



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR FORMA PARTE DE LA VÍA MULTISINÁPTICA DE
COMUNICACIÓN ENTRE EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO Y EL OVARIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

DEYRA DE LOS ANGELES RAMÍREZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO,

NOVIEMBRE DE 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR FORMA PARTE DE LA VÍA MULTISINÁPTICA DE
COMUNICACIÓN ENTRE EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO Y EL OVARIO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

DEYRA DE LOS ANGELES RAMÍREZ HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO,

NOVIEMBRE DE 2016.

Lic. Ivonne Ramirez Wence
Directora 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 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna, **RAMÍREZ HERNÁNDEZ DEYRA DE LOS ÁNGELES** con número de cuenta: **99262893** con la tesis titulada "EL NERVIIO OVÁRICO SUPERIOR FORMA PARTE DE LA VÍA MULTISINÁPTICA DE COMUNICACIÓN ENTRE EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO Y EL OVARIO", bajo la dirección del Tutor Principal: **DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ:**

Presidente: DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA
Vocal: DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
Secretario: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA
Suplente: DR. BENJAMÍN FLORAN GARDUÑO
Suplente: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de octubre de 2016.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDÍ ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM** por darme la oportunidad de entrar en su programa y brindarme una gran formación académica de calidad, además por todo el apoyo económico que me permitió desarrollar y terminar mis estudios de doctorado.

Agradezco al **CONACyT** por la beca 23073 otorgada para realizar mis estudios de doctorado, así como apoyo financiero del convenio 236908. También agradezco el apoyo financiero de **UNAM-DGAPA-PAPIIT** convenio IN-211813.

Agradezco a mi Tutor Principal y a los miembros del Comité Tutor:

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Dra. Leticia Morales Ledesma

Por su gran apoyo académico en la realización de este estudio, así como la guía brindada que me permitió terminar mis estudios de doctorado.





Agradezco a cada uno de los miembros del jurado:

Dra. Ana Lilia Cerda Molina

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Dr. Benjamín Florán Garduño

Dra. Leticia Morales Ledesma

Por el tiempo y dedicación a la revisión de la tesis, por sus comentarios y sugerencias que la enriquecieron.

Un agradecimiento muy especial a mi tutor, el **Dr. Roberto** por aceptarme como su alumna y guiar mi desarrollo académico desde la licenciatura hasta el doctorado, dando la mejor crítica cada día. Por corregir mis errores y enseñarme a trabajar correctamente el análisis y escritura de los resultados del presente estudio y por compartir sus valiosos conocimientos. Gracias por su invaluable amistad.

Agradezco al **Dr. Pablo** por seguir muy de cerca mi desarrollo académico desde la maestría y ahora el doctorado. Por el gran apoyo en la realización de esta tesis, enriqueciéndola en cada tutorial, por su valiosa amistad y consejos que me ayudaron a terminar mis estudios de doctorado. Muchas gracias por toda su dedicación.

Quiero agradecer enormemente a la **Dra. Lety**, por cada momento que se preocupó por sacarme adelante en este difícil camino desde mis estudios de licenciatura hasta el doctorado, por todas sus enseñanzas y por la gran amistad que nos une desde entonces. Muchas Gracias, la quiero mucho.





A todos mis amigos del laboratorio que colaboraron en la realización de esta tesis: Caro, Noé, Francisco, Aldo, Isa grande, Isa chica, Cata, Alina, Hazael, Dany, César, Lizz, Iván, Wendy, Rocío, Valeria, Misael, David, Nallely, Ricardo, Juan, Dra. Paty y muy en especial a Azu, Rosa, Gaby y Ely. Por el crecimiento de esta hermosa amistad que espero se siga fortaleciendo día a día.

A la Dra. María Elena Ayala y a la Dra. Juana Monroy por su tiempo dedicado en la enseñanza de la técnica estereotáxica utilizada en el presente estudio.

A la Dra. Adriana, a la Dra. Ely, al Dr. Román y al personal técnico del bioterio por su gran apoyo en el cuidado de las ratas utilizadas en el presente estudio y por su valiosa amistad.

Al Biol. Roberto Chavira y al Biol. Mario Cardénas por su colaboración en la medición hormonal del presente estudio.





DEDICATORIAS

A mi Dios

Porque nunca me abandonaste y me guiaste por este difícil camino, dándome fortaleza y perseverancia para terminar mis estudios de doctorado. Te amo señor.

A mis padres

María de Jesús y Roberto

*A ti **mamita** que siempre me acompañas y apoyas en todo momento, me enseñas a ser positiva y segura de mi misma, porque cada una de tus palabra me alienta a seguir adelante para ser mejor persona cada día y porque siempre has confiado en mis capacidades. Te amo y adoro mamá ♥.*

*A ti **papá**, que me has apoyado y que ahora más que nunca te encuentras más cerca de mí, espero que esta cercanía siga creciendo y pueda seguir compartiendo contigo cada uno de mis éxitos. Te quiero ♥.*

A mis abuelitos

*A ustedes **Mamá Fanny** y **Papá Chucho**, que forman parte invaluable en mi vida, me han enseñado que la vida hay que disfrutarla al máximo, alentándome y aconsejándome sabiamente en las decisiones que hay que tomar en la vida, por su enorme cariño que siempre me han brindado. Los quiero y adoro muchísimo ♥.*

*A mi **abuelita Vice**, porque tus palabras de aliento me ayudan a seguir adelante, dándome confianza en que podía terminar esta etapa tan importante en mi vida. Gracias abuelita.*

A mis hermanos

Roberto, Fanny, María de Jesús, Jorge y Morin

A mis hermanos gracias por todos sus consejos y ejemplos que me han direccionado a sobresalir en mi profesión, porque siempre están ahí apoyándome en todo momento, por animarme a dar este gran paso en mi vida. Los admiro y amo ♥.





A mis tías

A mi queridísima tía Gela que siempre tus palabras son una luz que me entusiasman a seguir adelante cada día, por fortalecer mi fe en Dios y enseñarme a sacar el mejor provecho a todas las adversidades que parecían no tener solución. Te quiero mucho ♥.

A mis tías Conchita e Inés, por estar al pendiente de mi avance profesional y porque están ahí siempre acompañándome en cada uno de mis logros. Gracias por todo su apoyo.

A mis sobrinitos

A mis cuatro pequeños angelitos: Pony, Cayi, Betito y Roli, por esos grandes abrazos y besos que me brindan, así como una gran alegría a mi vida y que aunque todavía pequeños, me han enseñado a ser perseverante y fuerte para ir siempre adelante. Los adoro muchísimo ♥.

A Ángeles y Carlos

Que forman una parte muy importante en mi vida, por su gran amistad, cariño, e invaluable consejos que me han permitido mirar hacia adelante positivamente en mi futuro profesional. Gracias por todo.

A Ely

Que me has acompañado desde que iniciamos la carrera, por darme apoyo cada que lo necesité, y porque aún mantenemos esta hermosa e invaluable amistad y sobre todo porque has sido mi gran compañera en cada uno de estos proyectos profesionales. Muchas gracias Ely por toda la motivación que me brindaste para terminar esta tesis. Te quiero mucho amiga.

A Rosa, Gaby y Azu

Por su enorme apoyo que me ha permitido terminar esta tesis, porque después de muchos años de conocernos finalmente hemos formado una hermosa amistad y me es muy grato tenerlas a mi lado porque ustedes han sido un gran ejemplo a seguir y he aprendido lo mejor de cada una de ustedes. Gracias chicas, las quiero muchísimo.



ÍNDICE

	<i>Páginas</i>
RESUMEN -----	<i>i</i>
ABSTRACT -----	<i>iii</i>
INTRODUCCIÓN -----	1
ANTECEDENTES -----	3
<i>R</i> Ritmos biológicos-----	3
<i>R</i> Estructura del núcleo supraquiasmático (NSQ)-----	5
<i>R</i> Vías aferentes y eferentes al NSQ-----	8
<i>R</i> Participación del NSQ en la regulación de las funciones ováricas-----	12
<i>R</i> Asimetría central-----	14
<i>R</i> Inervación simpática del ovario-----	16
<i>R</i> Papel del nervio ovárico superior en la regulación de las funciones del ovario-----	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	19
HIPÓTESIS -----	20
OBJETIVOS -----	21
MATERIAL Y MÉTODOS -----	22
<i>R</i> Procedimiento de autopsia-----	24
<i>R</i> Análisis morfológico de los ovarios-----	25
<i>R</i> Confirmación de la lesión en el NSQ-----	25
<i>R</i> Cuantificación de hormonas por RIA-----	25
<i>R</i> Análisis estadístico-----	27

RESULTADOS -----	28
1. <i>Análisis histológico de los cortes de cerebro</i> -----	28
2. <i>Ovulación y morfología ovárica</i> -----	29
2.1. Efectos de la operación simulada del NSQ y laparotomía abdominal-----	29
2.2. Efectos de la lesión uni o bilateral del NSQ-----	30
2.3. Efectos de la sección uni o bilateral del NOS-----	31
2.4. Efectos de la sección ipsilateral del NOS en animales con lesión unilateral del NSQ-----	33
3. <i>Concentraciones hormonales en suero</i> -----	35
3.1. <u>Progesterona</u> -----	35
3.1.1. Efectos de la operación simulada del NSQ y laparotomía abdominal-----	35
3.1.2. Efectos de la lesión uni o bilateral del NSQ-----	37
3.1.3. Efectos de la sección uni o bilateral del NOS-----	39
3.1.4. Efectos de la sección ipsilateral del NOS en animales con lesión unilateral del NSQ-----	40
3.2. <u>Testosterona</u> -----	42
3.2.1. Efectos de la operación simulada del NSQ y laparotomía abdominal-----	42
3.2.2. Efectos de la lesión uni o bilateral del NSQ-----	43
3.2.3. Efectos de la sección uni o bilateral del NOS-----	46
3.2.4. Efectos de la sección ipsilateral del NOS en animales con lesión unilateral del NSQ-----	48
3.3. <u>Estradiol</u> -----	50
3.3.1. Efectos de la operación simulada en el NSQ y laparotomía abdominal-----	50
3.3.2. Efectos de la lesión uni o bilateral del NSQ-----	51
3.3.3. Efectos de la sección uni o bilateral del NOS-----	53
3.3.4. Efectos de la sección ipsilateral del NOS en animales con lesión unilateral del NSQ-----	55
3.4. <u>LH</u> -----	57
3.4.1. Efectos de la operación simulada en el NSQ y laparotomía abdominal-----	57
3.4.2. Efectos de la lesión uni o bilateral del NSQ-----	58
3.4.3. Efectos de la sección uni o bilateral del NOS-----	59

3.4.4. Efectos de la sección ipsilateral del NOS en animales con lesión unilateral del NSQ-----	59
DISCUSIÓN -----	61
MODELO -----	72
CONCLUSIONES -----	74
BIBLIOGRAFÍA -----	75
APÉNDICE -----	88
 Artículo publicado en la revista Reproductive Sciences-----	88

Deyra A. Ramírez, Elizabeth Vieyra, Aldo I. González, Carolina Morán, Roberto Domínguez and Leticia Morales-Ledesma (2016). Both the Suprachiasmatic Nucleus and the Superior Ovarian Nerve Contribute to the Processes of Ovulation and Steroid Hormone Secretion on Proestrus. *Reproductive Sciences*.1-12. DOI: 10.1177/1933719116670307.

R E S U M E N

En los vertebrados, el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo participa en la regulación de la secreción preovulatoria de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y la ovulación. A su vez, la inervación noradrenérgica que llega al ovario por medio del nervio ovárico superior (NOS) participa en la regulación del proceso ovulatorio y la secreción de hormonas esteroides.

Hay evidencias neuro-morfológicas de asimetría en la inervación trans-neuronal del ovario y en estructuras hipotalámicas y extra-hipotalámicas que conectan trans-neuronalmente con el ovario. Además, hay evidencia de una regulación lateralizada de los ritmos circadianos entre los NSQs. El NSQ se comunica con muchos tejidos periféricos a través de las ramas simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo. A nuestro conocimiento, no hay evidencias anatómicas que demuestren conexiones nerviosas entre el NSQ y los ovarios. Por lo que, el objetivo del presente estudio fue analizar si el NOS forma parte de la vía multisináptica de comunicación entre el NSQ y los ovarios durante el día del proestro, y si el NSQ izquierdo, derecho o ambos participan de manera similar en la regulación de la ovulación y la secreción de hormonas esteroides.

Para este propósito, ratas en proestro a las 11:00-12:00 o 17:00-18:00 horas fueron anestesiadas con éter y sometidas a una lesión uni o bilateral del NSQ, a una sección uni o bilateral del NOS, o a una lesión unilateral del NSQ seguido por la sección unilateral del NOS ipsilateral al NSQ lesionado. Algunos animales fueron sometidos a una operación simulada del NSQ o laparotomía de la pared abdominal y fueron usados como grupos de comparación. También se incluyó un grupo testigo intacto. Los diferentes tratamientos fueron evaluados 1 o 24 horas después de los procedimientos quirúrgicos. A la autopsia se evaluó la ovulación espontánea (tasa de animales ovulantes y número de ovocitos liberados) y la concentración de progesterona, testosterona, estradiol y de hormona luteinizante (LH) en suero.

En comparación con los animales testigo, la operación simulada o laparotomía uni o bilateral no modificaron la tasa de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados.

En comparación con la operación simulada, la lesión bilateral del NSQ realizada a las 11:00 h resultó en anovulación, la cual fue restaurada por la inyección de GnRH sintética.

En comparación con los animales laparotomizados, la sección del NOS derecho o bilateral realizada a las 17:00 h, resultó en una menor tasa de animales ovulantes y del número de ovocitos liberados por el ovario derecho. Los ovarios de animales no ovulantes mostraron la presencia de folículos luteinizados con ovocito atrapado. La lesión del NSQ derecho realizada a las 11:00 h con o sin sección del NOS derecho resultó en un menor número de ovocitos liberados. En ratas con lesión unilateral del NSQ, con o sin sección unilateral del NOS, las concentraciones de hormonas esteroides dependieron de la hormona estudiada y del tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia.

Los resultados del presente estudio nos sugieren que en el día del proestro, la ovulación y la secreción de hormonas esteroides son reguladas por diferentes mecanismos neuroendocrinos que provienen de los NSQs. Además apoyan la hipótesis de que el NOS podría ser parte de la vía de comunicación entre el NSQ y los ovarios.

A B S T R A C T

In vertebrates the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus participates in the regulation of the preovulatory release of gonadotropins releasing hormone (GnRH) and the ovulation. Also, the noradrenergic innervation arriving to the ovary through the superior ovarian nerve (SON) is also involved in the regulation of the ovulatory process and steroid hormone secretion. There is neuro-morphological evidence of the trans-neuronal innervation asymmetry of the ovary and on the asymmetry of the hypothalamus and extra-hypothalamic structures trans-neuronally connected with the ovary. Furthermore, data has been published on the side-linked regulation asymmetry of the circadian rhythm in the SCN. The SCN is connected to many peripheral tissues via the sympathetic and parasympathetic branches of the autonomic nervous system. To our knowledge, there are no anatomical evidences showing the neural connections between the SCN and the ovary. For this reason, the aims of the present study were to analyze if during proestrus day the SON forms part of the multi-synaptic pathway between the SCN and ovaries determining the results and if the left and right SCN participates in similar way on the regulation of ovulation and ovarian steroids secretion.

For this purpose, rats on proestrus at 11.00-12.00 or 17.00-18.00 hours were anesthetized with ether and submitted to a unilateral or bilateral injury of the SCN, a unilateral or bilateral section of the SON, or with a unilateral injury to the SCN followed by a unilateral sectioning of the SON ipsilateral to the treated SCN. Some animals were subjected to sham surgery of the SCN or laparotomy of abdominal wall that were used as comparison groups and one untouched control group was included. Treatments were evaluated one or 24 hours after surgical procedures. At autopsy we assessed the spontaneous ovulation (ovulation rate and number of ova shed), and the progesterone, testosterone, estradiol and luteinizing hormone (LH) levels in serum.

Compared to control animals, the uni or bilateral sham surgery or laparotomy did not modify the ovulation rate nor the number of ova shed. Compared to animals with sham surgery, the bilateral SCN injury performed at 11.00 h resulted in anovulation, which was restored by injecting synthetic of GnRH.

Compared to laparotomized animals, right or bilateral SON sectioning treatment at 17.00 h resulted in lower ovulation rates and number of ova shed by the right ovary. The ovaries of non-ovulating animals showed early follicular luteinization signs and trapped ova. The injury of the right SCN performed at 11.00 h, with or without right SON sectioning, resulted in a lower number of ova shed. In rats with a unilateral injury to the SCN, with or without unilateral sectioning of the SON, the effects on hormone levels depended of the hormone studied and the time elapsed between surgery and autopsy.

Present results suggest that on proestrus day ovulation and the regulation of steroid hormone secretion takes place through different neuroendocrine mechanisms in the SCN. In addition, present results support the hypothesis that the SON may serve as the communication link between the SCN and the ovaries.

INTRODUCCIÓN

La expresión de los ritmos biológicos es una capacidad intrínseca de los seres vivos, los cuales persisten en condiciones de aislamiento de las señales ambientales, manteniendo un periodo similar al que mostraban previo al aislamiento (Klein y col., 1991). Los procesos rítmicos en el sistema reproductor femenino dependen de la actividad coordinada y sincronizada de múltiples señales neuroendocrinas en cada nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Sellix, 2015).

En los mamíferos, el marcapaso circadiano localizado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo anterior proporciona un marco temporal en los mecanismos neuroendocrinos que controlan la liberación de gonadotropinas, la ovulación y la secreción de hormonas esteroideas (Urlep y Rozman, 2013, Sellix, 2015).

La importancia del NSQ en la generación de ritmos circadianos fue evidente a partir de experimentos en los cuales se realizaron lesiones bilaterales del NSQ y se evaluaron diversas conductas o fenómenos biológicos que presentan ritmos, como es el caso de la ovulación (Boden y Kennaway, 2006). En la rata hembra, la destrucción bilateral del NSQ por radiofrecuencia induce estro vaginal persistente e inhibición de la secreción de la hormona luteinizante (LH) (Antunes-Rodrigues y McCann, 1967; Wiegand y Terasawa, 1982; Ma y col., 1990) que resulta en anovulación (Brown-Grant y Raisman, 1977).

El NSQ recibe diversas vías aferentes. Las más estudiadas son el tracto retino-hipotalámico (RHT), el tracto genículo-hipotalámico (GHT) y entradas serotoninérgicas provenientes de los núcleos del rafe dorsal y medial (Dibner y col., 2010). De estas 3 vías el RHT envía información fótica directa proveniente de la retina, mientras que el GHT y los núcleos del rafe proveen principalmente información no fótica al NSQ (Morin y Allen, 2006; Dibner y col., 2010).

El NSQ proyecta eferencias a varias regiones del sistema nervioso central, entre las que se encuentran el área preóptica y el núcleo del lecho de la estría terminalis que contienen neuronas secretoras de la hormona liberadora de

gonadotropinas (GnRH) (Van der Beek y col., 1999; de la Iglesia y col., 2003; Kriesgfeld y Silver, 2006), a otras regiones hipotalámicas y extrahipotalámicas que modulan la activación de dichas neuronas GnRHérgicas (Krout y col., 2002; Morin, 2012) y hacia otras regiones que participan en la regulación de la disponibilidad de alimento (Morin y col., 1994).

Estudios con trazadores muestran que existen conexiones multisinápticas del NSQ con diversos órganos periféricos mediante el sistema nervioso parasimpático y simpático, por lo que el NSQ juega un papel significante en el control de los ritmos diarios del organismo (Bartness, 2001; Kennaway, 2005; Gerendai y col., 2009).

Los ovarios están inervados por fibras de naturaleza simpática, parasimpática y sensorial (Lawrence y Burden, 1980; Klein y Burden, 1988; Dissen y Ojeda, 1999; Aguado, 2002). El nervio ovárico superior (NOS) provee el mayor aporte nervioso simpático que llega al ovario e inerva a la glándula intersticial y la teca externa de los folículos ováricos (Burden, 1972; Lawrence y Burden, 1980).

La información que transcurre por el NOS modula de manera estimulante la secreción de hormonas esteroides y la ovulación (Chávez y col., 1991; Morales-Ledesma y col., 2012). Los efectos de la sección del NOS varían en función de la hora del día y del ciclo estral, lo que nos sugiere un mecanismo de control circadiano que regula la síntesis hormonal y la ovulación (Ramírez, 2011). Es posible que las señales rítmicas originadas en el NSQ sean enviadas a los ovarios por una vía multisináptica que llega al ganglio celiaco-mesentérico superior, en donde se localizan los somas de las neuronas del NOS (Lawrence y Burden, 1980). Dado que la información nerviosa que llega por el NOS modula la respuesta de los folículos ováricos a las gonadotropinas (Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993), es posible que este nervio sea una de las vías nerviosas por las que el NSQ modula las funciones de los ovarios. En el presente estudio se analizaron los efectos agudos o sub-agudos de la lesión uni o bilateral del NSQ o la lesión unilateral del NSQ seguido de la sección unilateral del NOS, realizada en la rata adulta a las 11:00 o 17:00 horas del proestro, sobre la ovulación, la concentración de hormonas esteroides y de LH en suero.

A N T E C E D E N T E S

RITMOS BIOLÓGICOS

La expresión de los ritmos biológicos es una capacidad intrínseca de los seres vivos, que persiste en condiciones de aislamiento de las señales ambientales, manteniendo un periodo similar al que mostraban previo al aislamiento (Kwon y col., 2011). En este contexto, los ritmos biológicos pueden haber surgido en el curso de la evolución en respuesta a determinadas variables ambientales cíclicas (exposición a la luz, temperatura, humedad, salinidad, etc), que actúan como señales temporales o *zeitgebers* [del alemán *zeit*, tiempo; *geber*, dador] (Aschoff, 1960; Salazar-Juárez y col., 2006). En presencia de estos zeitgeber, el reloj biológico ajusta su periodo y fase al ciclo ambiental (Golombek y Rosenstein, 2010).

Los ritmos biológicos se definen como la repetición de eventos o fenómenos en intervalos regulares de tiempo (Kennaway, 2005) y son el resultado de la adaptación del organismo a las variaciones cíclicas del ambiente (Gruart y col., 2002).

Los ritmos biológicos se expresan a nivel conductual, fisiológico, bioquímico, molecular, etc. Las características de los ritmos biológicos son: 1) su naturaleza endógena, es decir que la persistencia de la ritmicidad se mantiene en un ambiente constante como la oscuridad continua, y por tanto no son adquiridos por aprendizaje; 2) su capacidad de sincronizarse (*entrainment*) con señales o variables cíclicas del medio ambiente, lo cual es importante en el contexto del ajuste estacional a la duración de los días largos; y 3) la generación de los ritmos es la consecuencia de la oscilación de un conjunto de genes reloj en las células que componen el NSQ (Gruart y col., 2002; Kennaway, 2005).

Con base en la frecuencia de oscilación, los ritmos biológicos se clasifican en: ultradianos, circadianos e infradianos.

- Los **ritmos ultradianos** tienen una frecuencia que van desde segundos a menos de 20 horas, es decir, que ocurren más de una vez durante el día. Por ejemplo, la ingesta de alimento y agua, el ritmo cardíaco y respiratorio (Gruart y col., 2002).
- Los **ritmos circadianos** son aquellos con una duración aproximada de un día (entre 19 y 28 horas), por ejemplo la secreción de cortisol, el ciclo sueño-vigilia y el ciclo actividad-reposo (Gruart y col., 2002).
- Los **ritmos infradianos** son aquellos con una duración de más de 28 horas, es decir, que requieren más de un día para que se repitan. Ejemplos de estos ritmos son el ciclo estral, el ciclo menstrual y los ritmos de hibernación de algunas especies de animales. De todos los ritmos biológicos, los circadianos han sido los más estudiados, tanto en su descripción como en los mecanismos fisiológicos y moleculares (Gruart y col., 2002; Salgado y col., 2009).

En 1972 Stephan y Zucker identificaron a los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) como estructuras del hipotálamo anterior de la rata que son esenciales para el mantenimiento de los ritmos de actividad motora.

En el hámster con lesión bilateral del NSQ que perdió su ritmo de actividad locomotora a causa de dicha lesión, el trasplante de células fetales de NSQ de otro animal restableció su ritmicidad (Meyer-Bernstein y col., 1999), pero con ritmos circadianos proveniente del NSQ donante y no del huésped (Ralph y col., 1990). Estos estudios establecieron la función del NSQ como un marcapaso circadiano (Moore, 2013).

ESTRUCTURA DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (NSQ)

Anatómicamente, el NSQ es una estructura pareada, con forma ovoide que se localiza en la porción ventral del hipotálamo anterior, ventro-lateral al tercer ventrículo y dorsal al quiasma óptico (Kriegsfeld y Silver, 2006, Shirakawa y col., 2001) (**Figura 1**).

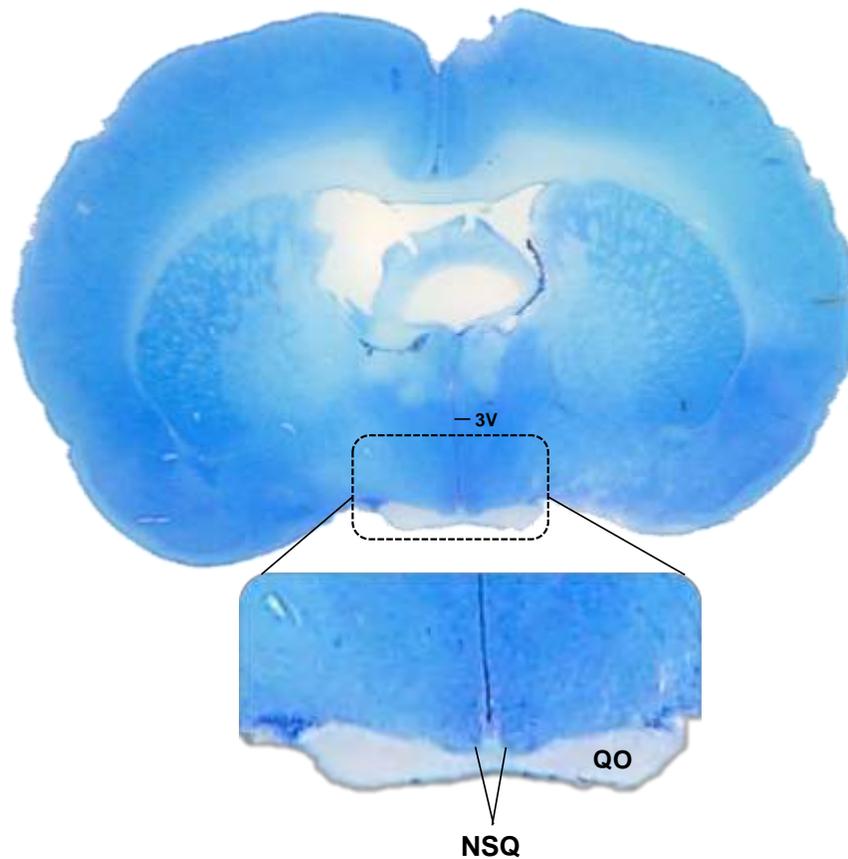


Figura 1. Corte coronal del sistema nervioso central a nivel del quiasma óptico, teñido con violeta de Cresilo, que ilustra la ubicación del núcleo supraquiasmático (NSQ) en el cerebro de una ratona hembra de la cepa C57BL/6. En la ampliación de la zona están presentes los NSQs, se observa el quiasma óptico (QO) y el tercer ventrículo (3V).

En la ratona, las dimensiones dorsoventral, mediolateral y rostrocaudal de cada NSQ son 360, 450 y 750 μm respectivamente, cada NSQ tiene un volumen de 0.064 mm^3 (Gülner, 1983; Moore, 2013) y contiene un promedio de 8,000-10,000 neuronas,

las cuales presentan aposiciones soma-soma, glias y terminales nerviosas (Van den Pol, 1980, 1991; Reppert y Weaver, 2001; Shirakawa y col., 2001).

Las neuronas del NSQ expresan un gran número de péptidos y neurotransmisores. Por criterios anatómicos, funcionales y neuroquímicos, en cada NSQ se describen dos subregiones: la ventro-lateral llamada "core" y la dorso-medial llamada "shell" (Abrahamson y Moore, 2001; Moore y col., 2002; Morin, 2012).

La región "core" está formada por neuronas grandes con extenso desarrollo dendrítico (Shirakawa y col., 2001; Moore, 2013), la mayoría de las cuales sintetizan el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Welsh y col., 1995; Herzog y col., 2004), otras sintetizan el péptido liberador de gastrina (GRP) (Van den Pol y Tsujimoto, 1985), neurotensina (Moore y col., 2002) y una pequeña parte de las neuronas localizadas en la interfase entre el "core" y "shell" sintetizan sustancia P (SP) (Card y col., 1988; Mikkelsen y Larsen, 1993; Reuss y col., 1994). Las neuronas del "core" no generan ritmos autónomos en su actividad eléctrica. Las neuronas al recibir una señal fótica originada en la retina, presentan un ritmo diario en la expresión de c-fos y de los genes reloj Per 1 y Per 2 (Moore y Silver, 1998).

