQ y la del receptor a vasopresina-arginina_{1a} (AVPR_{1a}) en el hipotálamo es menor en ratones hembras mutantes para el gen *Clock/Clock*, en comparación con animales silvestres. En ratones mutantes del gen *Clock* la micro-inyección de AVP en la región de mPOA en la tarde del proestro, induce el pico pre-ovulatorio de LH. El efecto de la AVP es mediado por el receptor (AVPR_{1a}), ya que la administración de un antagonista específico para AVPR_{1a}, bloquea la liberación de LH inducida por AVP (Miller y col., 2006).

El NSQ regula la secreción de GnRH a través de vías multisinápticas

El NSQ envía información al núcleo periventricular anteroventral (AVPV, por sus siglas en inglés), a la región periventricular rostral del tercer ventrículo (RP3V, por sus siglas en inglés), al PVN, al núcleo arcuato (ARC), por medio de fibras VIPérgicas y AVPérgicas (Figura 4). Estas áreas forman parte de las vías multisinápticas de comunicación entre las neuronas GnRHérgicas y el NSQ, que regulan de manera indirecta la secreción de GnRH (Watson y col., 1995; Krout y col., 2002; Barbacka-Surowiak y col., 2003; Morin y Blanchard, 2005; Morin, 2013; Piet y col., 2015).

El NSQ envía proyecciones mono-sinápticas a células del AVPV que expresan receptores a estrógenos alfa (ER α) (de la Iglesia y col., 1995) y a *Kiss1* (gen que codifica para kisspeptina). *Kiss1* muestra un patrón circadiano que alcanza su punto máximo cuando se observa el pico pre-ovulatorio de LH. La expresión de *Kiss1* depende de las concentraciones de estradiol, ya que en ausencia de este estrógeno, no se observa un patrón circadiano en la expresión de las neuronas kisseptidérgicas. Según Robertson y col. (2009) el aumento de LH es controlado por las neuronas presentes en el AVPV que expresan el *Kiss1* y dependen de las concentraciones de estradiol. La lesión térmica del NSQ resulta en la disminución del número de neuronas GnRHérgicas que expresan c-Fos en POA, y de la concentración del RNAm de *Kiss1* en AVPV. Los autores sugieren que la activación de las neuronas GnRHérgicas en POA y el incremento de las concentraciones del RNAm de *Kiss1* dependen de las señales circádicas generadas por el NSQ (Smarr y col., 2012).

En el AVPV algunas neuronas expresan GABA, el cual participa en el control de la actividad de las neuronas GnRHérgicas, debido a la presencia de sinapsis entre ambas neuronas (Herbison, 2006) y de los receptores GABA_A y GABA_B en las neuronas GnRHérgicas (Sliwowska y col., 2006). El GABA inhibe el pico pre-ovulatorio de LH. Las concentraciones de GABA en el NSQ disminuyen antes del aumento de LH, lo que permite el “pico pre-ovulatorio” de LH (Barbacka-Surowiak y col., 2003).

En la rata y el ratón, el AVPV y el núcleo periventricular forman la región RP3V. En esta zona hay neuronas que sintetizan kisspeptina las cuales estimulan las neuronas GnRHérgicas (Piet col., 2015). Las neuronas del RP3V, expresa receptores a estrógenos, están inervadas por neuronas del NSQ que expresan AVP y que regulan de manera directa a las neuronas que expresan kisspeptina (Vida y col., 2010; Williams y col., 2011; Piet y col., 2015).

En el PVN se originan fibras que llegan al tronco cerebral caudal (Buijs y Kalsbeek, 2001), en donde se encuentran los núcleos noradrenérgicos A₁ y A₂ (Temel y col., 2002). La estimulación eléctrica de los núcleos A₁ o A₂ produce incremento de la liberación de noradrenalina (NA) en POA (Herbison y col., 1990). En la rata el aumento en la concentración de NA en POA estimula la actividad de las neuronas GnRHérgicas que se traduce en un aumento de la secreción de LH en la tarde del proestro (Rawson y col., 2001).

El ARC actúa como una vía de comunicación entre el NSQ y POA (Krout y col., 2002; Williams y Kriegsfeld, 2012). El 50% de las neuronas del ARC que se proyectan a POA sintetizan NPY o beta endorfina (Simonian y col., 1999), y otras sintetizan kisspeptina (Smith y col., 2006).

Según d'Anglemont de Tassigny y col., (2008) y Williams y Kriegsfeld, (2012) la kisspeptina proveniente del ARC regula la liberación de GnRH por su acción directa sobre las terminales GnRHérgicas, mientras que la kisspeptina proveniente del AVPV actúa sobre el soma de la neurona GnRHérgica. Sin embargo, esta idea es controversial ya que se ha propuesto que ambos núcleos pueden estimular la neurona GnRHérgica (Dungan y col., 2006; Pinilla y col., 2012; Piet y col., 2015).

El NSQ envía información colinérgica a la banda diagonal de broca y al septum medial (Figura 4) (Bina y col., 1993). En estos núcleos se encuentran algunas neuronas GnRHérgicas (Silverman, 1994).

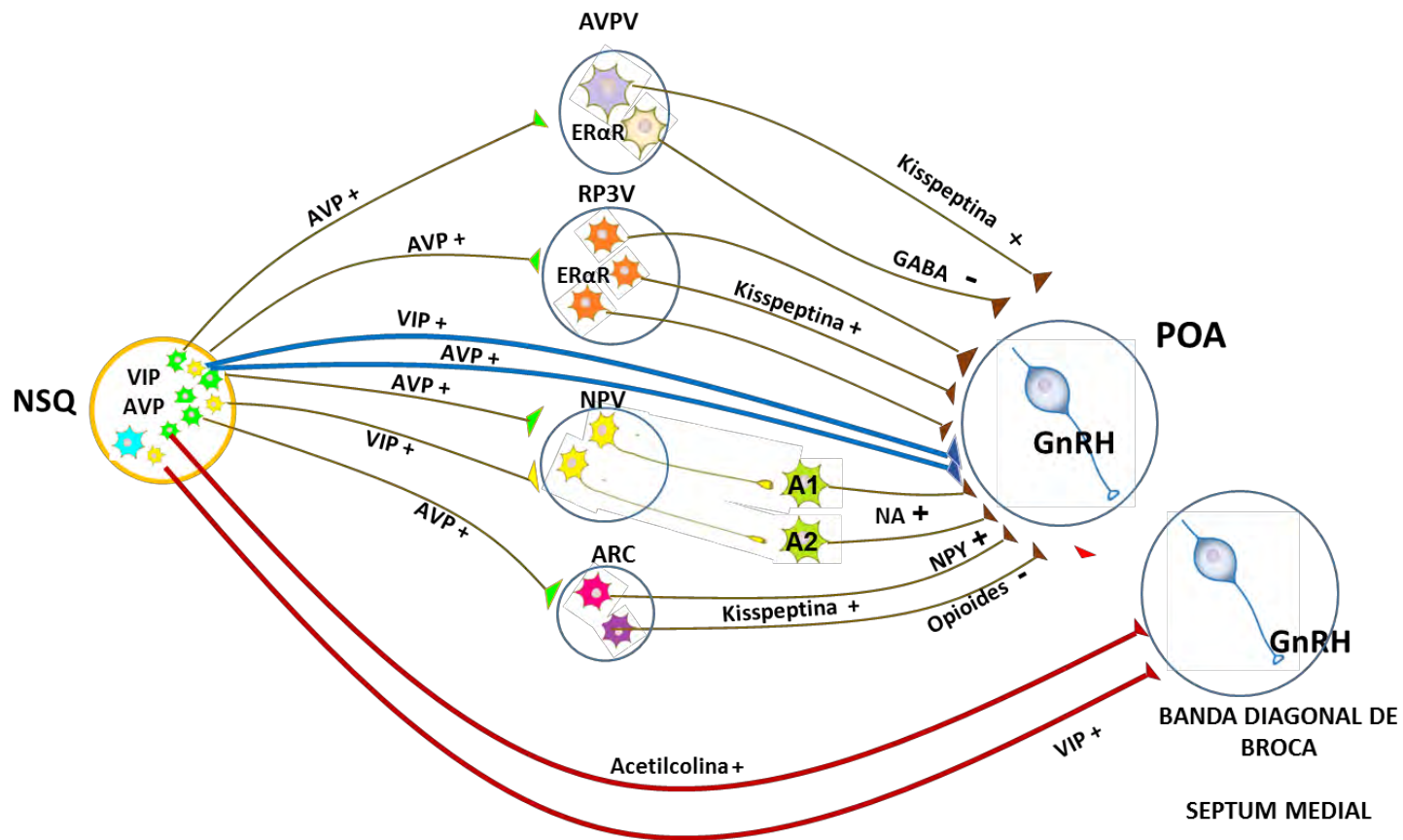


Figura 4. Representación de las vías multisinápticas por las cuales el núcleo supraquiasmático (NSQ) regula de manera directa o indirecta a las neuronas GnRHérgicas (Bina y col. 1993; Van der Beek y col. 1993; Barbacka-Surowiak y col. 2003; Mahoney y Smale 2005; Williams y Kriegsfeld 2012; Piet y col., 2015). arginina-vasopresina); VIP (Péptido intestinal vasoactivo); AVPV (Núcleo periventricular anteroventral); RP3V (Región periventricular rostral del tercer ventrículo) PVN (Núcleo paraventricular del hipotálamo); ARC (Núcleo arcuato); A1-A2 (Núcleo noradrenérgicos); GABA (Ácido gama amino butírico); NA (Noradrenalina); NPY (Neuropéptido Y); ER α R (Receptor a estrógenos).

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES OVÁRICAS

El sistema colinérgico es uno de los sistemas de neurotransmisión que regula la secreción de gonadotropinas y, en consecuencia, la ovulación. Desde la década de los 40 Everett y colaboradores (1949) mostraron que el sistema colinérgico estimula la secreción preovulatoria de la LH que ocurre en el día del proestro. En la coneja, un animal de ovulación refleja, la inyección de sulfato de atropina después del coito impide la ovulación. En la rata, un animal de ovulación espontánea, el mismo tratamiento en la tarde del proestro bloquea la ovulación esperada en la mañana del estro (Everett y col., 1949; 1950). Años más tarde, se mostró que la secreción de las gonadotropinas, regulada por el sistema colinérgico, parece presentar un ritmo circadiano (Domínguez y col., 1982).

Cruz y colaboradores (2014) sugieren que la falta de ovulación en animales con bloqueo de los receptores muscarínicos de POA-AHA parece estar vinculada a la inhibición del estímulo que induce el crecimiento folicular ovárico, ya que el implante de atropina del lado derecho de POA-AHA bloquea la liberación preovulatoria de LH y el efecto estimulante de los estrógenos, lo que nos sugiere que la activación de los receptores muscarínicos juegan un papel crítico en la regulación de la síntesis de GnRH (Cruz y col., 1992).

Por otro lado, López y colaboradores (1997) sugieren que POA-AHA regula de manera asimétrica y lateralizada la secreción fásica de la GnRH. En el día del estro, el sistema colinérgico del lado derecho de POA-AHA regula de manera estimulante los eventos que culminan con la liberación fásica de la GnRH, mientras que el lado izquierdo la regula de forma inhibitoria. La estimulación unilateral de los receptores muscarínicos de POA-AHA, mediante el implante unilateral de pilocarpina (agonista muscarínico), bloquean la ovulación debido a la alteración de la liberación fásica de la GnRH que ocurre en el día del proestro, ya que su reemplazo la restablece.

La actividad de la ChAT en POA-AHA varía durante el ciclo estral, en el día del estro es mayor en el lado derecho, mientras que en el día del diestro 2 es mayor en el lado izquierdo (Sánchez y col., 1994), lo que sugiere que en el día del estro hay una mayor actividad colinérgica necesaria para que se desencadenen los eventos que culminan con la ovulación.

Los efectos estimulantes e inhibitorios que resultan de la estimulación o inhibición del sistema colinérgico dependen del estado endocrino del animal. En los días del diestro 1 y 2 el sistema colinérgico regula de manera inhibitoria la secreción de testosterona, mientras que en el proestro la hace de forma estimulante (Flores y col., 2006). La regulación que ejerce el sistema colinérgico sobre la secreción de estradiol por los ovarios, depende del ovario *in situ* y del día del ciclo estral (Cruz y col., 2006).

El sistema colinérgico regula la actividad de los ovarios. El ovocito presenta el receptor mAChR₃ acoplado a proteínas Gq. La presencia de los receptores en ambas estructuras ováricas sugiere que la ACh producida por las células de la granulosa, luteinizadas o no, actúa de manera paracrina/autocrina sobre el ovocito y las mismas células de la granulosa (Mayerhofer, 2003).

Mayerhofer y Kunz (2005) proponen un mecanismo a través del cual la ACh participa en la regulación de la secreción de hormonas esteroides, mediada por la activación de los receptores muscarínicos, localizados en las células de la granulosa. En presencia de LH, la ACh producida por las células de la granulosa, se une a sus receptores mAChR₁/mAChR₅ y estimula la liberación de Ca²⁺ intracelular, lo que resulta en la activación de los receptores BK_{Ca} y la activación de canales dependientes de voltaje e hiperpolarización de la membrana. Este proceso se traduce en la secreción de progesterona y estradiol.

La ACh participa en la regulación de la acción de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis. En células de la granulosa luteinizadas, estimuladas con carbacol, se incrementa la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), la cual interviene en el transporte de colesterol a la membrana interna de la mitocondria, así como la secreción de progesterona. El incremento de la actividad de la StAR, inducida por la gonadotropina coriónica humana (hCG), se amplifica en presencia de carbacol, lo que se traduce en una mayor secreción de progesterona (Fritz y col., 2001). La secreción de progesterona y estradiol por las células de la granulosa, estimuladas con gonadotropinas, es mayor en presencia de ACh (Kornya y col., 2001). Estos resultados indican que el sistema colinérgico modula, de manera estimulante, los efectos de las gonadotropinas en la secreción de esteroides, tal y como ocurre con el sistema catecolaminérgico (Morales y col., 1993).

PARTICIPACIÓN DEL NERVIOS VAGO EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES OVÁRICAS

El estudio de la regulación del nervio vago sobre las funciones ováricas se inició con las investigaciones de Lawrence y Burden, en los años 70s. La sección bilateral del nervio en la rata preñada disminuye la concentración de progesterona y aumenta la reabsorción de los fetos, lo que nos sugiere que la información neural que transporta el nervio vago modula de manera estimulante la actividad de la enzima 3β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa (3β -HSD) (Lawrence y col., 1978).

En la rata prepúber, la información vagal modula de manera estimulante los mecanismos que culminan con el inicio de la pubertad (Ojeda y col., 1983; Morales y col., 2004), mientras que en la rata adulta participa en la regulación del ciclo estral (Burden y col., 1981) y modula de forma estimulante la secreción de las gonadotropinas (Burden y Lawrence, 1977; Lawrence y col., 1978).

La vagotomía bilateral, realizada en la mañana del proestro de ratas cíclicas, no modifica el pico preovulatorio de LH (Allen y col., 1985). En la rata prepúber, de 24 días de edad, el nervio vago estimula la secreción de progesterona e inhibe la de estradiol. En la rata de 28 días de edad, el nervio vago regula de forma estimulante la secreción de progesterona y estradiol (Morales y col., 2004), mientras que en la rata prepúber con ovariectomía unilateral, el nervio vago regula de manera asimétrica la secreción de hormonas esteroides y este resultado depende de la edad del animal y del ovario *in situ* (Morales y col., 2007).

En la rata adulta los nervios vagos regulan de manera inhibitoria la respuesta de los ovarios a las gonadotropinas, ya que después de la vagotomía bilateral aumenta la población de folículos de Graaf y el número de ovocitos liberados (Cruz y col., 1986). La participación de los nervios vagos en la regulación de la ovulación es asimétrica, donde el vago izquierdo está más comprometido con los procesos que culminan con la ovulación (Cruz y col., 1986, Chávez y col., 1989).

Al final de la etapa juvenil, ambos nervios vago modulan de manera inhibitoria la primera ovulación, mientras que al inicio de esta etapa, la información vagal parece no ser indispensable para que se produzca la ovulación al primer estro vaginal (Morales y col., 2004).

Cruz y colaboradores (2015) proponen que la activación de los receptores mAChR₁ en el ovario izquierdo es requerida para que se produzca la secreción pre-ovulatoria de GnRH y la ovulación, vía el nervio vago.

Para el estudio de la regulación de la secreción de hormonas esteroides por el sistema colinérgico, vía la interacción de fibras simpáticas y parasimpáticas, se utilizan dos sistemas *ex vivo*: 1) donde se aísla el ganglio celiaco-nervio ovárico superior-ovario (GC-NOS-O); 2) ganglio mesentérico superior-nervio del plexo ovárico-ovario (GMS-NPO-O) (Sosa y col., 2004, Vega y col., 2006; 2010, Delgado y col., 2010). Ambos sistemas permiten emular *in vitro* las condiciones *in vivo*, ya que son sistemas que poseen su propio tono neural y el sistema se obtiene de animales en cada etapa del ciclo estral (Sosa y col., 2000).

En el modelo *ex vivo* (GC-NOS-O) de ratas adultas, los efectos de la estimulación del ganglio celiaco con fármacos colino-miméticos varían en función de la fase del ciclo estral de la rata, por lo que este ganglio forma parte de las vías nerviosas que regulan la secreción de hormonas ováricas, como la progesterona (Sosa y col. 2004).

La adición de ACh en el ganglio mesentérico superior izquierdo del sistema (GMS-NPO-O) regula de manera estimulante la secreción de progesterona, mientras que la de estradiol es regulada de forma inhibitoria. La ACh en el ganglio mesentérico superior derecho no modifica las concentraciones de hormonas esteroides. Estas evidencias indican que el ovario izquierdo es más sensible a los estímulos colinérgicos generados en el ganglio mesentérico superior (Vega y col., 2006; 2010).

Con base en los antecedentes ya mencionados, es evidente que las funciones ováricas son reguladas por la información colinérgica del sistema nervioso central y periférico, así como por el nervio vago. Donde la regulación puede ser modulada por el marcapasos central que conforma al NSQ. Por ello, en el presente estudio se analizó si el sistema colinérgico del NSQ regula la ovulación y la secreción de hormonas esteroides ováricas, y si el nervio vago forma parte de las vías de comunicación nerviosa entre los ovarios y el NSQ.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El NSQ envía señales de tiempo hacia POA-AHA en forma de impulsos nerviosos sincronizados. En esta región se localizan neuronas que secretan GnRH, la cual regula la secreción de gonadotropinas y la ovulación. La secreción de GnRH es regulada por diversos sistemas de neurotransmisión, algunos de los cuales se originan en el NSQ.

El NSQ recibe información de diversas regiones del SNC, algunas de las cuales son de tipo colinérgico. Hasta el momento, no hay estudios que analicen la participación del sistema colinérgico que inerva al NSQ en relación con la regulación de las funciones de los ovarios.

Una de las vías nerviosas que regulan la respuesta de los diferentes compartimentos de los ovarios a los efectos de las gonadotropinas es el nervio vago, y hay evidencias morfológicas de la existencia de una vía de comunicación nerviosa entre el NSQ y los núcleos donde se origina el nervio vago. Diversos estudios experimentales proponen que la regulación que ejerce la inervación vagal de los ovarios es asimétrica y varía en función de los días y horas del ciclo estral.

A partir de la información que disponemos, planteamos dos preguntas sobre las relaciones funcionales entre los NSQ y los ovarios.

- 1.- ¿Cuál es la participación de la información colinérgica de los NSQ en la regulación de la ovulación?
- 2.- ¿El nervio vago es una de las vías nerviosas por las que el NSQ se comunica con los ovarios?

Para tratar de dar respuesta a ambas preguntas, en el presente proyecto se analizó:

- El efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos presentes en los NSQ sobre la ovulación.
- El efecto de la estimulación de los receptores colinérgicos del NSQ sobre las funciones de los ovarios.
- Si la regulación que ejerce el NSQ sobre la ovulación depende del día y de la hora del ciclo estral.
- Si los efectos de la estimulación o inhibición del sistema colinérgico del NSQ, dependen de la integridad del nervio vago.

HIPÓTESIS 1

Dado que el NSQ recibe inervación colinérgica y envía información a la región POA-AHA, la cual participa en la regulación de la secreción de GnRH, entonces la estimulación o el bloqueo de los receptores muscarínicos localizados en neuronas que comunican al NSQ con las células que secretan GnRH modificarán la ovulación espontánea, la secreción hormonal ovárica, y la de LH lo que dependerá del NSQ estudiado (izquierdo o derecho), del día del ciclo estral y de la hora en que se realicen los experimentos.

HIPÓTESIS 2

Dado que el NSQ envía información nerviosa por una vía multi-sináptica hacia los núcleos que originan al nervio vago, entonces la sección unilateral del nervio en animales con previa estimulación o inhibición del sistema colinérgico del NSQ modificará la ovulación dependiendo del nervio seccionado, del día del ciclo estral y de la hora del día en que se realicen los experimentos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos del bloqueo o la estimulación farmacológica del sistema colinérgico del NSQ (izquierdo o derecho) y el papel del nervio vago en la comunicación entre el NSQ y los ovarios.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Analizar los efectos del bloqueo del sistema muscarínico del NSQ izquierdo o derecho, en el día del diestro 1 o proestro, sobre la ovulación espontánea, la secreción de LH y de hormonas esteroides ováricas.
- 2.- Analizar los efectos de la estimulación del sistema colinérgico del NSQ izquierdo o derecho, en el día del proestro, sobre la ovulación espontánea y la secreción de hormonas esteroides ováricas.
- 3.- Analizar los efectos de la sección del nervio vago izquierdo o derecho, en el animal con bloqueo del sistema muscarínico del NSQ izquierdo o derecho, sobre la ovulación espontánea y la secreción de hormonas esteroides ováricas.
- 4.- Analizar los efectos de la sección del nervio vago izquierdo o derecho, en el animal con estimulación del sistema colinérgico del NSQ izquierdo o derecho, sobre la ovulación espontánea y la secreción de hormonas esteroides ováricas.

CAPÍTULO II

Unilaterally blocking the muscarinic receptors in the suprachiasmatic nucleus in proestrus rats prevents pre-ovulatory LH secretion and ovulation

Elizabeth Vieyra, Deyra A. Ramírez, Noé Lagunas, Mario Cárdenas, Roberto Chavira, Pablo Damián-Matsumura, Angélica Trujillo, Roberto Domínguez and Leticia Morales-Ledesma.

Aceptado para ser publicado en la revista *Reproductive Biology and Endocrinology* (2016)

14:34. DOI. 10.1186/s12958-016-0168-7.

Unilaterally blocking the muscarinic receptors in the suprachiasmatic nucleus in proestrus rats prevents pre-ovulatory LH secretion and ovulation

Elizabeth Vieyra¹, Deyra A. Ramírez¹, Noé Lagunas¹, Mario Cárdenas², Roberto Chavira², Pablo Damián-Matsumura³, Angélica Trujillo⁴, Roberto Domínguez¹ and Leticia Morales-Ledesma^{1*}

Address: ¹Biology of Reproduction Research Unit, Physiology of Reproduction Laboratory, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, AP 9-020, CP 15000, Ciudad de México, México; ²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" Ciudad de México, México; ³Department of Biology of Reproduction, UAM-Iztapalapa, Ciudad de México, México; ⁴Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Escuela de Biología, Edificio 112A Ciudad Universitaria, CP 72570, Puebla, Puebla, México.

EV: eliz_vv@hotmail.com;

DAR: deyra_veg@yahoo.com.mx;

NL: lagunas@live.com.mx;

MC: marcar@correo.unam.mx;

RCH: robertochavira2002@yahoo.com.mx;

PDM: pgdm@xanum.uam.mx;

AT: atrujilloh@hotmail.com;

RD: rdcasala@hotmail.com;

* Corresponding author

E-mail: moralesledesma@yahoo.com.mx

Telephone: 52 55 56 23 07 74

Abstract

Background: The suprachiasmatic nucleus (SCN) and the cholinergic system of various regions of the hypothalamus participate in the regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin secretion, which are necessary for the occurrence of ovulation. In the present study, our goal was to analyse the effects of unilaterally blocking the muscarinic receptors in the SCN on ovulation and steroid secretion.