En la región "shell" las neuronas son pequeñas, con poco desarrollo dendrítico (van den Pol, 1980) y sintetizan principalmente vasopresina (VP) (van den Pol y Tsujimoto, 1985; Ingram y col., 1996), algunas de las cuales también sintetizan angiotensina II o encefalina (Sakanaka y col., 1990; Moore y col., 2002). Otras neuronas sintetizan somatostatina (Moore y col., 2002) y un pequeño número de ellas, que se localizan en el borde de ambas regiones, sintetizan calretinina y ácido gamma-amino butírico (GABA) (Silver y col., 1996; Moore y col., 2002). Por la actividad nerviosa espontánea y auto-sostenida que presentan éstas neuronas presentes en el "shell", al NSQ se le considera un verdadero marcapaso circadiano (Moore y Silver, 1998; Honma y col., 2004).

Ambas regiones del NSQ ("core" y "shell") sintetizan GABA, considerado uno de los neurotransmisores principales del sistema circadiano (Abrahamson y Moore, 2001; Morin y Blanchard, 2001; Moore y col., 2002).

A pesar de que la organización anatómica del NSQ es similar entre los roedores, la anatomía intrínseca del NSQ muestra diferencias entre especies. La forma del NSQ en el hámster y el ratón es vertical, más o menos en forma de lágrima (un poco más elíptica en el hámster), pero en la rata la forma es achatada (**Figura 2**), por lo que el NSQ tiene un eje medial-lateral más grande que el eje dorsal-ventral (Morin, 2007, 2012).

En el hámster, además del "core" y "shell", en el NSQ se describe un subnúcleo central caracterizado por presentar neuronas inmunoreactivas a calbindin, SP, GRP y calretinina (LeSauter y col., 2002), mientras que en la rata no se ha descrito estructura equivalente (Morin y col., 2006; Morin, 2012), lo que nos sugiere que la organización del NSQ no es tan simple con regiones "core"/"shell" (Morin, 2007).

En la rata, además de las dos subdivisiones "core" y "shell", presentan diferencias en el fenotipo neuronal, de conexiones locales, en aferencias y eferencias (**Figura 3**), ambas subdivisiones y ambos núcleos (izquierdo y derecho) interactúan como una sola unidad (Shirakawa, 2001). La base anatómica para este acoplamiento no está del todo conocido (Leak y col., 1999). Se describen conexiones sinápticas entre las neuronas del "core" y "shell" (**Figura 3**). Primero, las neuronas de "shell" proyectan al "shell" contralateral y las neuronas del "core" al "core" contralateral. Segundo, las neuronas del "core" inervan densamente al "shell" ipsilateral en una proyección no-recíproca (Leak y col., 1999; More y col., 2002). Los NSQ izquierdo y derecho se conectan por axones que se extienden a través de la línea media (van den Pol, 1980), por lo que ambos núcleos se comunican y sincronizan a través de sinapsis. También se describe que bajo ciertas circunstancias, los núcleos pueden funcionar independientes uno del otro (Shirakawa y col., 2001).

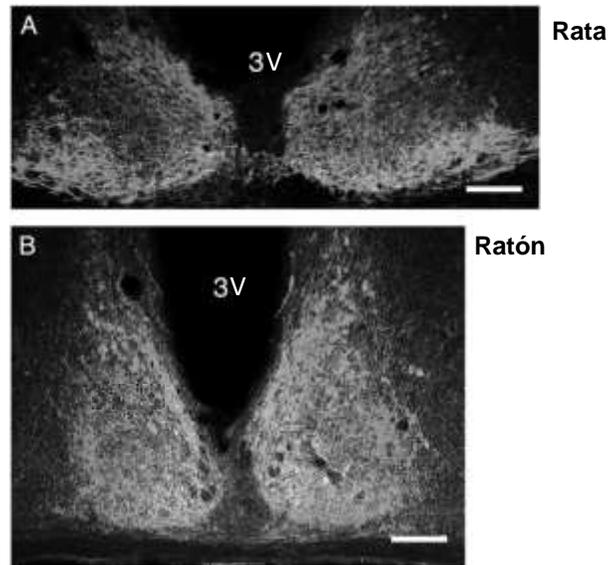


Figura 2. Forma del NSQ en rata y ratón. A) Forma achatada del NSQ en la rata, B) Forma vertical del NSQ en el ratón. 3V: tercer ventrículo (Modificado de Morin, 2012).

VÍAS AFERENTES Y EFERENTES DEL NSQ

Los relojes biológicos presentan vías aferentes que transmiten las señales externas hacia el oscilador endógeno y ajustan el tiempo circadiano con el ambiente, proceso denominado sincronización (Balsalobre, 2002). El *zeitgeber* más estable y por ende más predecible, es el fotoperiodo (Salazar-Juárez y col., 2006).

En la retina, la luz ambiental es detectada por fotorreceptores "circadianos" diferentes a los que intervienen en la visión. Estos fotorreceptores son un tipo especial de células ganglionares que poseen melanopsina, un fotorpigmento que mide la cantidad de luz (luminiscencia) y no la posición o el movimiento de los objetos en el espacio (Rollag y col., 2003).

La información lumínica captada por la retina llega al NSQ por tres vías aferentes (**Figura 3**) (Morin, 1994). La principal aferencia luminosa directa al NSQ es el tracto retino-hipotalámico (RHT) (Moore y col., 1995). El RHT también inerva la IGL y ésta envía fibras hacia el núcleo del rafe dorsal (Morin y Blanchard, 2005). La IGL envía información hacia el NSQ por medio del tracto genículo-hipotalámico

(GHT), lo que representa una segunda vía indirecta hacia el NSQ sobre la iluminación que recibe el animal (Dibner y col., 2010). Las fibras del GHT transportan GABA, neuropéptido Y (NPY) y encefalina a la región “core” del NSQ (Morin, 1994). Los núcleos del rafe dorsal y medial envían fibras serotoninérgicas hacia la región del “core” del NSQ, lo que se describe como la segunda vía nerviosa por la cual el NSQ es modulado por señales no-fólicas (Dibner y col., 2010).

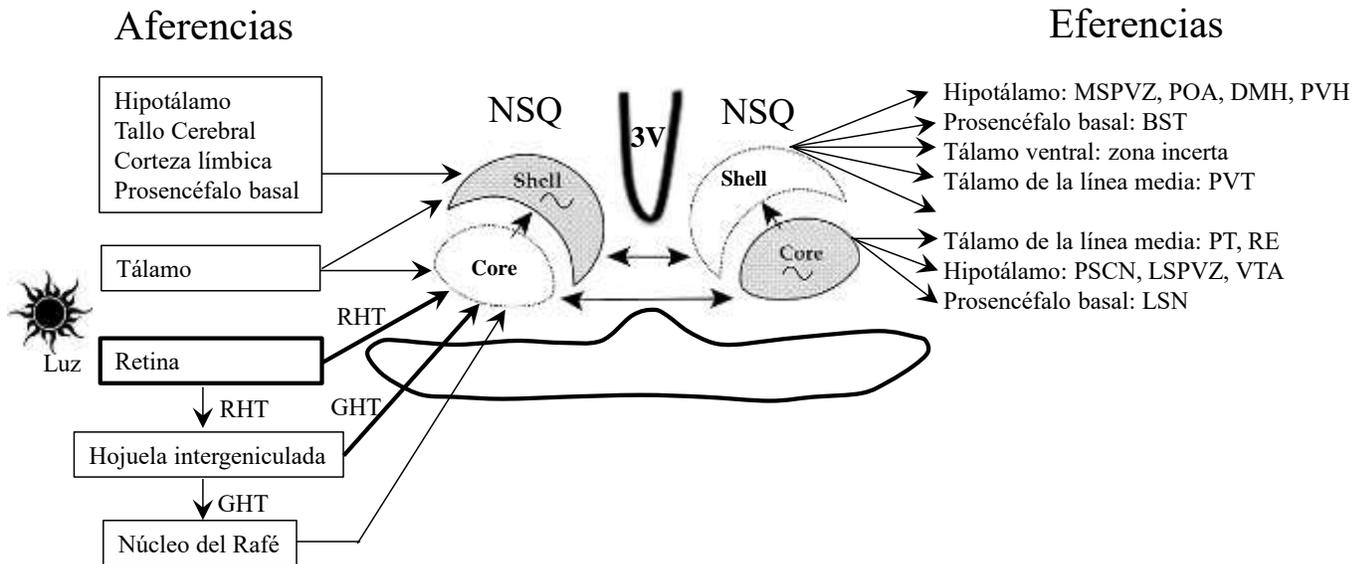


Figura 3. Organización de aferencias, eferencias y de conexiones intrínsecas y comisurales de los NSQs de rata. Se puede observar las diferentes conexiones entre las áreas del sistema nervioso central (aferencias y eferencias) con el “core” y “shell” del NSQ. Las conexiones intrínsecas en el NSQ van de “core” a “shell” y las comisurales de “core” a “core” y de “shell” a “shell”. 3V: tercer ventrículo, RHT: tracto retino-hipotalámico, GHT: tracto genículo-hipotalámico, BST: núcleo de la estria terminalis, DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo, LSN: núcleo septal lateral, POA: área preóptica, PT: núcleo paratenial, PSCN: núcleo perisupraquiasmático, PVH: núcleo paraventricular del hipotálamo, PVT: núcleo paraventricular del tálamo, RE: núcleo reuniens, LSPVZ, área subparaventricular lateral, MSPVZ: área subparaventricular medial, VTA, área tuberal ventral (Modificado de Leak y col., 1999).

Los axones de las células ganglionares de la retina forman el RHT, un haz de fibras nerviosas localizadas en el nervio óptico (Moore y col., 1995), que llega a la porción “core” del NSQ (Tanaka y col., 1993). La mayoría de estos axones liberan de manera conjunta glutamato y SP, una subpoblación de fibras liberan glutamato y el

péptido activador del adenilato ciclasa hipofisiario (PACAP) (Hannibal, 2002), el cual potencia la acción del glutamato en el NSQ (Harrington y col., 1999; Minami y col., 2002). La liberación de glutamato y PACAP induce la remodelación de la cromatina (Crosio y col., 2000) y por ello la expresión de genes reloj (Albrecht y col., 1997), con una oscilación de aproximadamente 24 horas (Kennaway, 2005).

La topografía de las terminales del RHT en los NSQs varía entre las especies estudiadas, al igual que la contribución de la inervación retinal ipsi vs. contralateral al NSQ (Morin, 2012). En el hámster y el ratón, en la región “shell” del NSQ se describe la presencia de gran cantidad de terminales nerviosas provenientes de la retina que llega por el RHT, mientras que en la rata, esta región no recibe inervación de la retina y es la región “core” la que recibe la información lumínica (Morin y col., 2006). En la rata y el ratón, el RHT proyecta bilateralmente al NSQ (predominantemente contralateral en la rata) e ipsilateral en el ratón (Morin y col., 2006).

La IGL es una región en la que convergen señales fóticas y no-fóticas (señales auditivas, de las interacciones sociales, temperatura, movimiento etc.). Las señales no-fóticas son percibidas por los núcleos del rafe medial y dorsal (Dibner y col., 2010) y transmitidas directamente al NSQ, o indirectamente a la IGL y de ésta a los NSQs (Meyer-Bernstein y Morin, 1996; Huhman y col., 1997; Aguilar-Roblero y col., 2004). Además de la IGL, otras dos regiones del tálamo inervan monosinápticamente al NSQ; el núcleo paraventricular y la zona incerta (Krount y col., 2002).

Muchas zonas de la región preóptica del hipotálamo que incluyen al núcleo preóptico medial, anterodorsal y anteroventral, a los núcleos periventricular anteroventral (AVPV), ventromedial, dorsomedial y subparaventricular, del hipotálamo proyectan fibras nerviosas directamente al NSQ, mientras que la región preóptica lateral lo hace por vías multisinápticas (Palm y col., 1999; Krount y col., 2002; Aguilar-Roblero y col., 2004).

El "shell" del NSQ proyecta de manera directa fibras que contienen VP al AVPV (Watson y col., 1995; Barbacka-Surowiak y col., 2003). En el AVPV convergen información del NSQ y hormonal (estradiol), las cuales estimulan la secreción preovulatoria de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Watson y col., 1995; Williams y Kriegsfeld, 2012; Smarr y col., 2012). En el AVPV de la rata, las neuronas que sintetizan kisspeptina son inmunoreactivas al receptor de estrógenos alfa y envían proyecciones a las vecindades de las neuronas GnRH del área preóptica (POA) rostral (Simonian y col., 1999; Mahoney y Smale, 2005), las cuales expresan el receptor a kisspeptina, el GPR-54 (receptor 54 acoplado a proteínas G) (Clarkson y Herbison, 2006; Smarr y col., 2012).

En la rata adulta, las neuronas VIPérgicas de la región "core" del NSQ hacen contacto monosináptico directo con las neuronas GnRHérgicas localizadas en POA, área hipotalámica anterior (AHA), la parte media de la banda diagonal de Broca (DBB) y en la región del órgano vasculoso de la lámina terminalis (OVLT) (Van der Beek y col 1993), donde el 35% de las neuronas GnRHérgicas están en aposición con fibras VIPérgicas (Mahoney y Smale, 2005).

La inyección de VIP en la parte medial de POA (mPOA) o en el tercer ventrículo de ratas cíclicas intactas u ovariectomizadas tratadas con estrógenos, reduce la amplitud del aumento de LH (Weick y Stobie, 1995; Van der Beek y col., 1997), por lo que los autores sugieren que la secreción endógena de VIP por las neuronas del NSQ ejerce un efecto inhibitorio a nivel de mPOA.

Las neuronas que sintetizan VP localizadas en la región "shell" del NSQ hacen contacto con las neuronas GnRHérgicas localizadas en el mPOA (Van der Beek y col., 1998). La lesión del NSQ disminuye la concentración de LH en suero, mientras que la microinyección de VP en el área mPOA incrementa la secreción de LH, por lo que se propone que la VP regula la liberación de LH (Palm y col., 1999). En cocultivos que contienen tejido del NSQ y del POA, la liberación de VP por el NSQ estimula la secreción de GnRH (Funabashi y col., 2000). Por lo anterior, se postula

que la VP es parte del sistema que estimula el aumento brusco en la concentración de LH ("pico" preovulatorio de LH) en la tarde del proestro (Palm y col., 1999; Funabashi y col., 2000).

El NSQ tiene conexiones con diversos núcleos que regulan de manera indirecta la secreción de GnRH, entre los que se destacan el núcleo arcuato, el núcleo paraventricular del hipotálamo y IGL, los cuales a su vez tienen conexiones multisinápticas con las neuronas GnRHérgicas (Bons y col., 1983; Watson y col., 1995; Krout y col., 2002; Barbacka-Surowiak y col., 2003; Morin y Blanchard, 2005; Morin, 2012).

PARTICIPACIÓN DEL NSQ EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES OVÁRICAS

Los NSQs transmiten información rítmica a las células de otras regiones cerebrales y órganos periféricos vía una gran variedad de señales, que incluyen conexiones nerviosas y señales humorales (Abrahamson y Moore, 2001; Dibner y col., 2010).

El NSQ regula la función reproductiva a través de proyecciones nerviosas directas e indirectas al eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Boden y Kennaway, 2006; de la Iglesia y Schwartz, 2006; Kriegsfeld y Silver, 2006; Christian y Moenter, 2010).

En ratas macho, la lesión bilateral del NSQ desorganiza el patrón circadiano de la actividad locomotora, la ingesta de alimento (Kennaway, 2005) y agua (Buijs y col., 1993), la secreción de la hormona adrenocorticotropa, de melatonina y la temperatura corporal (Balsalobre, 2002; Aguilar-Roblero y col., 2004; Kennaway, 2005), debido a la alteración de conexiones nerviosas, así como de vías parácrinas o endocrinas (Kennaway, 2005).

Samson y McCann (1979) mostraron en ratas ovariectomizadas, que la lesión bilateral del NSQ decrece el contenido de GnRH en la región preóptico-septal-pericomisural y en la eminencia media, lo cual se traduce en la inhibición de la liberación cíclica de LH inducida por progesterona. Los autores sugieren que el efecto de la lesión bilateral del NSQ sobre la secreción fásica de gonadotropinas puede ser debido a un menor aporte de fibras GnRH que llegan a la eminencia media, sin embargo, no descartan la participación del NSQ en la generación del ritmo de secreción de gonadotropinas.

En la rata hembra, la destrucción bilateral del NSQ por radiofrecuencia induce estró vaginal persistente (Antunes-Rodrigues y McCann, 1967; Wiegand y Terasawa, 1982), inhibición en la secreción de LH (Antunes-Rodrigues y McCann, 1967; Wiegand and Terasawa, 1982; Ma y col., 1990) y anovulación (Brown-Grant y Raisman, 1977).

Wiegand y Terasawa (1982) realizaron lesiones electrolíticas bilaterales en el NSQ o en el núcleo preóptico medial (MPN) de ratas cíclicas y en ambos casos los animales no ovularon. Kimura y Kawakami (1978) observaron que la lesión bilateral del NSQ realizado en la tarde del proestro (12:00-14:00 h) también resultó en anovulación, mientras que Terasawa y col. (1980) mostraron que la lesión bilateral del NSQ en la mañana del proestro (09:00-10:00 h) no impidió la ovulación al día siguiente. Con base en estos resultados, para explicar las discrepancias entre sus hallazgos y los de Kimura y Kawakami, los autores sugieren la existencia de una ligera diferencia en el lugar y tamaño de las lesiones.

La lesión bilateral del NSQ disminuye la liberación de LH estimulada por progesterona, mientras que la lesión del MPN la elimina, por lo que se sugiere que la anovulación asociada con lesiones del MPN o NSQ se explica por la alteración del "feedback" estimulante de la progesterona en la liberación de LH (Wiegand y Terasawa, 1982), como Samson y McCann (1979) lo propusieron previamente. En apoyo a esta interpretación Ma y col. (1990) mostraron que la lesión bilateral del

NSQ en el día del proestro disminuye la concentración de progesterona, sin modificar la de estradiol.

En ratas en proestro, esto o metaestro, la lesión unilateral del NSQ realizado a las 9:00 h del proestro bloquea la ovulación en el día del estro esperado (Silva y col., 2012). El reemplazo de GnRH a las 14:00 h en el día del proestro, restableció la ovulación. Con base en estos resultados se sugiere que ambos lados del NSQ son necesarios para gatillar el aumento preovulatorio de GnRH necesario para la ovulación (Silva y col., 2015).

ASIMETRÍA CENTRAL

Existen numerosas evidencias de que diversas regiones pares del sistema nervioso central presentan asimetría funcional en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación (Cruz y col., 1989; Cruz y col., 1992; Ramírez y Alba, 1993; Ayala y col., 1994; Gerendai y Halász, 1997; de la Iglesia y col., 2003; Cruz y col., 2014).

En la rata hembra adulta la concentración de GnRH en el lado derecho del hipotálamo medio basal es el doble que el izquierdo (Gerendai y col., 1978), lo cual está asociado con la mayor cantidad del ARNm que codifica para la GnRH en el lado derecho del área preóptica-hipotalámica anterior(POA-AHA) (Arteaga-López y col., 2003).

Además, los implantes unilaterales de atropina (bloqueador de los receptores muscarínicos) en el POA-AHA de la rata en el día del diestro 1, en el lado izquierdo en el diestro 2 o en el lado derecho en el día del estro bloquean la ovulación (Cruz y col., 1989). Con base en esos resultados los autores sugieren que la región POA-AHA ejerce una regulación asimétrica sobre la ovulación, lo cual depende del día del ciclo estral en el que se realizó el implante. El bloqueo unilateral de los receptores muscarínicos en el POA-AHA está asociado a la inhibición del crecimiento folicular en los ovarios, lo que les sugiere que el crecimiento folicular también es regulado de manera asimétrica por el sistema colinérgico de POA-AHA (Cruz y col., 2014).

La participación de la amígdala en los mecanismos que modulan la secreción de GnRH es asimétrica. Banczerowski y col. (2003) mostraron que las modificaciones en la secreción *in vitro* de testosterona por los testículos de ratas con lesión unilateral de la amígdala por la microinyección de ácido kaínico, no se explica por la disminución de la secreción de LH, si no por mecanismos nerviosos provenientes de la amígdala independientes de la señal hipofisaria.

Los mecanismos que regulan los ritmos circadianos también presentan asimetría. Estudios *in vitro* muestran que la actividad neuronal del NSQ derecho presenta un patrón de actividad bimodal, mientras que la del izquierdo es unimodal (Zhang y Aguilar-Roblero, 1995).

En hámsteres mantenidos en iluminación constante se observó un patrón de actividad motora dividido que se presenta cada doce horas (llamado "split") (Pittendrigh y Dann, 1976). Cada periodo de actividad coincide con un aumento en la secreción de LH (Swann y Turek, 1985). Posteriormente, de la Iglesia y col. (2003) mostraron que en el hámster mantenido en iluminación constante, existe en el NSQ alternancia en la actividad neuronal del lado izquierdo y derecho, determinado por la expresión de c-Fos. Existen evidencias de que cada lado del NSQ funciona como un marcapaso independiente, basados en el hecho de que el "split" desaparece después de lesionar unilateralmente el NSQ (Stephan y Zucker, 1972; Pickard y Turek, 1983).

En conjunto estas evidencias muestran que el hipotálamo y otras estructuras extra-hipotalámicas (Sánchez y Domínguez, 1995; Cruz y col., 2001) regulan la secreción de GnRH y las funciones reproductivas de manera asimétrica.

INERVACIÓN SIMPÁTICA DEL OVARIO

En la regulación de las funciones de diversos órganos participan conexiones multisinápticas entre el sistema nervioso simpático y parasimpático con el NSQ (Bartness y col., 2001; Buijs y col., 2003; Kalsbeek y col., 2004; Vujović y col., 2008; Gerendai y col., 2009). Con base en diferentes estudios se describe una vía de comunicación multisináptica entre el sistema nervioso central y los ovarios (Gerendai y col., 1998; Gerendai y col., 2005, 2009; Tóth y col., 2007; Kagitani, 2008; Cruz y col., 2014). Kennaway (2005) y Sellix (2015) proponen que la información proveniente del NSQ participa en la regulación de las funciones ováricas, vía la inervación simpática o parasimpática que reciben los ovarios.

Los ovarios están inervados por fibras de naturaleza simpática, parasimpática y sensorial (Lawrence y Burden, 1980; Klein y Burden, 1988; Dissen y Ojeda, 1999; Aguado, 2002). Las funciones de los ovarios como la ovulación y secreción de hormonas, son reguladas por una vía humoral proveniente del eje hipotálamo-hipófisis-gónada y de vías nerviosas provenientes del sistema nervioso central (Burden, 1985; Gerendai y col., 1998; Morales y col., 1993; Morán y col., 2000; Zhang y col., 2010; Flores y col., 2011; Morales-Ledesma y col., 2012; Uchida y Kagitani, 2014; Uchida, 2015).

Las fibras simpáticas que inervan a los ovarios surgen de los segmentos torácico 11 al lumbar 4 de la médula espinal. Estas fibras hacen sinapsis con las neuronas post-ganglionares que se localizan en el complejo ganglio celiaco-mesentérico superior (GCMS), donde se originan los somas de dos grandes paquetes nerviosos, el nervio ovárico superior (NOS) y el nervio del plexo ovárico (NPO) (Dissen y Ojeda, 1999).

El NOS corre junto al ligamento suspensorio del ovario e inerva a la glándula intersticial y la teca externa de los folículos ováricos y provee el mayor aporte noradrenérgico que llega a la gónada (Burden, 1972), mientras que el NPO se

encuentra asociado a la arteria ovárica e inerva principalmente a los vasos sanguíneos (Lawrence y Burden, 1980; Klein y Burden, 1988).

Las fibras que componen al NOS y NPO son principalmente amielínicas con un pequeño porcentaje de tipo mielínico (Payer, 1978; Lawrence y Burden, 1980; Hanada y col., 2011). En el NOS existen fibras que utilizan como neurotransmisor a la noradrenalina (NA), adrenalina, el VIP y NPY, mientras que en el NPO se describen fibras que utilizan la NA, sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen que codifica a la calcitonina (CGRP) como neurotransmisores (Lawrence y Burden, 1980; Klein y Burden, 1988).

PAPEL DEL NERVIIO OVÁRICO SUPERIOR EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL OVARIO

Chávez y col. (1991) describen que en la rata adulta la sección bilateral o derecha del NOS, resulta en una menor respuesta ovulatoria por el ovario derecho, efecto que no se restablece por la inyección de la gonadotropina coriónica humana. Los autores concluyen que el NOS regula la ovulación espontánea de manera estimulante modulando la reactividad de los folículos ováricos a las gonadotropinas.

En la rata adulta la sección bilateral del NOS realizada a las 11:00 o 16:00 h del día del proestro, disminuye la concentración de progesterona y estradiol a partir de los 4 y hasta los 24 minutos después de la sección, mientras que tales efectos no se observan si la cirugía se realiza a las 11:00 h del día del estro, lo que sugirió que el NOS regula de manera estimulante la secreción de esteroides por el ovario y que los efectos dependen del día del ciclo estral (Aguado y Ojeda, 1984).

Los efectos de la sección del NOS también dependen del nervio seccionado y del tiempo transcurrido entre la cirugía y la autopsia. En un estudio previo mostré que la sección del NOS derecho a las 11:00 h del proestro resulta en el incremento en la

concentración de estradiol a la hora, mientras que ésta disminuye a las 24 horas. En tanto que la sección del NOS izquierdo no la modifica (Ramírez, 2011).

En el día del diestro 1, la sección del NOS izquierdo o derecho a las 11:00 o 17:00 h no modificó la concentración de progesterona una hora post-denervación (Ramírez, 2011), pero si la sección del NOS derecho se realiza a las 13:00 h, se observa una menor concentración de la hormona (Flores y col., 2011).

En conjunto estas evidencias permiten postular que la información simpática que llega por el NOS participa en la regulación de la esteroidogénesis ovárica y varía a lo largo del día.

Kagitani y col. (2008) mostraron que en la rata adulta, la estimulación eléctrica del NOS en el día del estro, disminuye la tasa de secreción de estradiol, lo que les sugirió que la información nerviosa que llega por dicho nervio modula de manera inhibitoria la secreción de estradiol. Esta reducción en la secreción de estradiol durante la estimulación del NOS fue bloqueado por la inyección de un antagonista alfa 2-adrenérgico y no por la de un antagonista alfa 1-adrenérgico (Kagitani y col., 2011).

Para descartar que la menor secreción de estradiol fue consecuencia de una menor producción de testosterona, en el mismo modelo experimental, Uchida y Kagitani (2014) observaron que la estimulación del NOS inhibió la secreción de testosterona, la cual no fue modificada por la inyección de yohimbina, un antagonista alfa 2-adrenérgico, pero fue abolida por la inyección de prazosin, un agonista alfa 1-adrenergico. A partir de estos resultados los autores concluyen que el NOS regula la secreción de hormonas esteroides por diferentes mecanismos neuroendocrinos, ya que la reducción de la secreción de estradiol por la estimulación del NOS es independiente de la reducción de la secreción de testosterona.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El NSQ es uno de los centros nerviosos que regula la secreción de GnRH y por ende de las gonadotropinas, las hormonas ováricas y la ovulación. Es posible que las señales nerviosas originadas en el NSQ sean enviadas a los ovarios por una vía multisináptica que llega al ganglio celiaco-mesentérico superior, en donde se localizan los somas de las neuronas del NOS.

Dado que la información nerviosa que llega por el NOS modula la respuesta de los folículos ováricos a las gonadotropinas, es posible que este nervio sea una de las vías nerviosas por las que el NSQ modula las funciones de los ovarios.

Por ello, en el presente estudio se trató de dar respuesta a la siguiente pregunta:

¿Cuál es el papel de los NSQs izquierdo, derecho o ambos en la regulación de la ovulación y la esteroidogénesis ovárica y de qué manera interviene el NOS como una vía de relevo entre el NSQ y los ovarios?

Para responder a dicha pregunta, se planteó la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

Dado que el NSQ regula la secreción pulsátil de GnRH, y envía información rítmica hacia los ovarios por medio del NOS, entonces la eliminación de esta información por la lesión unilateral del NSQ y la sección unilateral del NOS resultará en cambios en la función ovárica.

OBJETIVO GENERAL

- ↻*** Analizar el papel del NSQ en la regulación de las funciones ováricas y la participación del NOS como una posible vía multisináptica de comunicación entre el NSQ y el ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ↻*** Analizar los efectos de la lesión unilateral o bilateral del NSQ en diferentes horas del día del proestro sobre la ovulación espontánea y la concentración en suero de hormonas esteroides ováricas.
- ↻*** Analizar en la rata adulta con lesión unilateral del NSQ los efectos de la sección ipsilateral del NOS sobre las funciones ováricas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos se realizaron con estricto apego a lo establecido por la Ley Mexicana de Protección Animal para el Uso de Animales de Experimentación y siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El Comité Institucional para el Cuidado y Uso Animal de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y el Subcomité del Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM aprobaron el protocolo experimental. Se hicieron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento.

Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa CII-ZV, mantenidas en condiciones de iluminación contralada de 14 h de luz por 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h) y temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$); con libre acceso al agua y alimento (Purina S.A., México). El ciclo estral de los animales fue monitoreado por el análisis citológico de frotis vaginales diarios. Sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron al menos dos ciclos consecutivos de 4 días de duración y el estudio fue realizado en ratas en el día del proestro.

✓ Grupo Testigo Absoluto (Testigo)

Grupos de ratas hembra intactas fueron sacrificadas a las 12:00 o 18:00 horas del proestro, o a las 11:00 o 17:00 horas de estro.

Grupos de 6-13 ratas cíclicas fueron anestesiadas con éter entre a las 11:00-12:00 o entre las 17:00-18:00 horas. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después de la cirugía. Los animales fueron asignados al azar en alguno de los siguientes grupos experimentales:

✓ Grupos con lesión uni o bilateral del NSQ

Grupos de animales en el día del proestro una vez anestesiados fueron colocados en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga CA, USA). Se seccionó el cuero cabelludo, se hizo un orificio en el cráneo con ayuda de una broca

odontológica (1mm bit). Subsecuentemente, un electrodo térmico aislado excepto en la punta (TCZ 0.2, Radionics, Inc. Burlington, MA; con 0.2 mm de longitud de la punta y 0.3 mm de diámetro) fue conectado a un Sistema Generador de Lesión por Radio Frecuencia, modelo RFG 4A (Radionics, Inc. Burlington, MA). El NSQ fue localizado tomando las coordenadas estandarizadas que se calcularon a partir de las coordenadas reportadas en el Atlas Estereotáxico del Cerebro de Rata (Paxinos y Watson, 2004): para el *NSQ izquierdo*: -0.3 mm antero-posterior al bregma, +0.3 mm lateral-medial al bregma, -9.1 mm por debajo del bregma; para el *NSQ derecho*: -0.3 mm antero-posterior al bregma, -0.4 mm lateral-medial al bregma, -9.1 mm por debajo del bregma. El daño al NSQ se produjo por el paso de corriente a través del electrodo, calentando la punta de éste a una temperatura constante de 90°C por 15 segundos. La lesión fue realizada en el NSQ izquierdo, derecho o en ambos (bilateral). Después de producida la lesión, el electrodo fue removido y la herida suturada.

Como grupos de comparación utilizamos animales a los que se les practicó una operación simulada en el NSQ izquierdo (OS-I), derecho (OS-D) o bilateral (OS-B). Los animales fueron tratados como se describió para los grupos con lesión y usando las mismas coordenadas, el electrodo fue introducido al NSQ por 15 segundos sin pasar corriente, inmediatamente después el electrodo fue removido y la herida suturada.

En aquellos animales a los que se les practicó una lesión en el NSQ y se bloqueó la ovulación, se les realizó un remplazo con GnRH sintética. Para ello, a las 14:00 h del proestro a grupos de animales con lesión del NSQ se les inyectó, por vía subcutánea, 3.7 µg/kg de GnRH sintética (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

✓ **Grupos con sección uni o bilateral del NOS**

La sección del NOS izquierdo, derecho o bilateral se realizó siguiendo la metodología descrita por Morales-Ledesma y col. (2012). En breve, los animales se anestesiaron con éter y se les realizó una incisión dorso-lateral por debajo de la última costilla que

incluyó piel, músculo y peritoneo. El ovario izquierdo, derecho o ambos fueron expuestos, se identificó el ligamento suspensorio por donde corre el NOS, el cual se seccionó con la ayuda de una pinza fina a 1 cm de distancia del ovario. La gónada fue inmediatamente regresada a la cavidad abdominal y se suturó la herida.

Como grupos de comparación utilizamos animales a los que se les realizó una laparotomía izquierda (LAP-I), derecha (LAP-D) o bilateral (LAP-B), la cual consistió en la incisión de piel, músculo y peritoneo, y sin tocar ningún órgano interno se suturó la herida.

✓ **Grupos con lesión unilateral del NSQ seguida de la sección unilateral del NOS ipsilateral al NSQ lesionado (Lesión+Sección)**

Grupos de animales con lesión unilateral del NSQ fueron sometidos inmediatamente a la sección unilateral del NOS, ipsilateral al núcleo lesionado:

- Lesión del NSQ izquierdo seguido por la sección del NOS izquierdo.
- Lesión del NSQ derecho seguido por la sección del NOS derecho.

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Los animales de cada grupo experimental fueron sacrificados por decapitación 1 o 24 horas después del tratamiento. Se recogió la sangre del tronco en tubos de vidrio y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. El suero se congeló a -20 °C hasta que se midió la cantidad de progesterona, testosterona, estradiol y LH por radioinmunoanálisis (RIA) y se calculó la concentración de cada hormona. Para confirmar que se había seccionado correctamente el NOS y el ligamento suspensorio, a la autopsia se verificó el libre movimiento del ovario, lo que confirmó la correcta sección del NOS (Morales-Ledesma y col., 2012). Se disecaron los oviductos en los que se buscó la presencia de ovocitos, los cuales fueron contados con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Los ovarios fueron disecados,

pesados y fijados en líquido de Bouin, incluidos en parafina, cortados a 10 μm de grosor y teñidos con hematoxilina-eosina. El cerebro de los animales con operación simulada o con lesión seguido o no de la sección del NOS fue disecado, fijado en formol al 10% durante ocho días.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS OVARIOS

Con la ayuda de un microscopio binocular Nikon, en todas las secciones histológicas de los ovarios de los animales que no ovularon, se buscó la presencia de cuerpos lúteos recién formados, de folículos con ovocito atrapado o de ambos.

CONFIRMACIÓN DE LA LESIÓN EN EL NSQ

En los cerebros de los animales con operación simulada o lesión seguidos o no de sección del NOS, se realizaron cortes coronales de 100 μm de grosor usando un vibratomo (Serie 3000; Technical Products International, Inc., St Louis, MO). Cada una de las secciones que incluían al NSQ fueron montadas por flotación sobre portaobjetos impregnados con gelatina al 2% disuelta en fenol al 0.5%. Los cortes fueron teñidos con la técnica de Nissl (Violeta de Cresilo) y analizados con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ800) para ubicar la trayectoria del electrodo y la zona de lesión, las cuales fueron fotografiadas con una cámara digital (HP Photosmart M637). En nuestro estudio sólo se incluyeron los resultados obtenidos en aquellos animales en los que la lesión estuvo dentro del NSQ.

CUANTIFICACIÓN DE LAS HORMONAS POR RIA

➤ Hormonas esteroideas

La medición de la concentración de progesterona (ng/ml), testosterona y estradiol (pg/ml) se realizó por RIA de fase sólida, con estuches comerciales (Coat-A-Count,

Los Angeles, CA, USA), que consisten de tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos específicos: anti-progesterona- I^{125} , anti-testosterona- I^{125} o anti-estradiol- I^{125} y calibradores para la realización de la curva patrón de cada hormona. En el caso de progesterona y estradiol, a cada tubo se le adicionaron 100 μ l de suero problema y para testosterona se adicionó 50 μ l del suero, más 1 ml de la hormona radioactiva (I^{125}). Los tubos se agitaron en un vortex durante un minuto y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas. La muestra fue decantada, se retiró el sobrenadante y los tubos se colocaron en un contador de centelleo gamma modelo Cobra 5005, PackardTM. En función de las cuentas por minuto y de la curva de calibración, se determinó la concentración de la hormona en la muestra problema. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 6.58% y 7.42% para progesterona, 7.85% y 8.76% para testosterona, y 7.54% y 8.21% para estradiol.

➤ LH

La cuantificación de LH se realizó por RIA de doble anticuerpo, en tubos de vidrio se colocaron 100 μ l de suero problema más 100 μ l de hormona marcada con LH- I^{125} , después se adicionó el anticuerpo obtenido de suero de borrego anti-LH y la mezcla se dejó incubar por 24 horas. Posteriormente, se agregaron 100 μ l del segundo anticuerpo suplementado con suero normal de conejo y la mezcla se incubó durante 2 horas. A continuación, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a -4 °C por 30 minutos, se decantó el sobrenadante y se secaron las paredes de los tubos y enseguida se colocaron en un contador de rayos gamma, modelo Cobra 5005, PackardTM. La concentración de la hormona en la muestra problema se calculó a partir de las cuentas por minuto y de la curva de calibración, utilizando concentraciones crecientes de LH y como estándar se utilizó la rLH-RP2 de NIH. Las concentraciones de LH se expresaron en ng/ml de suero. Los coeficientes intra e inter-ensayo fueron 5.1% y 6.5%. La sensibilidad del análisis fue de 0.02 ng/ml.

La cuantificación de las hormonas esteroides y proteicas se realizó en el Laboratorio de Hormonas Esteroides y Proteicas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la supervisión del Biol. Roberto Chavira y del Dr. Mario Cárdenas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del número de ovocitos liberados fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de U de Mann-Whitney o de Dunn. La tasa de animales ovulantes (número de animales ovulantes/número de animales por grupo) fue analizada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Las concentraciones de hormonas esteroides y de LH fueron analizadas por la prueba de análisis de varianza multifactorial (ANDEVA) de una vía seguida por la prueba de Tukey. Las diferencias entre dos grupos fueron analizadas con la prueba “t” de Student o U de Mann-Whitney. En todos los casos se consideró como diferencia estadística aquella probabilidad que fue menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS CORTES DE CEREBRO

En la **figura 5** se muestran fotografías de cortes de cerebro que confirman la trayectoria del electrodo en los animales con operación simulada, así como las lesiones producidas en el NSQ izquierdo, derecho o bilateral, seguidas o no por la sección del NOS.

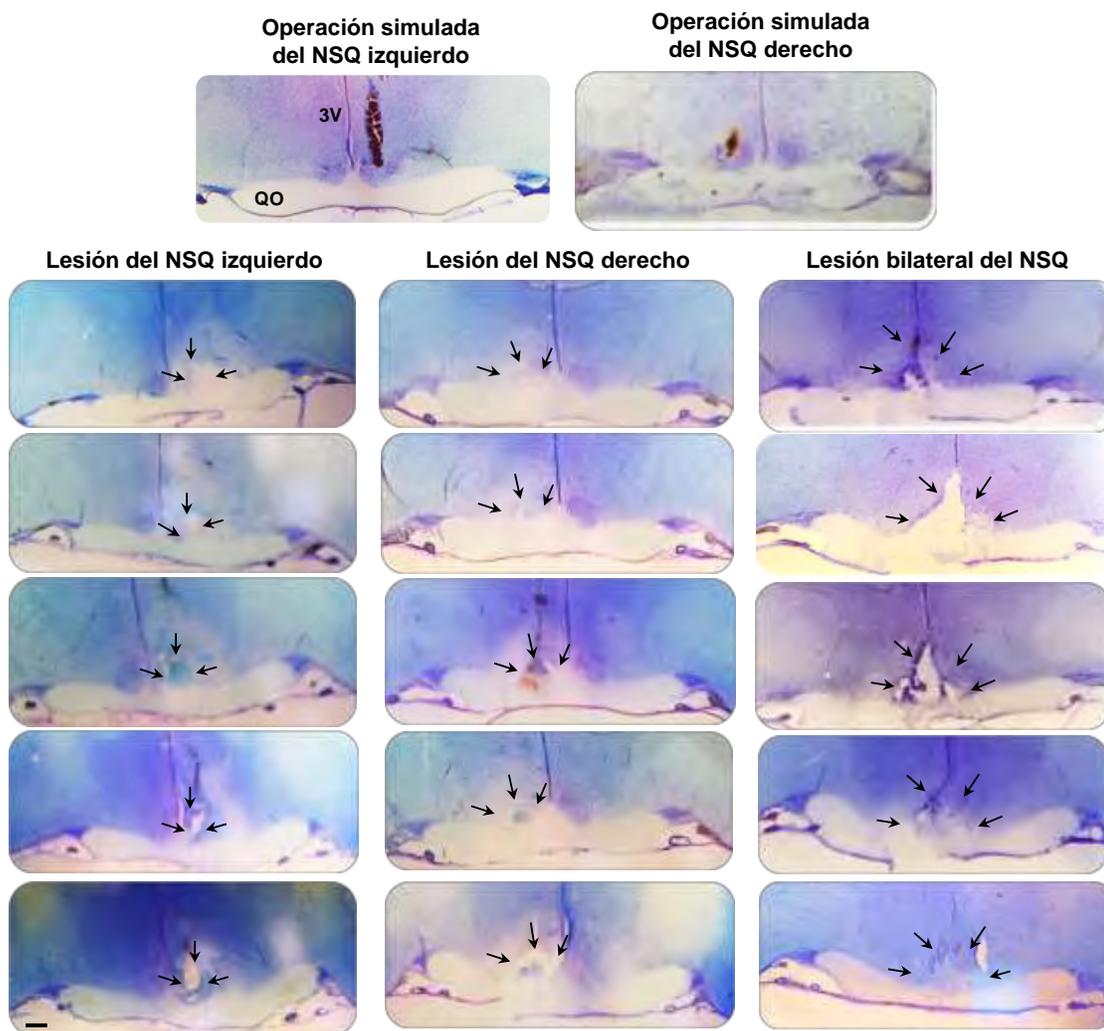


Figura 5. Fotografías de los cortes coronales de cerebro (100 μm de grosor) de animales con operación simulada izquierda o derecha, o con lesión del núcleo supraquiasmático (NSQ) izquierdo, derecho o bilateral. Teñidos con Violeta de Cresilo. Se puede observar la trayectoria del electrodo en el NSQ (operación simulada). Las flechas indican la ausencia del NSQ producida por lesión. 3V: tercer ventrículo; QO: quiasma óptico. Ampliación a 4X. Barra de escala=100 μm .

2. OVULACIÓN Y MORFOLOGÍA OVÁRICA

2.1. EFECTOS DE LA OPERACIÓN SIMULADA DEL NSQ Y LAPAROTOMÍA ABDOMINAL

La tasa de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados por los animales con operación simulada o laparotomía uni o bilateral fueron similares a la del grupo testigo (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m del número total de ovocitos liberados de ratas testigo, con operación simulada bilateral (OS-B), derecha (OS-D) o izquierda (OS-I) del núcleo supraquiasmático, o con laparotomía abdominal bilateral (LAP-B), derecha (LAP-D) o izquierda (LAP-I), realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 24 horas después del tratamiento.

Hora de la cirugía	11:00 h		17:00 h	
	GRUPOS	TAO	Número total de ovocitos	TAO
Testigo	9/9	11.8 \pm 0.9	8/8	12.8 \pm 0.6
OS-B	10/10	10.6 \pm 0.7	10/11	10.2 \pm 1.1
LAP-B	10/10	13.4 \pm 0.9*	7/7	10.6 \pm 1.3
OS-D	8/8	11.4 \pm 0.6	11/11	12.7 \pm 0.4
LAP-D	10/10	11.9 \pm 1.1	9/10	11.9 \pm 1.0
OS-I	11/12	10.8 \pm 1.0	9/9	10.6 \pm 1.0
LAP-I	10/10	12.0 \pm 1.0	9/10	11.3 \pm 1.1

*p<0.05 vs. OS-B (Prueba U de Mann-Whitney).

2.2. EFECTOS DE LA LESIÓN UNI O BILATERAL DEL NSQ

La lesión bilateral del NSQ realizada a las 11:00 h resultó en la falta de ovulación, lo que no ocurrió en los animales tratados a las 17:00 h. El número de ovocitos liberados por los animales con lesión del NSQ derecho, a las 11:00 o 17:00 h, fue menor que en los animales con operación simulada (*11:00 h*: 7.7 ± 1.1 vs. 11.4 ± 0.6 ; *17:00 h*: 9.2 ± 1.0 vs. 12.7 ± 0.4 ovocitos, $p < 0.05$ prueba de U de Mann-Whitney). La lesión del NSQ izquierdo no modificó la ovulación en los animales tratados a las 11:00 o 17:00 h. (**Cuadro 2**).

La inyección de GnRH sintética a ratas con lesión bilateral del NSQ restauró la ovulación (5/5 vs. 0/6, $p < 0.005$, prueba de probabilidad exacta de Fisher) y el número total de ovocitos liberados fue similar a los animales con operación simulada (10.5 ± 0.9 vs. 10.6 ± 0.7 N.S).

Cuadro 2. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados por ovario izquierdo y derecho de ratas con operación simulada (OS) o lesión bilateral (B) derecha (D) o izquierda (I) del núcleo supraquiasmático, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 24 horas después del tratamiento.

Hora de la cirugía		11:00 h		17:00 h		
GRUPOS	TAO	Número de ovocitos liberados por ovario		TAO	Número de ovocitos liberados por ovario	
		Izquierdo	Derecho		Izquierdo	Derecho
OS-B	10/10	6.0 \pm 0.5	5.7 \pm 0.5	10/11	4.5 \pm 0.6	5.7 \pm 0.8
Lesión-B	0/6♣	0	0	11/11	5.8 \pm 0.6	6.1 \pm 0.6
OS-D	8/8	5.7 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4	11/11	6.5 \pm 0.4	6.2 \pm 0.6
Lesión-D	8/11	5.1 \pm 0.5	3.5 \pm 0.5*	11/11	4.5 \pm 0.6*	5.2 \pm 0.8
OS-I	11/12	5.5 \pm 0.6	5.8 \pm 0.8	9/9	5.1 \pm 0.7	5.4 \pm 0.7
Lesión-I	8/10	6.0 \pm 0.7	4.6 \pm 0.3	9/9	6.2 \pm 0.5	6.3 \pm 0.8

♣p<0.05 vs. OS-B (Prueba de probabilidad exacta de Fisher).

*p<0.05 vs. OS-D (Prueba U de Mann-Whitney).

2.3. EFECTOS DE LA SECCIÓN UNI O BILATERAL DEL NOS

La sección bilateral del NOS realizada a las 11:00 o 17:00 h resultó en un menor número de ovocitos liberado por animal ovulante (11:00 h: 8.2 \pm 1.0 vs. 13.4 \pm 0.9, p<0.006; 17:00 h: 4.8 \pm 0.7 vs. 10.6 \pm 1.7 ovocitos, p<0.017, prueba U de Mann-Whitney). El número de ovocitos totales liberados por los animales con sección del NOS derecho a las 11:00 o 17:00 h fue menor que en los animales con operación simulada (11:00 h: 6.2 \pm 1.0 vs. 11.9 \pm 1.1, p<0.002; 17:00 h: 7.3 \pm 0.9 vs. 11.9 \pm 1.0 ovocitos, p<0.005, prueba U de Mann-Whitney). En ambos casos, el número de ovocitos liberados fue menor en el ovario derecho (11:00 h) o izquierdo (17:00 h). La

sección del NOS izquierdo realizada a las 11:00 o 17:00 h no modificó la ovulación. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados por ovario izquierdo y derecho de ratas con laparotomía (LAP) o sección bilateral (B), derecha (D) o izquierda (I) del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 24 horas después del tratamiento.

Hora de la cirugía	11.00 h				17.00 h			
	TAO		Número de ovocitos liberados por ovario		TAO		Número de ovocitos liberados por ovario	
	Ovario Izquierdo	Ovario Derecho	Izquierdo	Derecho	Ovario Izquierdo	Ovario Derecho	Izquierdo	Derecho
LAP-B	10/10	9/9	6.7 \pm 0.7	5.6 \pm 1.0	7/7	7/7	4.6 \pm 0.8	6.0 \pm 1.1
Sección-B	9/10	9/10	4.7 \pm 0.5*	4.2 \pm 0.2	10/14	6/14♣	4.8 \pm 0.5	2.3 \pm 0.3*
LAP-D	10/10	9/10	5.6 \pm 0.7	7.0 \pm 0.6	7/10	9/10	5.7 \pm 0.5	6.6 \pm 0.8
Sección-D	14/16	8/16	4.1 \pm 0.6	4.4 \pm 0.7*	11/15	7/15♣	5.6 \pm 0.6	3.6 \pm 0.9*
LAP-I	9/10	10/10	6.1 \pm 0.5	6.5 \pm 0.5	9/10	9/10	6.0 \pm 0.6	5.4 \pm 0.7
Sección-I	9/14	13/14	4.8 \pm 0.6	6.8 \pm 0.7	12/17	11/17	4.4 \pm 0.7	5.5 \pm 0.7

♣p<0.05 vs. LAP (Prueba de probabilidad exacta de Fisher).

*p<0.05 vs. LAP (Prueba U de Mann-Whitney).

Los ovarios de ratas con sección uni o bilateral del NOS realizada a las 11:00 h que no ovularon, presentaron folículos preovulatorios atrésicos, cuerpos lúteos viejos y poco desarrollo folicular. En las ratas tratadas a las 17:00 h se observó la presencia de folículos atrésicos o con signos de luteinización y ovocito atrapado (**Figura 6**).

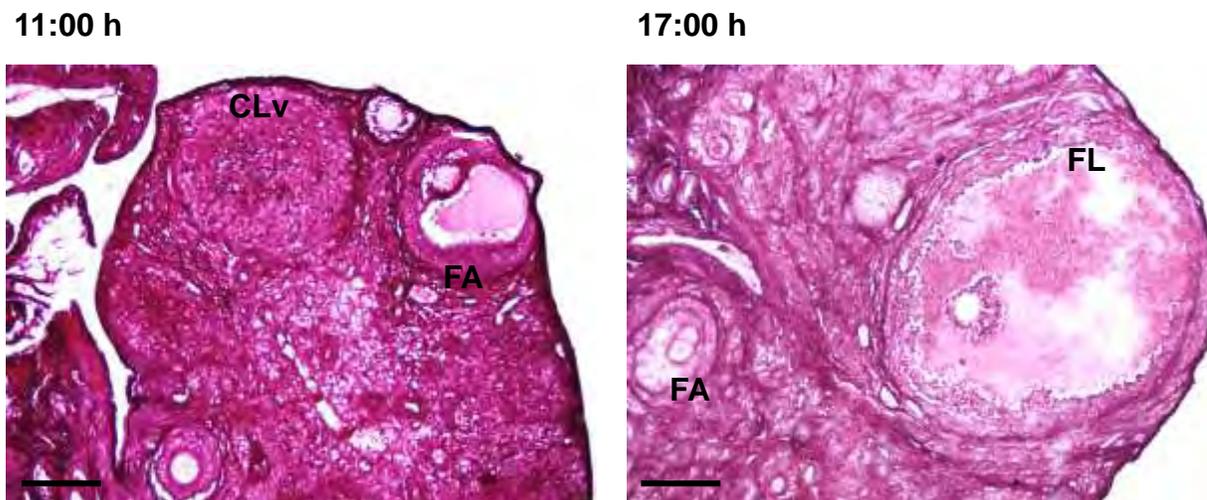


Figura 6. Histología ovárica de ratas con sección del nervio ovárico superior derecho o bilateral, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del día del proestro que **no ovularon**. Los animales fueron sacrificados 24 horas después del tratamiento. Las microfotografías corresponden a secciones de ovario a 10 μm de grosor teñidas con hematoxilina-eosina. FA: folículo atrésico, FL: folículo luteinizado, CLv: cuerpo lúteo viejo. Ampliación a 10X. Barra de escala= 200 μm .

2.4. EFECTOS DE LA SECCIÓN IPSILATERAL DEL NOS EN ANIMALES CON LESIÓN UNILATERAL DEL NSQ

En los animales con lesión del NSQ derecho seguida de la sección del NOS derecho realizadas a las 11:00 h, la tasa de animales ovulantes fue menor que en los animales con sección. El número de ovocitos liberados por el ovario derecho también fue menor que en los otros grupos. El mismo tratamiento realizado a las 17:00 h no modificó la ovulación. La lesión+sección del lado izquierdo realizada a las 11:00 o 17:00 h tampoco modificó la respuesta ovulatoria (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho de ratas con sección del nervio ovárico superior derecho (Sección-D) o izquierdo (Sección-I), o lesión del núcleo supraquiasmático derecho (Lesión-D) o izquierdo (Lesión-I) seguida o no de la sección del nervio ovárico superior derecho o izquierdo, realizadas a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados a las 24 horas después del tratamiento.

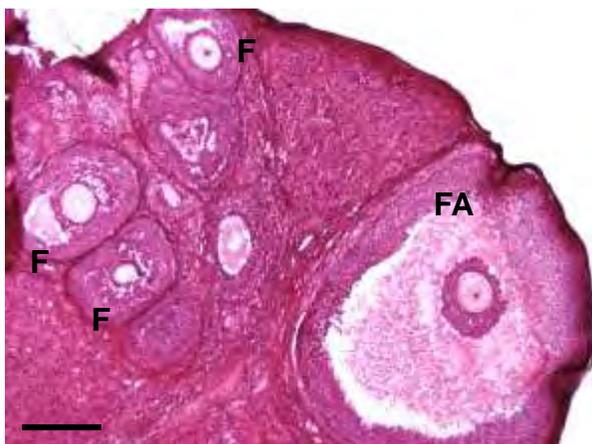
Hora de la cirugía		11:00 h		17:00 h		
GRUPOS	TAO	Número de ovocitos liberados por		TAO	Número de ovocitos liberados por	
		ovario izquierdo	ovario derecho		ovario izquierdo	ovario derecho
Lesión-D	8/11	5.1 \pm 0.5	3.5 \pm 0.5	11/11	4.5 \pm 0.6	5.2 \pm 0.8
Sección-D	14/16	4.1 \pm 0.6	4.4 \pm 0.7	11/15	5.6 \pm 0.6	3.6 \pm 0.9
Lesión-D+Sección-D	3/10♣	5.5 \pm 0.4	1.7 \pm 0.3*	10/11	6.9 \pm 0.9	4.6 \pm 0.9
Lesión-I	8/10	6.0 \pm 0.7	4.6 \pm 0.3	9/9	6.2 \pm 0.5	6.3 \pm 0.8
Sección-I	13/14	4.8 \pm 0.6	6.8 \pm 0.7	12/17	4.4 \pm 0.7	5.5 \pm 0.7
Lesión-I+Sección-I	7/11	4.0 \pm 0.9	5.0 \pm 1.3	12/13	5.4 \pm 0.8	6.9 \pm 1.0

♣p<0.05 vs. Sección-D (Prueba de probabilidad exacta de Fisher).

*p<0.05 vs. Lesión-D, Sección-D (Prueba U de Mann-Whitney).

Los ovarios de ratas con lesión del NSQ derecho y sección del NOS derecho realizada a las 11:00 h que no ovularon, mostraron la presencia de folículos preovulatorios atrésicos con ovocito libre en el antro folicular. A las 17:00 h también se observó la presencia de folículos atrésicos (**Figura 7**).

11:00 h



17:00 h

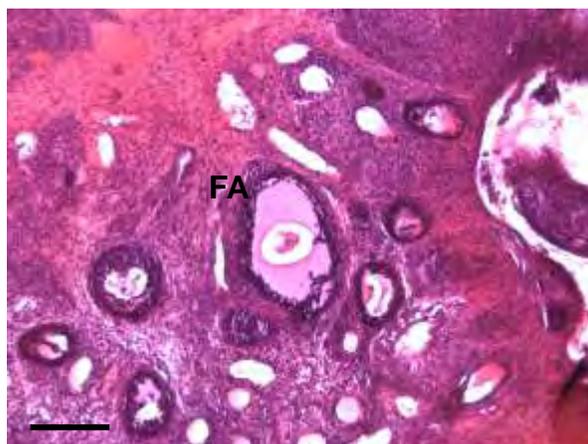


Figura 7. Histología ovárica de ratas con lesión del núcleo supraquiasmático derecho más la sección nervio ovárico superior derecho, realizadas a las 11:00 o 17:00 horas del día del proestro que **no ovularon**. Los animales fueron sacrificados 24 horas después del tratamiento. Las microfotografías corresponden a secciones de ovario a 10 μm de grosor teñidas con hematoxilina-eosina. F=folículo normal, FA=folículo atrésico. Ampliación a 10X. Barra de escala= 200 μm .

3. CONCENTRACIONES HORMONALES EN SUERO

3.1. PROGESTERONA

3.1.1. EFECTOS DE LA OPERACIÓN SIMULADA DEL NSQ Y LAPAROTOMÍA ABDOMINAL

Una hora después de realizada la operación simulada o laparotomía uni o bilateral a las 11:00 o 17:00 h, la concentración de progesterona fue mayor que las ratas testigo. Mientras que fue menor en los animales tratados con las mismas cirugías a las 11:00 h, sacrificados 24 horas después (**Figura 8**).

24 h después de realizada la laparotomía unilateral a las 17:00 h, la concentración de progesterona fue menor que la del grupo testigo (**Figura 8**).