Methods: Cyclic rats were randomly allotted to one of the experimental groups. Groups of 8–14 rats were anaesthetized and microinjected with 0.3 µl of saline or a solution of atropine (62.5 ng in 0.3 µl of saline) into the left or right SCN at 09.00 or 19.00 h during diestrus-1 or on the proestrus day. The rats were euthanized on the predicted day of oestrus, and evaluated ovulation and levels of progesterone and oestradiol. Other groups of 10 rats were microinjected with atropine into the left or right SCNs at 09.00 h on the proestrus day, were euthanized eight h later, and luteinizing hormone (LH) was measured.

Results: At 09.00 or 19.00 h during diestrus-1, atropine microinjections into the SCNs on either side did not modify ovulation. The atropine microinjections performed at 09.00 h of proestrus into either side of the SCN blocked ovulation (right SCN: 1/9 ovulated *vs.* 9/10 in the saline group; left SCN: 8/14 ovulated *vs.* 10/10 in the saline group). The LH levels at 17.00 h in the rats that were microinjected with atropine at 09.00 h of proestrus were lower than those of the controls. In the non-ovulating atropine-treated rats, the injection of synthetic LH-releasing hormone (LHRH) restored ovulation. Atropine treatment at 19.00 h of proestrus on either side of the SCN did not modify ovulation, while the progesterone and oestradiol levels were lower.

Conclusion: Based on the present results, we suggest that the cholinergic neural information arriving on either side of the SCN is necessary for the pre-ovulatory secretion of LH to induce ovulation. Additionally, the regulation of progesterone and oestradiol secretion by the cholinergic innervation of the SCN varies with the time of day, the day of the cycle, and the affected SCN.

Keywords: suprachiasmatic nucleus, cholinergic system, ovulation, progesterone, oestradiol, LH.

Background

The suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus contains a “central pacemaker” that orchestrates circadian rhythms. The circadian system is important for successful reproduction because it ensures that the period of maximal fertility aligns with peak of sexual motivation [1]. The SCN regulates gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion, the pre-ovulatory surge of luteinizing hormone (LH) and ovulation [2]-[5].

The pulsatile frequency and secretion amplitude of GnRH regulate gonadotropin and sex steroid hormone secretion, follicular maturation and ovulation [6]-[11]. According to Robertson et al. [12], there are two possible routes by which the SCN could regulate GnRH neurons and hence the LH surge. One pathway involves the direct innervation of the GnRH neurons by the SCN. Direct synapses exist between the neurons in the SCN and GnRH neurons in the preoptic anterior area (POA), and vasoactive intestinal peptide (VIP) and vasopressin (AVP) act as neurotransmitters in these synapses [13], [14]. The second pathway involves an indirect circuit linking the SCN with the GnRH neurons through a relay station in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV), which is a hypothalamic region that is critical for the GnRH/LH surge in rodents. The SCN sends AVPergic fibres directly to the AVPV [15] where kisspeptidergic neurons have been identified [9]. These neurons are probably responsible for generating the oestradiol-mediated GnRH and LH surges that are required for ovulation [16].

The central cholinergic system regulates the circadian system and modulates the activities of neurons in the SCN. In rats, the SCN receives cholinergic projections from the basal forebrain, including the nucleus basalis magnocellularis (NBM), the brainstem (from the pedunculopontine tegmental nucleus (PPTg)), and the latero-dorsal tegmental nucleus (LDTg) [17]. According to Yang et al. [18], multiple cholinergic-modulatory actions occur via multiple receptors and ion channels that may allow acetylcholine to exert delicate control of the excitabilities of SCN neurons in different physiological settings. Damaging the NBM with quinolic acid reduces SCN cholinergic input and decreases the expressions of VIP and AVP by SCN neurons. The extents of the declines in the expressions of VIP and AVP correlate with the numbers of destroyed cholinergic afferents, which supports the notion that acetylcholine plays a direct role in regulating the metabolic activities of SCN neurons [19].

The SCN sends a cholinergic efferent to the diagonal band of Broca and the medial septum [17], [20], and GnRH neurons are present in these two nuclei [21], which suggests the possibility that the cholinergic system of the SCN regulates GnRH neurons via a direct cholinergic pathway. According to Turi et al. [22], the GnRH neurons are regulated by cholinergic neurons located in different areas of the brain in apposition to GnRH neurons. Everett et al. [23] demonstrated that at proestrus, the cholinergic system participates in the regulation of ovarian hormone secretion and ovulation. Unilaterally implanting atropine crystals into either side of the preoptic-anterior hypothalamic area (POA-AHA) blocks ovulation in a manner that depends on the side into which the POA-AHA atropine is implanted and the day of the oestrous cycle on which the treatment is performed [24]. Moreover, GnRH injection at the predicted time of proestrus restores ovulation [25]. The participation of the muscarinic system in the regulation of progesterone and oestradiol serum levels varies with the hours and days of the oestrous cycle [26], [27].

Asymmetry is a natural trait that is displayed across the range of basic particles to complex organ functions [28]. The SCN consists of two bilaterally paired nuclei [29], each of which is capable of generating a behavioural activity rhythm [30] and may act as an independent oscillator [31]. To our knowledge, there is no information on the effects on spontaneous ovulation that are elicited by the unilateral block of the cholinergic receptors in the SCN. Since in rats on diestrus-1 the unilateral implant of atropine on either side of the POA-AHA blocked ovulation, while the same treatment with rats on proestrus day did not [24] and the subcutaneously injecting atropine sulphate to rats on each day of the oestrous cycle blocked ovulation, depending on day and hour of treatment [32], the aims of the present study were to analyse the effects of unilaterally blocking the SCN's muscarinic system in rats during diestrus-1 or proestrus on ovulation. According to Zhao and Kriegsfeld [33] immortalized GnRH cells exhibit intrinsic daily changes in their sensitivity to neurochemicals stimulating their activity, which did not depend on clock genes. To test the possibility that blocking SCN cholinergic inputs has an effect on ovulation regulation, the effects of injecting atropine into either side of the SCN were evaluated at two different times of day, i.e., during the light period at 09.00 h and at the beginning of the dark period at 19.00 h.

Material and methods

Animals

This study was performed with adult, virgin, 3-month-old, female, CIIZ-V strain rats weighing 230-260 g from our own breeding stock. The animals were maintained under controlled light (on from 05:00 to 19:00 h) and temperature (22 ± 2 °C) conditions with free access to food (Purina S.A., México) and tap water. The animals' oestrous cycles were monitored via cytological examinations of daily vaginal smears. Only rats that exhibited at least two consecutive 4-day oestrus cycles were used in the experiment.

Unilateral microinjection of atropine into the left or right SCN

The experimental protocol is illustrated in Figure 1A and B. At 09.00 or 19.00 h, groups of 4-day cyclic rats in diestrus-1 or proestrus were anaesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg I.P.; Pisabental, PISA Agropecuaria S.A. de C.V. México). To assess the effectiveness of the anaesthesia, we used the tail pinch method [34]. After verifying that the rats were anaesthetized, they were placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). The skin of the skull was sectioned, and the left or right side of the skull was drilled with a 1-mm bit. Subsequently, a 29-gauge stainless steel microinjection needle was lowered into the left or right side of the SCN. The SCN was located according to the coordinates of the Paxinos and Watson [35] atlas (left SCN: -0.3 mm AP, +0.2 mm ML, and -9.1 mm DV; right SCN: -0.3 mm AP, -0.4 mm ML, and -9.1 mm DV). The microinjection needle was connected to a 25- μ l Hamilton syringe placed on a microinjection pump (CMA/100; BAS, Stockholm, Sweden) with a Teflon tube (0.65 mm OD, 0.12 mm OI; Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN). Next, 0.3 μ l of saline or 62.5 ng of atropine (based on reference [24], [25], [32]) in 0.3 μ l of saline (atropine is a non-specific muscarinic blocker with a half-life of 2 h; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was microinjected into the left (saline n=36; atropine n=42 rats) or right SCN (saline n=36; atropine n=35 rats). After surgery, each animal was placed in an individual cage with warm sawdust and heated with an incandescent lamp until the animal awoke.

To examine the potential diffusion of the liquid from one SCN into the other, ten rats were microinjected with 0.3 μ l of methylene blue dye in saline solution (10 mg/ml) in the left or right SCN [36]. No diffusion of methylene blue dye into the contralateral SCN, the ipsilateral nuclei (including the POA), or the third ventricle was observed.

Effects of the unilateral microinjection of atropine on the pre-ovulatory LH peak

To assess whether the atropine treatment modified the pre-ovulatory LH surge that occurs at 17.00 h on the proestrus day, groups of rats were injected at 09.00 h on the proestrus day with either vehicle or atropine in the left SCN (n=10 per group) or right SCN (n=10 per group) following the procedures described above. The rats were sacrificed at 17.00 h on the same day.

Effects of injecting synthetic LH-releasing hormone on the ovulation responses of non-ovulating rats microinjected with atropine in the SCN

Following the procedures described above, groups of rats on the proestrus day were treated at 09.00 h with atropine in the left SCN (n=9 per group) or right SCN (n = 9 per group) and treated again at 14.00 h (5 h later). The rats were subcutaneously injected with 3.7 μ g/kg of synthetic LH-releasing hormone (LHRH)-Gly-OH (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluted in saline following the protocol of Humphrey and colleagues [37]. The rats were sacrificed the next day (predicted oestrus) between 09.00-10.00 h (Figure 1C).

Effects of the microinjection of atropine into the SCN at 09.00 h on the proestrus day on ovarian morphology.

To assess the effects the microinjection of the atropine into the SCN on ovarian morphology, the left and right ovaries from the experimental rats were removed, cleaned of adherent fat tissue, fixed in Bouin 's solution for 24 h, dehydrated and embedded in paraffin. The ovaries (left and right) of three randomly selected rats from each group [i.e., the atropine-microinjected and vehicle-injected groups] were serially sectioned at 10 μ m and stained with haematoxylin-eosin. All ovary sections were analysed for the presence of antral follicles and new and old corpora lutea with the aid of a Nikon binocular microscope.

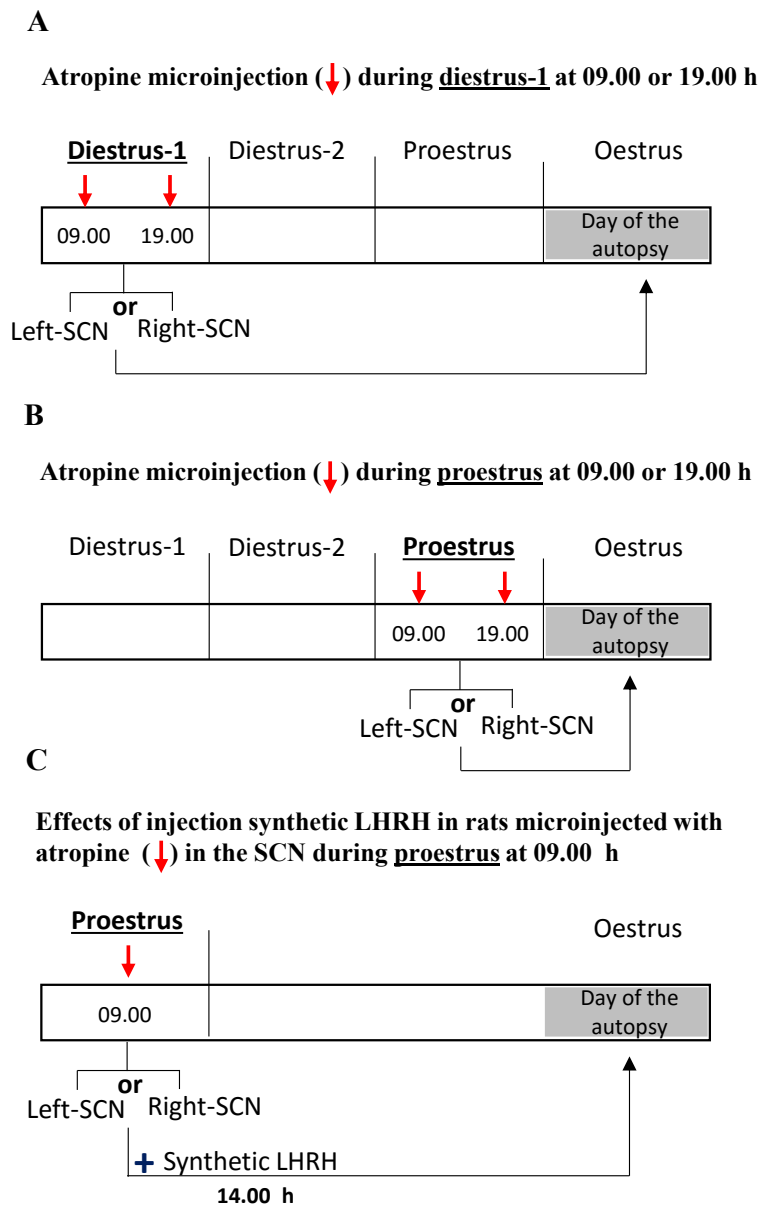


Figure 1. Schematic representation of the treatment design. The groups of rats were microinjected with atropine in the left or right SCN at 09.00 or 19.00 h during diestrus-1 (A), and the other groups were microinjected on the proestrus day (B). In panel C, note that the group of rats were microinjected with atropine in the left or right SCN at 09.00 h and at 14.00 h these rats were subcutaneously injected with 3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ synthetic LHRH. All animals were sacrificed on the predicted vaginal oestrus day.

Autopsy procedures

On the predicted vaginal oestrus day (72 h or 24 h after treatment), the rats were sacrificed by decapitation [38], [39]. The blood of the trunk from each animal was collected, allowed to clot and centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes. The serum was stored at -20 °C until the progesterone, oestradiol and LH concentrations were measured via specific radioimmunoassays. Upon autopsy, the oviducts were dissected, and the numbers of ova shed were counted with the aid of a stereoscopic microscope (Nikon, Model C-PS). The brain was subsequently dissected and quickly placed on a plate cooled with dry ice to verify the accuracy of the microinjection site.

Brain histologic processing

The brains of all rats treated with vehicle or atropine were frozen, and 100- μ m sections were obtained on a cryostat (MICROM HM 505 N, Walldorf, Germany). The sections were mounted on slides and stained with 1% cresyl violet. All results of the present study are based on rats with verified microinjections into the SCN (Figure 2A, B).

Hormone measurements

The serum concentrations of progesterone (ng/ml) and oestradiol (pg/ml) were measured using radioimmunoassay (RIA) with kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). The intra-assay coefficients of variation were 8.35% and 8.12% for the progesterone and oestradiol assays, respectively, and the inter-assay coefficients of variation were 9.45% and 9.28% for the progesterone and oestradiol assays, respectively.

The LH levels in the sera (ng/ml) were measured using the double antibody RIA technique with reagents and protocols kindly supplied by the NIADDK National Pituitary Program (Bethesda, MD, USA). The intra- and inter-assay variations were approximately 5.1% and 6.5%, respectively, for LH. The results are expressed in terms of the NIADDK standards RP-2 for FSH and LH.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Instant 3. The ovulation rates (i.e., the numbers of ovulating animals/the numbers of treated animals) were analysed using Fisher's exact probability or Chi-square tests. Data regarding the numbers of ova shed were analysed using Kruskal-Wallis tests followed by a Mann-Whitney *U* tests. The hormonal serum level results were analysed

using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's tests. When two means were compared, we used Student's t-tests. P-values below 0.05 were considered statistically significant.

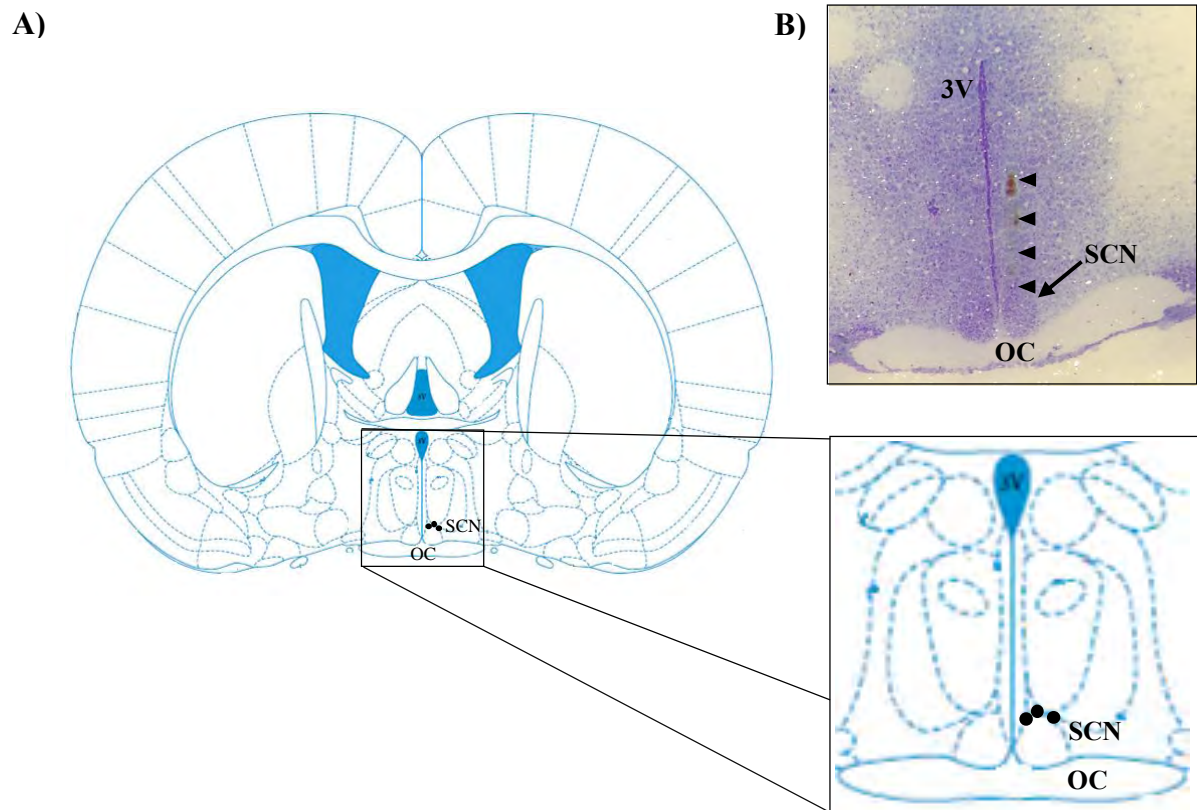


Figure 2. Diagrammatic representation of the locations of the microinjection sites. (A) The black circles represent the microinjection sites. Schematic illustration of a coronal section taken from the rat brain atlas of Paxinos and Watson [35]. (B) Nissl-stained coronal sections illustrating the trajectories of the microneedles into the left SCN. 3V: third ventricle; OC: optic chiasm; SCN: suprachiasmatic nucleus. The arrowheads indicate the trajectory of the microinjections into the left side of the SCN.

Results

Ovulation and the numbers of ova shed

To investigate whether the cholinergic system of the left and/or right SCN regulated spontaneous ovulation in the rat, the ovulation rates and the numbers of the ova shed were determined. The ovulation rates and the numbers of ova shed were not modified by the microinjection of atropine into either side of the SCN at 09.00 or 19.00 h during diestrus-1 (Table 1).

The microinjection of atropine into the left SCN at 09:00 h during proestrus resulted in a lower ovulation rate (57% of the atropine-treated rats ovulated *vs.* 100% of the saline-injected group; $p < 0.001$, chi-square test). Only 11% of the rats that were microinjected with atropine into the right SCN ovulated, whereas 90% of those microinjected with saline ovulated. No differences in the numbers of ova shed by the ovulating rats that were microinjected with vehicle or atropine were observed (Table 1).

At 19.00 h during proestrus, the atropine treatments on either side of the SCN did not modify the ovulation rate or the number of ova shed (Table 1).

Progesterone and oestradiol serum levels in the rats microinjected with atropine during diestrus-1

Compared with the saline-microinjected animals, atropine microinjection at 09.00 h in either SCN did not modify the serum progesterone or oestradiol levels (Figure 3).

In the rats that were microinjected with atropine in the right SCN at 19.00 h, the progesterone levels were higher, whereas atropine treatment in the left SCN resulted in lower oestradiol levels compared to the rats that were microinjected with the vehicle (Figure 3). Atropine microinjection in the right SCN yielded higher progesterone levels compared with those of the rats that were treated in the left SCN (Figure 3).

Table 1. Ovulatory responses of the rats with atropine into the SCN during diestrus-1 or proestrus. The ovulation rates and the means \pm SEMs of the numbers of ova shed by the rats subjected to microinjections of the vehicle into the left SCN (Vh L-SCN) or the right SCN (Vh R-SCN) and those subjected to atropine microinjections into the left SCN (ATR L-SCN) or the right SCN (ATR R-SCN) at 09.00 or 19.00 h during diestrus-1 or proestrus. ^a represents the number of ova shed by the only ovulating rat. ^b Number of ovulating animals/number of treated animals. * $p < 0.02$ vs. the respective group treated with Vh L-SCN (Fisher's exact probability test). ** $p < 0.001$ vs. the respective group treated with Vh R-SCN (Fisher's exact probability test). *** $p < 0.04$ vs. ATR L-SCN (Fisher's exact probability test).

Groups	n	Ovulation rate ^b	Number of ova shed	n	Ovulation rate ^b	Number of ova shed
09.00 h of diestrus-1				19.00 h of diestrus-1		
Vh L-SCN	8	8/8	10.4 \pm 2.1	10	10/10	10.1 \pm 1.2
ATR L-SCN	10	10/10	11.5 \pm 1.2	10	10/10	8.8 \pm 1.1
Vh R-SCN	10	10/10	8.5 \pm 1.0	8	7/8	10.0 \pm 1.9
ATR R-SCN	10	9/10	9.5 \pm 1.1	8	8/8	8.3 \pm 1.3
09.00 h of proestrus				19.00 h of proestrus		
Vh L-SCN	10	10/10	8.5 \pm 1.0	8	7/8	10.0 \pm 1.9
ATR L-SCN	14	8/14 *	9.8 \pm 1.2	8	8/8	11.5 \pm 1.4
Vh R-SCN	10	9/10	11.4 \pm 1.6	8	8/8	8.3 \pm 1.3
ATR R-SCN	9	1/9 **, ***	3 ^a	8	8/8	11.6 \pm 0.8

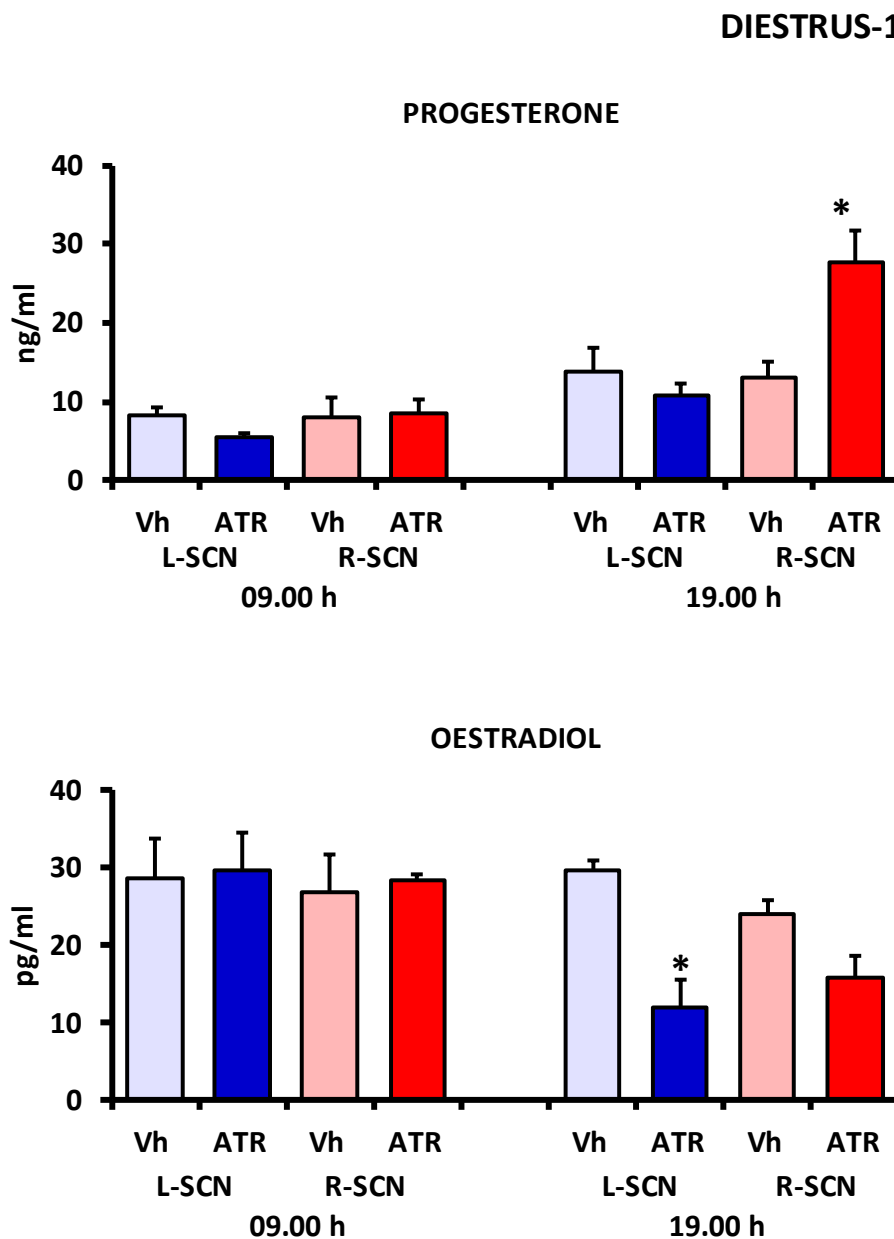


Figure 3. Steroid hormone serum levels in the rats treated at 09.00 and 19.00 h during diestrus-1. Means \pm SEMs of the progesterone (ng/ml) and oestradiol serum levels (pg/ml) in the rats subjected to microinjections of vehicle into the left (Vh L-SCN) or right (Vh R-SCN) SCN or atropine microinjection into the left (ATR L-SCN) or right (ATR R-SCN) SCN at 09.00 or 19.00 h during diestrus-1. * $p < 0.05$ vs. the respective groups microinjected with Vh (ANOVA followed by Tukey's test). ♦ $p < 0.001$ vs. ATR-L-SCN (ANOVA followed by Tukey's test).

Serum progesterone and oestradiol levels in the rats that were microinjected with atropine during proestrus

The rats in proestrus that were treated with atropine into either side of the SCN at 09.00 h exhibited significantly lower ovulation rates; consequently, the progesterone and oestradiol levels in the ovulating and non-ovulating animals were analysed separately.

Compared with the group that was microinjected with vehicle, the non-ovulating rats that were microinjected with atropine into the left SCN (n=6) exhibited lower progesterone levels. Atropine microinjection into the right SCN (n=8) yielded lower oestradiol levels compared with those of the rats that were treated in the left SCN (n=8; Figure 4). In the ovulating rats that were microinjected with atropine in the left SCN (n=8), the serum progesterone and oestradiol levels were not different from those of the saline-microinjected rats. A statistical analysis of the difference between the ovulating rats that were treated with atropine in the right SCN and the corresponding vehicle-treated group was not possible because only one rat in the right SCN atropine treatment group ovulated (Figure 4).

In the proestrus rats that were treated at 19.00 h with atropine into the right SCN, the progesterone levels were lower than those in the corresponding vehicle-treated group. The atropine treatment in the left SCN resulted in lower oestradiol levels compared with those of the corresponding vehicle-treated group of rats (Figure 5).

LH serum levels at 17.00 h during proestrus

The LH levels in the rats that were microinjected with atropine at 09.00 h on either side of the SCN and sacrificed at 17.00 h were lower than the LH levels the corresponding vehicle-microinjected group (Figure 6). Atropine treatment in the right SCN yielded lower LH levels compared with those of the rats with left SCN treatments (ATR R-SCN 1.4 ± 0.2 vs. ATR L-SCN 5.1 ± 1.3 ; $p < 0.023$, Student's *t*-test).

Influence of LHRH on ovulation in the rats that were microinjected with atropine in the SCN

Because the microinjection of atropine into the SCN at 09.00 h during proestrus blocked ovulation, and the pre-ovulatory release of GnRH is required for ovulation, we examined whether the microinjection of atropine into the SCN altered the pre-ovulatory release of GnRH. The results obtained from the rats that were microinjected with atropine in either SCN were combined. Among the rats that were

microinjected with atropine in the SCN, ovulation was induced in 77% of the rats that were treated following a subcutaneous injection of synthetic LHRH (Figure 7).

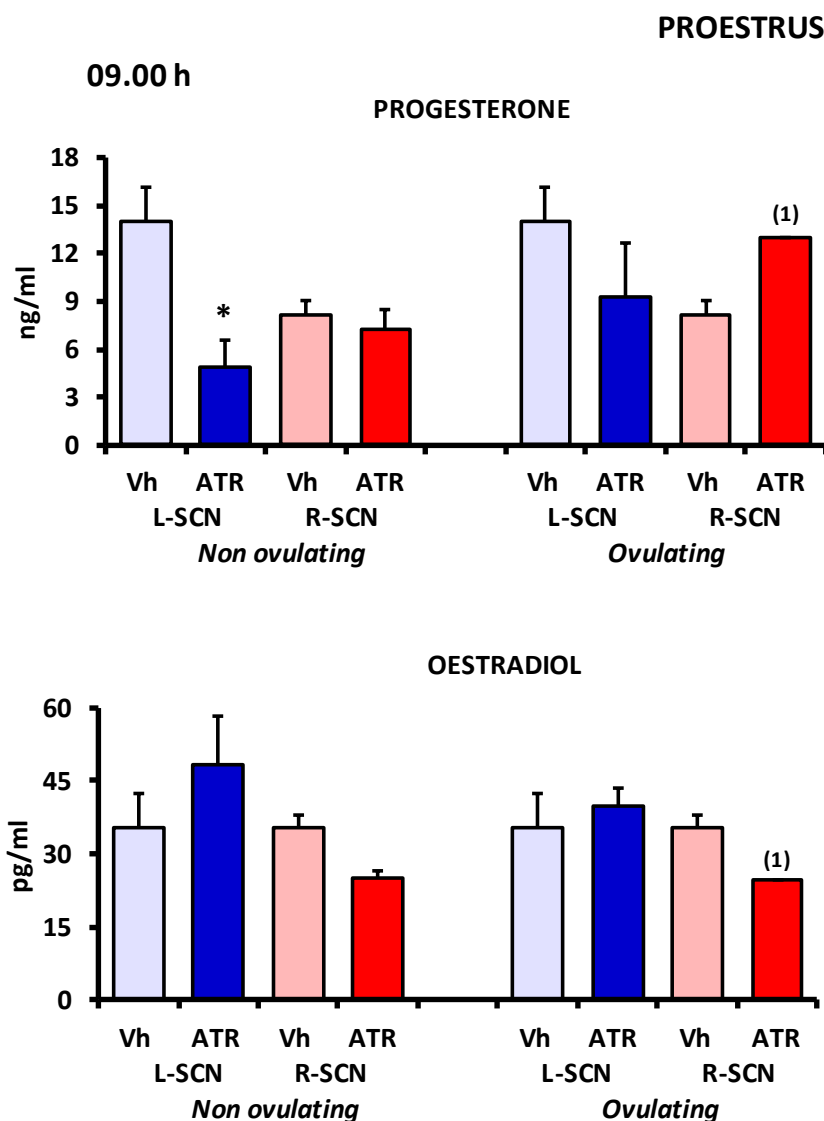


Figure 4. Steroid hormone serum levels of the rats treated at 09.00 h on the proestrus day. The means \pm the SEMs for the progesterone (ng/ml) and oestradiol serum levels (pg/ml) of the non-ovulating and ovulating rats that received microinjections of the vehicle in the left (Vh L-SCN) or right (Vh R-SCN) SCN or atropine microinjection in the left (ATR L-SCN) or right (ATR R-SCN) SCN at 09.00 h during proestrus. (1) Represents the level of one animal's ovulation. * $p < 0.01$ vs. the respective groups microinjected with Vh (ANOVA followed by Tukey's test). ♦ $p < 0.05$ vs. ATR-L-SCN (ANOVA followed by Tukey's test).

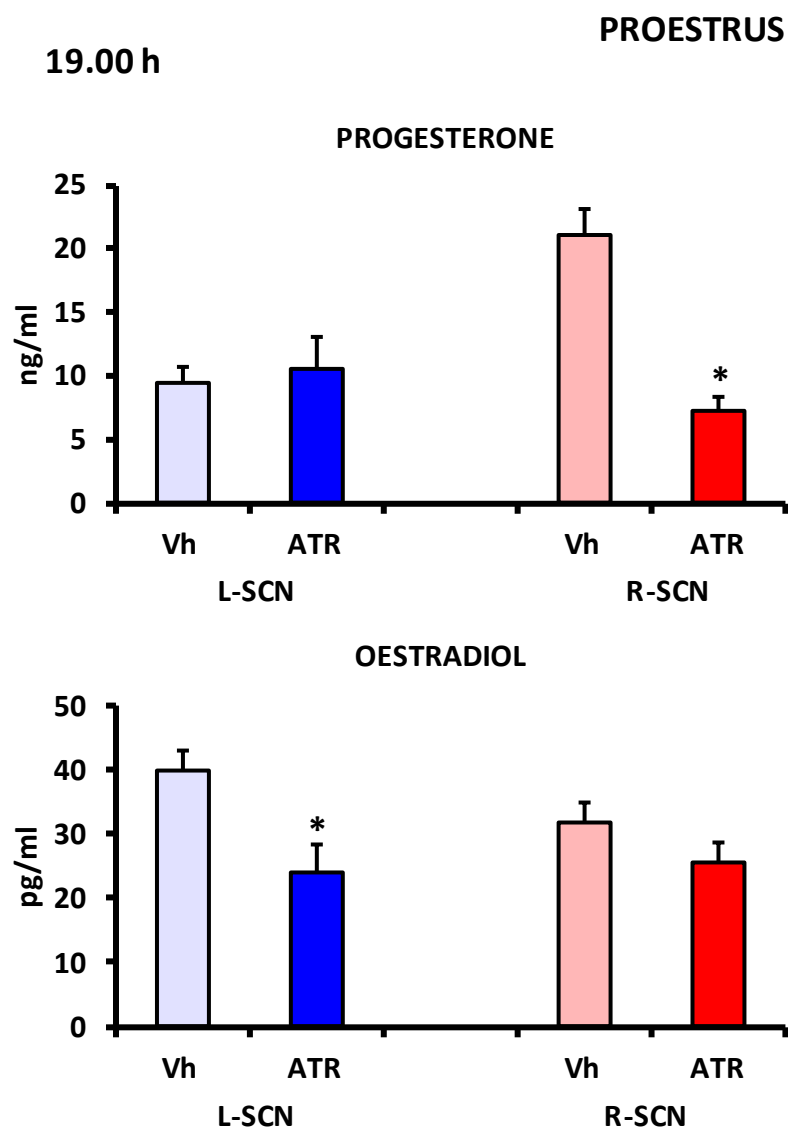


Figure 5. Steroid hormone serum levels of the rats treated at 19.00 h on the proestrus day. The means \pm the SEMs of the progesterone (ng/ml) and oestradiol serum levels (pg/ml) in the rats subjected to microinjections of vehicle in the left (Vh L-SCN) or right (Vh R-SCN) SCN or atropine microinjections in the left (ATR L-SCN) or right (ATR R-SCN) SCN at 19.00 h during proestrus. * $p < 0.05$ vs. their respective groups that were microinjected with Vh (Student's *t*-test).

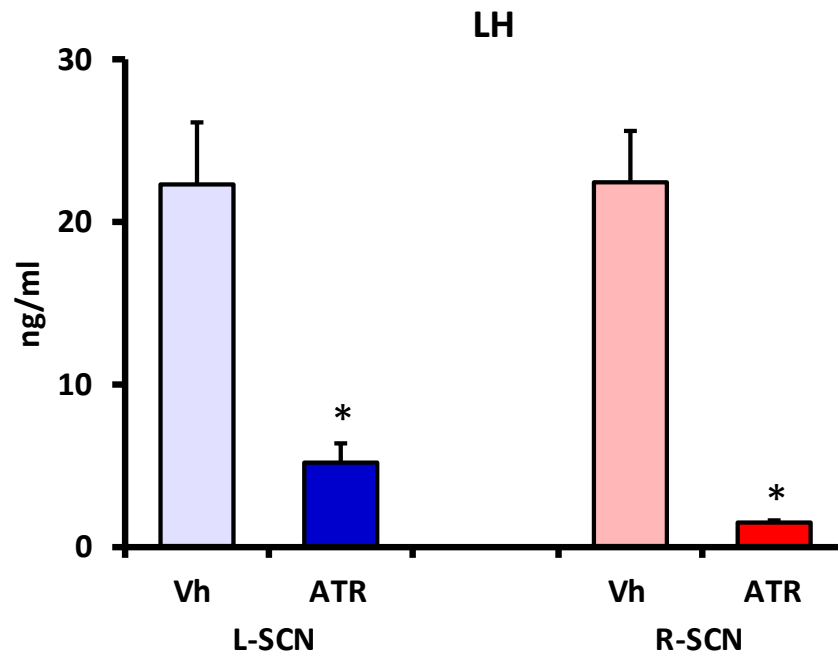


Figure 6. LH serum levels evaluated at 17.00 h on the proestrus day. The means \pm the SEMs for the LH serum levels (ng/ml) of the rats subjected to microinjection of the vehicle in the left (Vh L-SCN) or right (Vh R-SCN) SCN or atropine microinjection into the left (ATR L-SCN) or right (ATR R-SCN) SCN at 09.00 h during proestrus and sacrificed at 17.00 h on the same day. * $p < 0.01$ vs. the respective groups that were microinjected with Vh (Student's t-test).

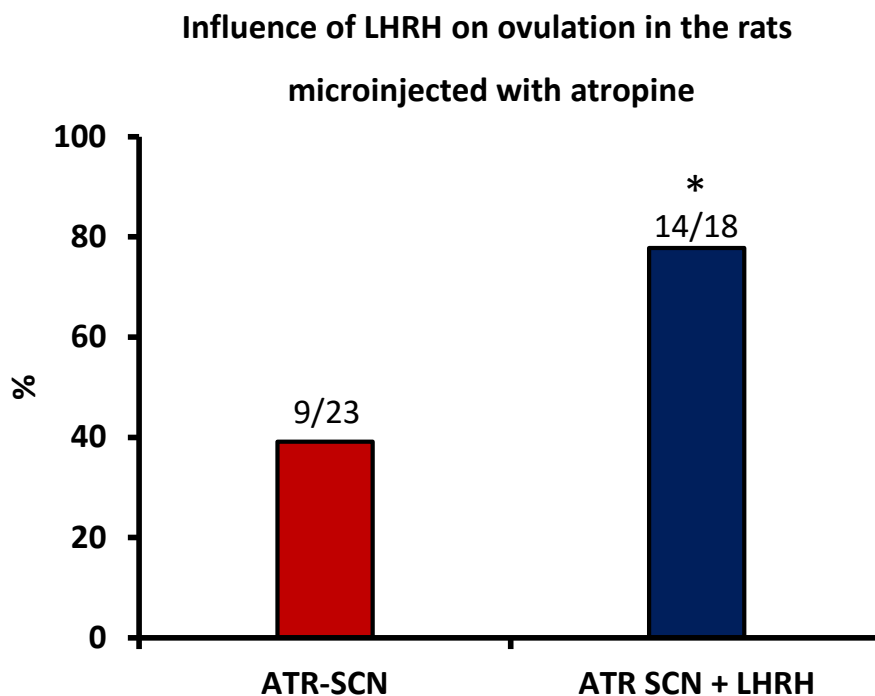


Figure 7. Influence of LHRH on ovulation in the rats that were microinjected with atropine. Ovulation rates of the **rats subjected** to microinjections of atropine in the SCN (ATR-SCN) at 09.00 h during proestrus and rats microinjected with atropine followed by injection with 3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per body weight of synthetic LHRH at 14.00 h on the same day (ATR-SCN+LHRH). The animals were sacrificed 18-20 h after treatment on the predicted oestrus day. * $p < 0.025$ vs. the atropine group (Fisher's exact probability test).

Ovarian morphology

Independently of the day and time, vehicle microinjection into either side of the SCN did not modify the ovarian morphology (Figure 8A). A histological analysis of the ovaries of the non-ovulating rats that were treated with atropine in either side of the SCN at 09.00 h during proestrus revealed the presence of a few antral follicles and old corpora lutea (Figure 8B).

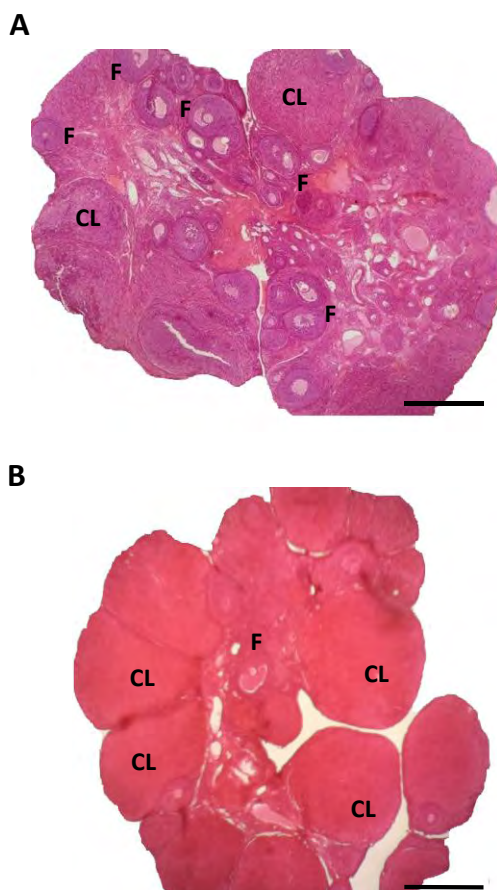


Figure 8. Ovarian histologies of the rats with atropine into the SCN at 09.00 h during proestrus. The micrographs correspond to the greatest section of the ovary at 10- μ m thick that was stained with haematoxylin-eosin. The rats were sacrificed on the predicted vaginal oestrus day. (A), the ovaries of rats following the microinjection of the vehicle into either SCN (Vh-SCN) in which several fresh corpora lutea can be observed and some antral follicles can be observed. (B), Ovaries of rats microinjected with atropine in either SCN (ATR-SCN); F, antral follicles; CL, corpora lutea. 4X microscopic lens, Scale Bar = 200 μ m.

Discussion

The present results suggest that the cholinergic neural information arriving to either side of the SCN at 09.00 h is necessary for the pre-ovulatory secretions of GnRH and LH that result in spontaneous ovulation in proestrus rats. This neural information does not appear to participate in the regulation of GnRH or LH secretion on the proestrus day at 19.00 h or during diestrus-1 at 09.00 or 19.00 h.

Funabashi et al. [40] demonstrated that the injection of pentobarbital on the morning of proestrus (8.00-09.00 h) does not interfere with the pulsatile secretion of LH. Domínguez and Smith [41] demonstrated that in 4- and 5-day cyclic rats on the proestrus day, the injection of pentobarbital at 09.00 h does not modify ovulation. A similar effect was observed in the present study. In rats on the proestrus day, the injection of barbiturates or atropine at 13.00 h blocks ovulation, and the injection GnRH, LH or human chorionic gonadotrophin (hCG) at 17.00 h (4 h later) restored ovulation, which suggests that the blocking agents (barbiturates or atropine) affect the spontaneous release of LH [41]-[43].

We have previously demonstrated that systemically blocking the cholinergic system via the subcutaneous injection of atropine sulphate blocks spontaneous ovulation on the predicted oestrus day in a manner that depends on the day and time of the oestrous cycle, which suggests that gonadotropin secretion throughout the oestrous cycle is controlled by a circadian rhythm and that this circadian rhythm is closely related to the cholinergic system [32].

We have previously demonstrated that the blockade of the cholinergic system via the implantation of atropine crystals at 13.00 h into either side of the POA-AHA during diestrus-1, into the right POA-AHA during oestrus, and into the left POA-AHA during diestrus-2 results in the lack of ovulation on the predicted day of oestrus. However, implantation on either side of the hypothalamus during proestrus does not modify the rate of ovulation [24]. In the present study, the unilateral block at 09.00 h of the muscarinic receptors in the SCN of rats on the proestrus day partially blocked ovulation, whereas the same treatment had no effect in rats during diestrus-1. These results are the opposite of those observed when we blocked the cholinergic system in the POA-AHA region (i.e., complete blockade in diestrus-1 rats and a lack of effect in proestrus rats). Taken together, the present and previous results suggest that, during the first three days of the cycle, the POA-AHA regions participate in the regulation

of GnRH secretion and ovulation, whereas the participation of the SCN's cholinergic system occurs only during the beginning of the proestrus day.

In the adult rat, the SCN's cholinergic afferents that originate in the NBM play an important role in maintaining the anatomy and chemo-architecture of the SCN [19], [44]. On the afternoon of proestrus, the AVP innervation arising from the SCN stimulates the pre-ovulatory LH surge [45]. Loh et al. [46] demonstrated that, in female VIP-knockout mice, the ovulatory response is reduced. In the present study, the ovulation blockade that resulted from the atropine treatment of the rats in proestrus at 09.00 h might have resulted from a decrease in the neural signals from the AVPergic and/or VIPergic neurons that regulate the GnRH neurons located in the POA. Moreover, this decrease would prevent the pre-ovulatory LH surge required for ovulation. The loss of VIP signalling can result in a decrease in reproduction [46].

According to Cruz et al. [47], blocking the muscarinic receptors in the POA-AHA during diestrus-2 or oestrus appears to be linked to the inhibition of ovarian follicular population growth in the ovary ipsilateral to the treated hypothalamic area. In another experiment, the blockade of M₁R muscarinic receptors in the left ovary was observed to block ovulation, whereas this block had no effect when performed in the right ovary. Based in these results, the authors suggested that the M₁R receptors in the left ovary might regulate ovulation asymmetrically through a stimulatory neural signal that is relayed to the hypothalamus via the vagus nerve and induces GnRH secretion, which then triggers ovulation [48].

Ovulation is a complex process that leads to the release of the mature oocyte from the ovarian follicle, induced by the LH surge [49]. Part of the events for LH-induced ovulation include the weakening of the follicle wall by proteolytic digestion, apoptotic follicle cell death, and follicle contraction. Overall, in mammals these coordinated events are crucial for follicle rupture and subsequent expulsion of the oocyte [50]. In proestrus day, acetylcholine binding to M₁R in the follicular cells of the left ovary generates a neural signal involved in the regulation of GnRH secretion, which in turn, stimulates LH secretion, which is required for ovulation [48].