Una hora después de realizada la operación simulada bilateral a las 11:00 h, la concentración de progesterona fue mayor que en los animales con operación simulada derecha (38.4 ± 3.3 vs. 28.5 ± 2.2 ng/ml, $p < 0.05$, prueba "t" de Student). 24 horas post operación simulada derecha a las 11:00 h, la concentración de progesterona fue menor que en los animales con operación simulada izquierda o bilateral (OS-D: 5.6 ± 0.6 vs. OS-I: 14.1 ± 1.4 ; OS-B: 11.7 ± 1.6 ng/ml, $p < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

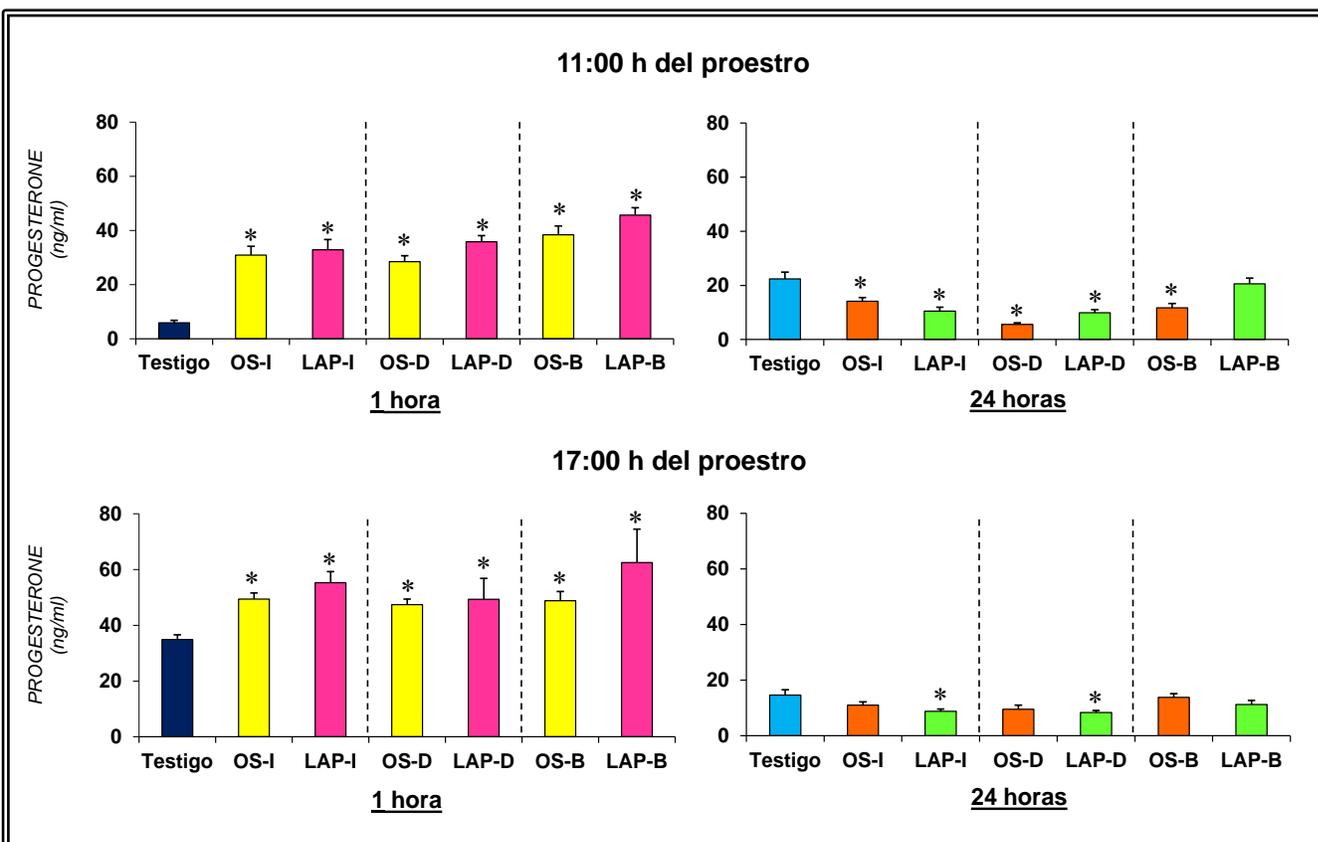


Figura 8. Media \pm e.e.m de la concentración de progesterona en suero de ratas testigo, con operación simulada izquierda (OS-I), derecha (OS-D) o bilateral (OS-B) del núcleo supraquiasmático o con laparotomía abdominal izquierda (LAP-I), derecha (LAP-D) o bilateral (LAP-B) realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento. * $p < 0.05$ vs. Testigo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.1.2. EFECTOS DE LA LESIÓN UNI O BILATERAL DEL NSQ

En la **figura 9** se presentan los cambios resultantes de la lesión uni o bilateral del NSQ, realizadas a las 11:00 o 17:00 h, sobre las concentraciones de progesterona en animales sacrificados 1 o 24 horas después de la cirugía.

Una hora después de la lesión unilateral del NSQ realizada a las 11:00 h, la concentración de progesterona fue mayor que en las ratas con operación simulada, lo que no ocurrió en los animales con lesión bilateral del NSQ.

En los animales con lesión del NSQ izquierdo realizada las 11:00 h, sacrificados 24 horas después, la concentración de progesterona fue menor que los animales con operación simulada. Tales diferencias no fueron observadas en las ratas con lesión del NSQ derecho o bilateral.

Una hora después de la lesión del NSQ derecho realizada a las 17:00 h, la concentración de progesterona fue mayor a la de los animales con operación simulada.

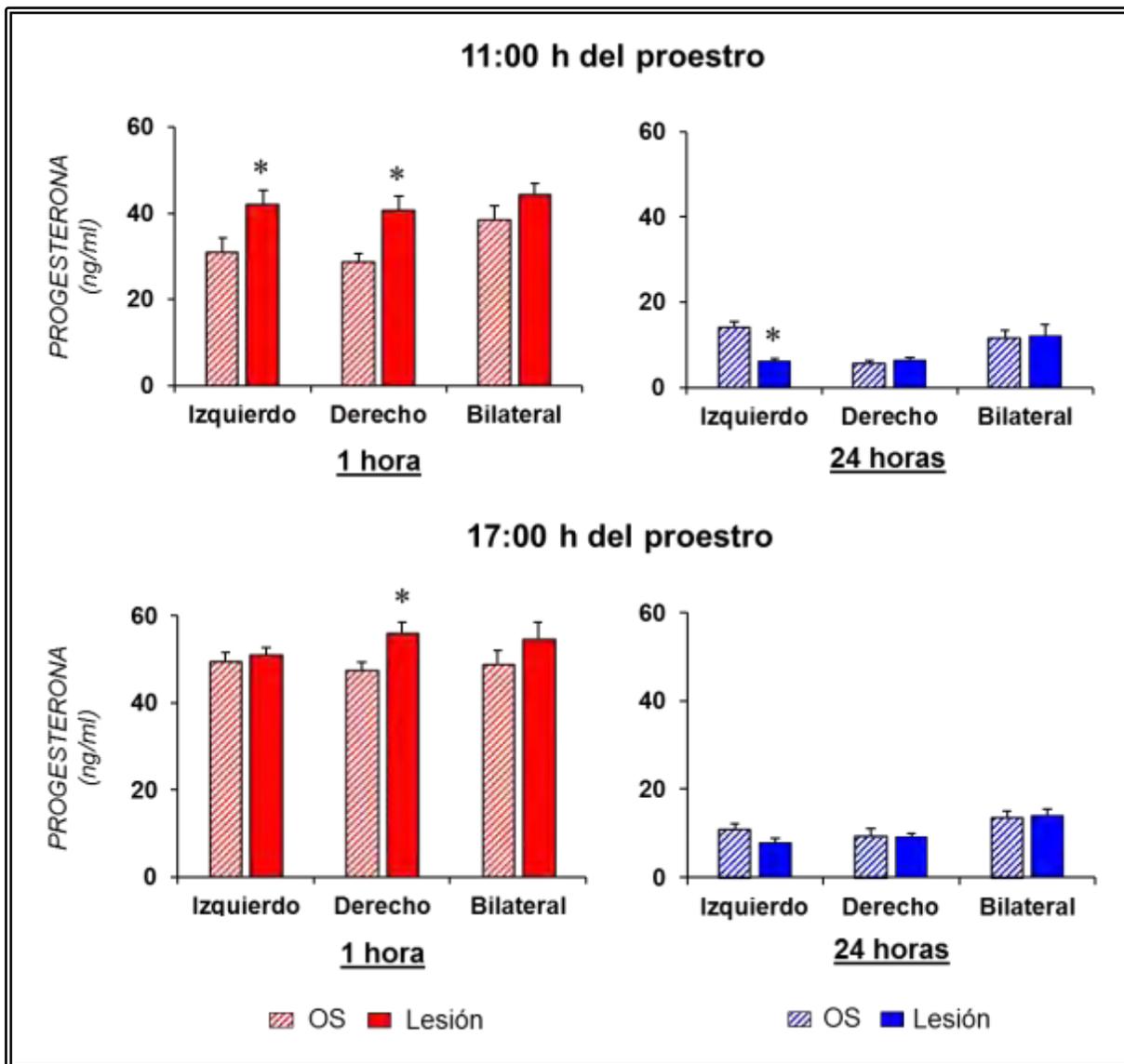


Figura 9. Media \pm e.e.m de la concentración de progesterona en suero de ratas con operación simulada (OS) o lesión izquierda, derecha o bilateral del núcleo supraquiasmático, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento. * $p < 0.05$ vs. OS (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.1.3. EFECTOS DE LA SECCIÓN UNI O BILATERAL DEL NOS

La concentración de progesterona, 1 hora después de la sección bilateral del NOS realizada a las 11:00 h, fue menor que en los animales con laparotomía. En los animales con sección uni o bilateral del NOS realizadas a las 17:00 h, la concentración de progesterona fue similar al de los animales con laparotomía (Figura 10).

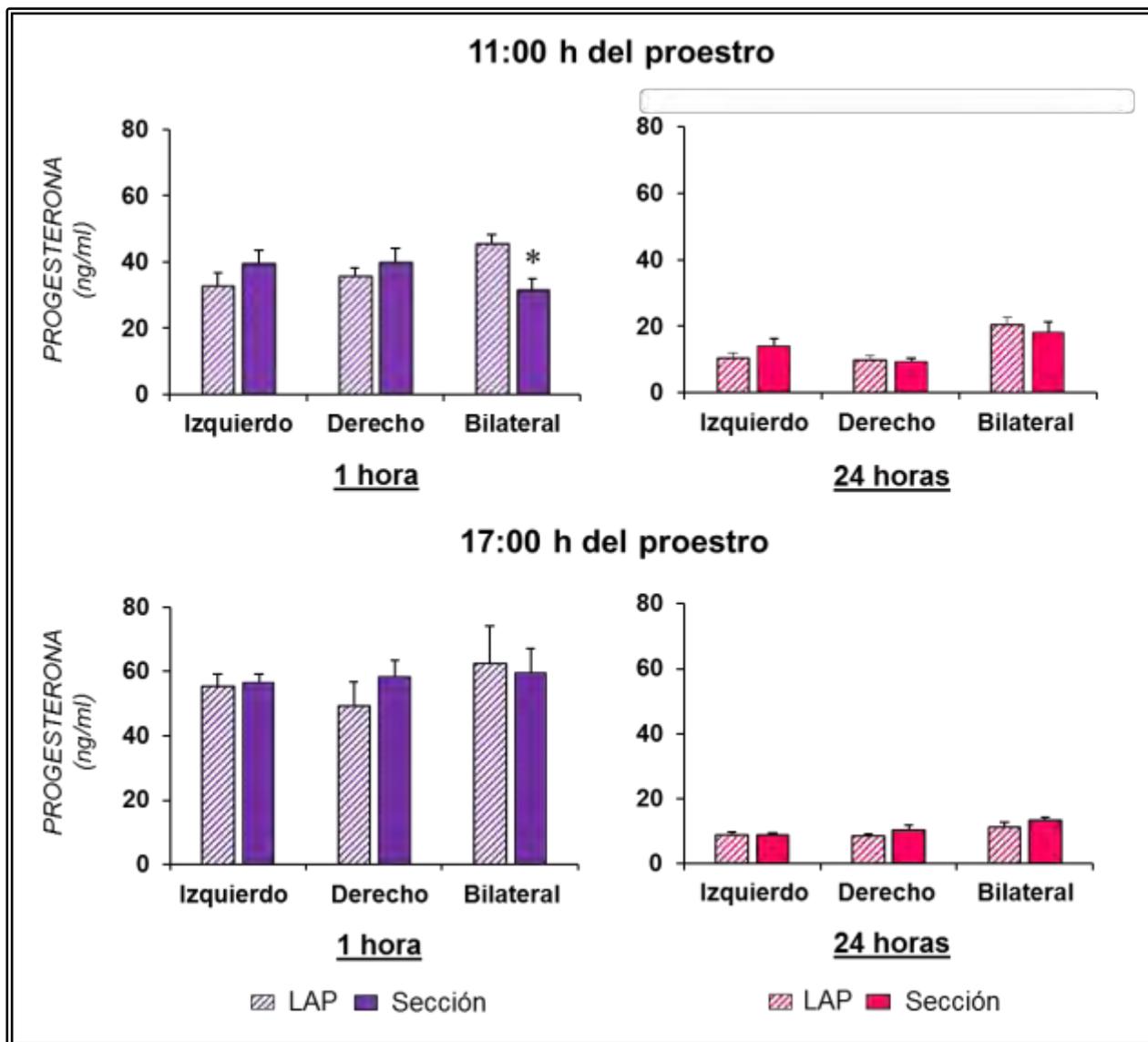


Figura 10. Media \pm e.e.m de la concentración de progesterona en suero de ratas con laparotomía (LAP) o sección izquierda, derecha o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento. *p<0.05 vs. OS (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.1.4. EFECTOS DE LA SECCIÓN DEL NOS EN ANIMALES CON LESIÓN UNILATERAL DEL NSQ

En los animales con lesión del NSQ izquierdo y sección del NOS izquierdo realizada a las 11:00 h, sacrificados 24 horas después, la concentración de progesterona fue mayor que en el grupo con lesión del NSQ izquierdo. En aquellos con lesión del NSQ derecho y sección del NOS derecho, la concentración de progesterona fue menor que en los animales tratados del lado izquierdo (**Figura 11**).

La concentración de progesterona fue mayor en los animales con lesión del NSQ izquierdo y sección del NOS izquierdo realizadas a las 17:00 h, sacrificados 1 hora post-cirugía, que aquellos con lesión del NSQ izquierdo (**Figura 11**).

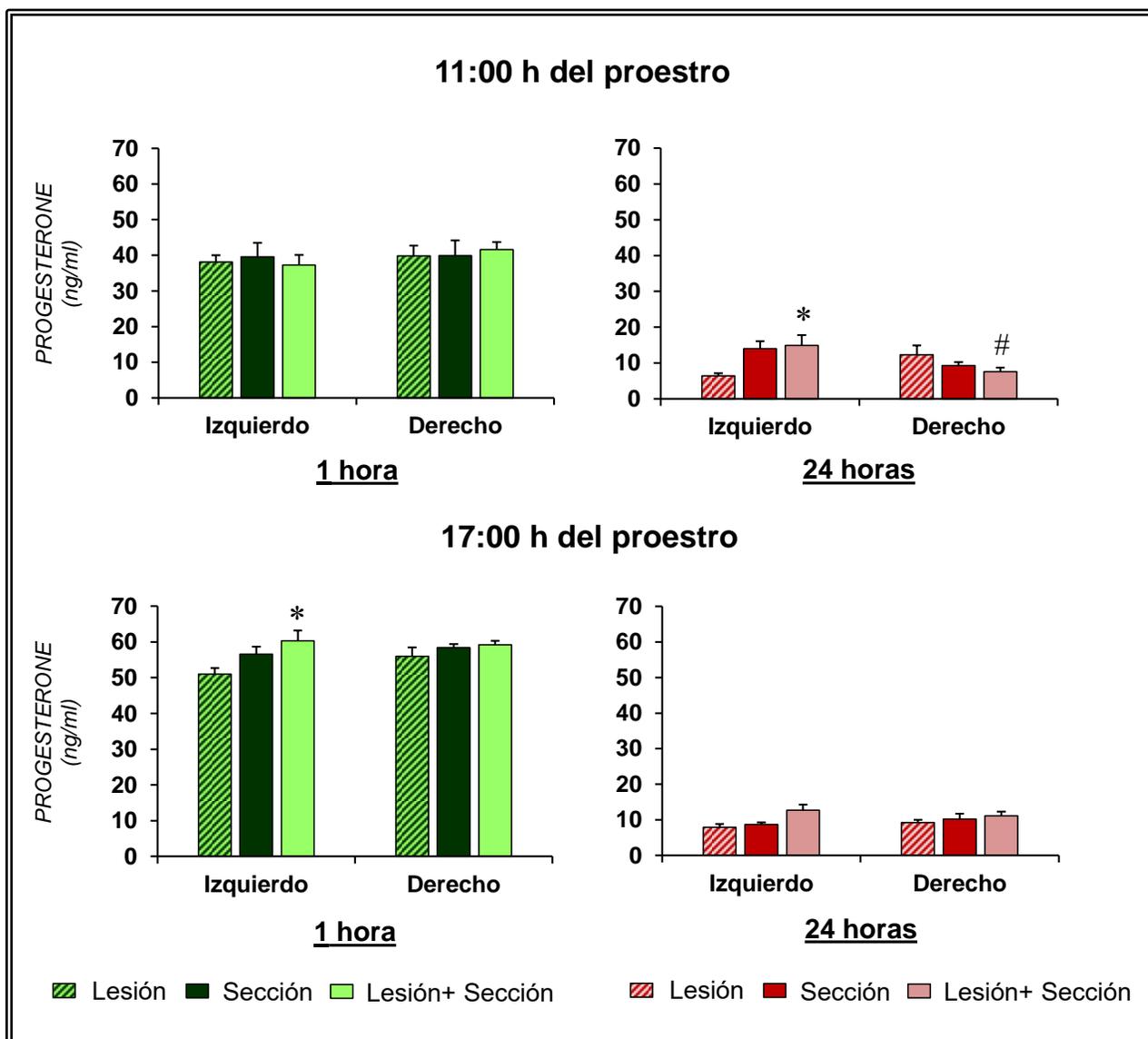


Figura 11. Media \pm e.e.m de la concentración de progesterona en suero de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho, o con lesión del núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho seguida o no de la sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después de la cirugía. * $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con lesión, # $p < 0.05$ vs. Lesión+Sección izquierda (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

3.2. TESTOSTERONA

3.2.1. EFECTOS DE LA OPERACIÓN SIMULADA DEL NSQ Y LAPAROTOMÍA ABDOMINAL

La concentración de testosterona fue mayor en los animales con operación simulada unilateral o con laparotomía uni o bilateral realizadas a las 11:00 h, sacrificados 1 hora después de la cirugía, que en los animales testigo. 24 horas después de la operación simulada bilateral o con laparotomía uni o bilateral a las 11:00 h, la concentración de testosterona fue menor que en el grupo testigo (**Figura 12**).

Una hora después de realizada la operación simulada bilateral a las 11:00 h, la concentración de testosterona fue menor que en los animales con operación simulada derecha (184 ± 11.8 vs. 410 ± 38.8 pg/ml, $p < 0.05$, prueba "t" de Student). Mientras que, la concentración de testosterona en los animales con operación simulada derecha fue mayor que en el grupo con operación simulada izquierda (410 ± 38.8 vs. 237 ± 13.7 pg/ml, $p < 0.05$, prueba "t" de Student).

En los animales con operación simulada bilateral realizada a las 11:00 h, sacrificados a las 24 horas post-cirugía, la concentración de testosterona fue menor que en los animales con operación simulada izquierda o derecha (5.0 ± 0.9 vs. OS-I: 145 ± 25.5 ; OS-D: 167 ± 15.4 pg/ml, $p < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

La concentración de testosterona fue menor en los grupos con operación simulada o laparotomía uni o bilateral realizadas a las 17:00 h, evaluada 1 o 24 horas post-cirugía que la del grupo testigo (**Figura 12**).

Una hora después de la operación simulada derecha o bilateral realizada a las 17:00 h, la concentración de testosterona fue menor que los animales con operación simulada izquierda (OS-D: 34.4 ± 4.7 ; OS-B: 21.0 ± 3.1 vs. OS-I: 102 ± 10.5 pg/ml, $p < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

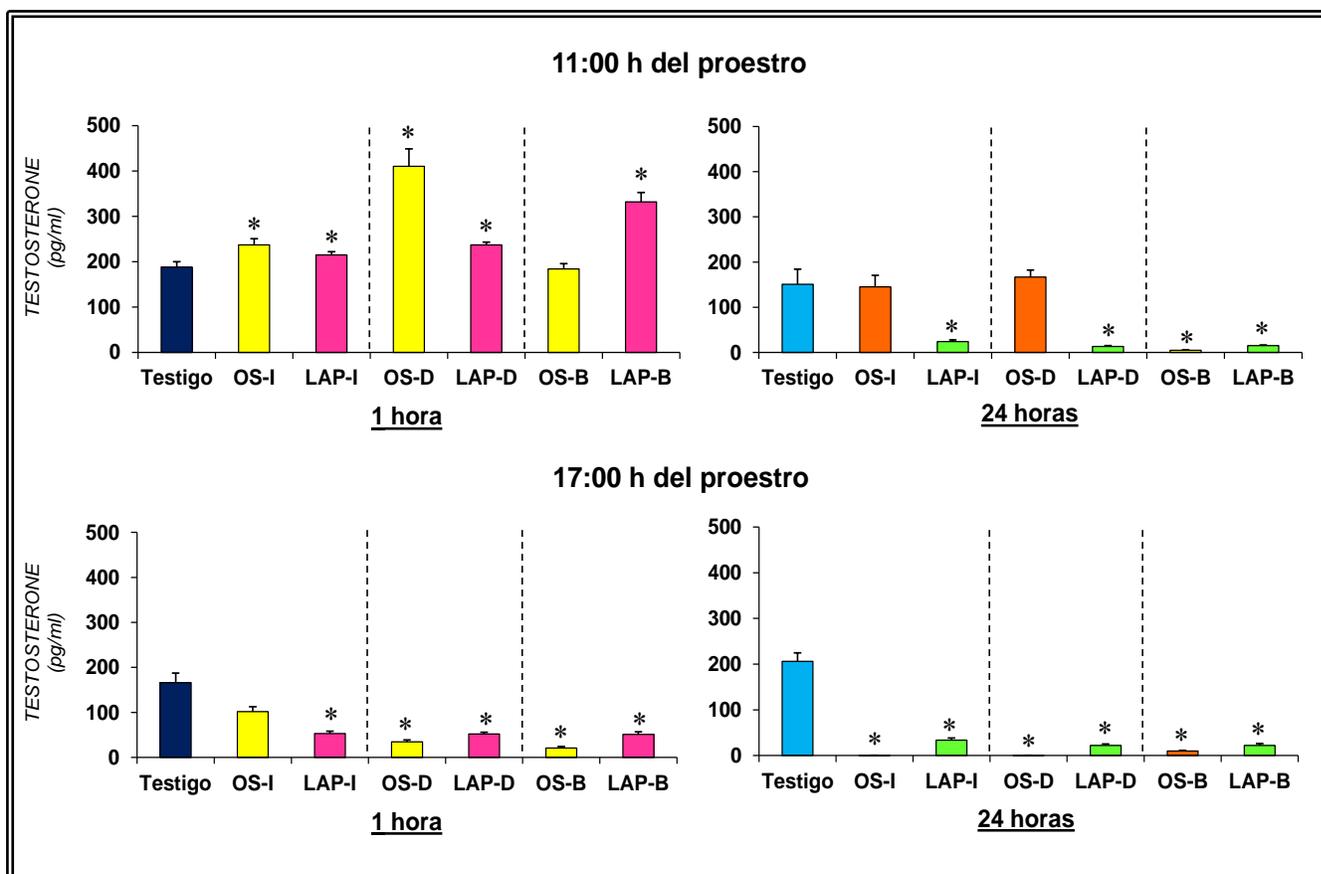


Figura 12. Media \pm e.e.m de la concentración de testosterona en suero de ratas testigo o con operación simulada en el núcleo supraquiasmático izquierdo (OS-I), derecho (OS-D) o bilateral (OS-B), o con laparotomía abdominal izquierda (LAP-I), derecha (LAP-D) o bilateral (LAP-B) realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento. * $p < 0.05$ vs. Testigo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.2.2. EFECTOS DE LA LESIÓN UNI O BILATERAL DEL NSQ

En las ratas con lesión del NSQ derecho realizada a las 11:00 h, sacrificadas 1 hora después, la concentración de testosterona fue menor que en el grupo con operación simulada, lo que no ocurrió en los animales con lesión izquierda o bilateral del NSQ (Figura 13).

Una hora después de la lesión bilateral del NSQ realizada a las 11:00 h, la concentración de testosterona fue menor que la de los grupos con lesión unilateral (139 ± 13.8 vs. Lesión izquierda: 244 ± 21.8 ; Lesión derecha: 251 ± 18.1 pg/ml, $p < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

24 horas después de la lesión del NSQ derecho realizada a las 11:00, la concentración de testosterona fue menor que en las ratas con operación simulada, mientras que la concentración de la hormona fue mayor en los animales con lesión bilateral del NSQ (**Figura 13**).

La concentración de testosterona fue menor en las ratas con lesión del NSQ izquierdo realizada a las 17:00 h, evaluada 1 hora después, que en los animales con operación simulada y fue mayor en aquellas con lesión bilateral del NSQ (**Figura 13**).

La lesión bilateral del NSQ realizada a las 17:00 h, evaluada 1 hora después, resultó en mayor concentración de testosterona que las lesiones unilaterales (138 ± 22.6 vs. Lesión izquierda: 22.1 ± 5.5 ; Lesión derecha: 49.4 ± 14.4 pg/ml, $p < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

La concentración de testosterona fue mayor en los animales con lesión del NSQ izquierdo o bilateral realizada a las 17:00 h, evaluada 24 horas después, que aquellos con operación simulada (**Figura 13**).

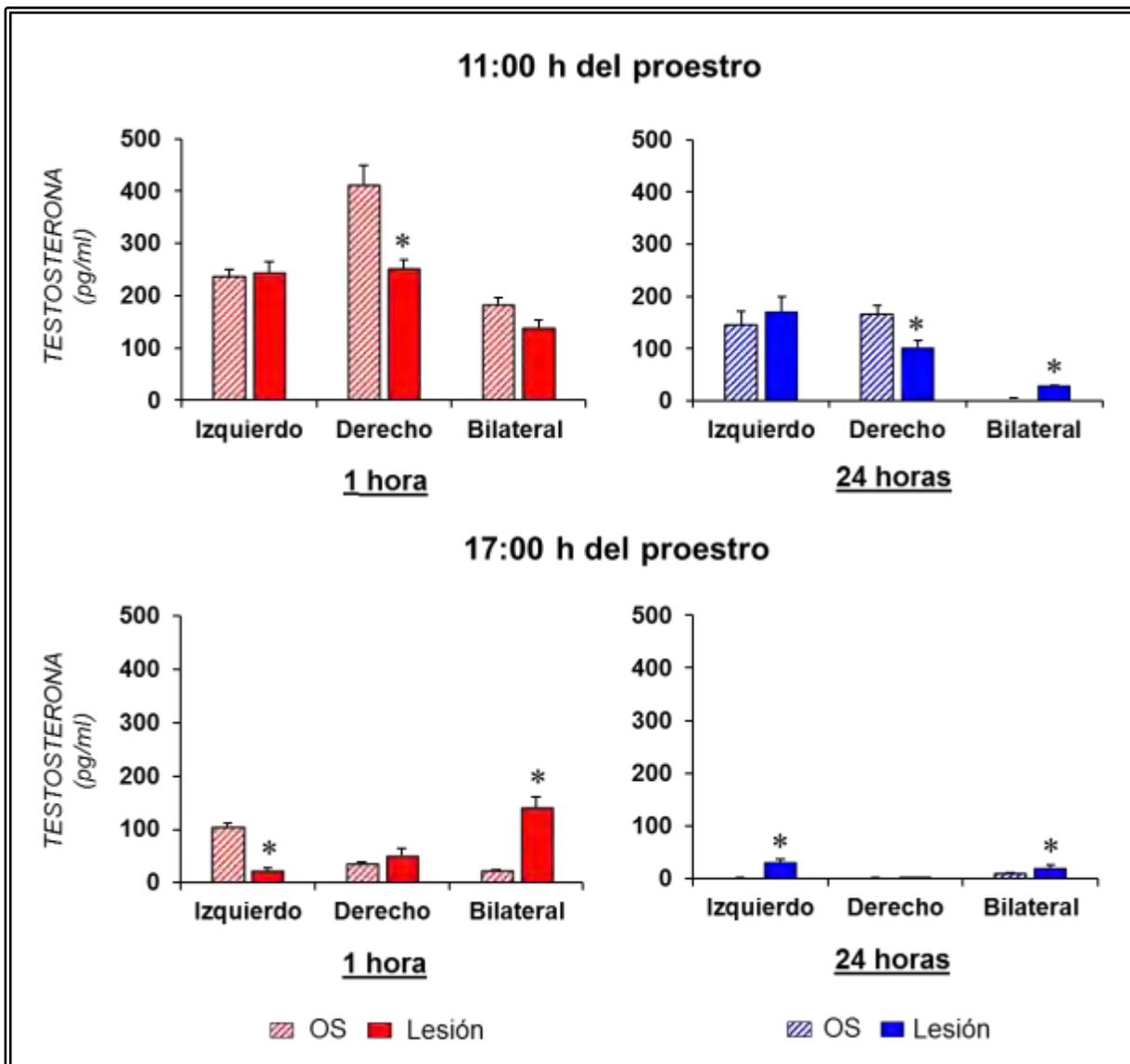


Figura 13. Media \pm e.e.m de la concentración de testosterona en suero de ratas con operación simulada (OS) o lesión izquierda, derecha o bilateral del núcleo supraquiasmático, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento. * $p < 0.05$ vs. OS (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.2.3. EFECTOS DE LA SECCIÓN UNI O BILATERAL DEL NOS

La concentración de testosterona fue menor en los animales con sección bilateral del NOS realizada a las 11:00 h, sacrificados 1 hora post-cirugía, que en aquellos con laparotomía (**Figura 14**).