Although present results cannot rule out the possibility that the pre-ovulatory LH surge underwent a phase change (advance or delay), the presence of a few antral follicles and old corpora lutea in the

ovaries of non-ovulating rats suggest that the low levels of LH measured at 17.00 h during proestrus were not sufficient to stimulate the final follicle maturation phase. Our interpretation is supported by the observed ovulation induced by injecting LHRH at 14.00 h to atropine treated rats during proestrus and by Cruz et al. [47] results showing that in rats on oestrus day, blocking the muscarinic receptors in the right POA-AHA resulted in a greater number of pre-ovulatory atretic follicles in the ipsilateral ovary, suggest that the lack of ovulation in rats with an atropine implant on the right POA-AHA was the result of an insufficient LH surge on proestrus. Based on these results we suggest that the cholinergic signal originating at the SCN regulates the follicle's final maturation phase, perhaps through a cholinergic neuronal pathway.

Because the injection of synthetic LHRH into the rats that were treated with atropine in the right SCN induced ovulation, we propose that the cholinergic signal originating in the SCN is necessary for the regulation of GnRH and LH secretion. In proestrus rats, the injection of atropine into the left or right SCN at 09.00 h resulted in lower LH levels, which suggests that on the morning of proestrus, the cholinergic system innervating the SCN regulates gonadotropin secretion in a stimulatory manner. Moreover, the present results suggest that a pre-ovulatory LH surge shift was not produced. *In vitro* studies have demonstrated that carbachol (a nonspecific acetylcholine agonist) acts directly on the SCN to alter the phase of the rhythm of neuronal activity and that atropine and pirenzepine (a M1-selective antagonist) block carbachol's phase-shifting effects [51]. Cruz et al. [52] reported that atropine-sulphate treated animals exhibit a 24-h delay in the LH preovulatory surge.

There is evidence that kisspeptin regulates GnRH secretion at two different levels, i.e., the kisspeptinergic signal originating from the AVPV that acts on the somata of GnRH neurons [53] and the arcuate kisspeptinergic neurons at the GnRH axons [54]. Because the SCN sends AVPergic information to both the AVPV and arcuate kisspeptinergic neurons, the present results suggest that the somata of the SCN cells that release AVP are stimulated by acetylcholine ligand binding on their muscarinic receptors. The differences in LH levels observed in the proestrus rats that were microinjected at 17.00 h with atropine into either SCN suggest that the cholinergic signals originating from the left and right SCNs modulate GnRH secretion from two different zones of the hypothalamus.

There is evidence that the regulation exerted by the hypothalamus on ovarian function exhibits presents asymmetry [55] and that this asymmetry varies during the oestrous cycle [24], [25]. Gerendai and Halász

[55] suggested that the right side of the hypothalamus plays a dominant role in the control of reproductive functions. We have previously demonstrated that the right side of POA-AHA exhibits greater choline acetyltransferase activity during the day of oestrous, whereas this activity is greater in the left POA-AHAs of rats studied during diestrus-2 [56]. In the SCN, there is evidence of asymmetries, i.e., the asymmetrical patterns of activity from each side of the SCN support the hypothesis that independent oscillators exist on each side. This asymmetry could reflect a more general feature of brain organization, namely, functional lateralization [31]. According to Yang and Okamura [57] and Yan and Silver [58], the expressions of *Per1* in the middle and rostral SCN regions are asymmetric. In adult male Syrian hamsters, exposure to constant light induces a splitting in their locomotor activity that results in asymmetry in the *Per1* expression in the SCN [59]. In the present study, the differences in the capacities of atropine microinjections into the right and left SCNs at 09.00 h of proestrus to affect spontaneous ovulation (i.e., the ovulation rate) suggest that there are differences in the sensitivities of the muscarinic systems of each SCN. These results suggest that the right SCN seems to be more committed to the regulation of ovarian function. Although additional studies are required to clarify this idea, we cannot rule out the notion that the differences could be related to the numbers of muscarinic receptors in each SCN.

The SCN regulates the activity of the adrenal gland by acting on neurons that release corticotrophin-releasing hormone (CRH) and AVP [60], [61]. We have previously demonstrated that the adrenal glands are the main source of progesterone during the oestrous cycle in rats [26]. According to Kornya et al. [62], the cholinergic action on steroid production in human granulosa cells is mediated through the muscarinic route, and cholinergic neurotransmission may play a physiological role in intraovarian regulatory pathways. According to Cruz et al. [27], the participation of the cholinergic system in the regulation of ovarian oestradiol secretion varies throughout the oestrous cycle, and in unilaterally ovariectomized rats, this participation also depends on the *in situ* ovary.

In the present study, the changes in the progesterone and oestradiol levels in the rats that underwent unilateral atropine microinjection depended on the hormone measured, the time of day of the treatment, and the side of the SCN treated, which suggests that the neuroendocrine mechanisms that regulate hormone secretion exhibit asymmetry. Additionally, the regulations of progesterone and oestradiol secretions are modulated by SCN signals after pre-ovulatory LH release occurs.

Conclusions

Based on the present results, we propose that, for ovulation to occur, the system regulating GnRH and LH secretion requires a cholinergic signal from the left or right SCN on the morning (09.00 h) of proestrus. Together, the present results suggest that the cholinergic innervation of the SCN participates in the regulation of progesterone and oestradiol secretions and that this participation varies according to the hour and day of the cycle studied and exhibits functional asymmetry.

Abbreviations

SCN: suprachiasmatic nucleus; VIP: vasoactive intestinal peptide; AVP: vasopressin; AVPV: anteroventral periventricular nucleus; NBM: nucleus basalis magnocellularis; PPTg: pedunculopontine tegmental nucleus; LDTg: latero-dorsal tegmental nucleus; ARC: arcuate nucleus RP3V: rostral periventricular area of the third ventricle; GnRH: gonadotropin-releasing hormone; LH: luteinizing hormone; POA: preoptical area.

Acknowledgements

We thank the “Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM” and CONACyT for the support provided for this study. This work is a requirement for obtaining the degree of Doctor of Biological Sciences. We also thank M Sc A. Domínguez-González for the revision of the English manuscript.

Funding

The experimental work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN217016; CONACyT Grant 236908.

Availability of data and materials

All datasets on which the conclusions of the paper rely are available to readers.

Authors' contributions

EV, LML and RD planned the experiments. EV, DAR and NL performed the experiments. EV, LML, PDM, AT and RD participated in the analysis and discussion of the results. MC and RCH participated in the performance of the RIAs to measure the different hormones levels. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable

Ethics approval and consent to participate

All experiments were performed in strict accordance with the Mexican Law of Animal Treatment and Protection Guidelines and the specifications of the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999. The Institutional Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México approved the experimental protocols (FES/DEPUCI/236/14).

Authors' information

¹Biology of Reproduction Research Unit. Physiology of Reproduction Laboratory. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. AP 9-020, CP 15000. México, D.F.; ²Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" México; ³Department of Biology of Reproduction. UAM, México D.F., México. ⁴Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Escuela de Biología, Edificio 112A Ciudad Universitaria, CP 72570, Puebla, Puebla, México.

References

1. Urlep Z, Rozman D. The interplay between circadian system, cholesterol synthesis, and steroidogenesis affects various aspects of female reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013; 4:11.
2. Brown-Grant K, Raisman G. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1977;198(1132):279–296.
3. Samson WK, McCann SM. Effects of suprachiasmatic nucleus lesions on the hypothalamic LH-releasing hormone (LHRH) content and gonadotropin secretion in the ovariectomized (OVX) female rat. *Brain Res Bull*. 1979;4(6):783–788.
4. Wiegand SJ, Terasawa E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology*. 1982;34(6):395–404.
5. Ma YJ, Kelly MJ, Rönnekleiv OK. Pro-gonadotropin-releasing hormone (ProGnRH) and GnRH content in the preoptic area and the basal hypothalamus of anterior medial preoptic nucleus/suprachiasmatic nucleus-lesioned persistent estrous rats. *Endocrinology*. 1990;127(6):2654–64.

6. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Paret AS, Matagne V, Mungenast AE. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is time ripe for a systems biology approach?. *Endocrinology*. 2006;147(3):1166-1174.
7. Dungan HM, Gottsch ML, Zeng H, Gragerov A, Bergmann JE, Vassilatis DK, Clifton DK, Steiner RA. The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *J Neurosci*. 2007;27(44):12088–12095.
8. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci*. 2008;28(35):8691-7.
9. Clarkson J, Herbison AE. Oestrogen, kisspeptin, GPR54 and the pre-ovulatory luteinising hormone surge. *J. Neuroendocrinol*. 2009;21(4):305-11.
10. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 2012;92(3):1235–316.
11. Plant TM. 60 years of neuroendocrinology: The hypothalamo-pituitary–gonadal axis. *J Endocrinol*. 2015;226(2): T41–T54.
12. Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 2009;150(8):3664-71.
13. Van der Beek EM, Wiegant VM, van der Donk HA, van den Hurk R, Buijs RM. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J Neuroendocrinol*. 1993;5(2):137–44.
14. Tonsfeldt KJ, Chappell PE. Clocks on top: the role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;349(1):3-12.
15. Vida B, Deli L, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Caraty A, Coen CW, Liposits Z, Kalló I. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol*. 2010;22(9):1032-9.
16. Colledge WH. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(3):115-21.

17. Bina KG, Rusak B, Semba K. Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *J Comp Neurol.* 1993;335(2):295–307.
18. Yang JJ, Wang YT, Cheng PC, Kuo YJ, Huang RC. Cholinergic modulation of neuronal excitability in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol.* 2010;103(3):1397–409.
19. Madeira MD, Pereira PA, Silva SM, Cadete-Leite A, Paula-Barbosa MM. Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 2004;125(4):889–901.
20. Hut RA, Van der Zee EA. The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. *Behav Brain Res.* 2011;221(2):466–480.
21. Silverman AJ, Livne I, Witkin JW. The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's physiology of reproduction* New York: Raven Press; 1994. p. 1683–1706.
22. Turi GF, Liposits Z, Hrabovszky E. Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *Neurochem Int.* 2008;52(4-5):723–8.
23. Everett JW, Sawyer CH, Markee JE. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology.* 1949;44(3):234–50.
24. Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R. Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus in the cyclic rat. *J Endocrinol.* 1989;123(3):437–9.
25. Cruz ME, Castro J, Domínguez R. A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J Endocrinol.* 1992;133(2):205–10.
26. Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Barco AI, Chavira R, Domínguez R, Cruz ME. The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine.* 2005;28(2):145–51.
27. Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez OJ, Chavira R, Domínguez R. The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2006; 4:43.
28. Bock GR, Marsh J. Biological Asymmetry and Handedness. In “CIBA Foundation Symposium 162”, Toronto. Chichester/New York/Brisbane/Singapore: Wiley, 1991.

29. Michel S, Marek R, vanderleest HT, vansteensel MJ, Schwartz WJ, Colwell CS, Meijer JH. Mechanism of bilateral communication in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. 2013;37(6):964-71.
30. Pickard GE, Turek FW. Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei. *Science*. 1982;215(4536):1119-21.
31. Zhang L, Aguilar-Roblero R. Asymmetrical electrical activity between the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Neuroreport*. 1995;6(3):537-40.
32. Domínguez R, Riboni L, Zipitría D, Revilla R. Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *J Endocrinol*. 1982;95(2):175-80.
33. Zhao S, Kriegsfeld J. Daily changes in GT1-7 cell sensitivity to GnRH secretagogues that trigger ovulation. *Neuroendocrinology* 2009; 89:448-457.
34. Goodchild CS, Serrao JM, Kolosov A, Boyd BJ. Alphaxalone Reformulated: A Water-Soluble Intravenous Anesthetic Preparation in Sulfobutyl-Ether- β Cyclodextrin. *Anesth Analg*. 2015;120(5):1025-31.
35. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. London: Elsevier Academic; 2004.
36. Lohman RJ, Liu L, Morris M, O'Brien TJ. Validation of a method for localised microinjection of drugs into thalamic subregions in rats for epilepsy pharmacological studies. *J Neurosci Methods*. 2005;146(2):191-197.
37. Humphrey RR, Dermody WC, Brink HO, Bousley FG, Schottin NH, Sakowski R, Vaitkus JW, Veloso HT, Reel JR. Induction of luteinizing hormone (LH) release and ovulation in rats, hamsters, and rabbits by synthetic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Endocrinology*. 1973;92(5):1515-26.
38. Derr RF. Pain perception in decapitated rat brain. *Life Sci*. 1991;49(19):1399-402.
39. Dhibi S, Ettaya A, Elfeki A, Hfaiedh N. Protective effects of *Artemisia arborescens* essential oil on oestroprogestative treatment induced hepatotoxicity. *Nutr Res Pract*. 2015;9(5):466-71.
40. Funabashi T, Jinnai K, Sano A, Shinohara K, Kimura F. Pentobarbital stimulates the activity of the GnRH pulse generator interacting with opioid neurons in rats in proestrus. *Psychoneuroendocrinology*. 2000; 25:277-287.

41. Domínguez R, Smith ER. Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology*. 1974;14(3):212-23.
42. Weick RF, Smith ER, Domínguez R, Dhariwal AP, Davidson JM. Mechanism of stimulatory feedback effect of estradiol benzoate on the pituitary. *Endocrinology*. 1971;88(2):293-301.
43. Everett JW. "Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview". In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. ed. by J.D. Neill. St. Louis: Elsevier Press; 2006. p. 1289-1308.
44. Abbott SM, Arnold JM, Chang Q, Miao H, Ota N, Cecala C, Gold PE, Sweedler JV, Gillette MU. Signals from the brainstem sleep/wake centers regulate behavioral timing via the circadian clock. *PLoS ONE*. 2013;8(8): e70481.
45. Palm IF, Van Der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A. Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 1999;93(2):659-66.
46. Loh DH, Kuljis DA, Azuma L, Wu Y, Truong D, Wang HB, Colwell CS. Disrupted reproduction, estrous cycle, and circadian rhythms in female mice deficient in vasoactive intestinal peptide. *J Biol Rhythms*. 2014;29(5):355-69.
47. Cruz ME, Flores A, Domínguez R. The cholinergic system of the preoptic-anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way. *Endocrine*. 2014;47(3):913-22.
48. Cruz ME, Flores A, Alvarado BE, Hernández CG, Zárata A, Chavira R, Cárdenas M, Arrieta-Cruz I, Gutiérrez-Juárez R. Ovulation requires the activation on proestrus of M₁ muscarinic receptors in the left ovary. *Endocrine*. 2015;49(3):809-19.
49. Espey LL, Richards JS. Ovulation. In: Neil JD, editors. *Physiology of Reproduction*. Amsterdam. Academic Press; 2006. p. 425-474.
50. Crespo D, Goetz FW, Planas JV. Luteinizing hormone induces ovulation via tumor necrosis factor α -dependent increases in prostaglandin F₂ α in a nonmammalian vertebrate. *Sci Rep*. 2015; 5:14210.
51. Liu C, Gillette MU. Cholinergic regulation of the suprachiasmatic nucleus circadian rhythm via a muscarinic mechanism at night. *J Neurosci*. 1996;16(2):744-51.
52. Cruz ME, Villegas G, Domínguez-González A, Chavira R, Domínguez R. Ovulation delay induced by blockade of the cholinergic system on dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of the preoptic anterior-hypothalamic area of the rat. *Brain Res Bull*. 2001;54(4):339-44.

53. Smarr BL, Morris E, de la Iglesia HO. The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of Kiss1 and the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 2012;153(6):2839-50.
54. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology*. 2008;149(8):3926-32.
55. Gerendai I, Halász B. Asymmetry of the neuroendocrine system. *News Physiol Sci*. 2001;16: 92-5.
56. Sánchez MA, López-García JC, Cruz ME, Tapi R, Domínguez R. Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Neuroreport*. 1994;5(4):433-4.
57. Yan L, Okamura H. Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. 2002;15(7):1153-62.
58. Yan L, Silver R. Day-length encoding through tonic photic effects in the retinorecipient SCN region. *Eur. J. Neurosci*. 2008;28(10):2108-15.
59. Mahoney CE, Brewer JM, Bittman EL. Central control of circadian phase in arousal-promoting neurons. *PLoS One* 2013;8(6):e67173.
60. Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, Kalsbeek A. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*. 1999;11(5):1535-44.
61. Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(5):581-91.
62. Kornya L, Bódis J, Koppán M, Tinneberg HR, Török A. Modulatory effect of acetylcholine on gonadotropin-stimulated human granulosa cell steroid secretion. *Gynecol Obstet Invest*. 2001;52(2):104-107.

CAPÍTULO III

**Effects of unilaterally microinjecting acetylcholine in the suprachiasmatic nucleus
on ovulatory responses**

Elizabeth Vieyra, Deyra A. Ramírez, Roberto Domínguez and Leticia Morales-Ledesma.

Enviado para su publicación a la revista *Biology Open*

Effects of unilaterally microinjecting acetylcholine in the suprachiasmatic nucleus on ovulatory responses

Elizabeth Vieyra, Deyra A. Ramírez, Roberto Domínguez and Leticia Morales-Ledesma*.

Biology of Reproduction Research Unit. Physiology of Reproduction Laboratory. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. AP 9-020, CP 15000. México, D.F.

*Corresponding author:

Leticia Morales-Ledesma

Email: moralesledesma@yahoo.com.mx

Physiology of Reproduction Laboratory.

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.

AP 9-020, CP 15000. México, D.F.

Telephone: 52 55 56 23 07 74

FAX: 52 55 5773 63 30

Running title: Ovulation and cholinergic in SCN

Key words: suprachiasmatic nucleus, acetylcholine, ovulation, steroids hormones.

Summary statement: The ovarian functions are regulated by the cholinergic system and the suprachiasmatic nucleus that is the "central pacemaker" regulates biological rhythms.

Abstract

In rats on proestrus day, unilaterally blocking the muscarinic receptors with atropine in the suprachiasmatic nucleus (SCN) at 09.00 h blocked ovulation. In the present study, our goal was analyse the effects of unilaterally stimulating the acetylcholine receptors in the SCN on ovulation and steroids hormone levels in adult cyclic rats on proestrus. The treatment consisted of microinjecting of 0.3 μ l of acetylcholine [50 μ M] into the left or right SCN at 09.00 or 19.00 h. Acetylcholine microinjection in either side of the SCN performed at 09.00 h blocked ovulation in (11/22) 50 % of treated animals. Regardless of the SCN side, microinjection treatments outside the SCN did not modify ovulation (13/16). The effects on hormone levels resulting from stimulating the cholinergic SCN-system depended of the hormone studied and the time elapsed between stimulation treatments. Present results suggest that, on proestrus day the cholinergic system of the SCN participates in the stimulating regulation of ovulation.

Introduction

The circadian clock of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) is regulated by multiple neurotransmitter systems, including the cholinergic innervation from the brain stem and basal forebrain (Bina et al., 1993; Abbott et al., 2013). The cholinergic system participates in ovarian hormone secretion and ovulation regulation (Flores et al., 2005). Acetylcholine (ACh) plays a direct role in regulating the metabolic activity of SCN neurons (Madeira et al., 2004), circadian rhythmicity, and seasonal reproductive cycle (Earnest and Turek, 1985). Adding carbachol, a nonspecific ACh agonist, to brain slices containing the SCN resulted in phase advances of the neural firing activity of SCN neurons, modifying the time at which peak firing rates occur (Gillette et al., 2001).

The SCN consists of two bilaterally paired nuclei, each capable of generating a behavioral activity rhythm (Michel et al., 2013). The SCN communicates with neuroendocrine cells regulating reproductive functions through two neural pathways: one is through mono-synaptic projections to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the preoptic area (POA) that use vasoactive intestinal peptide (VIP) as neurotransmitter. The other neural pathway is multi-synaptic, and forms a circuit that includes a relay in the antero-ventral periventricular nucleus (AVPV) (Williams and Kriegsfeld, 2012). Kisspeptin, a critical GnRH regulator, and thus of luteinizing hormone (LH) release and ovulation, is present within the AVPV (Smarr et al., 2012). In female rodents, disrupting the SCN

signaling pathways or the intrinsic activity of the cellular clockwork leads to gross ovulatory function and fecundity deficits (Miller et al., 2004; Williams and Kriegsfeld, 2012).

Previously we showed that in the microinjecting atropine into the right-SCN of rats on proestrus day blocked ovulation, while the same treatment in the left-SCN only partially blocked ovulation, so we suggest that the cholinergic neural information arriving on either side of the SCN is necessary for the pre-ovulatory secretion of LH to induce ovulation (Vieyra et al., 2016).

Therefore, this study was designed to analyze whether the unilateral stimulation of the cholinergic system SCN in the morning of the proestrus day modified the ovulation and the progesterone and estradiol levels.

Results

Ovulation and number of ova shed

At 09.00 h the ovulation rates was not modified by microinjection of ACh inside or outside of the left SCN, but resulted in high number of ova shed. The microinjection of ACh inside the right SCN at 09.00 h of proestrus resulted in lower ovulation rates (36% of ACh-treated rats ovulated *vs.* 90% in the saline-microinjected group; $p < 0.05$, Fisher exact probability test), without affecting the number of ova shed by ovulating rats. The microinjection of ACh outside the right SCN did not modify the ovulation rate and number of ova shed (Table 1). The ovulation rates and the number of ova shed were not modified by the microinjected of ACh at 19.00 h, inside or outside of the either of the SCN (Table 1).

Progesterone and estradiol serum levels in rats microinjected with acetylcholine at proestrus

In rats microinjected with ACh in the inside left SCN at 09.00 or 19.00 h, progesterone levels were higher than in rats microinjected with the vehicle. The progesterone levels in rats microinjected with ACh at 09.00 h outside of the left SCN were lower than in rats treated with ACh inside of the left SCN. At 09.00 h the ACh treatment inside the right SCN yielded lower progesterone levels than rats treated in the left SCN (Table 2). In comparison with saline-microinjected animals, ACh treatment inside the right SCN at 09.00 h lowered estradiol serum levels, while treatment at 19.00 h increased them (Table 2).

Table 1. Ovulation rate and mean \pm SEM of the number of ova shed, in rats with microinjection of vehicle in the left SCN (Vh L-SCN) (n=18) or right SCN (Vh R-SCN) (n=18) or acetylcholine microinjected inside or outside the left SCN (ACh L-SCN) (n=30) or right SCN (ACh R-SCN) (n=27) at 09.00 or 19.00 h at proestrus. Treatment effects were evaluated on the predicted following vaginal estrus day. *Number of ovulating animals/number of treated animals. **a** $p < 0.05$ vs. Vh R-SCN (Fisher's exact probability test). **b** $p < 0.05$ vs. Vh L-SCN (ANOVA followed by Tukey's test).

Groups	n	Ovulation rate*	ova shed
09.00 h			
Vh L-SCN	10	10/10	8.5 \pm 1.0
ACh L-SCN inside	11	7/11	11.0 \pm 1.5 b
ACh L-SCN outside	8	7/8	13.4 \pm 0.6 b
Vh R-SCN	10	9/10	11.4 \pm 1.6
ACh R-SCN inside	9	4/11 a	9.0 \pm 0.7
ACh R-SCN outside	8	6/8	11.5 \pm 1.1
19.00 h			
Vh L-SCN	8	7/8	10.0 \pm 1.9
ACh L-SCN inside	8	7/7	10.0 \pm 1.4
ACh L-SCN outside	3	3/3	10.0 \pm 2.1
Vh R-SCN	8	8/8	8.3 \pm 1.3
ACh R-SCN inside	8	9/9	10.2 \pm 1.2
ACh R-SCN outside	2	2/2	11.0 \pm 0

Table 2. Progesterone (ng/ml) and estradiol (pg/ml) serum levels in rats with microinjected of vehicle in the left SCN (Vh L-SCN) (n=18) or right SCN (Vh R-SCN) (n=18) or acetylcholine microinjection inside or outside the left SCN (ACh L-SCN) (n=30) or right SCN (ACh R-SCN) (n=27) at 09.00 or 19.00 h at proestrus. Treatment effect were evaluated the following predicted vaginal estrus day. * p < 0.001 vs. Vh L-SCN (ANOVA followed by a Tukey's test); ++ p < 0.001 vs. ACh L-SCN *inside* (ANOVA followed by a Tukey's test); # p < 0.05 vs. ACh L-SCN *inside* (ANOVA followed by Tukey's test); **p < 0.05 vs. Vh R-SCN (Student's t test).

Groups	Progesterone (ng/ml)	Estradiol (pg/ml)
09.00 h		
Vh L-SCN	10.7 ± 2.2	35.4 ± 7.0
ACh L-SCN <i>inside</i>	21.5 ± 4.0 *	25.1 ± 3.0
ACh L-SCN <i>outside</i>	8.15 ± 1.4 #	21.8 ± 3.35
Vh R-SCN	8.15 ± 0.9	35.5 ± 2.4
ACh R-SCN <i>inside</i>	6.7 ± 0.8 ++	25.6 ± 1.7 **
ACh R-SCN <i>outside</i>	8.2 ± 1.2	29.5 ± 7.5
19.00 h		
Vh L-SCN	9.5 ± 1.2	40.0 ± 3.0
ACh L-SCN <i>inside</i>	19.6 ± 3.0 *	43.8 ± 4.0
ACh L-SCN <i>outside</i>	14.0 ± 0.6	38.5 ± 3.0
Vh R-SCN	21.1 ± 1.9	31.8 ± 3.0
ACh R-SCN <i>inside</i>	15.3 ± 3.4	43.9 ± 1.5**
ACh R-SCN <i>outside</i>	14.2 ± 0.7	40.9 ± 4.2

Discussion

The muscarinic cholinergic system's participation in regulating ovulation varies along the estrous cycle and presents a circadian rhythm (Domínguez et al., 1982). The hypothalamic muscarinic cholinergic system's participation in regulating spontaneous ovulation is asymmetric (Cruz et al., 2014). Previously we showed that blocking the SCN's muscarinic cholinergic system with atropine blocks the pre-ovulatory LH surge and ovulation; suggesting that in the morning (09.00 h) of proestrus the systems regulating GnRH and LH secretion require a cholinergic signal from the SCN (Vieyra et al., 2016). Earnest and Turek (1985) suggest that ACh may play an important role in the mechanism by which light regulates circadian rhythms and seasonal reproductive cycles. The fact that microinjection on the morning of proestrus resulting in lower ovulatory response and afternoon such parameters were not modified, suggests that at proestrus day the regulatory participation of the SCN's cholinergic system on ovulation depends on the hour of the day. In the present study, ACh treatment at 09.00 h lowered the ovulatory response and at 19.00 h had no apparent effect on ovulation, suggesting that on proestrus day the SCN's regulatory participation on ovulation depends on the time of day.

Smarr et al., (2012) showed that the labeling percentage of GnRH cells in the medial preoptic area (MPO) with cFOS+ nuclei and the expression of Kiss1 in the AVPV is significantly lower in the ipsilateral side of successful unilateral SCN lesions, but not in animals in which the unilateral lesion missed the SCN, the authors suggest that the lack of GnRH cells' activation was specifically due to the loss of the SCN. In the present study, ovulation rates were lower in rats successfully treated with ACh in the right SCN, while treatment outside of the SCN did not modify the ovulatory response. These results suggest that in the morning of the proestrus day the cholinergic system of the right SCN participates in ovulation regulation in a stimulating way, possibly regulating the mechanisms involved in the pre-ovulatory peak of LH. Previously we showed that microinjecting atropine in the SCN to its muscarinic receptors resulted in the pre-ovulatory LH surge blockade (Vieyra et al., 2016).

The majority of SCN neurons have gamma aminobutyric acid (GABA) receptors. Results by Elgueta et al. (2015) suggest that ACh triggers GABA release. According to Czarnecki et al. (2014) nicotinic receptors (ACh-Rs) facilitate the synaptic release of GABA and glutamate, suggesting a tight presynaptic cholinergic regulation of both GABAergic and glutamatergic inputs. SCN neurons expressing VIP is modulated directly by GABA (Fan et al., 2015). In the present study, since ovulation rates were lower

in rats treated with ACh in the right SCN, we suggest that the stimulation of ACh-R stimulated GABA release, which in turn lowered the VIPergic signal that stimulates GnRH release and ovulation.

According to Buijs et al. (2013), there is a neural connection between the adrenal gland and the SCN. Previously, we showed that during the estrous cycle the adrenals are the main origin of progesterone secretion (Flores et al., 2005). In the present study we observed that stimulating the left SCN's cholinergic system increased progesterone levels, suggesting that the cholinergic information from the left SCN regulates progesterone secretion in a stimulatory way. Present results suggest that the right SCN is related to estradiol regulation and that on proestrus day its regulatory function varies according to the time of day.

In conclusion, the effects of stimulating the SCN's cholinergic system on ovulation did not correlate with the changes observed on steroids levels, suggesting that ovulation and hormone secretion are independently regulated by the neuroendocrine system. The cholinergic system of the left SCN modulates in a stimulating way the progesterone secretion regardless of the time of the day. On the other hand, the modulation of the estradiol secretion by the cholinergic system of the right SCN depends on the time of day. The ovulation is regulated by stimulating pathways cholinergic originated in the SCN.

Materials and methods

Animals

This study was performed with adult, virgin, 3-month-old, female, CIIZ-V strain rats weighing 230-260 g from our own breeding stock. The animals were maintained under controlled light (on from 05:00 to 19:00 h) and temperature (22 ± 2 °C) conditions with free access to food (Purina S.A., México) and tap water. The animals' oestrous cycles were monitored via cytological examinations of daily vaginal smears. Only rats that exhibited at least two consecutive 4-day oestrus cycles were used in the experiment. The number of treated rats are shown in Table 1.

Ethical approval

All experiments were performed in strict accordance with the Mexican Law of Animal Treatment and Protection Guidelines and the specifications in the Mexican Official Standard, NOM-062-ZOO-1999. The Institutional Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México approved the experimental protocols (FES/DEPUCI/236/14). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Unilateral microinjection of acetylcholine into the left or right SCN

At 09.00 or 19.00 h, groups of 4-day cyclic rats in proestrus were anaesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg I.P.; Pisabental, PISA Agropecuaria S.A. de C.V. México). To assess the effectiveness of the anaesthesia, we used the tail pinch method (Goodchild et al., 2015). After verifying that the rats were anaesthetized, they were placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). The skin of the skull was sectioned, and the left or right side of the skull was drilled with a 1-mm bit. Subsequently, a 29-gauge stainless steel microinjection needle was lowered into the left or right side of the SCN. The SCN was located according to the coordinates of the Paxinos and Watson (2004) atlas (left SCN: -0.3 mm AP, +0.2 mm ML, and -9.1 mm DV; right SCN: -0.3 mm AP, -0.4 mm ML, and -9.1 mm DV). The microinjection needle was connected to a 25- μ l Hamilton syringe placed on a microinjection pump (CMA/100; BAS, Stockholm, Sweden) with a Teflon tube (0.65 mm OD, 0.12 mm OI; Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN). Next, 0.3 μ l of saline or solution of acetylcholine (Sigma Chem. Co. St. Louis, Mo) (50 μ M ACh diluted in 0.3 μ l of saline) was microinjected into the left or right SCN. After surgery, each animal was placed in an individual cage with warm sawdust and heated with an incandescent lamp until the animal awoke.

To examine the potential diffusion of the liquid from one SCN into the other, ten rats were microinjected with 0.3 μ l of methylene blue dye in saline solution (10 mg/ml) in the left or right SCN (Lohmana et al., 2005). No diffusion of methylene blue dye into the contralateral SCN, the ipsilateral nuclei (including the POA), or the third ventricle was observed.

Autopsy procedu

On the predicted vaginal oestrus day (24 h after treatment), the rats were killed by decapitation. The blood of the trunk from each animal was collected, allowed to clot and centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes. The serum was stored at -20 °C until the progesterone and oestradiol concentrations were

measured via specific radioimmunoassays. Upon autopsy, the oviducts were dissected, and the numbers of ova shed were counted with the aid of a stereoscopic microscope (Nikon, Model C-PS). The brain was subsequently dissected and quickly placed on a plate cooled with dry ice to verify the accuracy of the microinjection site.

Brain histologic processing

The brains of all rats treated with vehicle or atropine were frozen, and 100- μ m sections were obtained on a cryostat (MICROM HM 505 N, Walldorf, Germany). The section was mounted on slides and stained with 1% cresyl violet. All results of the present study are based on rats with verified microinjections into the SCN (Figure 1).

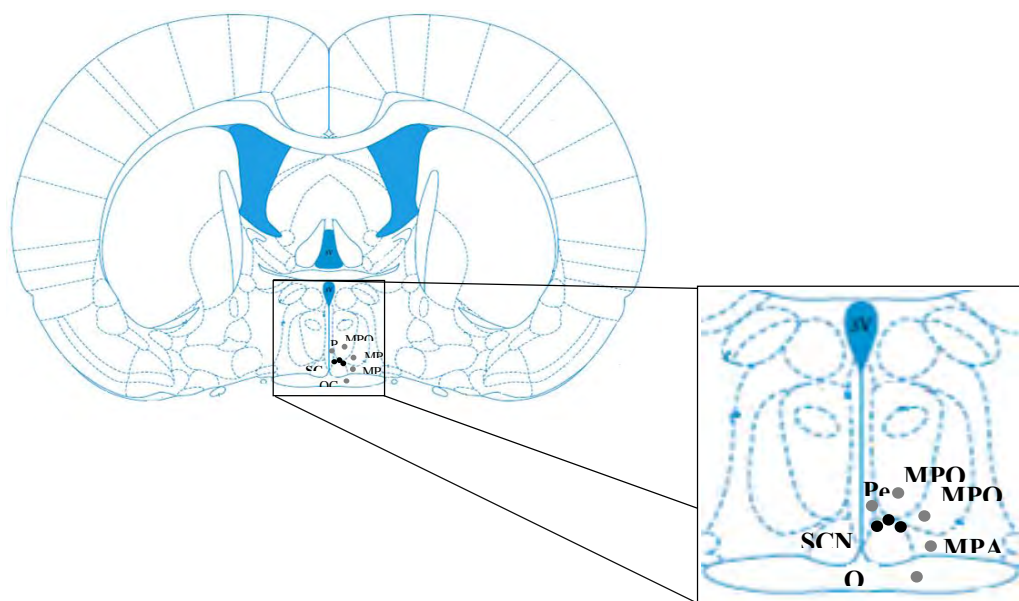


Figure 1. Diagrammatic representation of location of microinjection sites. The black circles represent the microinjection sites inside in the SCN, while the gray circles represent the microinjection sites outside in the SCN. The schematic illustrations of coronal section taken from the rat brain atlas of Paxinos and Watson (2004). 3V: third ventricle; OC: optic chiasm; SCN: suprachiasmatic nucleus; MPOC: medial preoptic nucleus, medial part; MPOL: medial preoptic nucleus, lateral part; MPA: medial preoptic area; Pe: Periventricular hypothalamic nucleus.

Hormone measurements

The serum concentrations of progesterone (ng/ml) and oestradiol (pg/ml) were measured using radioimmunoassay (RIA) with kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). The intra-assay coefficients of variation were 8.35% and 8.12% for the progesterone and oestradiol assays, respectively, and the inter-assay coefficients of variation were 9.45% and 9.28% for the progesterone and oestradiol assays, respectively.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Instant 3. The ovulation rates (i.e., the numbers of ovulating animals/the numbers of treated animals) were analysed using Fisher's exact probability tests. Data regarding the numbers of ova shed were analysed using Kruskal–Wallis tests followed by a Mann-Whitney *U* tests. The hormonal serum level results were analysed using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's tests. When two means were compared, we used Student's *t*-tests. *P*-values below 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

We thank the “Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM” and CONACyT for the support provided for this study. This work is a requirement for obtaining the degree of Doctor of Biological Sciences. We also thank Biol. R. Chavira having participated in performing the RIA's to measure the hormones levels. We also want to thank M Sc A. Domínguez-González for the revision of the manuscript in English.

Competing interests

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions

EV, RD and LML planned the experiments. EV and DAR performed the experiments. EV, LML, RD participated in the analysis and discussion of the results. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by the Universidad Nacional Autónoma de México- Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN-217016) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant 236908).

References

- Abbott, S. M., Arnold, J. M., Chang, Q., Miao, H., Ota, N., Cecala, C., Gold, P. E., Sweedler, J. V., Gillette, M. U. (2013). Signals from the brainstem sleep/wake centers regulate behavioral timing via the circadian clock. *PLoS ONE*. **8**, e70481.
- Bina, K. G., Rusak, B., Semba, K. (1993). Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *J. Comp. Neurol.* **335**, 295–307.
- Buijs, R. M. (2013). The autonomic nervous system: a balancing act. In Handbook of Clinical Neurology, Autonomic Nervous System. (R.M Buijs and D.F. Swaab, Editors.), pp. 1-11. Elsevier B.V.
- Cruz, M. E., Flores, A., Domínguez, R. (2014). The cholinergic system of the preoptic-anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way. *Endocrine*. **47**, 913-22
- Czarnecki, A., Le Corrnc, H., Rigato, C., Le Bras, B., Couraud, F., Scain, A. L., Allain, A. E., Mouffle, C., Bullier, E., Mangin, J. M., Branchereau, P., Legendre, P. (2014). Acetylcholine controls GABA-, glutamate-, and glycine-dependent giant depolarizing potentials that govern spontaneous motoneuron activity at the onset of synaptogenesis in the mouse embryonic spinal cord. *J. Neurosci.* **34**, 6389-6404.
- Domínguez, R., Riboni, L., Zipitría, D., Revilla, R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *J. Endocrinol.* **95**, 175-80.
- Earnest, D. J. and Turek, F. (1985). Neurochemical basis for the photic control of circadian rhythms and seasonal reproductive cycles: Role for acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 4277-4281.
- Elgueta, C., Vielma, A. H., Palacios, A. G., Schmachtenberg, O. (2015). Acetylcholine induces GABA release onto rod bipolar cells through heteromeric nicotinic receptors expressed in A17 amacrine cells. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 6.
- Fan, J., Zeng, H., Olson, D. P., Huber, K. M., Gibson, J. R., Takahashi, J. S. (2015). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus provide sparse GABAergic outputs to local neurons with circadian regulation occurring distal to the opening of postsynaptic GABAA ionotropic receptors. *J. Neurosci.* **35**, 1905-1920.
- Flores, A., Meléndez, G., Palafox, M.T., Rodríguez, J. O., Barco, A. I., Chavira, R., Domínguez, R., Cruz, M. E. (2005). The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine*. **28**, 145-51.

- Gillette, M. U., Buchanan, G. F., Artinian, L., Hamilton, S. E., Nathanson, N. M., Liu, C. (2001). Role of the M1 receptor in regulating circadian rhythms. *Life Sci* **68**, 2467–2472.
- Goodchild, C. S., Serrao, J. M., Kolosov, A., Boyd, B. J. (2015). Alphaxalone Reformulated: A Water-Soluble Intravenous Anesthetic Preparation in Sulfobutyl-Ether- β Cyclodextrin. *Anesthesia & Analgesia Journal*. **120**, 1025-31.
- Lohmana, R., Liu, L., Morris, M., O'Brien, T. J. (2005). Validation of a method for localised microinjection of drugs into thalamic subregions in rats for epilepsy pharmacological studies. *Journal of Neuroscience Methods*. **146**, 191–197.
- Madeira, M. D., Pereira, P. A., Silva, S. M., Cadete-Leite, A., Paula-Barbosa, M. M. (2004). Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. **125**, 889–901.
- Michel, S., Marek, R., vanderLeest, H. T., vanSteensel, M.J., Schwartz, W. J., Colwell, C. S., Meijer, J. H. (2013). Mechanism of bilateral communication in the suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*. **37**, 964-971.
- Miller, B. H., Olson, S. L., Turek, F. W., Levine, J. E., Horton, T. H., Takahashi, J. S. (2004). Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr. Biol*. **14**, 1367–1373.
- Paxinos, G. and Watson, C. (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic editors. Amsterdam: London.
- Smarr, B. L., Morris, E., de la Iglesia, H. O. (2012). The Dorsomedial Suprachiasmatic Nucleus Times Circadian Expression of Kiss1 and the Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology*. **153**, 2839-50.
- Vieyra, E., Ramírez, D. A., Lagunas, N., Cárdenas, M., Chavira, R., Damián-Matsumura, P., Trujillo, A., Domínguez, R., Morales-Ledesma, L. (2016). Unilaterally blocking the muscarinic receptors in the suprachiasmatic nucleus in proestrus rats prevents pre-ovulatory LH secretion and ovulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **14**:34, 1-11.
- Williams, W. P. and Kriegsfeld, L. J. (2012). Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Front Endocrinol (Lausanne)* **3**, 60.

CAPÍTULO IV

Effects of the vagotomy on ovulation, progesterone and estradiol levels in rats with blockade or stimulation of the cholinergic system of the suprachiasmatic nucleus

Elizabeth Vieyra, Julio Cesar García, Deyra A. Ramírez, Roberto Domínguez and
Leticia Morales Ledesma

Preparado para ser enviado a la revista *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*

Effects of the vagotomy on ovulation, progesterone and estradiol levels in rats with blockade or stimulation of the cholinergic system of the suprachiasmatic nucleus

Elizabeth Vieyra, Julio Cesar García, Deyra A. Ramírez, Roberto Domínguez and Leticia Morales-Ledesma*.

Biology of Reproduction Research Unit. Physiology of Reproduction Laboratory. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. AP 9-020, CP 15000. México, D.F.

*Corresponding author:

Leticia Morales-Ledesma

Physiology of Reproduction Laboratory.

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.

AP 9-020, CP 15000. México, D.F.

Telephone: 52 55 56 23 07 74

FAX: 52 55 5773 63 30

moralesledesma@yahoo.com.mx

Abstract

The suprachiasmatic nucleus (SCN) regulates the activity several peripheral organs way the paraventricular nucleus which project to the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus tractus solitaries, both nucleus are part of the complex that give rise to the vagus nerve. The vagus nerve regulated the ovulation and secretion of the steroids hormones. The present study analyzes the effects on ovulation and hormone secretion resulting from the sectioning of the vagus nerve (vagotomy) performed on rats which unilaterally blocking or stimulation the muscarinic receptors in the SCN. CIIZ-V strain cyclic rats on proestrus day were microinjected with 62.5 ng of atropine diluted in 0.3 μ l of saline or 0.3 μ l of the [50 μ M] acetylcholine into the left or right SCN at 09.00 h immediately after of the microinjection the vagotomy procedures were performed. The rats were sacrificed on the predicted day of estrus. In rats with microinjection of atropine in the right SCN, the right vagotomy restores the ovulatory responses and the regulation the progesterone and estradiol levels it depends on the severed nerve. In rats with microinjection of acetylcholine, the vagus nerve not participates in the regulation of the ovulation, while that steroids hormone they are regulated the manner stimulating. The present results support the idea that the vagus nerve is part of the multisynaptic pathways communicating the SCN and the ovaries and that such neural information participates in the regulation of the ovulation and progesterone and estradiol levels.

Keywords: Suprachiasmatic nucleus, vagus nerve, ovulation, atropine, acetylcholine.

1. Introduction

The suprachiasmatic nucleus (SCN), is the biological clock playing a crucial role in the organization of the daily physiology of the organism. The SCN prepares the body for the physiological changes associated with the sleep-wake cycle, these changes is through the organizing the circadian rhythms in hormone secretion and by autonomic control of our organs (Kalsbeek et al., 2000; Buijs and Kalsbeek, 2001). The ablation of the SCN, or the severing neuronal connections between the SCN and the preoptic area (POA), resulted in estrous acyclicity (Brown-Grant and Raisman, 1977; Wiegand and Terasawa, 1982). The absence or dysregulation of either type of input disrupts of the gonadotropin releasing hormone (GnRH) surge release and results in an anovulatory cycle (Christian and Moenter, 2010).

According to Buijs (2003, 2006) the SCN communicates with the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) through pre-autonomic sympathetic and parasympathetic fibers. Some of the neurons in the PVN project pre-autonomic sympathetic fibers to the sympathetic preganglionic neurons of the intermediate-lateral column (IML), regulating the output of sympathetic information to peripheral organs. Other parasympathetic neurons of the PVN project to the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV). The sympathetic information generated by peripheral organs returns to the spinal cord at the level of strata I and V of the dorsal horn and reach the hypothalamus via the nucleus tractus solitarius (NTS) and parabrachial nucleus. The information generated by the sensory peripheral organs carried by the vagus nerve arrives to the NTS, and is sent to the DMV and reaches the hypothalamus direct or indirectly through the parabrachial nucleus.

Buijs et al., (2014) showed that the SCN communicates directly with the NTS, one of the centers where sensory information is integrated (Travagli, 2007), suggesting a direct route between the NTS and the SCN which can provide a direct route of regulation between the SCN and the peripheral organs. This communication is type glutamatergic suggesting an excitatory neural pathway.

According to Gerendai et al., (2000), there are brain structures presumably involved in the control of ovarian function and acting via the vagus or the sympathetic nerves. The vagus nerve originates from four nuclei: the nucleus ambiguus, trigeminal nerve, NTS and DMV. The cell bodies of afferent fibers of the vagus nerve innervating the ovary are located in the nodose ganglion and in the dorsal root ganglia of segments T10-L2 (Burden et al., 1983).

In the adult rat, bilateral vagotomy altered the estrous cycle (Chávez et al., 1989), blocked pseudo-pregnancy induction (Burden et al., 1981), increased the number of ova shed by ovulating adult and pre-pubertal rats (Cruz et al., 1986; Morales et al., 2004), and in pregnant rats resulted in lower luteinizing hormone (LH) basal levels, causing fetal resorption (Lawrence et al., 1978). The participation of the vagus nerve in the regulation of ovulation depends on the day and the time of the estrus cycle (Domínguez et al., 2008; Everardo et al., 2012).

Previously we showed that in proestrus day the microinjecting atropine into the right-SCN blocked ovulation, while the same treatment in the left-SCN blocked ovulation only partially (Vieyra et al., 2016). The treatment at 09.00 h in either SCN blocked ovulation in 50 % of treated animals and the

stimulation of the cholinergic SCN-system resulted in asymmetric changes in steroids hormones levels (Vieyra et al., unpublished results). To our knowledge, there is no information on the vagus nerve as the cholinergic neural pathway by which the ovaries received neural information from the SCN and its participation in the regulation of ovulation and steroid hormone secretion. To assess this possibility, we studied the effects of unilateral vagotomy on ovarian steroids hormones and ovulatory response in rats with the blockade o stimulation of the cholinergic system of the SCN.

2. Materials and methods

All experiments were performed in strict accordance with the Mexican Law of Animal Treatment and Protection Guidelines and the specifications of the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999. The Institutional Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México approved the experimental protocols (FES/DEPUCI/236/14). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

This study was performed with adult, virgin, 3-month-old, female, CIIZ-V strain rats weighing 230-260 g from our own breeding stock. The animals were maintained under controlled light (on from 05:00 to 19:00 h) and temperature (22 ± 2 °C) conditions with free access to food (Purina S.A., México) and tap water. The animals' oestrous cycles were monitored via cytological examinations of daily vaginal smears. Only rats that exhibited at least two consecutive 4-day oestrus cycles were used in the experiment.

2.1 *Effects of the section the vagus nerves in rats with unilaterally microinjecting the atropine or acetylcholine in the SCN on ovulatory response and progesterone and estradiol levels*

Groups of ten rats in proestrus, at 09.00 h were anaesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg I. P.; Pisabental, PISA Agropecuaria S. A. de C.V. México). To assess the effectiveness of the anaesthesia, we used a tail pinch (Goodchild et al., 2015). After verifying that the rats were anaesthetized, they were placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). The skin of the skull was sectioned, and the left or right side of the skull was drilled with a 1-mm bit. Subsequently, a 29-gauge stainless steel microinjection needle was lowered into the left or right side of the SCN. The SCN was located according to the coordinates of the Paxinos and Watson (2004) atlas (left SCN: -0.3 mm AP, +0.2 mm ML, and -9.1 mm DV; right SCN: -0.3 mm AP, -0.4 mm ML, and -9.1 mm DV). The

microinjection needle was connected to a 25- μ l Hamilton syringe placed on a microinjection pump (CMA/100; BAS, Stockholm, Sweden) with a Teflon tube (0.65 mm OD 9, 0.12 mm OI; Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN) and 62.5 ng of atropine (Sigma Chen. Co. St. Louis, Mo; half-life of 2 hours) diluted in 0.3 μ l of saline (atropine treatment), or [50 μ M] of acetylcholine (Sigma Chen. Co. St. Louis, Mo) diluted in 0.3 μ l of saline (acetylcholine treatment) were microinjected on the left or right SCN.