24 horas después de la sección bilateral del NOS realizada a las 17:00 h, la concentración de testosterona fue mayor que en el grupo con laparotomía (**Figura 14**).

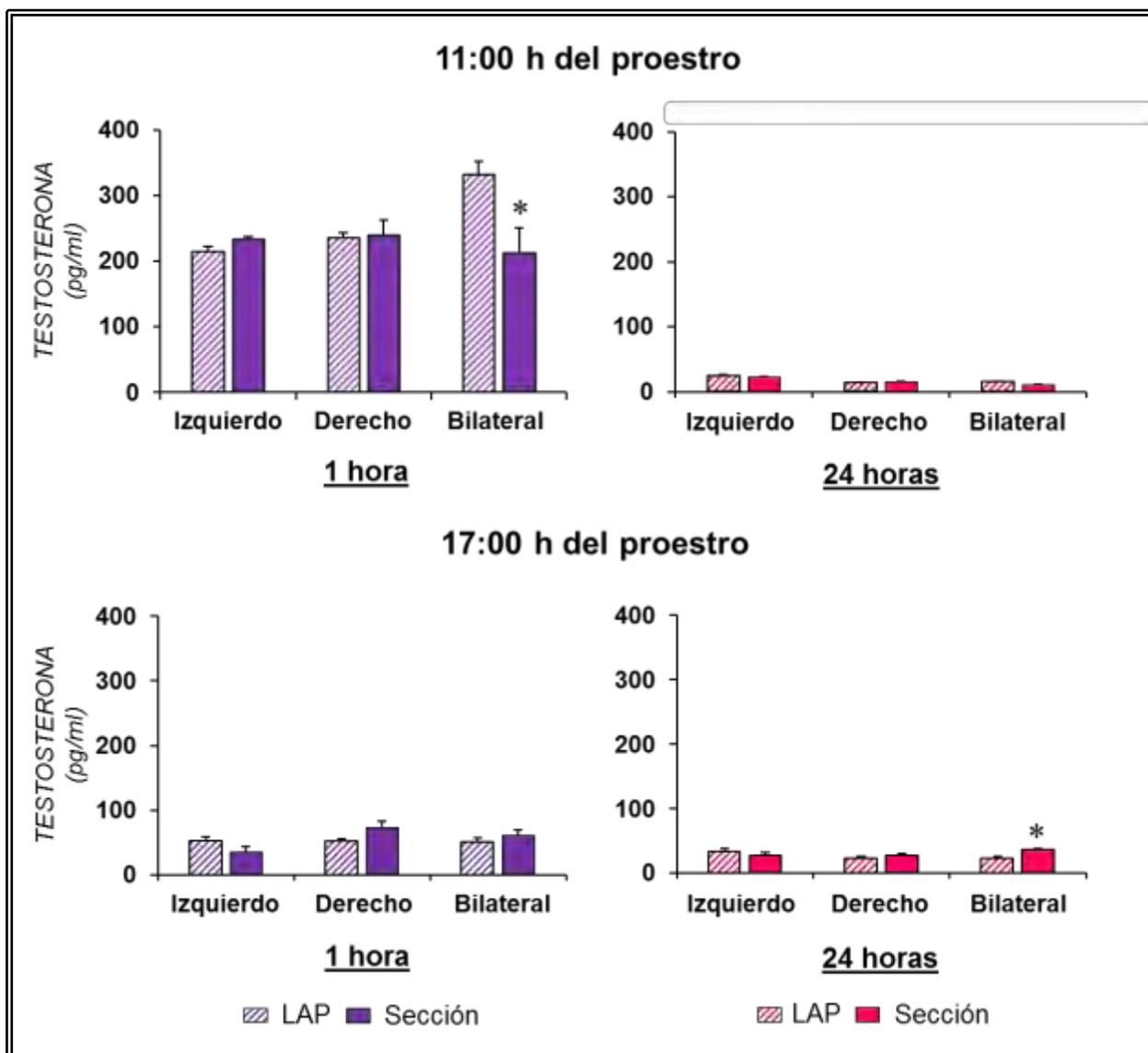


Figura 14. Media \pm e.e.m de la concentración de testosterona en suero de ratas con laparotomía (LAP) o sección izquierda, derecha o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento. * $p < 0.05$ vs. OS (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.2.4. EFECTOS DE LA SECCIÓN DEL NOS EN ANIMALES CON LESIÓN UNILATERAL DEL NSQ

La concentración de testosterona fue mayor en los animales con lesión del NSQ derecho y sección del NOS derecho, sacrificados 1 hora post-cirugía que los animales operados en el lado izquierdo (**Figura 15**).

24 horas después de la lesión unilateral del NSQ y sección unilateral del NOS realizada a las 11:00 h, la concentración de testosterona fue menor que en los grupos con lesión unilateral del NSQ o con sección unilateral del NOS (**Figura 15**).

En los animales con lesión del NSQ derecho y sección del NOS derecho realizada a las 17:00 h, sacrificados 1 hora después, la concentración de testosterona fue mayor que en los animales con lesión del NSQ derecho o con aquellos sometidos a la sección del NOS derecho, o bien, a la lesión+sección izquierda (**Figura 15**).

24 horas después de la lesión del NSQ izquierdo y sección del NOS izquierdo realizadas a las 17:00 h, la concentración de testosterona fue menor que en los animales sometidos sólo a la lesión del NSQ izquierdo o a la sección del NOS izquierdo. Una respuesta similar fue observada en los animales con lesión del NSQ derecho y sección del NOS derecho (**Figura 15**).

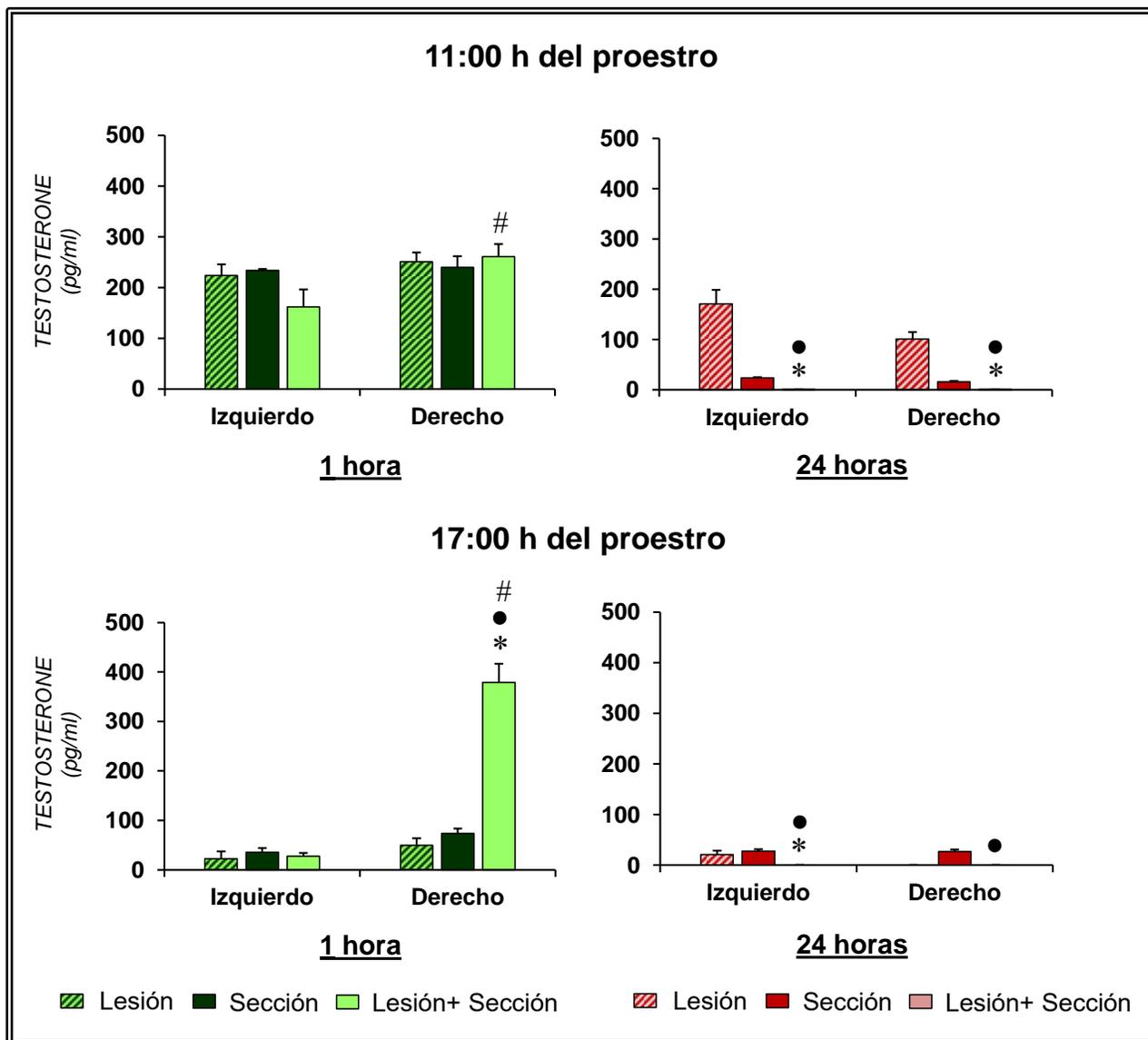


Figura 15. Media \pm e.e.m de la concentración de testosterona en suero de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho o con lesión del núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho seguida o no de la sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho, realizadas a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después de la cirugía. * $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con lesión, • $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con sección, # $p < 0.05$ vs. Lesión+Sección izquierda (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

3.3. ESTRADIOL

3.3.1. EFECTOS DE LA OPERACIÓN SIMULADA DEL NSQ Y LAPAROTOMÍA ABDOMINAL

La concentración de estradiol fue mayor en los animales con operación simulada o laparotomía uni o bilateral realizadas a las 11:00 h, sacrificados 1 hora después, que los animales testigo. Mientras que 24 horas después de la cirugía la concentración de estradiol fue menor (**Figura 16**).

En las ratas con operación simulada derecha o bilateral realizadas a las 11:00 h, sacrificadas 24 horas post-cirugía, la concentración de estradiol fue menor que la del grupo con operación simulada izquierda (OS-D: 57.6 ± 4.5 ; OS-B: 46.8 ± 4.8 vs. OS-I: 85.7 ± 6.1 pg/ml, $p < 0.05$, ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

La concentración de estradiol fue menor en los animales con operación simulada derecha o bilateral, o con laparotomía unilateral realizadas a las 17:00 h, sacrificados 1 hora después de la cirugía, que en los animales testigo (**Figura 16**).

En los animales con operación simulada o laparotomía izquierda realizada a las 17:00 h, sacrificados 24 horas después, la concentración de estradiol fue mayor que en las ratas testigo. Mientras que, en los animales con las misma cirugía del lado derecho, la concentración de la hormona fue menor que en las ratas testigo (**Figura 16**).

En comparación con el grupo testigo o con la operación simulada izquierda, la concentración de estradiol fue menor en el grupo con operación simulada derecha realizada a las 17:00 h, evaluada 24 horas después.

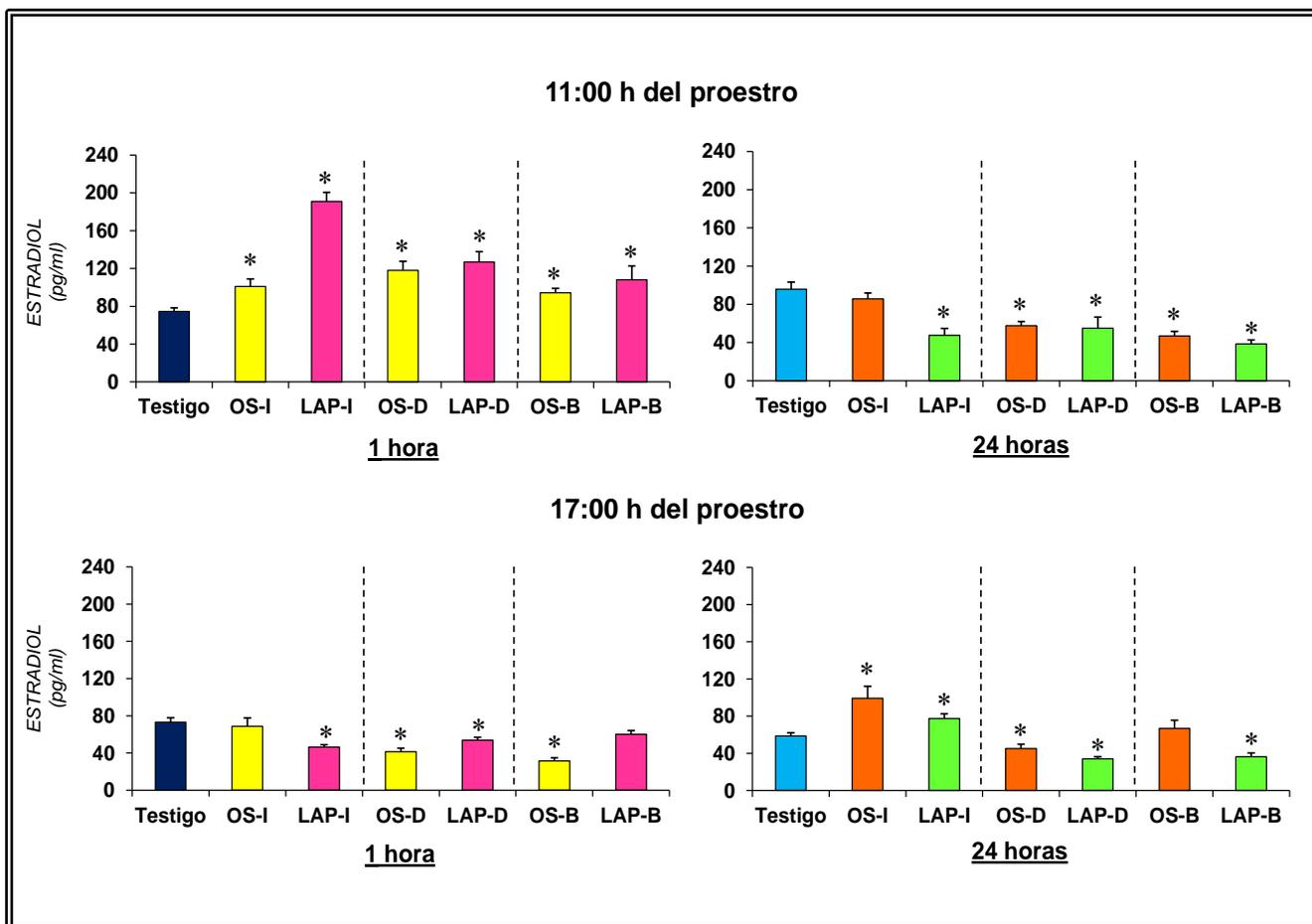


Figura 16. Media \pm e.e.m de la concentración de estradiol en suero de ratas testigo o con operación simulada izquierda (OS-I), derecha (OS-D) o bilateral (OS-B) del núcleo supraquiasmático, o con laparotomía abdominal izquierda (LAP-I), derecha (LAP-D) o bilateral (LAP-B) realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento. * $p < 0.05$ vs. Testigo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.3.2. EFECTOS DE LA LESIÓN UNI O BILATERAL DEL NSQ

24 horas después de realizada la lesión bilateral del NSQ a las 11:00 h, la concentración de estradiol fue mayor que en el grupo con operación simulada (Figura 17).

Una hora después de la lesión del NSQ derecho o bilateral realizada a la 17:00 h, la concentración de estradiol fue mayor que en los animales con operación simulada (**Figura 17**).

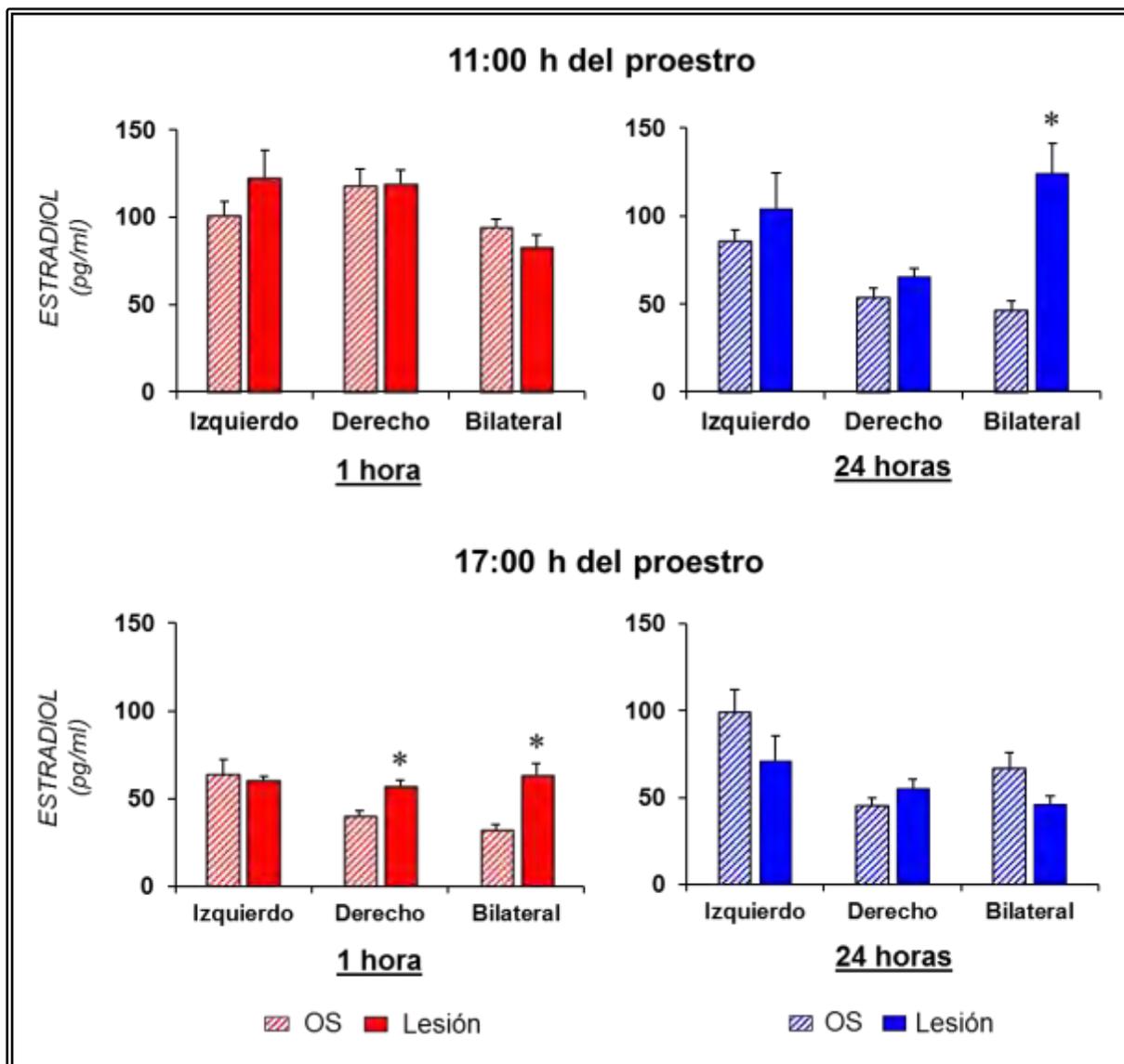


Figura 17. Media \pm e.e.m de la concentración de estradiol en suero de ratas con operación simulada (OS) o lesión izquierda, derecha o bilateral del núcleo supraquiasmático, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento. *p<0.05 vs. OS (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.3.3. EFECTOS DE LA SECCIÓN UNI O BILATERAL DEL NOS

La concentración de estradiol fue mayor en las ratas con sección del NOS derecho a las 11:00 h, evaluada 1 hora post-cirugía, que en los animales con laparotomía. Mientras que la misma cirugía evaluada 24 horas después resultó en menor concentración de estradiol que los animales con laparotomía (**Figura 18**).

24 horas después de la sección del NOS izquierdo realizada a las 17:00 h, la concentración de estradiol fue menor que en los animales con laparotomía, mientras que la sección bilateral del NOS la aumentó (**Figura 18**).

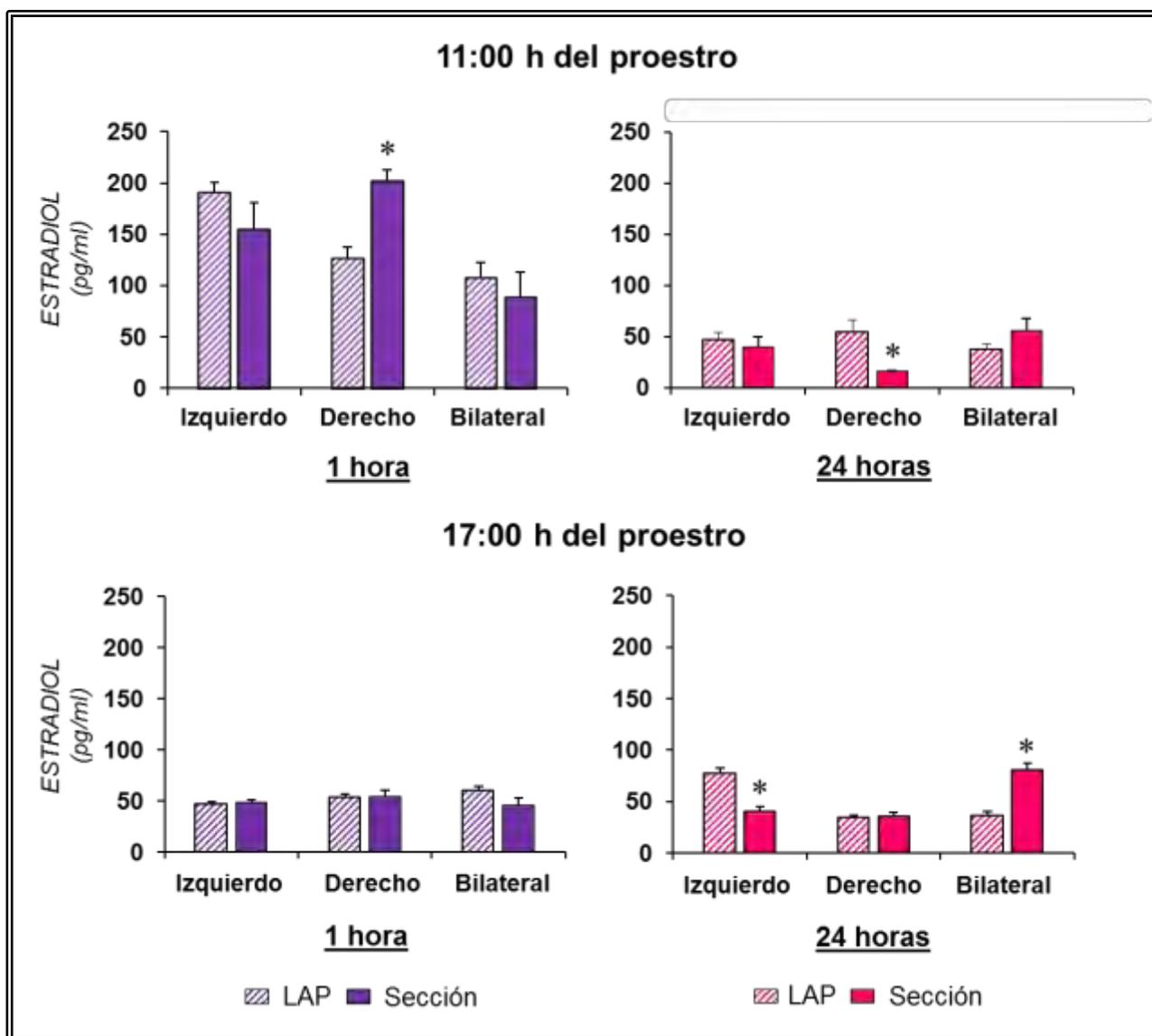


Figura 18. Media \pm e.e.m de la concentración de estradiol en suero de ratas con laparotomía (LAP) o sección izquierda, derecha o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento. * $p < 0.05$ vs. OS (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.3.4. EFECTOS DE LA SECCIÓN DEL NOS EN ANIMALES CON LESIÓN UNILATERAL DEL NSQ

En los animales con lesión unilateral del NSQ y sección unilateral del NOS realizadas a las 11:00 h, sacrificados 24 horas post-cirugía, la concentración de estradiol fue menor que en los grupos sometidos sólo a la lesión del NSQ o a la sección del NOS (**Figura 19**).

24 horas después de la lesión del NSQ izquierdo y sección del NOS izquierdo realizada a las 17:00 h, la concentración de estradiol fue menor que en los animales con lesión del NSQ izquierdo. Mientras que la lesión del NSQ derecho seguido por la sección del NOS derecho resultó en mayor concentración de estradiol que en los grupos con lesión del NSQ derecho, con sección del NOS derecho o con lesión+sección del lado izquierdo (**Figura 19**).

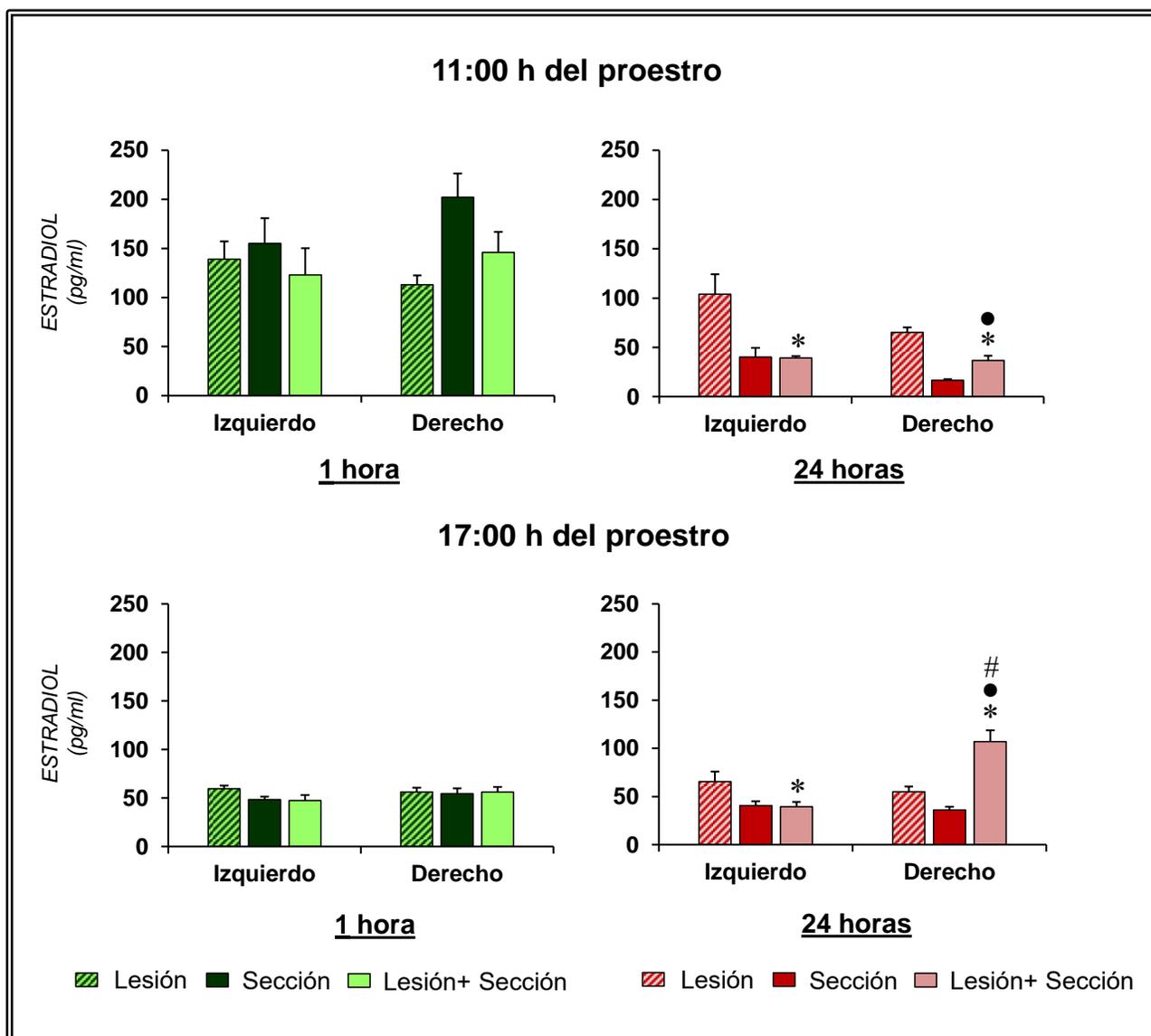


Figura 19. Media \pm e.e.m de la concentración de estradiol en suero de ratas con sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho, o con lesión del núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho seguida o no de la sección del nervio ovárico superior izquierdo o derecho, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después de la cirugía. * $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con lesión, • $p < 0.05$ vs. su respectivo grupo con sección, # $p < 0.05$ vs. Lesión+Sección izquierda (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

3.4. LH

3.4.1. EFECTOS DE LA OPERACIÓN SIMULADA DEL NSQ Y LAPAROTOMÍA ABDOMINAL

En comparación con el grupo testigo, la operación simulada derecha o izquierda realizada a las 11:00 o 17:00 h, evaluada 24 o 1 horas después de la cirugía resultó en menor concentración de LH (**Cuadro 5**).

La laparotomía izquierda realizada a las 11:00 h, evaluada 24 horas post-cirugía, resultó en menor concentración de LH que en los animales testigo (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Media \pm e.e.m de la concentración de LH (ng/ml) de ratas testigo o con operación simulada derecha (OS-D) o izquierda (OS-I) del núcleo supraquiasmático, o con laparotomía abdominal derecha (LAP-D) o izquierda (LAP-I), realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento.

Hora de la cirugía	11:00 h	17:00 h
Autopsia	24 horas	1 hora
GRUPO	LH	
Testigo	0.57 \pm 0.07	26.7 \pm 7.7
OS-D	0.26 \pm 0.03*	12.8 \pm 2.0*
LAP-D	0.51 \pm 0.04	23.5 \pm 3.2
OS-I	0.34 \pm 0.05*	9.4 \pm 0.6*
LAP-I	0.36 \pm 0.04*	17.6 \pm 1.2

*p<0.05 vs. Testigo (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.4.2. EFECTOS DE LA LESIÓN UNILATERAL DEL NSQ

24 horas después de la lesión del NSQ derecho realizada a las 11:00 h, la concentración de LH fue menor que en los animales con operación simulada o con lesión del NSQ izquierdo (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Media \pm e.e.m de la concentración de LH (ng/ml) de ratas con operación simulada (OS) o lesión derecha (D) o izquierda (I) del núcleo supraquiasmático, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento.

Hora de la cirugía	11:00 h	17:00 h
Autopsia	24 horas	1 hora
GRUPO	LH	
OS-D	0.26 \pm 0.03	12.8 \pm 2.0
Lesión-D	0.16 \pm 0.04* \blacklozenge	10.3 \pm 0.8
OS-I	0.34 \pm 0.05	9.4 \pm 0.6
Lesión-I	0.30 \pm 0.02	10.3 \pm 1.0

*p<0.05 vs. OS-D; \blacklozenge p<0.05 vs. Lesión-I (ANDEVA seguida por la prueba de Tukey).

3.4.3. EFECTOS DE LA SECCIÓN UNILATERAL DEL NOS

Una hora después de la sección del NOS derecho realizada a las 17:00 h, la concentración de LH fue menor que en los animales con laparotomía (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Media \pm e.e.m de la concentración de LH (ng/ml) de ratas con laparotomía (LAP) o sección derecha (D) o izquierda (I) del nervio ovárico superior, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento.

Hora de la cirugía	11:00 h	17:00 h
Autopsia	24 horas	1 hora
GRUPO	LH	
LAP-D	0.51 \pm 0.04	23.5 \pm 3.2
Sección-D	0.41 \pm 0.04	12.5 \pm 1.9*
LAP-I	0.36 \pm 0.04	17.6 \pm 1.2
Sección-I	0.32 \pm 0.03	13.7 \pm 1.0

*p<0.05 vs. LAP-D (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

3.4.4. EFECTOS DE LA SECCIÓN DEL NOS EN ANIMALES CON LESIÓN UNILATERAL DEL NSQ

24 h después de realizada la lesión del NSQ derecho y sección del NOS derecho realizadas a las 11:00 h, la concentración de LH fue menor que en los animales con sólo sección del NOS derecho. La concentración de LH en los animales con lesión del NSQ derecho y sección del NOS derecho realizada a las 17:00 h, sacrificados 1 hora post-cirugías, fue menor que la de los animales con sección del NOS derecho (**Cuadro 8**).

En los animales con lesión del NSQ izquierdo y sección del NOS izquierdo realizadas a las 11:00 h, sacrificados 24 horas después de la cirugía, la concentración de LH fue menor que en los animales con sólo lesión del NSQ izquierdo o con sección del NOS izquierdo. En los animales con lesión del NSQ izquierdo y sección del NOS izquierdo realizada a las 17:00 h, sacrificados 1 hora después, la concentración de LH fue mayor que la de los animales con sección del NOS izquierdo o con lesión+sección del lado derecho (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Media \pm e.e.m de la concentración de LH (ng/ml) de ratas con sección del nervio ovárico superior derecho (Sección-D) o izquierdo (Sección-I), o lesión del núcleo supraquiasmático derecho (Lesión-D) o izquierdo (Lesión-I) seguida o no de la sección del nervio ovárico superior derecho o izquierdo, realizada a las 11:00 o 17:00 horas del proestro. Los animales fueron sacrificados 1 o 24 horas después del tratamiento.

Hora de la cirugía	11:00 h	17:00 h
Autopsia	24 horas	1 hora
GRUPO	LH	
Lesión-D	0.16 \pm 0.04	10.3 \pm 0.8
Sección-D	0.41 \pm 0.04	12.5 \pm 1.9
Lesión-D+Sección-D	0.15 \pm 0.02●	6.8 \pm 0.9●
Lesión-I	0.30 \pm 0.02	10.3 \pm 1.0
Sección-I	0.32 \pm 0.03	13.7 \pm 1.0
Lesión-I+Sección-I	0.14 \pm 0.03*●	20.5 \pm 1.9*●#

*p<0.05 vs. Lesión, ●p<0.05 vs. Sección, #p<0.05 vs. Lesión-I+Sección-I (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que en el día del proestro la ovulación y la secreción de hormonas esteroides son reguladas por diferentes señales neuroendocrinas provenientes de cada NSQ, que depende de la hormona estudiada, la hora del día y del tiempo transcurrido entre la cirugía y la obtención de la muestra. Los resultados también nos sugieren que parte de la información nerviosa que se origina en el NSQ derecho llega a los ovarios por medio del NOS y modula de manera estimulante la reactividad del folículo ovárico necesaria para la ovulación.

Greig y Weisz (1973) mostraron que en la tarde del proestro se requiere una cantidad de LH equivalente al 14% de la concentración plasmática de la hormona en ese día y a esa hora, para inducir la ovulación. En nuestro estudio la sección uni o bilateral de vías nerviosas dorsales al NSQ (operación simulada) a las 11:00 o 17:00 h no modificó la tasa de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados, lo que nos sugiere que esa información nerviosa no participa en la regulación de la ovulación a pesar de la menor concentración de LH en los animales sacrificados a las 18:00 h.

En el clásico estudio de Everett y Sawyer (1950) los autores propusieron la existencia de una señal nerviosa que se activa entre las 14:00 y 16:00 h del día del proestro para estimular el sistema liberador de LH indispensable para la ovulación. Domínguez y Smith (1974) mostraron que en los días del diestro-1 y diestro-2 también se requiere de una señal nerviosa similar a la propuesta por Everett y Sawyer para que se produzca la ovulación.

La lesión bilateral del NSQ en la mañana del proestro (9:00-10:00 h) no afecta la ovulación al siguiente día (estro) (Terasawa y col., 1980), pero la misma lesión realizada entre las 12:00 y las 14:00 h bloquea la ovulación (Kimura y Kawakami, 1978). Tomados en conjunto, los resultados de Terasawa y col. (1980), Kimura y Kawakami (1978) y los del presente estudio, nos sugieren que a partir de las 11:00 h del proestro es necesaria la presencia de ambos NSQ para que se produzca la secreción adecuada de GnRH y la ovulación, ya que la lesión bilateral del NSQ bloqueó la ovulación y el remplazo con GnRH la restaura.

En el presente estudio la lesión del NSQ derecho no afectó la tasa de animales ovulantes, pero el número de ovocitos liberados fue menor, contrario a lo observado por Silva y col. (2012) quienes mostraron que la lesión unilateral del NSQ en ratas en proestro a las 9:00 h, bloqueó la ovulación. Estos resultados nos sugieren que la señal nerviosa originada en el NSQ derecho a las 9:00 h del proestro es necesaria para estimular la secreción de LH y la ovulación. Sin embargo, a las 11:00 h se observó que la falta de dicha señal, aunque reduce la secreción de LH en un 72%, también modularía la sensibilidad de los folículos ováricos a las gonadotropinas, lo que se vio reflejado en el menor número de ovocitos liberados. Dado que la lesión del NSQ izquierdo a las 11:00 h del proestro no modificó la ovulación y la bloqueó cuando la lesión se realizó a las 09:00 h (Silva y col., 2012), sugerimos que la información que se origina en el NSQ izquierdo es necesaria antes de las 11:00 h del proestro, mientras que la del NSQ derecho se requiere más allá de esta hora.

Chávez y col. (1991) mostraron que en ratas adultas, la sección bilateral o unilateral del NOS resulta en un menor número de animales ovulantes y de ovocitos liberados, y que la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) no restablece la ovulación en el ovario denervado. Los autores sugieren que la información nerviosa que transcurre por el NOS modula de manera estimulante la reactividad del folículo ovárico a las gonadotropinas. Morán y col. (2000) mostraron que en ratas infantiles la sección bilateral o derecha del NOS resultó en un crecimiento folicular menor y un aumento en el número de folículos atrésicos.

Según Espey (1980) la LH induce hiperemia ovárica, vasodilatación, edema e incluso extravasación de los vasos en los folículos que van a ovular. Según Zackrisson y col. (2000) en la rata una reducción aguda del flujo sanguíneo durante el proceso ovulatorio reduce la tasa ovulatoria. La electro-acupuntura a nivel de los segmentos (T9-T10 y L3-L5), de los cuales se originan los nervios simpáticos que llegan al ovario, incrementa la concentración de NPY en el fluido folicular (Stener-Victorin y col., 2003). De acuerdo a Yao y col. (1996) el VIP induce una relajación de los vasos pre-contraídos con NA, mientras que el NPY invierte notablemente la relajación inducida por el VIP, lo que sugiere que una disminución en el suministro de sangre al ovario puede estar relacionado con aumentos en NA y NPY (Markiewicz y col., 2003). Además se ha mostrado que la estimulación eléctrica del NOS decrece el flujo sanguíneo del ovario (Kagitani y col., 2008). A partir de estas evidencias proponemos que la información nerviosa aportada por el NOS a los ovarios (Dissen y Ojeda, 1999), participa en la regulación de la etapa final del proceso ovulatorio.

En el presente estudio, observamos que la participación del NOS en el día del proestro en la regulación de la ovulación es asimétrica y varía en intensidad con la hora del día, ya que la información que transcurre por el NOS izquierdo no parece ser crucial en los procesos que conllevan a la ovulación. El bajo número de ovocitos liberados en ratas con sección bilateral o derecha del NOS a las 11:00 o 17:00 h sugiere que la respuesta normal del folículo preovulatorio a la LH requiere algún tipo de información nerviosa que llega por medio del NOS. Dado que la tasa de animales ovulantes no fue modificada por la sección del NOS realizada a las 11:00 h, pero fue baja en aquellos tratados a las 17:00 h, proponemos que el reducido crecimiento folicular y la falta de nuevos cuerpos lúteos es el resultado de la disminución en la sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas y no a una falta en la secreción de las mismas. La menor sensibilidad de los folículos se explicaría por la falta de una señal nerviosa y el reordenamiento de factores neuroendocrinos que modulan la sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas. El hecho de que el número de ovocitos liberados por el ovario derecho de los animales con lesión del NSQ y sección del NOS derecho, fue menor que en los animales con lesión o sección derecha, apoya nuestra interpretación.

La sección del NOS izquierdo en los animales con lesión del NSQ izquierdo no modificó la respuesta ovulatoria, por lo que sugerimos que la información nerviosa que se origina en el NSQ-NOS del lado derecho está más comprometida con la regulación de la ovulación y que las señales nerviosas provenientes del NSQ regulan los cambios neuroendocrinos del ovario necesarios para la ovulación, por medio de la información nerviosa aportada por el NOS.

En el presente estudio, los efectos que resultan de la lesión uni o bilateral del NSQ en la ovulación no son paralelos a los cambios observados en las concentraciones de hormonas esteroides. Esto sugiere que aunque las señales endocrinas que regulan la ovulación y la secreción de hormonas esteroides son los mismos, los mecanismos neuroendocrinos que las modulan son diferentes.

El NSQ envía y recibe señales nerviosas desde el área preóptica medial y el núcleo paraventricular del hipotálamo (Watts y col. 1987), regiones que participan en la regulación de la secreción de LH (Herbison, 2006; Dobson y col., 2003). En la rata la principal fuente de progesterona en el día del proestro son las glándulas adrenales (Flores y col., 2005). Buijs y col. (1999) y Sage y col. (2002) mostraron que la sensibilidad de la corteza adrenal a la hormona adrenocorticotrópica y por tanto su función secretora, es modulada por el NSQ.

En este estudio observamos que la concentración sérica de progesterona fue mayor en los animales con operación simulada realizada a las 11:00 o 17:00 h, sacrificados 1 hora después, que en los testigos, lo que nos sugiere que la información nerviosa que transcurre por las vías dorsales al NSQ regula de manera inhibitoria la secreción de progesterona por las adrenales. En cambio, 24 horas después de la operación simulada realizada a las 11:00 h la información que transcurre por esas vías regularía de manera estimulante la secreción de progesterona.

En un estudio *in vitro*, Zhang y Aguilar-Roblero (1995) mostraron que el NSQ derecho presentaba un patrón bimodal de actividad eléctrica, mientras que el NSQ izquierdo presentaba un patrón unimodal, lo que sugirió un patrón de actividad

asimétrica entre los NSQs que podría reflejar una organización funcional lateralizada. En el presente estudio, la mayor concentración de progesterona en los animales con lesión del NSQ izquierdo realizada a las 11:00 h, sacrificados 1 hora después, sugiere que la información nerviosa que se origina en el núcleo izquierdo regula de manera inhibitoria la secreción de la hormona. Mientras que la información nerviosa generada en el NSQ derecho la regula de manera inhibitoria tanto a las 11:00 como a las 17:00 h. Estos resultados podrían ser el reflejo de una función alternada de los NSQs que regula la secreción de progesterona.

En la rata adulta, la sección bilateral del NOS realizada a las 11:00 o 16:00 h del proestro, disminuye la concentración de progesterona a partir de los 4 minutos y se mantiene hasta los 24 minutos (Aguado y Ojeda, 1984). En el presente estudio la sección bilateral realizada a las 11:00 h del proestro resultó en una menor concentración de la hormona a la hora después de la cirugía, la cual se recupera 24 horas más tarde, en tanto que la sección unilateral no la modifica en ninguno de los dos tiempos evaluados.

A partir de estos resultados sugerimos que en el día del proestro existen otras vías nerviosas que regulan la secreción de progesterona ovárica a la falta de la información simpática, mientras que en los animales con sección unilateral, basta la integridad de uno de los nervios para regular la secreción de la hormona. Forneris y Aguado (2002) mostraron que la sección bilateral del NOS en la rata neonata no modifica la actividad de la 3β -HSD (enzima implicada en la síntesis de progesterona) en el cuerpo lúteo ni la concentración sérica de progesterona, 56 días después de la denervación, resultados que apoyan nuestra interpretación. Al parecer la actividad de

la enzima limitante en la síntesis de la hormona depende más de la información parasimpática aportada por el nervio vago, ya que en la rata preñada la sección bilateral de éste nervio resulta en un decremento de la actividad en la $\Delta 5-3\beta$ -HSD en glándula intersticial y cuerpo lúteo (Burden y Lawrence, 1977).

En el presente estudio, la sección derecha del NOS en animales con lesión derecha del NSQ realizada a las 11:00 o 17:00 h, sacrificados a 1 hora post-cirugía, resultó en similar concentración de progesterona que los animales con sólo lesión del NSQ. Este resultado nos sugiere que la señal nerviosa que proviene del NSQ, que regula la secreción de progesterona, no llegaría a los ovarios vía el NOS o que específicamente en estas horas no es necesaria la información nerviosa aportada por el NOS derecho. En cambio, cuando la lesión y denervación se produjeron en el lado izquierdo la concentración de progesterona fue mayor, lo que nos sugiere que la información que llega al ovario por el NOS izquierdo regula de manera inhibitoria la secreción de la hormona.

La mayor concentración de testosterona en los animales con operación simulada uni o bilateral del NSQ a las 11:00 h, nos sugiere que existe información nerviosa que transcurre por las vías dorsales al NSQ y regula de manera inhibitoria la secreción de testosterona, mientras que a las 17:00 h la regulación sería estimulante. Sin embargo, no podemos descartar que la disminución en la concentración de LH observada una hora después de la sección unilateral de las vías dorsales a las 17:00 h sea la causa de la disminución en la concentración de testosterona.

La menor concentración de testosterona en los animales con lesión del NSQ derecho a las 11:00 h, nos sugiere que el NSQ derecho modula de manera estimulante la secreción de testosterona, mientras que a las 17.00 h es el NSQ izquierdo quien modula la secreción de la hormona, lo que apoya la idea de dos osciladores independientes propuesto por Zhang y Aguilar-Roblero (1995).

Morales-Ledesma y col. (2012) mostraron que 1 hora después de la sección bilateral del NOS en la rata prepúber, la concentración de testosterona es mayor que en los animales con laparotomía y que estos cambios no siempre se correlacionan con cambios en la concentración de LH. En el presente estudio, la concentración de testosterona disminuye o aumenta en función de la hora del día en que se realiza la sección bilateral del NOS, lo que apoya la idea de Flores y col. (2011) de que las modificaciones en las concentraciones de testosterona que resultan de la denervación son el reflejo de los cambios en la sensibilidad del ovario a la LH.

La sección unilateral del NOS realizada a las 11:00 o 17:00 h no modificó la concentración de testosterona, lo que nos sugiere que en estas horas la presencia de la señal nerviosa de uno de los nervios ováricos es suficiente para mantener la secreción de la hormona.

Según Gerendai y col. (2009), Domínguez y Cruz-Morales (2011) y Cruz y col. (2014), el NOS y el nervio vago son vías nerviosas que conectan al sistema nervioso central con los ovarios. En el presente estudio exploramos si el NSQ utiliza al NOS como parte de una vía nerviosa que regula la secreción de hormonas esteroides. Los resultados obtenidos sugieren que el NOS es una de las posibles vías nerviosas de

comunicación entre el NSQ y los ovarios y su funcionamiento varía durante el día. En los animales con lesión unilateral del NSQ y sección del NOS ipsilateral realizada a las 11:00 h, evaluada 1 hora post-cirugías, no modificó la concentración de testosterona en relación con lo observado en los animales con lesión del NSQ, lo que nos sugiere que la señal nerviosa que proviene del NSQ no llega al ovario vía el NOS. En cambio, cuando la lesión y la denervación se realizan del lado derecho a las 17:00 h, la concentración de testosterona fue mayor que en los animales sólo con lesión del NSQ, lo que nos sugiere que las vías de comunicación entre los NSQs y los ovarios por intermedio de los NOS varía según las horas del día.

Dado que 24 horas después de realizar la lesión unilateral del NSQ y la sección unilateral del NOS, la concentración de testosterona es menor que en los estudios agudos (1 hora), proponemos que estos cambios reflejan el re-acomodo de factores nerviosos que regulan la esteroidogénesis ovárica, como ha sido propuesto por Morán y col. (2000).

El hecho que a las 11:00 h la lesión unilateral del NSQ no modificó la secreción de estradiol, nos sugiere que la información nerviosa que proviene de cada núcleo es suficiente para mantener la secreción normal de estradiol. Sin embargo, a las 17:00 h, es la información nerviosa originada en el NSQ derecho quien regula de manera inhibitoria la secreción de dicha hormona.

Existen evidencias de que los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de hormonas esteroides ováricas varían dependiendo de la hormona estudiada. En un sistema *ex vivo* (usando el modelo de ganglio celiaco-NOS-ovario

izquierdo) en el día del proestro, el agregar NA o acetilcolina al compartimento ganglionar, induce liberación de androstenediona y estradiol mientras que inhibe la de progesterona (Delgado y col., 2010).

De acuerdo a Uchida y Kagitani (2014) y Kagitani y col. (2008) la estimulación eléctrica del NOS derecho afecta diferentes mecanismos neuroendocrinos que inhiben la secreción ovárica de testosterona y estradiol, a través de la activación de adrenoreceptores alfa 1 o alfa 2, respectivamente, lo que indica que la reducción en la secreción de estradiol por la estimulación del NOS es independiente de la reducción de la secreción de testosterona (Uchida y Kagitani, 2014).

Los cambios en las concentraciones de hormonas en los animales con lesión unilateral del NSQ y sección unilateral del NOS, sugieren que los cambios en los mecanismos neuroendocrinos dependen de señales adrenérgicas que regulan la secreción de cada hormona.

Los resultados del presente estudio sugieren que la información nerviosa aportada por el NOS derecho en la mañana del proestro está más comprometida con la regulación de la secreción de estradiol, mientras que por la tarde parece ser indispensable la información nerviosa aportada por el NOS izquierdo o por ambos nervios.

Garraza y col. (2004) mostraron que la secreción de progesterona *in vitro* por los ovarios provenientes de animales en diestro-1 o diestro-2 sobre-estimulados con NA, NPY o VIP depende del neurotransmisor utilizado y del día del ciclo en que se realiza el tratamiento. Rosas y col. (2014) mostraron que la estimulación VIPérgica

de los ovarios modifica la secreción de hormonas esteroides lo que depende del tiempo de estimulación y del día del ciclo estral estudiado. Dado que el NOS proporciona a los ovarios información nerviosa utilizando a la NA, VIP y NPY, los efectos de seccionar el NOS representaría la falta de dichos neurotransmisores que modulan la esteroidogénesis.

Los resultados del presente estudio sugieren que el NOS es parte de la vía de comunicación con el NSQ que modula la secreción de estradiol, que varía en función de las horas del día, respuesta que puede ser el resultado de cambios en la sensibilidad de los ovarios a la LH, en la actividad aromatasas o en ambos, como han sugerido Flores y col. (2011).

Tomados en conjunto, los resultados del presente estudio nos sugieren que en el día del proestro el NSQ regula la secreción de hormonas esteroides y la ovulación por diferentes mecanismos neuroendocrinos, que varían en función de la hora del día. La regulación de la secreción hormonal es estimulante o inhibitoria dependiendo de la hormona estudiada. La participación del NSQ derecho en la regulación de la ovulación es estimulante y lateralizada, quizás utilizando como vía final al NOS derecho. La información nerviosa del NSQ izquierdo no parece ser esencial en dicho proceso.

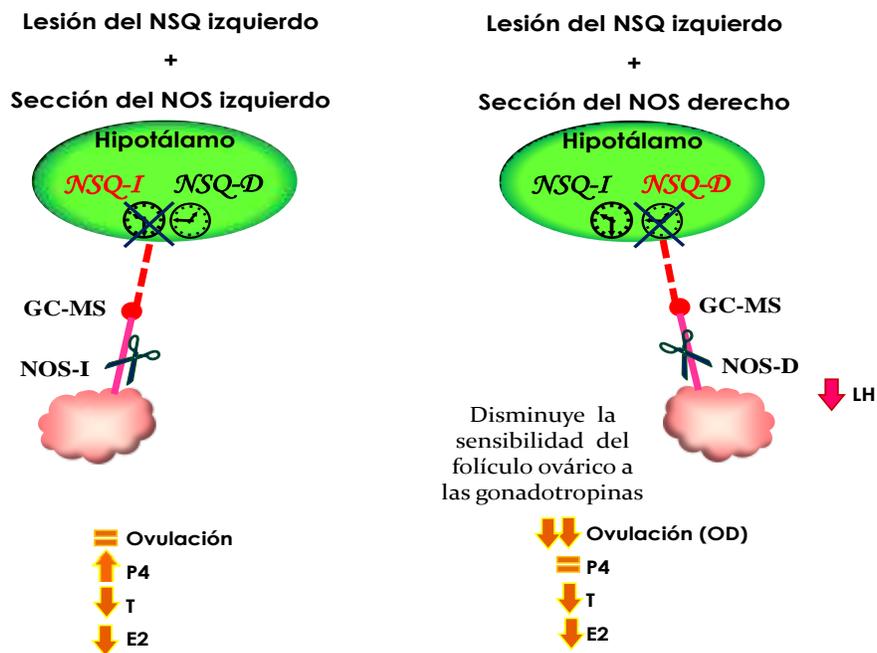
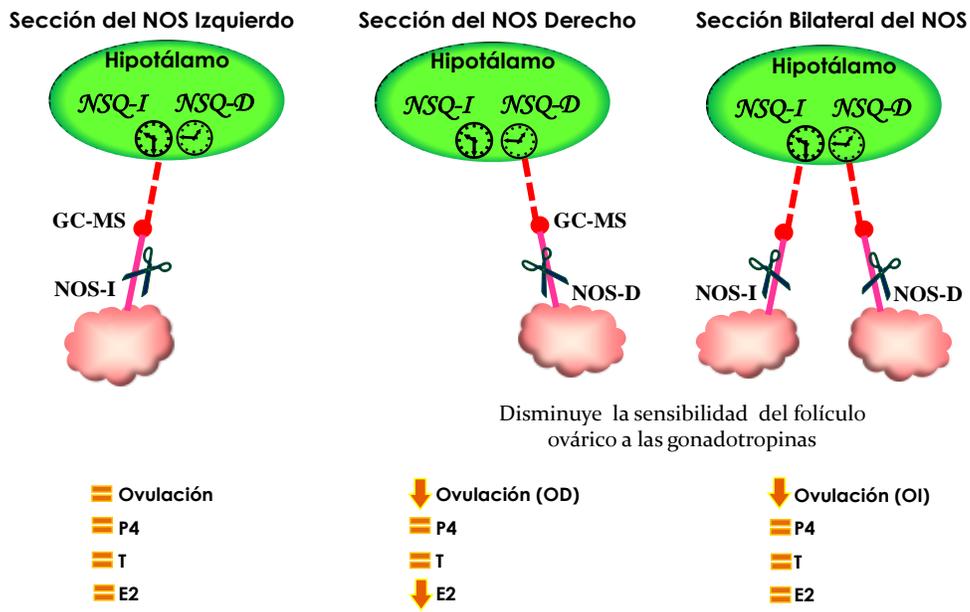
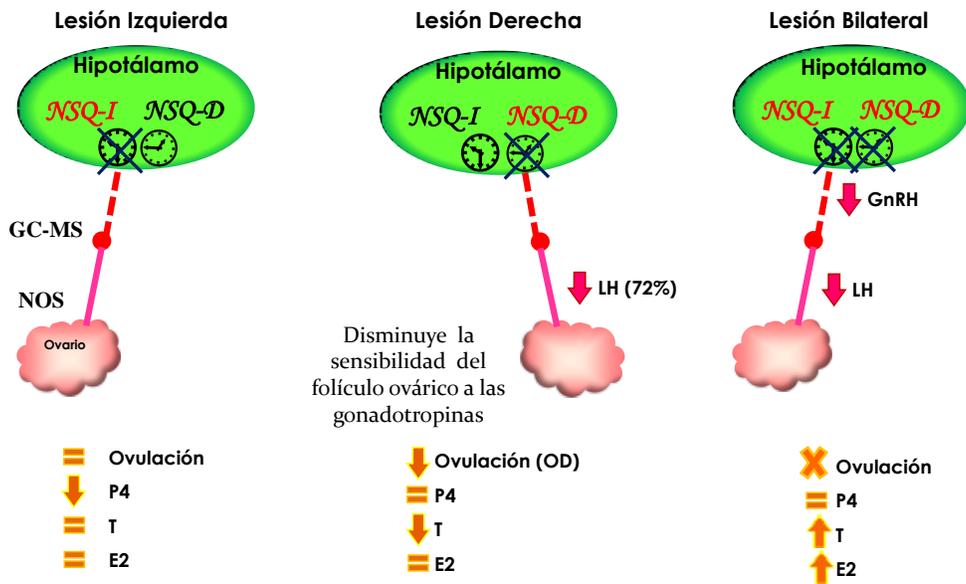


Figura 20. En este modelo se resumen los efectos de la sección izquierda, derecha o bilateral del nervio ovárico superior (NOS), o de la lesión izquierda, derecha o bilateral del núcleo supraquiasmático (NSQ) seguida o no de la sección ipsilateral del NOS. Realizadas a las 11:00 horas del proestro y evaluados 24 horas después de la cirugía, sobre la ovulación y la concentración de progesterona (P4), testosterona (T) y estradiol (E2).. Las flechas indican disminuciones o aumentos en los parámetros evaluados, los signos de igual indican que no se presentaron cambios significativos y el tache indica bloqueo. Como observamos en el modelo, las diferencias en la respuesta ovulatoria dependen del NSQ lesionado y la participación de cada núcleo en la regulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). La participación del NOS sobre las funciones de los ovarios dependen del nervio seccionado y de la hormona estudiada Dado que el NOS proporciona a los ovarios información nerviosa utilizando a la noradrenalina, al péptido intestinal vasoactivo y al neuropéptido Y, los efectos de seccionar el NOS representaría la falta de dichos neurotransmisores que modulan la esteroidogénesis.