Immediately after of the microinjection an ipsilateral vagotomy to the SCN microinjected was performed, following the methodologies previously described (Cruz et al., 1986; Morales-Ledesma et al., 2007). In brief, after the rats were microinjected with atropine or acetylcholine into the SCN, a ventral incision that included skin, muscle and peritoneum was performed, the liver was reflected, the esophagus exposed, and the ipsilateral vagotomy was performed. For comparison, groups of rats with left or right vagotomy were included. After surgery, each animal was placed in an individual cage with warm sawdust and heated with an incandescent lamp until the animal awoke.

To examine the potential diffusion of the liquid from one SCN into the other, ten rats were microinjected with 0.3 μ l of methylene blue dye in saline solution (10 mg/ml) in the left or right SCN (Lohmnan et al., 2005). No diffusion of methylene blue dye into the contralateral SCN, the ipsilateral nuclei (including the POA), or the third ventricle was observed.

2.2 Autopsy procedures

The rats were sacrificed by decapitation 24 h after treatment, at the day of estrus. The blood of the trunk from each animal was collected, allowed to clot and centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes. The serum was stored at -20 °C until the progesterone and oestradiol concentrations were measured via specific radioimmunoassays. Following the criterion proposed by Burden y Lawrence (1981), at the time of necropsy a distended stomach was considered an index of functional vagotomy. Upon autopsy, the oviducts were dissected, and the numbers of ova shed were counted with the aid of a stereoscopic microscope (Nikon, Model C-PS). The brain was subsequently dissected and quickly placed on a plate cooled with dry ice to verify the accuracy of the microinjection site.

2.3 Brain histologic processing

The brains of all rats treated with vehicle or atropine were frozen, and 100- μ m sections were obtained on a cryostat (MICROM HM 505 N, Walldorf, Germany). The sections were mounted on slides and stained with 1% cresyl violet. All results of the present study are based on rats with verified microinjections into the SCN (Figure 1).

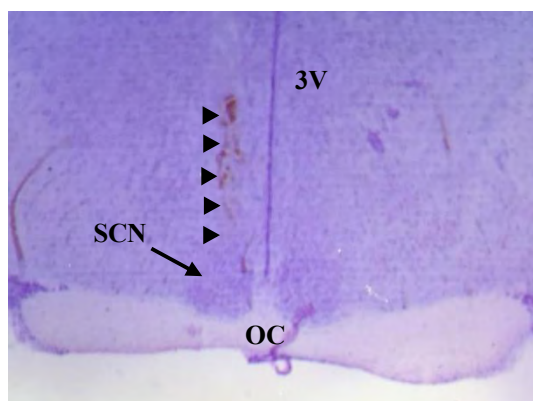


Figure 1. Nissl-stained coronal sections showing the trajectory of the micro-needle into the right R-SCN. 3V: third ventricle; OC: optic chiasm. Arrowheads indicate the trajectory of the micro-injection of the side right of the SCN.

2.4 Hormone measurement

The serum concentrations of progesterone (ng/ml) and oestradiol (pg/ml) were measured using radioimmunoassay (RIA) with kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). The intra-assay coefficients of variation were 8.35% and 8.12% for the progesterone and oestradiol assays, respectively, and the inter-assay coefficients of variation were 9.45% and 9.28% for the progesterone and oestradiol assays, respectively.

2.4 Statistical analysis

The statistical analyses were performed using GraphPad Instant 3. The ovulation rates (i.e., the numbers of ovulating animals/the numbers of treated animals) were analysed using Fisher's exact probability or Chi-square tests. Data regarding the numbers of ova shed were analysed using Kruskal-Wallis tests followed by a Mann-Whitney *U* tests. The hormonal serum level results were analysed

using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's tests. When two means were compared, we used Student's t-tests. P-values below 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Ovulatory response and steroids hormones levels in rats with vagotomy

The ovulation rate and number ova shed in rats which sham surgery was similar at control group. In comparison with the control groups the section of the left vagus nerve (LSVN) did not modify ovulation rates, while the section of the right vagus (RSVN) resulted in lower ovulation rate (4/11 vs. 10/10, $p < 0.025$ Fisher's exact probability test). The number of ova shed in animals with LSVN was lower than their respective control groups (5.8 ± 1.7 vs. 10.7 ± 0.7 , $p < 0.05$ Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U-test).

The section of the left or right vagus nerve resulted in lower progesterone and estradiol levels than in the control group. Progesterone (LSVN 6.7 ± 0.5 , RSVN 10.0 ± 1.7 vs. control 15.8 ± 1.7 , $p < 0.001$ analysis of variance followed by a Tukey's test) and estradiol (LSVN 5.6 ± 1.3 , RSVN 8.7 ± 3.0 vs. control 29.5 ± 3.3 , $p < 0.001$ analysis of variance, followed by Tukey's test).

3.2. Effects of vagus nerve section in rats with microinjection of atropine or acetylcholine in the SCN on ovulatory response

The LSVN in rats which microinjection of the atropine in the L-SCN did not modify the ovulation rate in comparison with the animals with atropine microinjection in the L-SCN. The ovulation rate was higher in RSVN rats' microinjected with atropine in the R-SCN than in rats with atropine microinjection in the R-SCN (Figure 2A). The number of ova shed by ovulating rats was similar to animals microinjected unilaterally with atropine in the SCN.

The unilateral vagotomy did not modify ovulation rate nor the number of ova shed in rats with unilateral microinjection of acetylcholine in the SCN (Figure 2B).

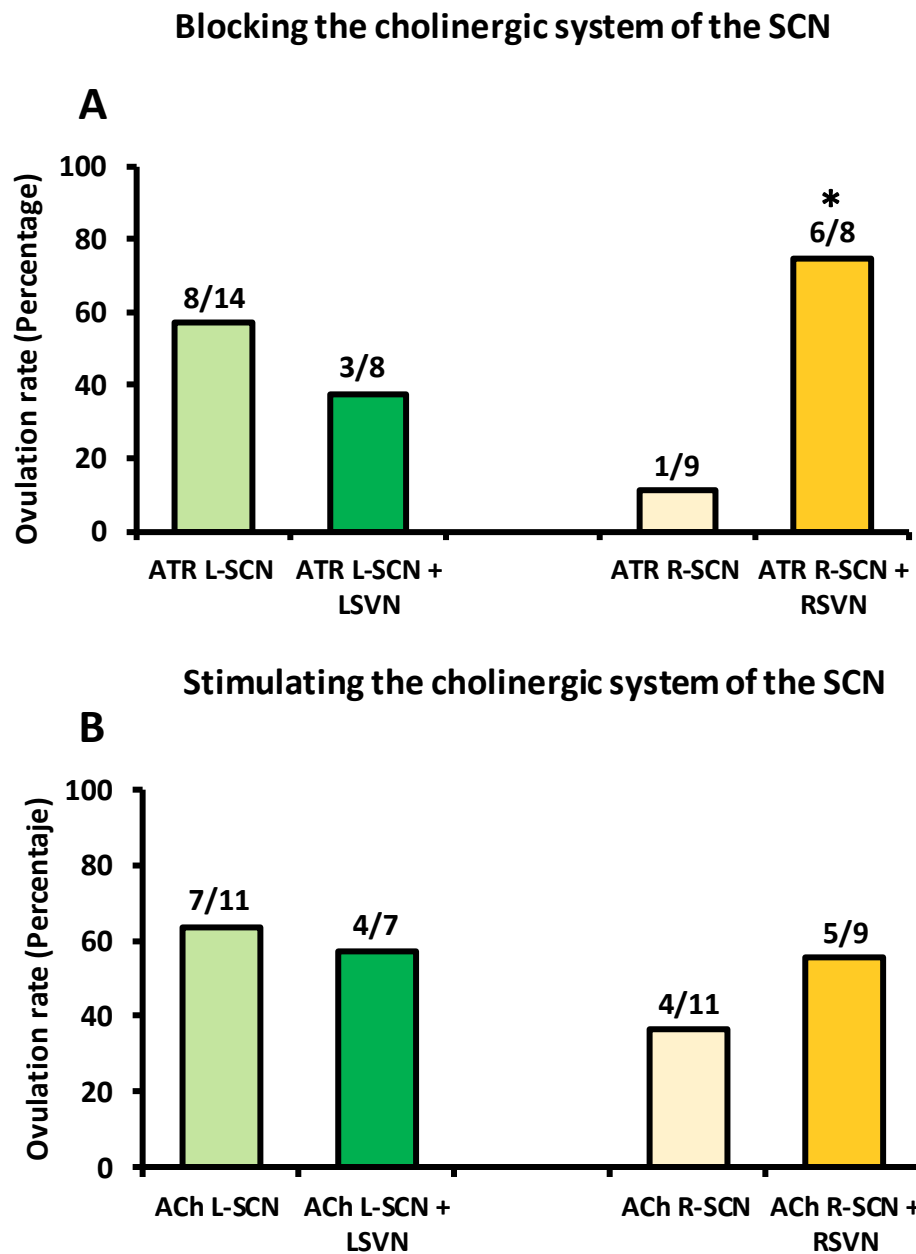


Figure 2. Percent of ovulating, in rats with microinjection the atropine (A) in the left SCN (ATR L-SCN) or right (ATR L-SCN) or microinjection with ATR followed of the sectioning of the left (LSVN) or right (RSVN) vagus nerve or acetylcholine (B) (ACh L-SCN) or right (ACh L-SCN) or ACh followed of the LSVN or RSVN vagus nerve at 09.00 h of the proestrus. The rats were sacrificed the predicted vaginal estrus day. * $p < 0.022$ vs. ATR R-SCN (Fisher's exact probability test).

3.3. Effects of vagus nerve section in rats with microinjection of atropine or acetylcholine in the SCN on progesterone and estradiol levels

In comparison to rats with unilateral microinjection of atropine in either SCN, the unilateral section of the vagus nerve in rats with unilateral atropine injection into the SCN did not modify progesterone levels (Figure 3A). The LSVN in rat microinjected with atropine in the L-SCN resulted in lower estradiol levels than their respective atropine L-SCN groups, while the RSVN did not modify the estradiol levels in rats with cholinergic system blockade of the right SCN. The estradiol levels were higher in the RSVN rats than in LSVN ones (Figure 3B).

The unilateral section of the vagus nerve to rats with unilateral microinjection of acetylcholine in the SCN resulted in a lower concentration of progesterone and estradiol. The progesterone and estradiol levels in RSVN were lower than the group with LSVN (Figure 4 A, B).

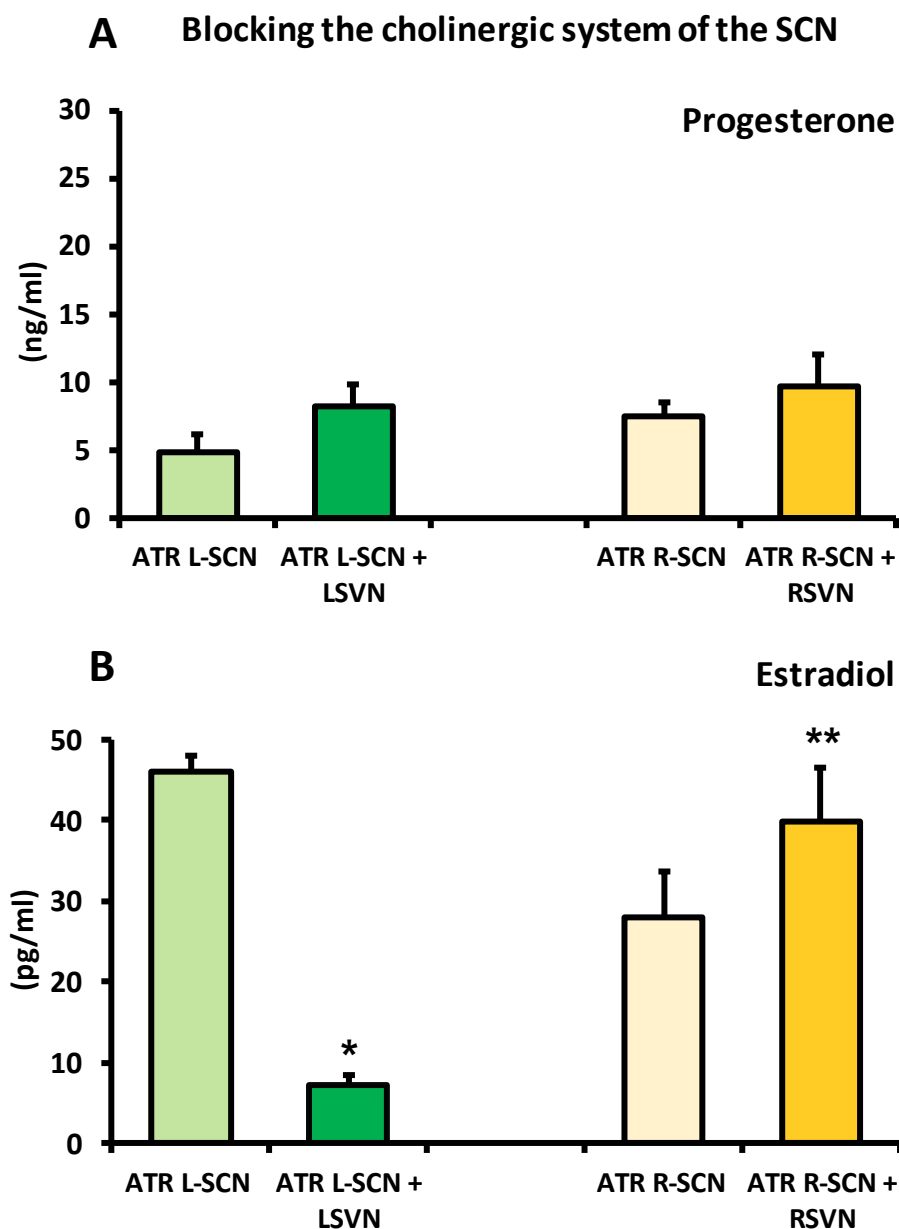


Figure 3. Mean \pm SEM of the progesterone (ng/ml) and estradiol (pg/ml) levels in rats with microinjection the atropine in the left SCN (ATR L-SCN) or right (ATR L-SCN) or microinjection with ATR followed of the sectioning of the left (LSVN) or right (RSVN) vagus nerve at 09.00 h of the proestrus. The rats were sacrificed the predicted vaginal estrus day. * $p < 0.001$ vs. ATR L-SCN or ACh L-SCN (Variance analysis followed by a Tukey's test); ** $p < 0.05$ vs. L-ATR + LSVN (Student's t test).

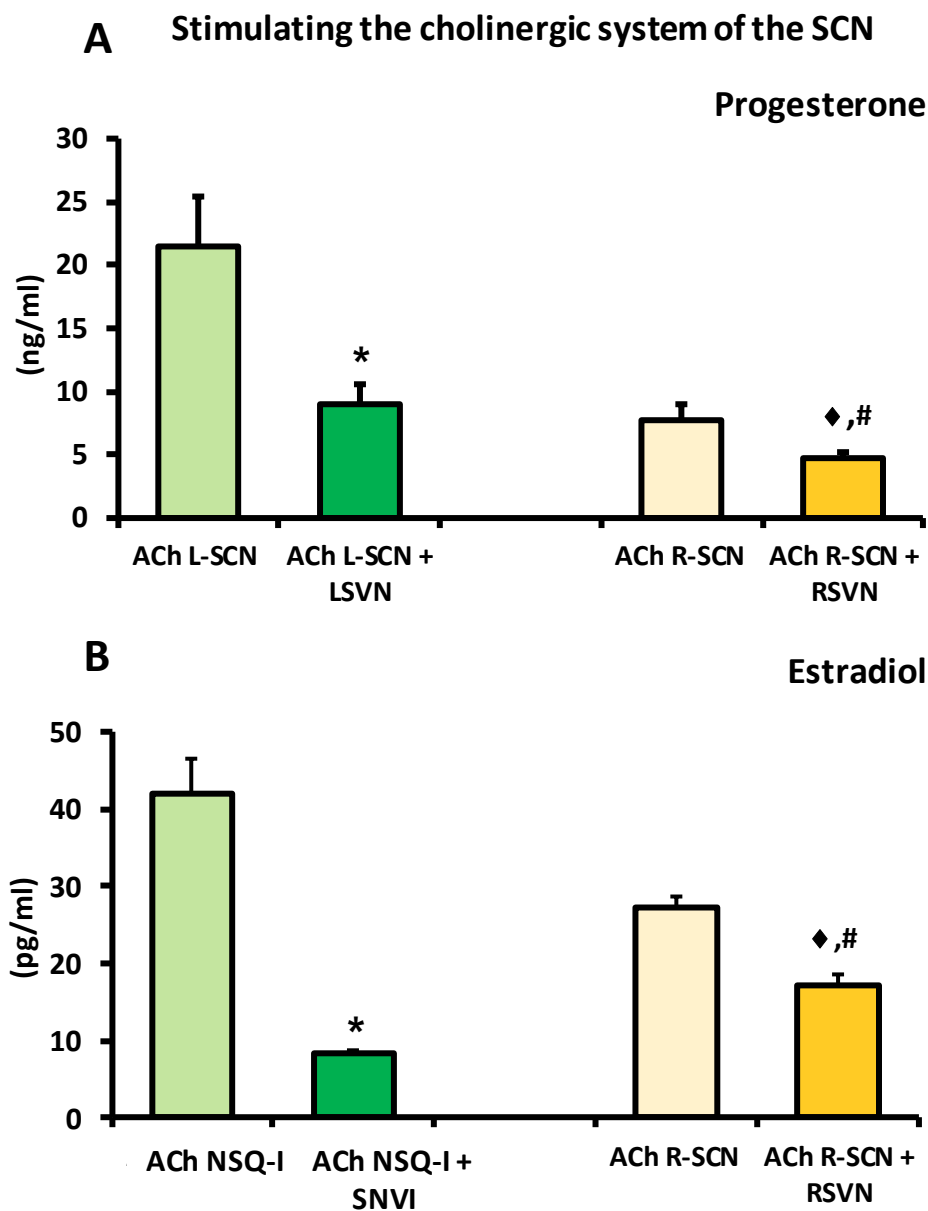


Figure 4. Mean \pm SEM of the progesterone (ng/ml) and estradiol (pg/ml) levels in rats with microinjection the acetylcholine in the left SCN (ACh L-SCN) or right (ACh R-SCN) or microinjection with ACh followed of the sectioning of the left (LSVN) or right (RSVN) vagus nerve at 09.00 h of the proestrus. The rats were sacrificed the predicted vaginal estrus day. * $p < 0.001$ vs. ACh L-SCN (Variance analysis followed by a Tukey's test); ♦ $p < 0.05$ vs. ACh R-SCN (Student's t test); # $p < 0.05$ vs L-ACh + LSVN (Student's t test)

4. Discussion

The results of the present study suggest that in the morning of proestrus day the neural signals traveling through the right vagus nerve plays a role in the communication between the right SCN and the right ovary, and that the left vagus nerve has not.

According to Cruz et al., (1986) and Chávez et al., (1989) the neural information carried by the left vagus nerve plays a role in the regulation of ovulation, while the right one did not. Differences between present results and previous ones could be related to the lapse between the vagus nerve section evaluations of the ovulation (20-40 days and 24 hours in present study). Then, we suggest that the vagus nerve regulates in a stimulating way the ovulatory response.

Gerendai et al., (2000), showed the existence of a multi-synaptic neural pathway between the ovary and the brain which includes the vagus nerve. Cruz et al., (2015) postulate the possibility that the stimulation of muscarinic receptors 1 (M₁R) in the left ovary regulates ovulation following the proposed pathways by Gerendai et al. (2000). According to Cruz et al. (2015) the M₁R in the left ovary might be regulating ovulation asymmetrically through a stimulatory neural signal relayed to the hypothalamus via the vagus nerve to induce the GnRH secretion which then triggers ovulation. In the present study the section of the right vagus nerve restored ovulation in rats with the blockade of the cholinergic system of SCN, suggesting two possible mechanisms: the sub-diaphragmatic section of the vagus nerve resulted in a stimulating signal arriving to the ovaries directly or indirectly through the celiac ganglion. The second explanation suggest that the acute stimulation of the ovarian-central nervous pathways (Gerendai et al (2000) provoked by the vagus nerve section, elicited the GnRH release resulting in ovulation. Both possibilities do not exclude the other one. Present results suggest that the left vagus nerve does not participate in these mechanisms.

According to Krsmanovic et al., (1998), the stimulation of the muscarinic or nicotinic receptors by ACh modulates GnRH secretion. In the GnRHergic neuron the binding of ACh to its mAChR₁ receptor, activates the phospholipase C, which hydrolyzes the phosphatidyl inositol and stimulates the formation of inositol triphosphate (IP₃). The binding of the IP₃ to its receptor on the membrane of the rough endoplasmic reticulum, mobilizes Ca²⁺ into the cytoplasm, resulting in the release of GnRH (Morales et al., 2005). The GnRH release depend on the intracellular Ca²⁺ concentration, and the presence of

estradiol, which modulates Ca^{2+} signals. In GT1-7 cells exposed to increasing concentrations of ACh temporarily increase the release of Ca^{2+} , which results in an increased release of GnRH (Morales et al., 2003).

We have previously shown that the adrenals are the main source of progesterone during the estrous cycle of the rat (Flores et al., 2005). According to Buijs et al., (1999) there is polysynaptic SCN–adrenal (cortex) neural pathway and the light-induced fast inhibition of corticosterone secretion which is dependent on the integrity of the SCN and which shows a circadian pattern. Tóth et al., (2008), there are neurons in the central nervous system that contribute to the transneuronal innervation of both the adrenal gland and the ovary. In the present study the unilateral section of the vagus nerve in the rat with stimulation of the SCN-cholinergic system resulted in lower progesterone levels, suggesting that the vagus nerve is one of the pathways regulating the secretion of progesterone. The adrenals receive vagal innervation directly, this innervation is originating in the situated cell bodies in the dorsal motor nucleus of the vagus and pre-vertebral celiac-superior mesenteric ganglia (Coupland et al., 1989).

Estradiol secretion from the ovary is controlled by the hypothalamic–pituitary–ovarian axis in a cyclic manner (Christensen et al., 2012). The participation of the vagus nerve in the regulation of the estradiol depends on the severed nerve and age of the animal (Morales et al., 2004; 2007). Present results show that the unilateral section of the vagus nerve to animals with blockade or stimulation of the SCN-cholinergic system results in lower estradiol levels, suggesting that the vagus nerve participates in the polysynaptic pathways between the SCN and the ovaries regulating the estradiol secretion.

Taken together, present results support the idea that the vagus nerve is part of the polysynaptic pathways communicating the SCN and the ovaries and that such neural information participates in the regulation of both functions of the ovaries.

Conflict of interest

The authors declare that there is not conflict of interest.

Acknowledgements

The experimental work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT IN-217016 and CONACyT Grand 236908. We want to thank for the support given to in the realization of this study to the “Posgrado en

Ciencias Biológicas, UNAM” and CONACyT. We also thank Biol. R. Chavira having participated in performing the RIA’s to measure the hormones levels. We also want to thank M Sc A. Domínguez-González for the revision of the manuscript in English.