También nos sugiere que parte de la información nerviosa que se origina en el NSQ derecho llega a los ovarios por medio del NOS derecho y modula de manera estimulante la reactividad del folículo ovárico a las gonadotropinas necesaria para producir la ovulación. La información nerviosa del NSQ izquierdo no parece ser esencial en dicho proceso. La regulación en la secreción hormonal es estimulante o inhibitoria dependiendo de la hormona estudiada. GC-MS: Ganglio celiaco-mesentérico superior.

CONCLUSIONES

- Algunas señales provenientes de vías nerviosas dorsales al NSQ participan en la regulación de la secreción de hormonas esteroides, efectos que varían con la hora del proestro.
- A partir de las 11:00 h del proestro, la información nerviosa proveniente de ambos NSQs es esencial para la secreción preovulatoria de GnRH y la ovulación.
- En el día del proestro, cada NSQ modula de manera alternada la secreción de hormonas esteroides, lo que depende de la hora del día.
- En el día del proestro la ovulación y la secreción de hormonas esteroides son reguladas por diferentes señales neuroendocrinas provenientes de cada NSQ, que depende de la hormona estudiada y la hora del día.
- En el día del proestro, la información nerviosa que se origina en el NSQ derecho y llega a los ovarios por medio del NOS derecho, modula de manera estimulante la reactividad del folículo ovárico necesaria para la ovulación, mientras que la información nerviosa que proviene del NSQ izquierdo no parece ser esencial en este proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamson EE y Moore RY (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: Retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916:172-191.
- Aguado LI (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Res Tech.* 59:462-473.
- Aguado LI y Ojeda SR (1984). Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology.* 114 (5):1944-1946.
- Aguilar-Roblero R, Mercado C, Guadarrama P y Chávez JL (2004). Fisiología celular y molecular. Principios y conceptos. Hernández ME y Ortega A (Eds.). Universidad Veracruzana. 181-192.
- Albrecht U, Sun ZS, Eichele G y Lee CC (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell.* 91:1055-64.
- Antunes-Rodrigues J y McCann SM (1967). Effects of suprachiasmatic lesions on the regulation of luteinizing hormone secretion in the female rat. *Endocrinology.* 81:666-670.
- Arteaga-López PR, Domínguez R, Cerbón MA, Mendoza CA y Cruz ME (2003). Differential mRNA expression of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. *Endocrine.* 21:251-260.
- Aschoff JA (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold. Spring Harb Symp Quant Biol.* 25:11-28.
- Ayala ME, Rosas P y Domínguez R (1994). Different effects of unilateral and bilateral lesion of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation. *Brain Research Bull.* 1(34):27-30.
- Barbacka-Surowiak G, Surowiak J y Stoklosowa S (2003). The involvement of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. *Reproductive Biology.* 3(2):99-129.
- Balsalobre A (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 309: 193-199.
- Banczerowski P, Csaba Zs, Csernus V y Gerendai I (2003). Lesion of the amygdala on the right and left side suppresses testosterone secretion but only left-sided intervention decreases serum luteinizing hormone level. *J Endocrinol Invest.* 26: 429-434.

- Bartness TJ, Song CK y Demas GE (2001). SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms*. 16:196-204.
- Boden MJ y Kennaway DJ (2006). Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction*. 132(3):379- 92.
- Bons N, Combes A y Szafarczyk A (1983) Efferences dextrahypothalamiques de noyau suprachiasmatic chez le rat. *C R Acad Sci*. 297:347-350.
- Brown-Grant K y Raisman G (1977). Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc R Soc Lond*. 198: 279-296.
- Burden HW (1972). Ultrastructural observations on ovarian perifollicular smooth muscle in the cat, guinea pig and rabbit. *Amer J Anat*. 133:125-142.
- Burden HW (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: Catecholamines as hormone regulators. Ben-Jonathan N, Bahr JM y Weiner RI (Eds.). Raven Press. New York. 261-278.
- Burden HW y Lawrence IE (1977). The effects of denervation on the localization of Δ^5 -3 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rat ovary during pregnancy. *Acta Anat*. 97:286-290.
- Buijs RM, Kalsbeek A, van der Woude TP, Van Heerikhuize JJ y Shinn S (1993). Suprachiasmatic nucleus lesion increases corticosterone secretion. *Am J Physiol*. 264:R1186-R1192.
- Buijs RM, La Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L, Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K y Nijima A (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol*. 464:36-48.
- Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ y Kalsbeek A (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*. 11:1535-1544.
- Card JP, Fitzpatrick-McElligott S, Gozes I y Baldino F Jr (1988). Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res*. 252(2):307-315.
- Clarkson J y Herbison AE (2006) Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neuron in relation to puberty. *Moll Cell Endocrinol*. 25: 32-38.

- Crosio C, Cermakian N, Allis CD y Sassone-Corsi P (2000). Light induce chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nat Neurosci.* 3:1241-47.
- Cruz ME, Castro J y Domínguez R (1992). A comparative analysis of the neuroendocrine mechanisms regulating ovulation, affected by an implant of atropine in the preoptic-anterior hypothalamic area, in intact and hemiovariectomized adult rats. *J Endocrinol.* 133:205-210.
- Cruz ME, Sánchez MA y Domínguez R (2001). Asimetrías funcionales del sistema reproductor. En: *Biología de la Reproducción II*. Velázquez Moctezuma J. (Ed.). UAM-PUIS. 75-91.
- Cruz ME, JaramilloLP y Domínguez R (1989). Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J Encocrinol.* 24:739-742.
- Cruz ME, Olvera E, Pérez MJ, Min EI, Flores A, Cárdenas M, Chavira R y Domínguez R (2014). Effects of unilaterally microinjecting ethanol in the preoptic-anterior hypothalamic areas of rats on ovulation. *Alcohol Clin Exp Res.* DOI: 10.1111/acer.12399.
- Chávez R, Carrizosa L y Dominguez R (1991). Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Med Sci Res.* 19:41-42.
- Christian CA y Moenter SM (2010). The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocr Rev.* 31(4):544-77.
- de la Iglesia HO, Meyer J y Schwartz WJ (2003). Lateralization of circadian pacemaker output: Activation of left-and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. *J Neurosci.* 23(19):7412-7414.
- de la Iglesia HO y Schwartz WJ (2006). Minireview: timely ovulation: Circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology.* 147:1148-1153.
- Delgado SM, Escudero CG, Casais M, Gordillo M, Anzulovich AC, Sosa Z y Rastrilla AM (2010). Ovaric physiology in the first oestral cycle: Influence of noradrenergic and cholinergic neural stimuli from coeliac ganglion. *Steroids.* 75:6585-694.
- Dibner C, Schibler U y Albrecht U (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol.* 72:517-49.
- Dissen GA y Ojeda SR (1999). Ovarian innervation. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil E y Neill JD (Eds.). Academic Press. USA. 3:583-589.

- Domínguez R y Cruz-Morales SE (2011). The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinol Metabol Syndrome*. S4:001. DOI: 10.4172/2161-1017.S4-00.
- Domínguez R y Smith ER (1974). Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology*. 14(3):212-23.
- Espey L (1980). Ovulation as an inflammatory reaction-a hypothesis. *Biol Reprod*. 22:73-106.
- Everett JW y Sawyer CH (1950). A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*. 47(3):198-218.
- Dobson H, Ghuman S, Prabhakar S y Smith R (2003). A conceptual model of the influence of stress on female reproduction. *Reproduction*. 125:151-163.
- Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Barco AI, Chavira R, Domínguez R y Cruz ME (2005). The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine*. 28(2):141-151.
- Flores A, Velasco J, Gallegos AI, Mendoza FD, Everardo PM y Cruz ME (2011). 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. *Reprod Biol Endocrinol*. 9:34. DOI: 10.1186/1477-7827-9-34
- Forneris M y Aguado L (2002). Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cycle activity of the female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 82:75-82.
- Funabashi T, Shinohara K, Mitsushima D y Kimura F (2000). Gonadotropin releasing hormone exhibits circadian rhythm in phase with arginine-vasopressin in co-cultures of the female rat preoptic area and suprachiasmatic nucleus. *J Neuroendocrinol*. 12: 521-528.
- Garraza MH, Aguado LI y De Bortoli MA (2004). In vitro effect of neuropeptides on ovary or celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat. *Med Sci Monit*. 10(12):BR440-BR446.
- Gerendai I y Halász B (1997). Neuroendocrine asymmetry. *Front Neuroendocrinol*. 3:354-81.
- Gerendai P, Banczerowski B y Halász (2005). Functional significance of the innervation of the gonads. *Endocrine*. 28:309-318.

- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I y Halász B (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology*. 68:244-256.
- Gerendai I, Rotsztein W, Marchetti B, Kordon C y Scapagnini U (1978). Unilateral ovariectomy-induced luteinizing hormone-releasing hormone content changes in two halves of the mediobasal hypothalamus. *Neurosci Lett*. 9:333-336.
- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkői Z y Halász B (2009). 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*. 36:179-188.
- Golombek DA y Rosenstein RE (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev*. 90: 1063-1102.
- Greig F y Weisz J (1973). Preovulatory levels of luteinizing hormone, the critical period and ovulation in rats. *J Endocrinol*. 57:235-245.
- Gruart A, Delgado JM, Escobar C y Aguilar-Roblero R (2002). Los relojes que gobiernan la vida. Fondo de Cultura Económica. México.1-197.
- Güldner FH (1983). Numbers of neurons and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Exp Brain Res*. 50(2-3):373-376.
- Hanada T, Uchida S, Hotta H y Aikawa Y (2011). Number, size, conduction, and vasoconstrictor ability of unmyelinated fibers of the ovarian nerve in adult and aged rats. *Auton Neurosci*. 164:6-12.
- Hannibal J (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Research*. 309:73-88.
- Harrington ME, Hoque S, Hall A, Golombek D y Biello S (1999). Pituitary adenylate cyclase activating peptide phase shifts circadian rhythms in a manner similar to light. *J Neurosci*. 19:6637-6642.
- Herbison AE (2006). Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E y Neill JD (Eds.). Elsevier. New York. 1429-1440.
- Herzog ED, Aton SJ, Numano R, Sakaki Y y Tei H (2004). Temporal precision in the mammalian circadian system: A reliable clock from less reliable neurons. *J Biol Rhythms*. 19:35-46.

- Honma S, Nakamura W, Shirakawa T y Honma K (2004). Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neurosci Lett.* 358:173-176.
- Huhman KL, Guillespie CF, Marvel CL y Albers HE (1997). Peptidergic mechanisms of action in the suprachiasmatic nucleus. *Ann N Y Acad Sci.* 814:300-304.
- Ingram CD, Snowball RK y Mihai R (1996). Circadian rhythm of neuronal activity in suprachiasmatic nucleus slices from the vasopressin-deficient Brattleboro rat. *Neuroscience.* 75:635-64.
- Kagitani F, Uchida S y Hotta H (2008). Effects of electrical stimulation of the superior ovarian nerve and the ovarian plexus on the ovarian estradiol secretion rate in rats. *J Physiol Sci.* 2 (58):133-138.
- Kagitani F, Uchida S y Hotta (2011). The role of adrenoceptors in the vascular and estradiol secretory responses to stimulation of the superior ovarian nerve. *J Physiol Sci.* 61:247-251.
- Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C y Buijs RM (2004). Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci.* 24(35):7604-7613.
- Kennaway DJ (2005). The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum Reprod Update.* 1(11):91-101.
- Kimura F y Kawakami M (1978). Reanalysis of the preoptic afferents and efferents involved in the surge of LH, FSH and prolactin release in the proestrous rat. *Neuroendocrinology.* 27(1-2):74-85.
- Klein CM y Burden HW (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters.* 85: 217-222.
- Klein DC, Moore RY y Reppert SM (1991). *Suprachiasmatic nucleus: The Mind's Clock.* New York: Oxford Univ. Press. 1-479.
- Kriegsfeld LJ y Silver R (2006). The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Hormo Behav.* 49:557-574.
- Krout KE, Kawano J, Mettenleiter TC y Loewy AD (2002). CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neuroscience.* 110(1):73-92.
- Kwon I, Choe HK, Son GH y Kim K (2011). Mammalian Molecular Clocks. *Experimental Neurobiology.* 20:18-28.

- Lawrence IE Jr y Burden HW (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*. 196: 51-59.
- Leak RK, Card JP y Moore RY (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transsynaptic transport. *Brain Research*. 819:23-32.
- Ma YJ, Kelly MJ y Ronnekleiv OK (1990). Pro-gonadotrophin-releasing hormone (pro-GnRH) and GnRH content in the preoptic nucleus/suprachiasmatic nucleus lesioned rats. *Endocrinology*. 127:2654-2664.
- Mahoney MM y Smale L (2005). 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*. 1049:156-164.
- Markiewicz W, Jaroszewski JJ, Bossowska A y Majewski M (2003). NPY: its occurrence and relevance in the female reproductive system. *Folia Histochem. Cytobiol.* 41(4):183-192.
- Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN y Bittman EL (1999). Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology*. 140:207-218.
- Meyer-Bernstein EL y Morin LP (1996). Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J Neurosci*. 16(6):2097-2111.
- Mikkelsen JD y Larsen PJ (1993). Substance P in the suprachiasmatic nucleus of the rat: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Histochemistry*. 100(1):3-16.
- Minami Y, Furuno K, Akiyama M, Moriya T y Shibata S (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide produces a phase shift associated with induction of mPer expression in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 113:37-45.
- Moore RY (2013). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 119:1-28.
- Moore RY y Silver R (1998). Suprachiasmatic nucleus organization. *Chronobiology International*. 15(5):475-487.
- Moore RY, Speh JC y Card JP (1995). The retinohypothalamic tract originates from a distinct subdivision of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*. 352:351-66.
- Moore RY, Speh JC y Leak RK (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*. 309:89-98.

- Morales L, Chávez R y Domínguez R (1993). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med Sci Res.* 21:15-17.
- Morales-Ledesma L, Vieyra E, Ramírez DA, Trujillo A, Chavira R, Cárdenas M y Domínguez R (2012). Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-pubertal rats. *Reprod Biol Endocrinol.* 10:88.
- Morán C, Morales L, Quiróz U y Domínguez R (2000). Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. *J Endocrinol.* 166: 205-211.
- Morin LP (1994). The circadian visual system. *Brain Res Rev.* 19:102-27.
- Morin LP (2007). SCN organization reconsidered. *J Biol Rhythms.* 22(1):3-13.
- Morin LP (2012). Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Exp Neurol.* 243:4-20.
- Morin LP y Allen CN (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain Res Rev.* 51:1-60.
- Morin LP y Blanchard JH (2001). Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *J Comp Neurol.* 437:79-90.
- Morin LP y Blanchard JH (2005). Descending projections of the hamster intergeniculate leaflet: Relationship to the sleep/arousal and visuomotor systems. *J Comp Neurol.* 487:204-216.
- Morin LP, Goodless-Sanchez N, Smale L y Moore RY (1994). Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster. *Neuroscience.* 61:391-410.
- Morin LP, Shivers KY, Blanchard JH y Muscat L (2006). Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 137:1285-1297.
- Palm IF, van der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM y Kalsbeek A (1999). Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesion of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* (2)93:659-666.
- Payer AF (1978). Ultrastructural study of the nerve plexus accompanying the ovarian artery and vein in the rat. *Anat Rec.* 190:47-63.

- Paxinos G y Watson C (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. Elsevier: Academic Press.
- Pickard GE y Turek FW (1983). The suprachiasmatic nuclei: Two circadian clocks?. *Brain Research*. 268:201-210.
- Pittendrigh CS y Daan S (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons *J Comp Physiol*. 106:333-355.
- Ralph MR, Foster RG, Davis FC y Menaker M (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*. 247(4945):975-8.
- Ramírez DA (2011). ¿La participación del nervio ovárico superior en la regulación de la ovulación y la esteroidogénesis depende del ciclo circádico? La rata adulta como modelo de estudio. Tesis de maestría. PCB. UNAM.
- Ramírez M y Alba F (1993). Bases biológicas de la asimetría cerebral. *Ver de Psicol Gral y Aplic*. 46(1):33-43.
- Reppert SM y Weaver DR (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*. 63:647-676.
- Reuss S, Decker K, Hodl P y Sraka S (1994). Anterograde neuronal tracing of retinohypothalamic projections in the hamster-possible innervation of substance P containing neurons in the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*. 174(1):51-54.
- Rollag M, Berson D y Prevec I (2003). Melanopsin, Ganglion-cell photoreceptors, and mammalian photoentrainment. *J Biol Rhythms*. 18:227-234.
- Rosas G, Ramírez MI, Linares R, Trujillo A, Domínguez R y Morales-Ledesma L (2014). Asymmetric steroidogenic response by the ovaries to the vasoactive intestinal peptide. *Endocrine*. DOI: 10.1007/s12020-014-0449-x.
- Sage D, Maurel D y Bosler O (2002). Corticosterone-dependent driving influence of the suprachiasmatic nucleus on adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282:E458-E465.
- Sakanaka M, Magari S, Inoue N y Lederis K (1990). Co-localization of arginine vasopressin- and enkephalin-like immunoreactivities in nerve cells of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res*. 260(3):549-554.
- Salazar-Juárez A, Parra-Gómez L, Barbosa-Méndez S, Leff P y Antón B (2006). Sincronización luminosa. Conceptos básicos. Primera parte. *Salud Mental*. 29(2):11-17.

- Salgado RC, Fuentes B y Escobar C (2009). La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta. *Salud Mental*. 32:69-76.
- Samson WK y McCann SM (1979). 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*. 4:783-788.
- Sánchez MA y Domínguez R (1995). Differential effects of unilateral lesion in the medial amygdala on spontaneous and induced ovulation. *Brain Res Bull*. 38:313-317.
- Shirakawa T, Honma S y Honma K (2001). Multiple oscillators in the suprachiasmatic nucleus. *Chronobiol Int*. 18:371-387.
- Simonian SX, Spratt DP y Herbison AE (1999). Identification and characterization of estrogen receptor α -containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *J Comp Neurol*. 411:346-358.
- Silva CC, Benítez DP, Monroy J, Ayala ME, Flores A y Domínguez R (2012). Unilateral lesion of the suprachiasmatic nucleus performed at diestrus-2 or proestrus induces a blockade of ovulation in the rat (abstract). I Congreso de FALAN and LV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Cancún, México. p. TH142.
- Silva CC, Benítez DP, Muñoz JC, Cortés GD, Cruz ME, Flores A y Domínguez R (2015). The suprachiasmatic nuclei, asymmetries and the involvement on non-proestrous events in the regulation of ovulation. Proceeding of the 45th Meeting of Society for Neuroscience. Chicago, Illinois. Poster Session V23.
- Silver R, Romero MT, Besmer HR, Leak R, Nunez JM y LeSauter J (1996). Calbindin-D28K cells in the hamster SCN express light-induced cFos. *Neuroreport*. 7(6):1224-1228.
- Sellix MT (2015). Circadian clock function in the mammalian ovary. *J Biol Rhythms*. 30(1):7-19.
- Smarr BL, Morris E y de la Iglesia HO (2012). The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of kiss1 and the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 153: 2839-2850.
- Stener-Victorin E, Kobayashi R y Kurosawa M (2003). Ovarian blood flow responses to electro acupuncture stimulation at different frequencies and intensities in anaesthetized rats. *Auto Neurosci*. 108:50-56.

- Stephan FK y Zucker I (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Nat Acad Sci USA*. 69:1583-1586.
- Swann JM y Turek FW (1985). Multiple circadian oscillators regulate the timing of behavioral and endocrine rhythms in female golden hamsters. *Science*. 228(4701):898-900.
- Tanaka M, Ichitani Y, Okamura H, Tanaka Y y Ibata Y (1993). The direct retinal projection to VIP neuronal elements in the rat SCN. *Brain Res Bull*. 31:637-40.
- Terasawa EI, Wiegand SJ y Bridson WE (1980). A role for medial preoptic nucleus on afternoon of proestrus in female rats. *Am J Physiol*. 238(6):E533-E539.
- Tóth IE, Wiesel O, Boldoglói Z, Bálint K, Tapaszti Z y Gerendai I (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microsc Res Tech*. 70:710-718.
- Uchida S (2015). Sympathetic regulation of estradiol secretion from the ovary. *Auton Neurosci*. 187:27-35.
- Uchida S y Kagitani F (2014). Effects of electrical stimulation of autonomic nerves to the ovary on the ovarian testosterone secretion rate in rats. *Auton Neurosci*. 180:48-52.
- Urlep Z y Rozman D (2013). The interplay between circadian system, cholesterol synthesis, and steroidogenesis affects various aspects of female reproduction. *Front Endocrinol*. 4:111. DOI: 10.3389/fendo.2013.00111
- van den Pol AN (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *J Comp Neurol*. 191 (4):661-702.
- van den Pol AN (1991). The suprachiasmatic nucleus: Morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. En: *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock*. Klein DC, Moore RY y Reppert SM (Eds.). Oxford University Press. New York. 17-50.
- van den Pol AN y Tsujimoto KL (1985). Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: Immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*. 15:1049-1086.
- van der Beek EM, Palm IF, Horvath TL, Kastelijn J y Wiegant VM (1998). Gender specific apposition of SCN-derived vasopressin containing axons on GnRH neurons in the preoptic area of adult rats. *Soc Neurosci*. 24:545.

- van der Beek EM, Wiegant VM, van der Donk HA, van den Hurk R y Buijs RM (1993). 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.* 5:137-144.
- van der Beek EM, Wiegant VM, van Oudheusten HJC, van der Donk HA, van den Hurt R y Buijs RM (1997). Synaptic contacts between gonadotrophin-releasing hormone-containing fibers and neurons in the suprachiasmatic nucleus and perichiasmatic areas: an anatomical substrate for feedback regulation?. *Brain Research.* 755:101-111.
- Vujović N, Davidson AJ y Menaker M (2008). Sympathetic input modulates, but does not determine, phase of peripheral circadian oscillators. *Am J Regul Integr Comp Physiol.* 295:R355-R360.
- Watson Jr RE, Langub Jr MC, Engle MG y Maley BE (1995). Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Research.* 689: 254-264.
- Watts AG, Swanson LW y Sanchez-Watts G (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *phaseolus vulgaris* Leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol.* 258:204-229.
- Weick RF y Stobie KM (1995). Role of VIP in the regulation of LH secretion in the female rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 19:251-259.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M y Reppert SM (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron.* 14:697-706.
- Wiegand SJ y Terasawa E (1982). Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology.* 34(6):395-404.
- Williams III WP y Kriegsfeld LJ (2012). Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. *Front Endocrinol.* 3:60. DOI: 10.3389/fendo.2012.00060
- Yao W, Sheikh SP, Ottesen B y Jørgensen JC (1996). Vascular effects and cyclic AMP production produced by VIP, HM, PHV, PACAP-27, PACAP-38, and NPY on rabbit ovarian artery. *Peptides.* 17(5):809-815.
- Zackrisson U, Mikuni M, Peterson MC, Nilsson B, Janson PO y Brännström M (2000). Evidence for the involvement of blood flow-related mechanisms in the ovulatory process of the rat. *Hum Reprod.* 15(2):264-272.

- Zhang L y Aguilar-Roblero R (1995). Asymmetrical electrical activity between the suprachiasmatic nuclei *in vitro*. *Neuro Report*. 6:537-540.
- Zhang X, Zhang L, Huo S, Wang J y Cui S (2010). Neonatal superior ovarian nerve transection inhibits follicle development by enhancing follicular atresia and suppressing granulosa cell proliferation in rats. *Reprod Fertil Develop*. 22:1148-1158.

APÉNDICE

ARTÍCULO PUBLICADO EN *REPRODUCTIVE SCIENCES*

Deyra A. Ramírez, Elizabeth Vieyra, Aldo I. González, Carolina Morán, Roberto Domínguez and Leticia Morales-Ledesma (2016). **Both the Suprachiasmatic Nucleus and the Superior Ovarian Nerve Contribute to the Processes of Ovulation and Steroid Hormone Secretion on Proestrus.** *Reproductive Sciences*.1-12. DOI: 10.1177/1933719116670307.

Both the Suprachiasmatic Nucleus and the Superior Ovarian Nerve Contribute to the Processes of Ovulation and Steroid Hormone Secretion on Proestrus

Deyra A. Ramírez, MSc¹, Elizabeth Vieyra, MSc¹, Aldo I. González, Biol¹, Carolina Morán, PhD², Roberto Domínguez, MD, PhD¹, and Leticia Morales-Ledesma, PhD¹

Reproductive Sciences
1-12
© The Author(s) 2016
Reprints and permissions:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1933719116670307
rs.sagepub.com


Abstract

The aims of the present study were to analyze if the superior ovarian nerve (SON) plays a role in the neural signals from suprachiasmatic nucleus (SCN) that lead to ovulation and ovarian steroids secretion on proestrus day. Rats on proestrus day were treated at 11.00 to 11.30 or 17.00 to 17.30 hours with 1 of the 3 experimental procedures (1) unilateral or bilateral SON sectioning, (2) unilateral or bilateral injury to the SCN, or (3) unilateral injury to the SCN followed by unilateral sectioning of the SON ipsilateral to the treated SCN. Treatments were evaluated 24 hours after surgical procedures. Compared to laparotomized animals, right or bilateral SON sectioning treatment at 17.00 hours resulted in lower ovulation rates and number of ova shed by the right ovary. The ovaries of nonovulating animals showed early follicular luteinization signs and trapped ova. Bilateral SCN injury treatment at 11.00 hours resulted in anovulation; whereas right SCN injury treatment, with or without right SON sectioning, resulted in a lower number of ova shed. Injecting luteinizing hormone-releasing hormone to animals with bilateral SCN injury restored ovulation. In rats with unilateral or bilateral SON sectioning, or with injury to the SCN with or without unilateral sectioning of the SON, the effects on hormone levels depended of the hormone studied and the time of day treatment was performed. The present results suggest that on proestrus day, the role of the right or both SON in ovulation and steroid hormone secretion regulation takes place through different neuroendocrine mechanisms from SCN.

Keywords

superior ovarian nerve, suprachiasmatic nucleus, ovulation, steroidogenesis, proestrus

Introduction

Ovulation and steroids hormones secretion are regulated by hormonal and neural signals that mainly arise from the hypothalamus, pituitary, ovary, and adrenals.^{1,2} Neural signals arrive to the ovaries through the superior ovarian nerve (SON), the ovarian plexus nerve (OPN), and the vagus nerve.³ The SON and OPN have their neurons located mainly in the celiac-superior mesenteric ganglia.³⁻⁵

The SON provides the ovary with fibers containing catecholamines, vasoactive intestinal peptide (VIP), and neuropeptide Y (NPY).⁵ The fibers of the SON are mainly distributed in the perfollicular theca layer, in close relation with the theca internal cells, while the noradrenergic fibers penetrating the ovary through the OPN are mainly perivascular.^{3,6}

We have previously shown that 24 and 72 hours after unilateral or bilateral sectioning of the SON noradrenaline (NA) levels in the denervated ovary were lower than in untouched (control) and laparotomized rats.⁷ According to Aguado and Ojeda,⁸ adult rats on proestrus day with bilateral SON

sectioning treatment at 11.00 hours showed lower progesterone and estradiol levels 4 minutes after treatment, whereas the same treatment performed at 16.00 hours resulted in a brief (8 minutes) progesterone secretion decrease and induced a prolonged estradiol decline. In rats on estrus day, the bilateral SON sectioning treatment at 11.00 hours did not alter progesterone or estradiol levels in serum.⁸

According to Flores et al.,⁹ compared to their corresponding laparotomized treatment group, unilateral SON sectioning

¹ Biology of Reproduction Research Unit, Physiology of Reproduction Laboratory, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México DF, México

² Department of Biology and Toxicology of Reproduction, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Manuel, Puebla, México

Corresponding Author:

Leticia Morales-Ledesma, Biology of Reproduction Research Unit, Physiology of Reproduction Laboratory, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, AP 9-020, CP15000, México DF, México.
Email: moralesledesma@yaoo.com.mx

treatment to adult rats on proestrus at 13.00 to 13.15 hours had different effects on testosterone levels depending on the SON sectioned. One hour after right SON sectioning treatment, testosterone levels were lower while left SON sectioning did not modify it. No changes in estradiol levels were observed.