5. References

1. Best, C. H., & Taylor N. (1961). The Physiological properties of nerve. In *The physiological basis of medical practice*. Seventh edition. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. Pp. 1115-1136.
2. Brown-Grant, K., & Raisman, G. (1977). Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 198, 279–96.
3. Buijs, F. N., Cazarez, F., Basualdo, M. C., Scheer, F. A. J. L., Perusquía, M., Centurion, D., & Buijs R. M. (2014). The suprachiasmatic nucleus is part of a neural feedback circuit adapting blood pressure response. *Neuroscience*, 266, 197–207.
4. Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat. Rev. Neuroscience*. 2, 521–526.
5. Buijs, R. M., La Fleur, S. E., Wortel, J., Van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T. C., Kalsbeek, A., Nagai, K. & Nijijima, A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *Journal of Comparative Neurology* 464, 36–48.
6. Buijs, R. M., Scheer, F. A., Kreier, F., Yi, C., Bos, N., Goncharuk, V. D., & Kalsbeek, A. (2006). Organization of circadian functions: interaction with the body. *Progress in Brain Research*, 153, 341-360.
7. Buijs, R. M., Wortel, J., van Heerikhuize, J. J., Feenstra, Gert, M. G. P., Ter Horst, G. J., Romijn, H. J., & Kalsbeek, A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *European Journal of Neuroscience*, 11, 1535–1544.
8. Burden, H. W., Lawrence, J., Louis, T. M., & Hodson, C. A. (1981). Effects of abdominal vagotomy on the estrous cycle of the rat and the induction of pseudopregnancy. *Neuroendocrinology*, 33, 218–222.

9. Burden, H. W., Leonard, M., Smith, C. P., & Lawrence, Jr I. E. (1983). The sensory innervations of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *The Anatomical Record*. 207, 623–6.
10. Chávez, R., Sanchez, S., Ulloa-Aguirre, A., & Domínguez, R. (1989). Effects on oestrus cyclicity and ovulation of unilateral section on the vagus nerve performed on different days of the oestrus cycle in the rat. *Journal of Endocrinology*. 123, 441–444.
11. Christensen, A., Bentley, G.E., Cabrera, R., Ortega, H.H., Perfito, N., Wu, T.J., Micevych, P. (2012). Hormonal regulation of female reproduction. *Horm. Metab. Res*. 44, 587–591.
12. Christian, C. A., & Moenter, S. M. (2010). The neurobiology of preovulatory and estradiol induced gonadotropin releasing hormone surges. *Endocrine Reviews*. 31, 544–77.
13. Coupland, R. E., Parker, T. L., Kesse, W. K., & Mohamed, A. A. (1989). The innervation of the adrenal gland. III. Vagal innervation. *J. Anat*. 163, 173–181.
14. Cruz, M. E., Chávez, R., & Domínguez, R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Rev. Invest. Clin*. 38, 167–171.
15. Cruz, M. E., Flores, A., Alvarado, B. E., Hernández, C. G., Zarate, A., Chavira, R., Cárdenas, M., Arrieta-Cruz, I., & Gutiérrez-Juárez, R. (2015). Ovulation requires the activation on proestrus of M1 muscarinic receptors in the left ovary. *Endocrine*, 49, 809–819.
16. Domínguez, R., Flores, A., Everardo, P. M., Gallegos, A. I., Mendoza, F. D., Velasco, J., & Cruz-Morales, S.E. (2008). The neuroendocrine interactions between adrenals and ovaries in the regulation of progesterone, testosterone and estradiol serum levels are asymmetric and varies during the estrous cycle. 1st International World Congress on Reproductive Biology. 24–25 May. Kailua-Kona, Hawaii.
17. Everardo, P. M., Guzmán, M. G., Benítez, D. P., Bonilla, E., Cruz, M. E., Flores, A., & Dominguez, R. (2012). The effects of unilateral or bilateral section of the vagus nerve to cyclic rats on spontaneous ovulation depend on the hours and the day of surgery. Program No. 382.06. Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience. Online.
18. Flores, A., Meléndez, G., Palafox, M. T., Rodríguez, J., Barco, A.I., Chavira, R., Domínguez, R., & Cruz, M. E. (2005). The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine*, 28, 145–152.

19. Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkő, Z., Medveczky, I., & Halász, B. (2000). CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 80, 40–45.
20. Goodchild, C. S., Serrao, J. M., Kolosov, A., Boyd, B. J. (2015). Alphaxalone Reformulated: A Water-Soluble Intravenous Anesthetic Preparation in Sulfobutyl-Ether- β Cyclodextrin. *Anesthesia & Analgesia Journal*, 120, 1025-31.
21. Kalsbeek, A., Fliers, E., Franke, A. N., Wortel, J., & Buijs, R. M. (2000). Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology*, 141, 3832–3841.
22. Krsmanovic, L. Z., Mores, N. Navarro., C. E., Abdul, S., Arora, K. K., Catt, K. J. (1998). Muscarinic Regulation of Intracellular Signaling and Neurosecretion in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology*, 139, 4037–4043.
23. Lawrence, I. E., Burden, H. W., & Louis, T. M. (1978). Effect of abdominal vagotomy of the pregnant rat on LH and progesterone concentration and fetal resorption. *J Reprod. Fertil.* 33, 131–136.
24. Lohmana, R. Liu L., Morris, M., O'Brien, T. J. (2005). Validation of a method for localised microinjection of drugs into thalamic subregions in rats for epilepsy pharmacological studies. *Journal of Neuroscience Methods*, 146, 191–197.
25. Morales, A., Diaz, M., Guelmes, P., Marín, R., Alonso, R. (2005). Rapid modulatory effect of estradiol on acetylcholine- induced Ca^{2+} signal is mediated through cyclic-GMP cascade in LHRH-releasing GT1-7 cells. *European Journal of Neuroscience*, 22, 2207–2215.
26. Morales, A., Diaz, M., Roperro, A.B., Nadal, A. & Alonso, R. (2003) Estradiol modulates acetylcholine-induced Ca^{2+} signals in LHRH-releasing GT1-7 cells through a membrane binding site. *Eur. J. Neurosci.*, 18, 2505–2514.
27. Morales, L., Betanzos, R., & Domínguez, R. (2004). Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepubertal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Arch. Med. Res.* 35, 279–283.
28. Morales, L., Ricardo, B., Bolaños, A., Chavira R., & Domínguez R. (2007). Ipsilateral vagotomy to unilaterally ovariectomized pre-pubertal rats modifies compensatory ovarian responses. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5, 24.

29. Paxinos, G., & Watson C. (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier Academic editors. Amsterdam: London.
30. Tóth, I. E., Banczerowski, P., Boldogkoi Z., Tóth J. S., Szabó, A., Halász, B., & Gerendai, I. (2008). Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary: a double viral tracing study. *Brain Res Bull*, 77, 306-11.
31. Travagli, R. A. (2007). The nucleus tractus solitarius: an integrative centre with 'task-matching' capabilities. *J. Physiol.* 582, 471.
32. Vieyra, E., Ramírez, D. A., Lagunas, N., Cárdenas, M., Chavira, R., Damián-Matsumura, P., Trujillo, A., Domínguez, R., Morales-Ledesma, L. (2016). Unilaterally blocking the muscarinic receptors in the suprachiasmatic nucleus in proestrus rats prevents pre-ovulatory LH secretion and ovulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 14:34, 1-11.
33. Wiegand, S. J., & Terasawa, E. (1982). Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology*, 34, 395–404.

CAPÍTULO V

Discusión General

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que, en el día del proestro, la información colinérgica originada en el NSQ derecho modula de manera estimulante los mecanismos que conllevan a la ovulación, debido a que se inhibe el incremento pre-ovulatorio de la concentración de LH, ya que el bloqueo o la estimulación del sistema colinérgico de dicho NSQ resulta en el bloqueo de la ovulación. Además, la falta de la información vagal reestablece la respuesta ovulatoria en animales con previo bloqueo del sistema colinérgico del NSQ, lo que sugiere que la regulación de las funciones ováricas también depende, al menos parcialmente de la inervación vagal.

En la rata adulta, la información colinérgica que se origina en NBM juega un papel importante en el mantenimiento de la anatomía y cito-arquitectura de las neuronas VIPérgicas y AVPérgicas del NSQ (Madeira y col., 2004; Abbott y col., 2013). En la tarde del proestro, la inervación AVPérgica proveniente del NSQ estimula el aumento pre-ovulatorio de LH, activando directamente a las neuronas GnRH localizadas en el POA (Palm y col., 1999). En el presente estudio observamos que el bloqueo de los receptores muscarínicos del NSQ en la mañana del proestro disminuyó la concentración de LH en la tarde de ese día, lo cual provocó la falta de ovulación al día siguiente. La disminución de la secreción de LH podría explicarse por la disminución de las señales neurales VIPérgicas y AVPérgicas que regulan a las neuronas GnRH ubicadas en POA. Loh y colaboradores (2014) mostraron que en ratones hembras knockout a VIP, la respuesta ovulatoria es menor, por lo que los autores sugieren que la pérdida de la señalización de VIP resulta en la disminución de la respuesta ovárica.

Debido a que la inyección de LHRH sintética en ratas tratadas con atropina en el NSQ derecho induce la ovulación, proponemos que las señales colinérgicas que se originan en el NSQ son necesarias para la regulación de la secreción de GnRH y LH.

El bloqueo del sistema colinérgico del NSQ resultó en la disminución de la concentración de LH, lo que nos sugiere que en la mañana del proestro el sistema colinérgico del NSQ estimula la secreción de gonadotropinas. Los resultados nos indican que no se produjo un desplazamiento del pico pre-ovulatorio de LH si no un bloqueo, el cual explica la falta de ovulación. *In vitro* se ha mostrado que el carbacol (agonista de acetilcolina no específico) actúa directamente sobre el NSQ alterando la fase de actividad neuronal rítmica; y que la atropina y pirenzepina (antagonista selectivo para mAChR₁) bloquea los cambios de fase producidos por el carbacol (Liu y Gillete, 1996).

La mayoría de las neuronas del NSQ sintetizan GABA (Moore y col., 2002). Elgueta y colaboradores (2015) sugieren que la ACh estimula la liberación de GABA, mientras que las neuronas que expresan VIP y AVP en el NSQ son estimuladas directamente por dicho neurotransmisor (Kretschmannova y col., 2005; Fan y col., 2015). La estimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos del NSQ bloqueó parcialmente y de manera asimétrica la ovulación (la estimulación del NSQ izquierdo no afectó la ovulación), por lo que sugerimos que la ACh micro-inyectada en el NSQ produjo la liberación de GABA, lo que resultó en la disminución de la señal VIPérgica y AVPérgica las cuales estimulan la secreción de GnRH y la ovulación.

La regulación que ejerce el hipotálamo sobre las funciones del ovario es asimétrica (Gerendai y col., 1978; Gerendai y Halász, 2001; Domínguez y col., 2003). Estudios *in vitro* muestran que existen variaciones circadianas en la actividad eléctrica de las neuronas presentes en ambos NSQs, ya que en el derecho, la actividad eléctrica de las neuronas presenta una forma de onda bimodal, mientras que las fluctuaciones del NSQ izquierdo presentan una onda uni-modal, lo que sugiere que cada NSQ puede actuar como un oscilador independiente (Zhang y Aguilar-Roblero 1995). Según Yan y Okamura (2002) y Yan y Silver, (2008) la expresión de *Per1* es asimétrica entre las regiones media y rostral del NSQ. La

exposición a luz constante induce *splitting* (división) en la actividad locomotora, lo que resulta en asimetría en la expresión de *Per1* en el NSQ (Mahoney y col., 2013).

Los ovarios reciben y envían información nerviosa desde y hacia el SNC vía la inervación parasimpática por medio del nervio vago (Gerendai col., 2000, 2005). El nervio vago regula la ovulación, lo que depende del estado endocrino del animal y es asimétrica, donde el nervio vago izquierdo está más comprometido con dicho fenómeno (Cruz y col., 1986, Chávez y col., 1989; Morales-Ledesma y col., 2004; 2007).

Cruz y colaboradores (1986) mostraron que tres ciclos estrales después de la sección del nervio vago izquierdo, la tasa de animales ovulantes fue menor que en el grupo control. En el presente estudio, observamos que la sección del nervio vago derecho, resultó en la disminución de la tasa de animales ovulantes, mientras que la del izquierdo resultó en un menor número de ovocitos liberados. Las diferencias en la tasa ovulatoria entre los resultados de Cruz y colaboradores podrían ser consecuencia del tiempo entre la sección y el estudio de la ovulación (24 h en el presente estudio y 12 días en el caso de Cruz y colaboradores). Por lo que sugerimos que la información colinérgica que viaja por el nervio vago regula de manera estimulante la ovulación.

En el presente estudio la sección del nervio vago derecho en animales con previo bloqueo del sistema colinérgico del NSQ derecho resultó en el reestableciendo de la ovulación. Con base en este resultado, proponemos que la información colinérgica que recibe el NSQ derecho en la mañana del proestro participa de manera estimulante en la regulación de la ovulación. Dado que la sección del nervio vago derecho restableció la ovulación en ambos ovarios, proponemos que este nervio, forma parte de la vía multi-sináptica que comunica al NSQ derecho con ambos ovarios, posiblemente por dos vías no excluyentes entre sí: 1) una vía simpática a través de la columna intermedio-lateral la cual llega al

hipotálamo y participa en regulación de la secreción de GnRH; 2) una parasimpática a través del NTS y del DMV, los cuales informan al SNC sobre los cambios que ocurren en el ovario.

La sección de un nervio resulta en una estimulación mecánica que resulta en una onda de excitación que se transmite a lo largo de la fibra nerviosa (Best y Taylor, 1961). Lo mismo ocurriría cuando se realizó la sección sub-diafragmática del nervio vago. Este estímulo agudo llegaría al SNC, al ovario, a las adrenales y a otros órganos. En el caso del SNC, dicho estímulo llegaría por vías multisinápticas a los núcleos hipotalámicos donde se localizan las neuronas GnRHérgicas, lo que resultaría en el aumento de la secreción de GnRH, de LH y la ovulación, lo que explicaría el restablecimiento de la ovulación en animales con bloqueo del sistema colinérgico del NSQ derecho. Se ha mostrado que la ACh por acción sobre sus receptores muscarínicos y nicotínicos, modula la secreción de GnRH (Krsmanovic y col., 1998). En la neurona GnRHérgica la unión de la acetilcolina a su receptor mAChR₁, activa a la proteína fosfolipasa C la cual hidroliza al fosfatidilinositol y estimula la formación del IP₃. La unión del IP₃ a su receptor en la membrana del retículo endoplasmático rugoso, moviliza el Ca²⁺ hacia el citoplasma, lo que resulta en la liberación de la GnRH (Morales y col., 2005). La liberación de GnRH depende de la concentración intracelular de Ca²⁺, y de la presencia de estradiol, el cual modula las señales de Ca²⁺. En células GT1-7 expuestas a concentraciones ascendentes de acetilcolina incrementan transitoriamente la liberación de Ca²⁺, lo que se traduce en un aumento de la liberación de GnRH (Morales y col., 2003).

Según Cruz y colaboradores (2015) el nervio vago izquierdo podría ser una de las vías por las cuales los ovarios se comunican con el hipotálamo y de esa manera participa en la regulación de la secreción de GnRH y la ovulación, efecto observado a las 13:00 h del proestro. En el presente estudio observamos que a las 09.00 h del proestro, el vago derecho también es una de las vías por las cuales los ovarios se comunican con el hipotálamo y posiblemente con el NSQ. Las diferencias entre los resultados actuales

y los anteriores podrían estar relacionados con la hora en la cual se evalúan los efectos de la sección del nervio vago (13:00 h y 09.00 h horas respectivamente), lo cual nos sugiere que la participación de los nervios vago en la regulación de la ovulación varía en función de la hora del día en la cual son evaluados.

La regulación que ejerce el sistema colinérgico sobre la secreción de hormonas esteroides depende del día del ciclo estral (Cruz y col., 2006, Flores y col., 2006). En el presente estudio el bloqueo de los receptores muscarínicos del NSQ en el día del diestro-1 o proestro resultó en efectos estimulantes o inhibitorios, los cuales dependieron de la hora del día en la cual fueron tratados, por lo que sugerimos que la regulación que ejerce el sistema colinérgico del NSQ sobre la secreción de hormonas esteroides depende de la hora y del día del ciclo estral en estudio.

En el PVN, estructura inervada directamente por el NSQ, se encuentran los somas de las neuronas que secretan el factor liberador de corticotropina (Buijs y col., 1993; Leliavski y col., 2015). A nivel de la hipófisis, el factor liberador de corticotropina y AVP estimulan la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y subsecuentemente la secreción de cortisol y progesterona por la corteza adrenal (Leliavski y col., 2015). Según Buijs y colaboradores (1999), hay una conexión neural entre la glándula suprarrenal y el NSQ. En la mañana del proestro, la micro-inyección de atropina en el NSQ izquierdo resultó en la disminución de la concentración de progesterona, mientras que el tratamiento con acetilcolina resultó en un aumento, lo que nos sugiere que el sistema colinérgico del NSQ izquierdo participa en la regulación de la secreción de progesterona, tanto de origen ovárico como adrenal (Flores y col., 2005, 2011). En la rata en diestro-1 la inyección intracerebroventricular de adrenalina incrementa la liberación de progesterona por parte del ovario, mientras que en diestro-2 la disminuye. Los cambios en la concentración de la progesterona ovárica serían el resultado de señales procedentes de las neuronas ganglionares que se ven afectadas por la estimulación adrenérgica de centros superiores (De bortoli y

col., 1998). Estudios *in vitro* muestran que los efectos de la ACh varían en función del día del ciclo estral y constituye uno de los neurotransmisores que regulan la secreción de progesterona por parte del ovario (Sosa y col., 2004). En nuestro estudio no podemos descartar que la micro-inyección de agentes colinérgicos en el NSQ modula la secreción de progesterona por parte de los ovarios y las adrenales, vía el nervio vago.

Las diferencias observadas entre el bloqueo y la estimulación del sistema colinérgico del NSQ, podrían atribuirse a los diferentes sistemas de neurotransmisión (VIP, AVP, GABA, etc.) que fueron activados en el NSQ izquierdo y que por vías diferentes regulan la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Buijs, 2013; Leliavski y col., 2015).

Según Kawakami y col., 1981 la estimulación electroquímica del área pre-quiasmática en el día del proestro incrementa la concentración sérica de estradiol, por lo que los autores sugieren que la información neural es complementaria al eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la regulación de la secreción de esteroides ováricos. En el día del proestro, la regulación de la secreción de estradiol depende del NSQ y de la hora del día en la cual los efectos son evaluados. La estimulación del sistema colinérgico del NSQ derecho resultó en aumento (mañana) o disminución (tarde) de la concentración de estradiol, lo que sugiere que el sistema colinérgico del NSQ derecho regula la secreción de estradiol dependiendo de la hora del día.

El nervio vago podría ser una de las vías que regulan la secreción de hormonas esteroides (Morales y col., 2007). En animales con bloqueo o estimulación del sistema colinérgico del NSQ la sección del nervio vago resultó en la disminución de la concentración de progesterona y estradiol, lo cual nos sugiere que el vago es una de las vías neurales que regula la secreción de hormonas esteroides de manera estimulante.

La disminución en la concentración de progesterona y estradiol, resultado de la sección del nervio vago en animales con bloqueo o estimulación del sistema colinérgico del NSQ, podría explicarse por la falta de información neural proveniente del nervio vago, la cual regula la actividad del ovario y de la glándula adrenal. Se ha mostrado que la ACh es el principal neurotransmisor que viaja por el nervio vago (Klein y Burden, 1988) y regula la acción de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis (Fritz y col., 2001). En células de la granulosa luteinizadas, estimuladas con carbacol, incrementa la expresión de la StAR, y la secreción de progesterona. El incremento de la actividad de la StAR, inducida por hCG, se amplifica en presencia de carbacol lo que se traduce en una mayor secreción de progesterona (Fritz y col., 2001). La información neural que transporta el nervio vago modula de manera estimulante la actividad de la enzima 3μ -HSD, ya que la sección bilateral del nervio en la rata preñada disminuye la concentración de progesterona y aumenta la reabsorción de los fetos (Lawrence y col., 1978).

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en el presente estudio, sugerimos que la información colinérgica que se originan en el NSQ regula de manera estimulante la secreción LH y por tanto la ovulación. El NSQ derecho, vía el nervio vago derecho, parecen estar más involucrado en la regulación de estos fenómenos reproductivos lo cual nos sugiere que la información vagal sub-diafragmática participa en la regulación de la ovulación y la secreción de hormonas esteroides de manera asimétrica.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, propongo que las funciones del ovario son reguladas directamente por el sistema colinérgico del NSQ, lo que indica que las variaciones observadas a lo largo del día en la concentración de hormonas esteroides y en la ovulación dependen del NSQ.

CONCLUSIONES GENERALES

1. La regulación que ejerce el sistema colinérgico del NSQ sobre la ovulación y la secreción de progesterona y estradiol varía en función de la hora y del día del ciclo estral y es asimétrica.
2. Para que se produzca la secreción preovulatoria de GnRH, LH y la ovulación se requiere que a las 09.00 horas del proestro en los NSQs se origine una señal colinérgica que estimule directa o indirectamente la liberación de GnRH.
3. Las señales colinérgicas estimulantes que se originan en el NSQ, requieren de vías nerviosas como el nervio vago, para estimular la secreción de hormonas esteroides por parte de los ovarios.
4. Los resultados nos permiten proponer que el nervio vago derecho, podría ser una de las vías neurales de comunicación entre el NSQ y los ovarios.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, propongo que se necesita:

1. Analizar la presencia de los receptores muscarínicos en el NSQ en ratas intactas a lo largo del ciclo estral, con el fin de conocer si existen diferencia en la expresión de los receptores entre los NSQs.
2. Estudiar cuál(es) es (son) el(los) receptor(es) muscarínico del NSQ implicado(s) en la regulación de la secreción de GnRH.
3. Analizar si la estimulación de los receptores colinérgicos del NSQ modula la secreción de GnRH en el hipotálamo.
4. Analizar la interacción del sistema colinérgico con los sistemas VIPérgico, AVPérgico y GABAérgico del NSQ en la regulación de las funciones de las neuronas GnRHérgica

REFERENCIAS GENERALES

- Abbott SM, Arnold JM, Chang Q, Miao H, Ota N, Cecala C, Gold PE, Sweedler JV, Gillette MU. Signals from the brainstem sleep/wake centers regulate behavioral timing via the circadian clock. *PLoS ONE* 2013, 8: e70481.
- Abrahamson E, Moore R. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* 2001, 916: 172–191.
- Aguilar-Roblero R, Mercado C, Guadarrama P, Chávez JL (2004). Fisiología celular y molecular. Principios y conceptos. Hernández ME y Ortega A (Eds) Universidad Veracruzana pp: 181-192.
- Allen LG, Lawrence IE, Burden HW, Hodson CA. Effects of abdominal vagotomy on serum LH concentrations in female rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 1985, 74: 87-94.
- Antle M, Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Neurosciences* 2005, 28: 145-151.
- Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue *American Journal of Physiology* 1998, 275: R291–R299.
- Barbacka-Surowiak G, Surowiak J, Stokłosowa S. The involvement of suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. *Reproductive Biology* 2003, 3(2): 99-129.
- Best, C. H., Taylor N. (1961). The Physiological properties of nerve. In *The physiological basis of medical practice*. Seventh edition. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. Pp. 1115-1136.
- Biello SM, Janik D, Mrosovsky N. Neuropeptide Y and behaviorally induced phase-shifts. *Neuroscience* 1994, 62: 273-279.
- Bina KG, Rusak B, Semba K. Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *Journal of Comparative Neurology* 1993, 335: 295–307.
- Buchanan GF, Gillette MU: New light on an old paradox: site-dependent effects of carbachol on circadian rhythms. *Experimental Neurology* 2005, 193(2): 489-96.
- Buijs FN, Cazarez F, Basualdo MC, Scheer FAJL, Perusquía M, Centurion D, Buijs RM. The suprachiasmatic nucleus is part of a neural feedback circuit adapting blood pressure response. *Neuroscience* 2014, 266: 197–207.
- Buijs RM y Kalsbeek A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience* 2001, 2: 521–526.

- Buijs RM, Markman M, Nunes-Cardoso B, Hou YX, Shinn S. Projections of the suprachiasmatic nucleus to stress-related areas in the rat hypothalamus: a light and electron microscopic study. *Journal of Comparative Neurology* 1993, 335: 42–54.
- Buijs RM, Scheer FA, Kreier F, Yi C, Bos N, Goncharuk VD, Kalsbeek A. Organization of circadian functions: interaction with the body. *Progress in Brain Research* 2006, 153: 341-360.
- Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, Kalsbeek A. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *European Journal of Neuroscience* 1999, 11: 1535–1544.
- Buijs RM: Chapter 1. The autonomic nervous system: a balancing act. En: *Autonomic Nervous System Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 117 (3rd series). R.M. Buijs and D.F. Swaab Editors 2013, 2-11.
- Burden HW, Lawrence IE. “The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy” *Neuroendocrinology* 1977, 23: 368-378.
- Burden HW, Lawrence IE Jr. Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat. *The Anatomical Record* 1978, 190(2): 233-241.
- Burden HW, Lawrence J, Louis TM, Hodson CA. Effects of abdominal vagotomy on the estrous cycle of the rat and the induction of pseudopregnancy. *Neuroendocrinology* 1981, 33: 218–222.
- Burden HW, Leonard M, Smith CP, Lawrence Jr IE. The sensory innervations of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *The Anatomical Record* 1983, 207: 623–62.
- Caulfield MP, Birdall NJM. International Union of Pharmacology: XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews* 1998, 50: 279-290.
- Chávez R, Sánchez S, Ulloa-Aguirre A, Domínguez R. Effects on oestrus cyclity and ovulation of unilateral section of the vagus nerve performed on different days of the oestrus cycle in the rat. *Journal of Endocrinology* 1989, 140:197-201.
- Choi J, Smitz J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014, 383: 203-13.
- Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2006, 147(12):5817-25.

- Cruz ME, Castro J, Domínguez R. A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by a unilateral implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Endocrinology* 1992, 133: 205–210.
- Cruz ME, Chávez R, Domínguez R. Ovulation follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Revista de Investigación* 1986, 38: 167-171.
- Cruz ME, Flores A, Alvarado BE, Hernández CG, Zárate A, Chavira R, Cárdenas M, Arrieta-Cruz I, Gutiérrez-Juárez R. Ovulation requires the activation on proestrus of M₁ muscarinic receptors in the left ovary. *Endocrine* 2015, 49: 809-19.
- Cruz ME, Flores A, Domínguez R. The cholinergic system of the preoptic-anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way. *Endocrine* 2014, 47(3): 913-22.
- Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez OJ, Chavira R, Domínguez R. The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006, 4: 1-8.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB & Colledge WH. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 2008, 149: 3926–3932.
- De Bortoli MA, Garraza MH, Aguado LI. Adrenergic intracerebroventricular stimulation affects progesterone concentration in the ovarian vein of the rat: participation of the superior ovarian nerve. *Journal of Endocrinology* 1998, 159(1):61-8.
- de la Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL. Oestrogen receptor-alpha-immunoreactive neurones project to the suprachiasmatic nucleus of the female Syrian hamster. *Journal of Neuroendocrinology* 1999, 11(7): 481-90.
- de la Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL. The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH. *Neuroreport* 1995, 6: 1715–1722.
- de la Iglesia HO, Meyer J, Schwartz WJ. 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* 2003, 23(19): 7412-4.
- DeBiasi M. Nicotinic mechanisms in the autonomic control of organ systems. *Journal of Neurobiology* 2002, 53: 568-579.

- Delgado SM, Escudero CG, Casais M, Gordillo M, Anzulovich AC, Sosa Z, Rastrilla AM. Ovaric physiology in the first oestral cycle: Influence of noradrenergic and cholinergic neural stimuli from coeliac ganglion. *Steroids* 2010, 75: 685-694.
- Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review Physiology* 2010,72: 517-49.
- Dissen GA, Ojeda SR (1999). Ovarian Innervation. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of Reproduction*. 3. USA: Academic Press. pp: 583-589.
- Domínguez R, Morales L, Cruz ME. Ovarian Asymetry. *ARBS. Annual Review of Biomedical Sciences* 2003, 5: 95-104.
- Domínguez R, Riboni L, Zipitría D, Revilla R. Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat? *Journal of Endocrinology* 1982, 95: 175-80.
- Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2006, 147(3): 1154-8.
- Elgueta C, Vielma AH, Palacios AG, Schmachtenberg O. Acetylcholine induces GABA release onto rod bipolar cells through heteromeric nicotinic receptors expressed in A17 amacrine cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2015,9: 6.
- Engelberth RC, Silva KD, Azevedo CV, Gavioli EC, dos Santos JR, Soares JG, Nascimento Junior ES, Cavalcante JC, Costa MS, Cavalcante JS. Morphological changes in the suprachiasmatic nucleus of aging female marmosets (*Callithrix jacchus*). *BioMed Research International* 2014, 2014: 243825.
- Everett JW, Sawyer CH, Markee JE. A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology* 1949, 44: 234-250.
- Everett JW, Sawyer CH. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 1950, 47(3): 198-218.
- Fan J, Zeng H, Olson DP, Huber KM, Gibson JR, Takahashi JS. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus provide sparse GABAergic outputs to local neurons with circadian regulation occurring distal to the opening of postsynaptic GABA ionotropic receptors. *The Journal of Neuroscience* 2015, 35: 1905-1920.
- Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Barco AI, Chavira R, Domínguez R, Cruz ME. The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine* 2005, 28(2): 145-51.

- Flores A, Rodríguez JO, Palafox MT, Meléndez G, Barco AI, Chavira R, Cruz ME, Domínguez R. The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006, 4(11): 1-10.
- Flores A, Velasco J, Gallegos AI, Mendoza FD, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2011, 18(9): 34.
- Foster RG, Hankins MW, Peirson SN. Light, photoreceptors, and circadian clocks. *Methods in Molecular Biology* 2007, 362: 3-28.
- Fritz S, Grünert R, Stocco DM, Hales DB, Mayerhofer A. StAR protein is increased by muscarinic receptor activation in human luteinized granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2001, 171: 49-5.
- Funabashi T, Jinnai K, Sano A, Shinohara K, Kimura F. Pentobarbital stimulates the activity of the GnRH pulse generator interacting with opioid neurons in rats in proestrus. *Psychoneuroendocrinology* 2000, 25: 277-287.
- Gannon RL, Garcia DA, Millan MJ. Effects of systemically applied nAChR α 7 agonists and antagonists on light-induced phase shifts of hamster circadian activity rhythms. *European Neuropsychopharmacology* 2014, 24(6): 964-73.
- Gerendai I, Halász B. Asymmetry of the neuroendocrine system. *News in Physiological Sciences* 2001, 16: 92-5.
- Gerendai I, Rotsztejn W, Marchetti B, Kordon C, Scapagnini U. Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in the two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neuroscience Letters* 1978, 9(4): 333-6.
- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkő Z, Medveczky I, Halász B. CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of the Autonomic Nervous System* 2000, 80: 40-45.
- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkői Z, Halász B. Recent findings on the organization of central nervous system structures involved in the innervation of endocrine glands and other organs; observations obtained by the transneuronal viral double-labeling technique. *Endocrine* 2009, 36: 179-88.
- Gerendai I, Banczerowski P, Halász B. Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine* 2005, 28: 309-18.

- Gordon MN, Finch CE. Topochemical localization of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in mouse brain. *Brain Research*. 1984, 308(2): 364-8.
- Hamada T, Antle MC, Silver R. Temporal and spatial expression patterns of canonical clock genes and clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. The Journal of Neuroscience* 2004, 19:1741-1748.
- Hamada T, LeSauter J, Venuti JM, Silver R. Expression of Period genes: rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *The Journal of Neuroscience* 2001, 21: 7742-7750.
- Herbison AE (2006) Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. En: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Neill JD (Ed). Elsevier. 1415-1482.
- Herbison AE, Heavens RP, Dyer RG. Oestrogen modulation of excitatory A1 noradrenergic input to rat medial preoptic gamma aminobutyric acid neurones demonstrated by microdialysis. *Neuroendocrinology* 1990, 52: 161-168.
- Honma S, Nakamura W, Shirakawa T, Honma K. Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neuroscience Letters* 2004, 358: 173-176.
- Hughes S, Jagannath A, Hankins MW, Foster RG, Peirson SN. Photic regulation of clock systems. *Methods in Enzymology* 2015, 552: 125-43.
- Hut RA, Van der Zee. The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. *Behavioural Brain Research* 2011, 221: 466-480.
- Jiang ZG, Yang Y, Liu ZP, Allen CN. Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *The Journal of Physiology* 1997, 499: 141-159.
- Kawakami M, Kubo K, Uemura T, Nagase M, Hayashi R. Involvement of ovarian innervation in steroid secretion. *Endocrinology*. 1981, 109(1): 136-45.
- Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008, 106(2): 167-73.
- Klein CM, Burden HW. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letter* 1988, 85: 217-222.

- Kornya L, BóDis J, Koppán M, Tinneberg HR, Török. A Modulatory effect of acetylcholine on gonadotropin-stimulated human granulosa cell steroid secretion. *Gynecologic Obstetric Investigation* 2001, 52: 104–107.
- Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, Van Heijningen CL, Sluiter AA, Mettenleiter TC, Romijn JA, Sauerwein HP, Buijs RM. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat functional implications. *Journal of Clinical Investigation* 2002, 110: 1243–1250.
- Kretschmannova K, Svobodova I, Balik A, Mazna P, Zemkova H. Circadian rhythmicity in AVP secretion and GABAergic synaptic transmission in the rat suprachiasmatic nucleus. *Annals of the New York Academy Sciences* 2005, 1048: 103-15.
- Kriegsfeld LJ y Silver R. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Hormones and Behavior* 2006, 49: 557-574.
- Krout A, kawano A, Mettenleiter, Loewya A. CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience* 2002, 110(1): 73-92.
- Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Abdul S, Arora KK, Catt KJ. Muscarinic Regulation of Intracellular Signaling and Neurosecretion in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology* 1998, 139: 4037–4043.
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver *Brain Research*. 2000, 871: 50–56.
- Lall GS, Biello SM. Neuropeptide Y, GABA and circadian phase shifts to photic stimuli. *Neuroscience* 2003, 120: 915-21.
- Lawrence IE, Burden HW, Louis TM. Effect of abdominal vagotomy of the pregnant rat on LH and progesterone concentration and fetal resorption. *Journal of Reproduction and Fertility* 1978, 33: 131–136.
- Lawrence IE, Burden HW. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record* 1980, 196: 51-59.
- Leak RK, Card JP, Moore RY. Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research* 1999, 819: 23–32.
- Leliavski A, Dumbell R, Ott V, Oster H. Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology. *Journal of biological rhythms* 2015, 30: 20–34.

- Liu C, Gillette MU. Cholinergic regulation of the suprachiasmatic nucleus circadian rhythm via a muscarinic mechanism at night. *The Journal of Neuroscience* 1996, 16: 744–51.
- Loh DH, Kuljis DA, Azuma L, Wu Y, Truong D, Wang HB, Colwell CS. Disrupted reproduction, estrous cycle, and circadian rhythms in female mice deficient in vasoactive intestinal peptide. *Journal of Biology Rhythms* 2014, 29: 355-69.
- López E, Cruz ME, Domínguez R. Asymmetrical effects of the unilateral implant of pilocarpine on the preoptic-anterior hypothalamic area on spontaneous ovulation of the adult rat. *Archives of Medical Research* 1997, 28(3): 343-8.
- Madeira MD, Pereira PA, Silva SM, Cadete-Leite A, Paula-Barbosa MM. Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 2004, 125: 889–901.
- Mahoney CE, Brewer JM, Bittman EL. Central control of circadian phase in arousal-promoting neurons. *PLoS One* 2013, 8(6): e67173.
- Mahoney MM, Smale L. Arginine vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide fibers make appositions with gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor cells in the diurnal rodent *Arvicanthis niloticus*. *Brain Research* 2005, 1049(2): 156-64.
- Mayerhofer A, Dimitrijevic N, Kunz L. The expression and biological role of the non-neuronal cholinergic system in the ovary. *Life Science* 2003, 72: 2039-2045.
- Mayerhofer A, Kunz L. A non-neuronal cholinergic system of the ovarian follicle. *Annals of Anatomy* 2005, 187: 521-528.
- Meyer-Bernstein E, Morin L: Differential Serotonergic Innervation of the Suprachiasmatic Nucleus and the Intergeniculate Leaflet and its Role in Circadian Rhythm Modulation. *The Journal of Neuroscience* 1996, 16(6): 2097-2111.
- Miller BH, Olson SL, Levine JE, Turek FW, Horton TH, Takahashi JS. Vasopressin regulation of the proestrous luteinizing hormone surge in wild-type and Clock mutant mice. *Biol. Reprod.* 2006, 75(5): 778-84.
- Moore RY. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2013, 119: 1-28.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell. Tissue Res.* 2002, 309(1): 89-98.
- Moore RY, Silver R. Suprachiasmatic nucleus organization. *Chronobiol. Int.* 1998, 15: 475-87.

- Morales L, Betanzos R, Domínguez R. Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepubertal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Archives of Medical Research* 2004, 35: 279–283.
- Morales L, Chávez R, Domínguez R. Participation of the superior nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Medical Science Research* 1993, 21: 15-17.
- Morales L, Ricardo B, Bolaños A, Chavira R, Domínguez R. Ipsilateral vagotomy to unilaterally ovariectomized pre-pubertal rats modifies compensatory ovarian responses. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2007, 5: 24.
- Morales A, Diaz M, Guelmes P, Marín R, Alonso R. Rapid modulatory effect of estradiol on acetylcholine- induced Ca²⁺ signal is mediated through cyclic-GMP cascade in LHRH-releasing GT1-7 cells. *European Journal of Neuroscience* 2005, 22: 2207–2215.
- Morales A, Diaz M, Ropero AB, Nadal A, Alonso R. Estradiol modulates acetylcholine-induced Ca²⁺ signals in LHRH-releasing GT1-7 cells through a membrane binding site. *European Journal of Neuroscience* 2003, 18:2505–2514.
- Morin L, Allen C. The circadian visual system. *Brain Research Rev* 2006, 51: 1-60.
- Morin L, Blanchard J, Moore R. Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. *Visual Neuroscience* 1992, 8: 219–230.
- Morin LP, Blanchard JH. Descending projections of the hamster intergeniculate leaflet: relationship to the sleep/arousal and visuomotor systems. *Journal of Comparative Neurology* 2005, 487(2): 204-16.
- Morin LP, Blanchard JH. Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *Journal of Comparative Neurology* 2001, 437: 79-90.
- Morin LP: Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology* 2013, 243: 4-20.
- Nakamaru-Ogiso E, Miyamoto H, Hamada K, Tsukada K, Takai K. Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep-wake cycles. *European Journal of Neuroscience* 2012, 35: 1762–1770.
- Neumaier J, Sexton T, Yracheta J, Diaz A, Brownfield M. Localization of 5-HT (7) receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2001, 21: 63-73.

- Nirthanan S1, Gwee MC. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; 94(1): 1-17.
- O'Hara BF, Macdonald E, Clegg D, Wiler SW, Andretic R, Cao VH, Miller JD, Heller HC, Kilduff TS. Developmental changes in nicotinic receptor mRNAs and responses to nicotine in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Molecular Brain Research* 1999, 66: 71-82.
- O'Hara BF, Edgar DM, Cao VH, Wiler SW, Heller HC, Kilduff TS, Miller JD. Nicotine and nicotinic receptors in the circadian system. *Psychoneuroendocrinology* 1998, 23(2): 161-73.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach?. *Endocrinology* 2006, 147(3): 1166-74.
- Ojeda SR, White SS, Aguado LI, Advis JP, Andersen JM. Abdominal vagotomy delays the onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat. *Neuroendocrinology* 1983, 36: 261-267.
- Owen BM, Bookout AL, Ding X, Lin VY, Atkin SD, Gautron L, Kliewer SA, Mangelsdorf DJ. FGF21 contributes to neuroendocrine control of female reproduction. *Nature Medicine* 2013, 19(9): 1153-6.
- Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine Online* 2007, 15: 326-37.
- Palm IF, Van Der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A. Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 1999, 93: 659-666.
- Palus K, Chrobok L, Lewandowski MH. Depolarization of the intergeniculate leaflet neurons by serotonin - in vitro study. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2013, 64(6): 773-8.
- Patanè S. M3 muscarinic acetylcholine receptor in cardiology and oncology. *International Journal of Cardiology* 2014, 177(2): 646-9.
- Picciotto MR, Caldarone BJ, Brunnzell DH, Zachariou V, Stevens TR, King SL. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics* 2001, 92(2-3): 89-108.
- Piet R, Fraissenon A, Boehm U, Herbison AE. Estrogen permits vasopressin signaling in preoptic kisspeptin neurons in the female mouse. *The Journal of Neuroscience* 2015, 35(17): 6881-92.

- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* 2012, 92: 1235–1316.
- Rawson JA, Scott CJ, Pereira A, Jakubowska A, Clarke IJ. Noradrenergic projections from the A1 field to the preoptic area in the brain of the ewe and Fos responses to oestrogen in the A1 cells. *Journal of Neuroendocrinology* 2001, 13(2): 129-38.
- Reghunandanan V, Reghunandanan R. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Circadian Rhythms* 2006, 4: 2.
- Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002, 418: 935–41.
- Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *Journal of Clinical Investigation* 2010, 120: 963-72.
- Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 2009, 150: 3664–3671.
- Sánchez MA, López-García JC, Cruz ME, Tapi R, Domínguez R. Asymmetrical changes in the choline acetyltransferase activity in the preoptic-anterior hypothalamic area during the oestrous cycle of the rat. *Neuroreport* 1994, 5(4): 433-4.
- Scheer FA, Ter Horst GJ, Van der Vliet J, Buijs RM. Physiological and anatomic evidence for regulation of the heart by suprachiasmatic nucleus in rats. *American Journal of Physiology* 2001, 280: H1391–H1399.
- Silverman AJ, Livne I, Witkin JW. The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's physiology of reproduction* New York: Raven Press; 1994. p. 1683-1706.
- Simonian SX, Spratt DP, Herbison AE. Identification and characterization of estrogen receptor alpha-containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 1999, 411(2): 346-58.
- Sliwowska JH, Billings HJ, Goodman RL, Lehman MN. Immunocytochemical colocalization of GABA-B receptor subunits in gonadotropin-releasing hormone neurons of the sheep. *Neuroscience* 2006, 141: 311-319.
- Smarr BL, Morris E, de la Iglesia HO. The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of Kiss1 and the luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 2012, 153(6): 2839-50.

- Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *The Journal of Neuroscience* 2006, 26: 6687–6694.
- Sosa ZY, Casais M, Rastrilla AM, Aguado L. Adrenergic influences on coeliac ganglion affect the release of progesterone from cycling ovaries: characterisation of an in vitro system. *Journal of Endocrinology* 2000, 166: 307-314.
- Sosa ZY, Delgado SM, Casais M, Aguado L, Rastrilla AM. Release of ovarian progesterone during the rat oestrous cycle by ganglionic cholinergic influence. The role of norepinephrine. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2004, 91: 179-184.
- Taylor P, Brown JH. (1999). Acetylcholine En: Basic Neurochemistry. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK. y Uhler MD. (eds.) pp. 213-242. Lippincott-Raven, New York.
- Temel S, Lin W, Lakhani S, Jennes L. Expression of estrogen receptor-alpha and cFos in norepinephrine and epinephrine neurons of young and middle-aged rats during the steroid-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 2002, 143(10): 3974-3983.
- Terawaki S, Matsubayashi R, Hara K, Onozuka T, Kohno T, Wakamatsu K. Biochemical characterization of a heterotrimeric G(i)-protein activator peptide designed from the junction between the intracellular third loop and sixth transmembrane helix in the m4 muscarinic acetylcholine receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015, 463(1-2): 64-9.
- Tóth IE, Wiesel O, Tóth DE, Boldogkoi Z, Halász B, Gerendai I. Transneuronal retrograde viral labeling in the brain stem and hypothalamus is more intense from the left than from the right adrenal gland. *Microscopy Research and Technique* 2008, 71(7): 503-9.
- Travagli RA. The nucleus tractus solitarius: an integrative centre with 'task-matching' capabilities. *The Journal of Physiology* 2007, 582.2: 471.
- Uchida S, Kagitani F. Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation. *The Journal of Physiology Sciences* 2015, 65: 1-9.
- Van den Pol A. The Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus of Rat: Intrinsic Anatomy. *The Journal of Comparative Neurology* 1980, 191: 661-702.
- Van der Beek EM, Wiegant VM, van der Donk HA, van den Hurk R, Buijs RM. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *Journal of Neuroendocrinology* 1993, 5(2):137–44.

- Van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, van den Hurk R y Buijs RM. 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. *Journal of Comparative Neurology* 1997, 384: 569-579.
- Van der Beek EM, Swarts HJ, Wiegant VM. Central administration of antiserum to vasoactive intestinal peptide delays and reduces luteinizing hormone and prolactin surges in ovariectomized, estrogen-treated rats. *Neuroendocrinology* 1999, 69(4): 227-37.
- Van der Zee EA, Biemans BA, Gerkema MP, Daan S. Habituation to a test apparatus during associative learning is sufficient to enhance muscarinic acetylcholine receptor-immunoreactivity in rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience Research* 2004, 78(4): 508-19.
- Van der Zee EA, Streefland C, Strosberg AD, Schöder H y Luiten PGM. Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors in cholinceptive neurons of the supraquiasmatic region in young and age rats. *Brain Research* 1991, 542: 348-352.
- Van Koppen CJ, Kaiser B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacology & Therapeutics* 2003, 98(2): 197-220.
- Vega A, Sosa Z, Delgado S, Casais M, Rastrilla AM. Involvement of ganglionic cholinergic receptors on the steroidogenesis in the luteal phase in rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2010, 120: 45-52.
- Vega A, Sosa Z, Filipa V, Mohamed F, Rastrilla AM. The cholinergic influence on the mesenteric ganglion affects the liberation of ovarian steroids and nitric oxide in oestrus day rats: characterization of an ex vivo system. *Journal Endocrinology* 2006, 191(3): 587-598.
- Vida B, Deli L, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Caraty A, Coen CW, Liposits Z, Kalló I. Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *Journal of Neuroendocrinology* 2010, 22: 1032-1039.
- Watson RE Jr, Langub MC Jr, Engle MG, Maley BE. Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Research* 1995, 689(2): 254-64.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Journal of Pharmacology* 2008, 154(8): 1558-71.
- Williams WP 3rd, Jarjisian SG, Mikkelsen JD, Kriegsfeld LJ. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 2011, 152(2): 595-606.

- Williams WP, Kriegsfeld LJ. Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology* 2012, 3: 1-14.
- Yan L, Okamura H. Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. The Journal of Neuroscience* 2002, 15: 1153–1162.
- Yan L, Silver R. Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *Eur J Neurosci.* 2002 16(8): 1531-40.
- Yan L, Silver R. Day-length encoding through tonic photic effects in the retinorecipient SCN region. *European Journal of Neuroscience* 2008, 28(10): 2108-15.
- Yang JJ, Wang YT, Cheng PC, Kuo YJ, Huang RC. Cholinergic modulation of neuronal excitability in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neurophysiology* 2010, 103: 1397-409.
- Zhang L, Aguilar-Roblero R. Asymmetrical electrical activity between the suprachiasmatic nuclei in vitro. *Neuroreport* 1995, 6(3): 537-40.