Kagitani et al.¹⁰ reported that in rats on estrous day right SON electrical stimulation reduced estradiol secretion rates of from the right ovary, whereas Uchida and Kagitani¹¹ showed that the right SON has an inhibitory role in ovarian testosterone secretion.

Taken together, the evidence suggests that a circadian mechanism may regulate ovarian functions and that such regulation can occur in any component of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis, as proposed by Kennaway¹² and Sellix.¹³

The participation of the hypothalamus in the regulation of gonadotropin secretion and ovulation includes the preoptic-anterior hypothalamic area,¹⁴ the arcuate nucleus,¹⁵ the anteroventral periventricular nucleus,¹⁶ and the suprachiasmatic nucleus (SCN).

In mammals, a cell-intrinsic molecular circadian pacemaker located in the SCN is part of the mechanism that allows them to anticipate changes in the environment and to regulate female reproductive functions.² In rats, the chronic bilateral lesion of the SCN results in persistent vaginal estrus,¹⁷ anovulation,^{18,19} and blockage of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge; this interrupts the secretion timing of the luteinizing hormone (LH).^{20,21}

Terasawa et al.²² showed that the acute bilateral electrolytic lesion to the SCN on the morning of proestrus (09.00-10.00 hours) failed to block ovulation on the morning of estrus day. These results contradict the findings of Kimura and Kawakami,²³ who reported that in rats on proestrus the bilateral lesion to the SCN at 12.00 to 14.00 hours produced an acute blocked of the preovulatory LH surge and blocked ovulation.

According to Gerendai et al.,²⁴ there is neuromorphological evidence of the transneuronal innervation asymmetry of the ovary and on the asymmetry of the hypothalamus and extrahypothalamic structures transneuronally connected with the ovary. Furthermore, data have been published on the side-linked regulation asymmetry of the circadian rhythm in the SCN.²⁵⁻²⁷

The SCN is connected to many peripheral tissues via the sympathetic and parasympathetic branches of the autonomic nervous system.^{24,28-30} To our knowledge, there are no anatomical evidences showing the neural connections between the SCN and the ovary. Kennaway¹² proposed that it is reasonable to expect that the sympathetic innervation of the ovary and uterus may also be influenced by the SCN. Sellix¹³ suggested that the SCN may modulate the timing of the ovarian clock via autonomic nervous cues (sympathetic and parasympathetic nervous system).

Based on the proposals of Kennaway¹² and Sellix¹³, the aims of the present study were to analyze the influences of the SCN on the SON's sympathetic innervation of the ovary in regulating ovarian functions in rats on proestrus day before (at 11.00 hours) or after (at 17.00 hours) the preovulatory LH peak.

To this end, 3 experimental procedures to evaluate their effects on ovulation and steroid hormone secretion were

conducted in rats on proestrus day. The 3 experiments consisted of (1) unilateral or bilateral sectioning to the SON at 11.00 or 17.00 hours, (2) unilateral or bilateral injury to the SCN at 11.00 or 17.00 hours, and (3) unilateral injury to the SCN followed by sectioning the SON ipsilateral to the injured SCN.

Materials and Methods

All experiments were carried out in strict accordance with the Mexican Law of Animal Treatment and Protection Guidelines and followed the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999 specifications. The Institutional Committee for the Care and Use of Animals of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza approved all experimental protocols. All possible efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

This study was performed with adult, female, CHIZ-V strain rats weighing 230 to 260 g from our own breeding stock. The animals were maintained under controlled light (on from 05.00 to 19.00 hours) and temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) conditions, with free access to food (Purina S.A., Mexico) and tap water. The animals' estrous cycles were monitored by cytological examination of daily vaginal smears. Only rats showing at least 2 consecutive 4-day estrus cycles were used in the experiment. The study was made with rats on proestrus day. The rats were anaesthetized with ether and surgical procedures were performed between 11.00 and 11.30 or 17.00 and 17.30 hours. Animals were sacrificed 24 hours after surgery treatment. The experimental protocol (Figure 1) in this article indicates the number of animals used in each experimental group.

Groups of animals were randomly allotted to each of the following experimental groups.

Unilateral or Bilateral SON Sectioning

Rats were allotted to 1 of the 6 surgery treatment groups—left, right, or bilateral SON sectioning or laparotomy (Figure 1A). Following previously described methodologies,³¹ a unilateral dorsolateral incision was performed 2 cm below the last rib on the left, right, or bilateral abdominal wall. The incision affected skin, muscle, and peritoneum. The left, right, or both ovaries were exposed and with the aid of fine forceps the ovarian ligament was sectioned approximately 1 cm from the ovary. The gonad was immediately returned to the abdominal cavity and the wound was sealed. The sham section of the SON treatment consisted of performing a dorsolateral incision on the left, right, or bilateral abdominal wall (laparotomy). No organs were manipulated. The wound was subsequently sealed.

Unilateral or Bilateral Injury to the SCN

Animals were allotted to 1 of the 6 surgery treatment groups—left, right, or bilateral SCN injury or sham (Figure 1B). The animals were anaesthetized and placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, California). The skin of the skull was sectioned and the left and/or right side of the skull

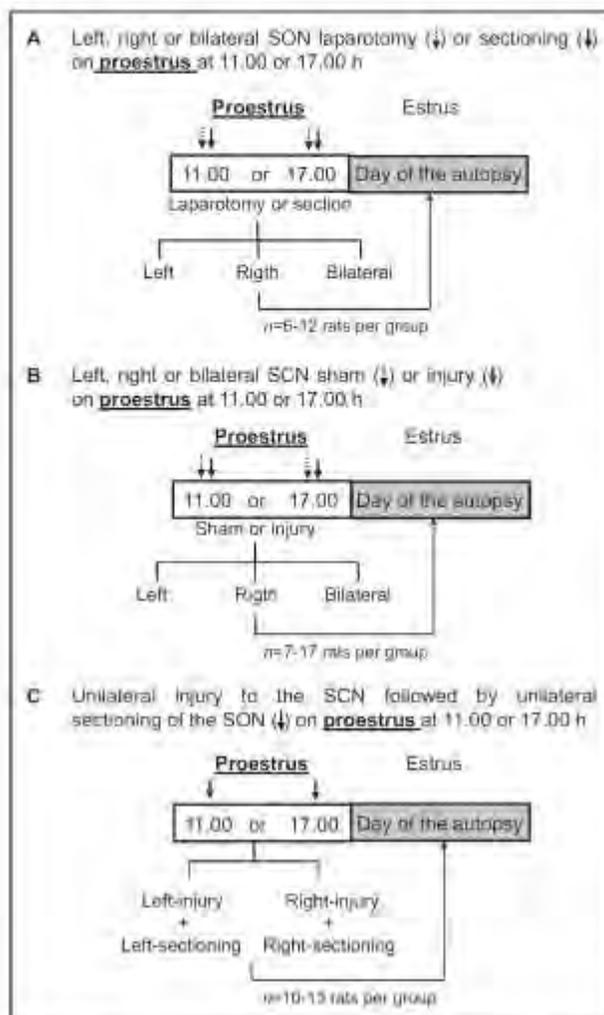


Figure 1. Schematic representation of the treatment design. A total of 28 groups of rats ($n = 300$) were randomly allotted to each of the following experimental procedures: (A) laparotomy or sectioning of the left, right, or bilateral superior ovarian nerve (SON) at 11.00 or 17.00 hours; (B) sham or injury treatment to the left, right, or bilateral suprachiasmatic nucleus (SCN); (C) unilateral injury to the SCN followed by unilaterally sectioning of the SON ipsilateral to the injured nucleus. All animals were sacrificed on the predicted estrus day (24 hours after surgery).

was drilled with a 1-mm bit. Subsequently, a thermic electrode insulated except at the 0.2-mm tip (thermocouple zone [TCZ], tip diameter 0.3 mm; Radionics, Inc, Burlington, Massachusetts) was connected to a Model RFG 4A Research Radio Frequency Lesion Generator System (Radionics, Inc) and lowered into the left, right, or both sides of the SCN. The SCN was located according to the coordinates of the Paxinos and Watson atlas⁵² (left SCN: -0.3 mm anterior-posterior to the bregma, $+0.3$ mm lateral-medial to the bregma, and -9.1 mm below to the bregma; right SCN: -0.3 mm anterior-posterior to the bregma, -0.4 mm lateral-medial, and -9.1 mm below to the

bregma). The injury into the left, right, or both sides of the SCN was produced by passing current of 10 mA at a voltage of about 20 V that heated the electrode tip to a constant temperature of 90°C for 15 seconds. After surgery, the electrode was removed and the wound sutured.

The sham surgery into the SCN consisted of the same procedures described earlier, except that no current was passed through the electrode.

Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Treatment to Nonovulating SCN-Treated Animals

The SCN injuries that blocked ovulation were identified and the treatments were replicated in a group of 6 animals. At 14.00 hours, approximately 3 hours after SCN injury treatment, the rats were subcutaneously injected with 3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight of synthetic LH-RH (Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri). These animals were sacrificed the next morning after treatment.

Unilateral Injury to the SCN Followed by Unilaterally Sectioning of the SON Ipsilateral to the Injured SCN (SCN Injury + SON Sectioning)

Following the procedures described earlier, groups of animals were treated with a unilateral injury to the SCN followed by sectioning of the SON ipsilateral to the injured SCN (*left*: L-SCN injury + L-SON sectioning; *right*: R-SCN injury + R-SON sectioning). Procedures were performed between 11.00 and 11.30 or 17.00 and 17.30 hours (Figure 1C).

Autopsy Procedures

Groups of animals from each experimental group were sacrificed by decapitation 24 hours after the surgery. The blood of the trunk from each animal was collected and centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes. The serum was stored at -20°C until the progesterone, testosterone, and estradiol levels were measured by radioimmunoassay. During autopsy the effectiveness of the SON sectioning procedure was confirmed by verifying the free movement of the ovary in the abdominal cavity. The oviducts were dissected and the number of ova present was counted with the aid of a stereoscopic microscope (Nikon, Model C-PS, Tokyo, Japan). Ovarian morphology was assessed in nonovulating animals.

Ovarian Morphology Assessment

The ovaries from each nonovulating experimental rats were removed and cleaned of adherent fat tissue, subsequently immersed in Bouin's fixative solution for 24 hours, dehydrated and embedded in paraffin. Ten microns-thick serial histological sections were made and stained with hematoxylin-eosin. With the aid of a Nikon binocular microscope, all histological sections were analyzed for the presence of new corpora lutea and follicles with enclosed oocyte.

Confirming the Location of the SCN Injury

The accuracy of the SCN injury and sham surgery treatments was verified by removing the brains of treated rats, fixing them in 10% formaldehyde, and subsequently obtaining 100- μ m thick slices using a vibratome (Series 3000; Technical Products International, Inc, St Louis, Missouri). Brain slices were stained with 1% cresyl violet. The location of the injured zone or the trajectory of the electrode (sham surgery) was assessed histologically with the aid of a stereoscopic microscope. The SCN measures between 500 and 600 μ m in our strain of rats.

Images documenting the injured zone or the electrode path were obtained with a digital camera (HP Photosmart M637). Figure 2 shows the electrode path and the injured area in the SCN. Only those animals with complete SCN lesions were included in the analysis.

Hormone Concentration Measurements

The serum levels of progesterone (ng/mL), testosterone, and estradiol (pg/mL) were measured using solid-phase radioimmunoassay with kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, California). The intra- and interassay coefficients of variation were 6.58% and 7.42% for progesterone; 7.85% and 8.76% for testosterone; and 7.54% and 8.21% for estradiol.

Statistical Analysis

The statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6 Software. The ovulation rates (the number of ovulating animals/the number of treated animals) were analyzed using Fisher exact probability or χ^2 test. Data on the number of ova shed were analyzed using Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney *U* test. Data on progesterone, testosterone, and estradiol serum levels were analyzed with 1-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test when assessing the effects of treatments, and a 2-way ANOVA test was used when assessing the effects of the same treatments at different hours of the day (11.00 vs 17.00 hours). A *P* value less than .05 was considered statistically significant.

Results

Effects of Unilateral or Bilateral SON Sectioning

Ovulation. Compared to the corresponding left laparotomy group, left SON sectioning at 11.00 or 17.00 hours did not modify ovulation rate nor the number of ova shed. Ovulation rate by rats with right SON sectioning at 11.00 hours was similar to the laparotomized group, though the number of ova shed by the right ovary was lower. The number of ova shed by the left ovary in rats with bilateral SON sectioning was lower than in the bilateral laparotomized group (Table 1).

Compared to their respective laparotomized group, rats with right or bilateral SON sectioning treatment at 17.00 hours resulted in lower ovulation rate and number of ova shed by the right ovary (Table 1).

Ovarian morphology. Figure 3 shows luteinized preovulatory follicles with trapped ova in nonovulating rats with unilateral or bilateral SON sectioning treatment at 11.00 hours (Figure 3A). No newly formed corpora lutea were observed. In rats treated at 17.00 hours (Figure 3B), the largest ovaries showed signs of early luteinization and trapped ova.

Effects of SON sectioning on hormone levels

SON sectioning at 11.00 hours. Rats treated with unilateral (left or right) or bilateral SON sectioning showed similar progesterone and testosterone levels as its corresponding laparotomized group. Rats treated with right SON sectioning treatment showed lower estradiol levels than its corresponding laparotomized group (Figure 4).

SON sectioning at 17.00 hours. Rats treated with unilateral (left or right) or bilateral SON sectioning showed similar progesterone levels as its corresponding laparotomized group. Bilateral SON sectioning treatment resulted in higher testosterone levels than in bilaterally laparotomized animals. Compared to the corresponding laparotomized treatment group, estradiol levels were lower in animals with left SON sectioning treatment and higher in rats with bilateral SON sectioning treatment (Figure 4).

The 2-way ANOVA test showed that the animals with bilateral SON sectioning treatment at 11.00 hours yielded lower testosterone levels than animals treated at 17.00 hours ($F_{1,24} = 31.37$; $P < .0001$) with significant effects between treatments and hours ($F_{2,48} = 6.813$; $P < .0045$). Animals with right SON sectioning at 11.00 hours showed lower estradiol levels than rats treated at 17.00 hours ($F_{1,31} = 9.010$; $P < .0053$) but no apparent effects were observed between treatments and hours ($F_{2,31} = 1.433$; $P < .2539$).

Effects of Unilateral or Bilateral SCN Injury

Ovulation. No difference in ovulation rate or number of ova shed was observed between left sham surgery and left SCN injured animals treated at 11.00 or 17.00 hours.

Compared to right sham surgery rats, animals with right SCN injury treatment at 11.00 or 17.00 hours showed similar ovulation rate but lower number of ova shed (Table 2).

Bilateral SCN injury treatment at 11.00 hours resulted in anovulation (0 of 6 vs 10 of 10). Injecting synthetic LH-RH to rats with bilateral SCN injury at 11.00 hours restored ovulation (5 of 5 vs 0 of 6; $P < .005$, Fisher exact probability test), and the total number of ova shed was similar to the bilateral sham surgery treatment group (10.5 ± 0.9 vs 10.6 ± 0.7).

SCN injury effects on hormone levels

SCN injury at 11.00 hours. Rats with left SCN injury treatment showed lower progesterone levels than its corresponding sham surgery group. Such difference was not observed in rats with right or bilateral SCN injury treatment.

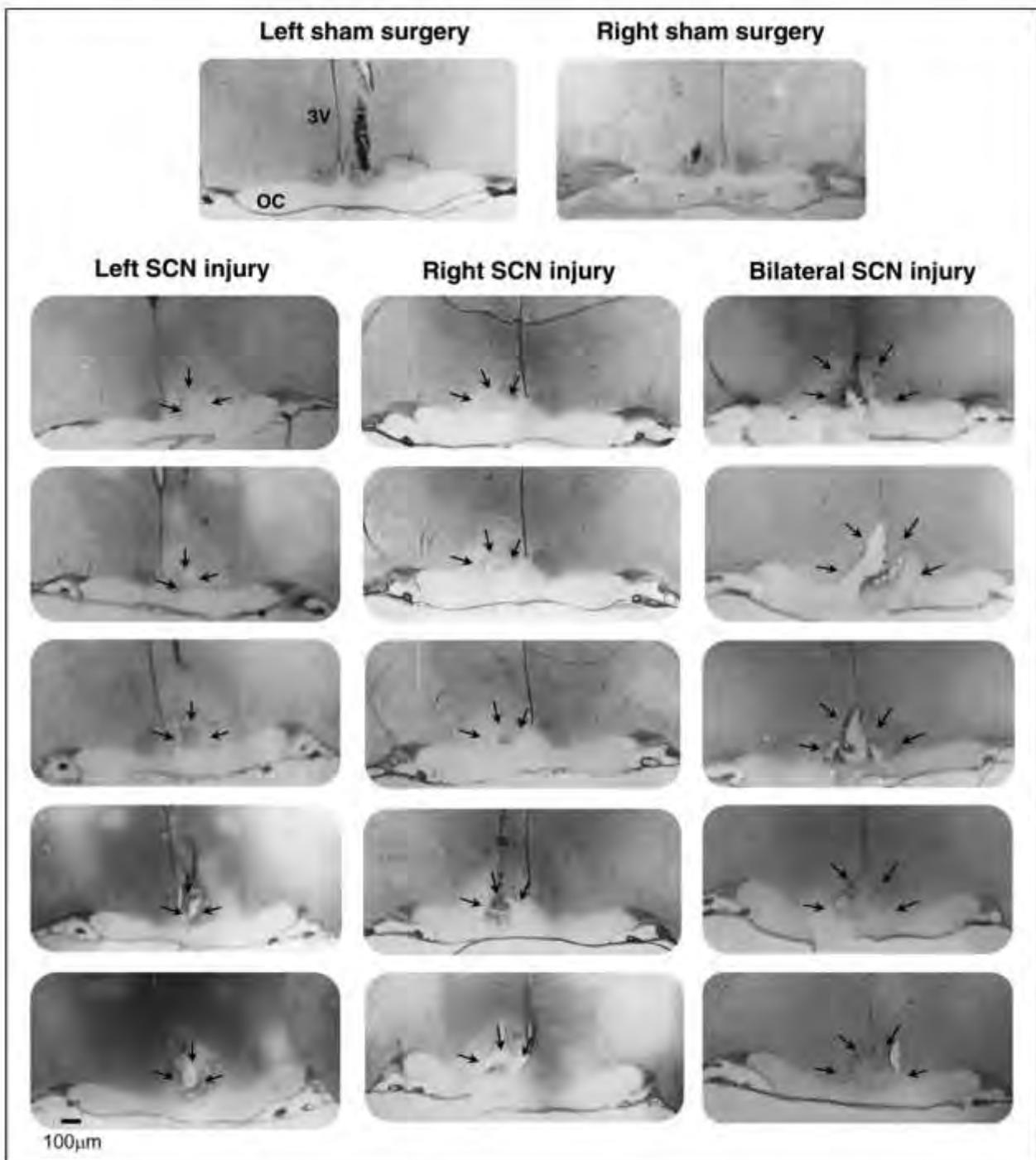


Figure 2. Image of brain coronal sections showing the trajectory of the electrode (sham surgery) and the injured zone. Coronal sections showing the rat's suprachiasmatic nucleus (SCN) stained with cresyl violet, and the electrode trajectory (sham surgery) to the SCN or the right, left, or bilateral SCN injury zone (arrows). OC indicates optic chiasma; 3V, third ventricle. 4× microscopic lens, scale bar = 100 µm.

Compared to its corresponding sham surgery group, testosterone levels were lower in animals with right SCN injury treatment and higher in the bilateral SCN injury group.

Rats with a bilateral SCN injury treatment showed higher estradiol levels than the bilateral sham surgery group (Figure 5).

Table 1. Ovulatory Response of the Animals With Unilateral or Bilateral Sectioning of the Superior Ovarian Nerve (SON).^a

Groups	11.00 hours				17.00 hours			
	Ovulation Rate per Ovary		Number of Ova Shed per Ovary		Ovulation Rate per Ovary		Number of Ova Shed per Ovary	
	Left	Right	Left	Right	Left	Right	Left	Right
L-LAP	9/10	10/10	6.1 ± 0.5	6.5 ± 0.5	9/10	9/10	6.0 ± 0.6	5.4 ± 0.7
L-sectioning	9/14	13/14	4.8 ± 0.6	6.8 ± 0.7	12/17	11/17	4.4 ± 0.7	5.5 ± 0.7
R-LAP	10/10	9/10	5.6 ± 0.7	7.0 ± 0.6	7/10	9/10	5.7 ± 0.5	6.6 ± 0.8
R-sectioning	14/16	8/16	4.1 ± 0.6	4.4 ± 0.7 ^b	11/15	7/15 ^c	5.6 ± 0.6	3.6 ± 0.9 ^b
B-LAP	10/10	9/9	6.7 ± 0.7	5.6 ± 1.0	7/7	7/7	4.6 ± 0.8	6.0 ± 1.1
B-sectioning	9/10	9/10	4.7 ± 0.5 ^b	4.2 ± 0.2	10/14	6/14 ^c	4.8 ± 0.5	2.3 ± 0.3 ^b

^aOvulation rates and numbers of ova shed (means ± standard error of the means) by the left or right ovary of rats with left (L-LAP), right (R-LAP), or bilateral (B-LAP) laparotomy or with left (L-sectioning), right (R-sectioning), or bilateral (B-sectioning) SON sectioning treatment. Treatments were performed to rats on proestrus day between 11.00 and 11.30 or 17.00 and 17.30 hours. The animals were sacrificed 24 hours after surgery.

^bP < .05 versus corresponding laparotomized group (Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test).

^cP = .0098 versus corresponding laparotomized group (χ² test).

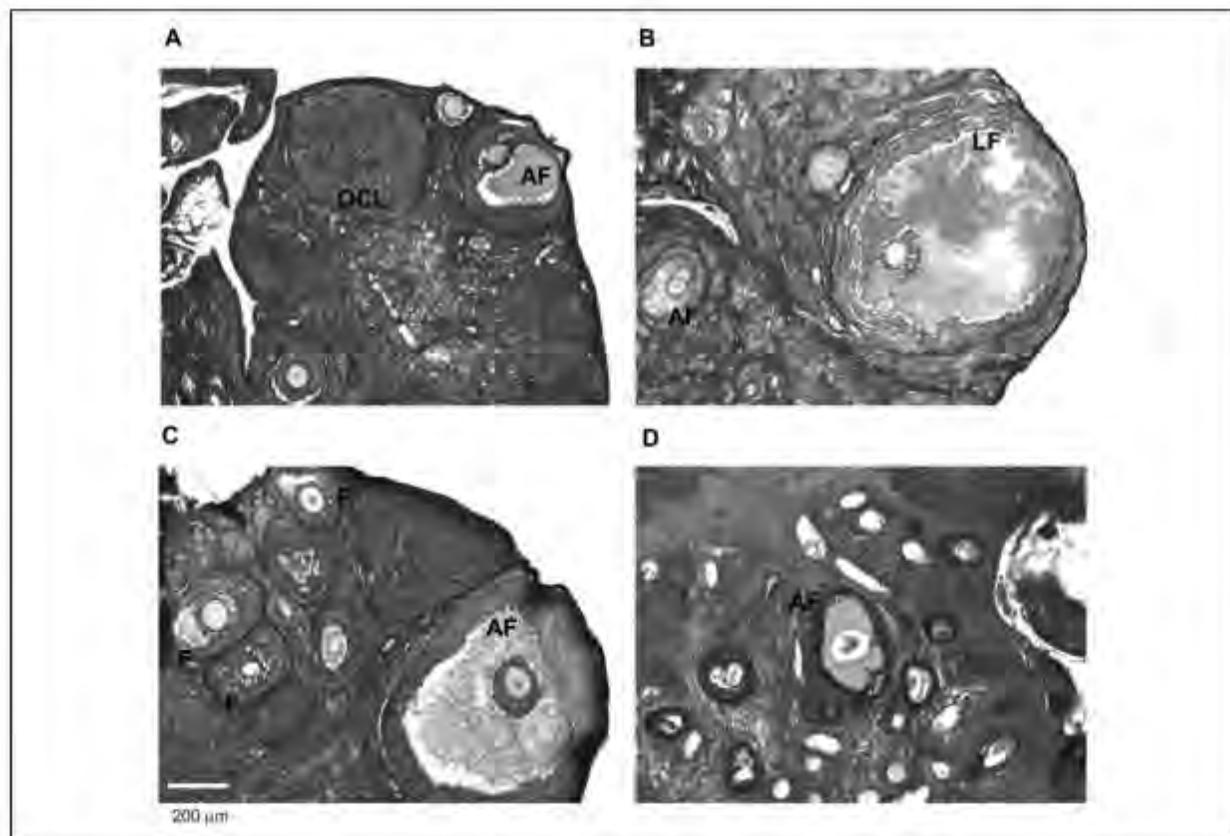


Figure 3. Ovarian histology of rats treated with right or bilateral superior ovarian nerve (SON) sectioning or treated with right supra-chiasmatic nucleus (SCN) injury followed by right SON sectioning. Micrographs correspond to sections of the ovary, of 10 μm thick, stained by hematoxylin–eosin. Ovary from a right or bilateral SON sectioning treated rat at 11.00 hours (A) or 17.00 hours (B). Ovary from a rat treated with right SCN injury followed by right SON sectioning at 11.00 hours (C) or 17.00 hours (D). Treatments were performed to rats on proestrus day between 11.00 and 11.30 or 17.00 and 17.30 hours. The animals were sacrificed 24 hours after surgery. AF indicates atretic follicle; F, normal follicle; LF, luteinized follicle; OCL, old corpora lutea. 10× microscopic lens, scale bar = 200 μm.

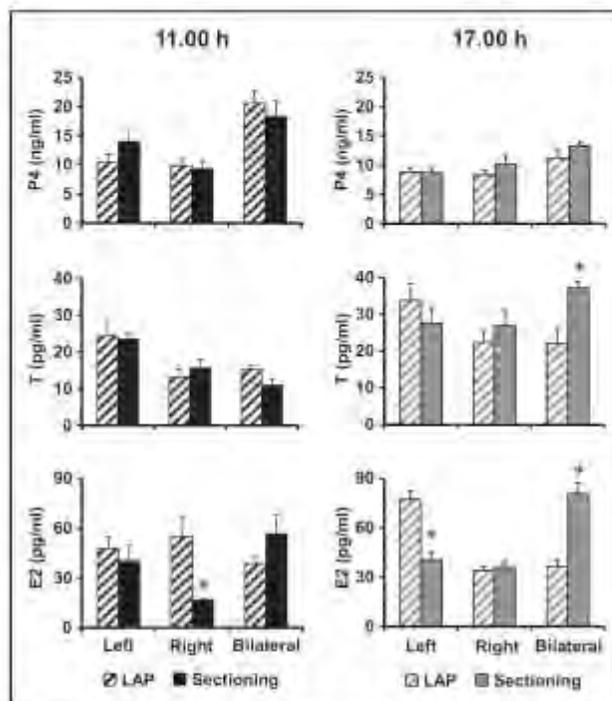


Figure 4. Effects of unilateral (left or right) or bilateral superior ovarian nerve (SON) sectioning treatment on hormones levels. Mean \pm standard error of the mean of progesterone (P4, ng/mL), testosterone (T, pg/mL), and estradiol (E2, pg/mL) serum levels in rats with left, right, or bilateral laparotomy (LAP) or with left, right, or bilateral SON sectioning. Treatments were performed with rats on proestrus between 11.00 and 11.30 or 17.00 and 17.30 hours. The animals were sacrificed 24 hours after treatment (n = 8 per group). *P < .05 versus corresponding laparotomized group (1-way analysis of variance followed by Tukey test).

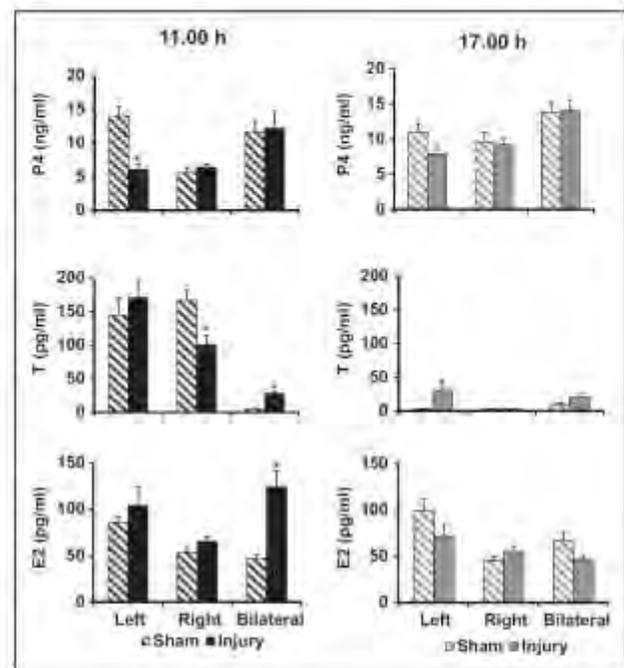


Figure 5. Unilateral or bilateral suprachiasmatic nucleus (SCN) injury treatment effects on hormones levels. Mean \pm standard error of the mean of progesterone (P4, ng/mL), testosterone (T, pg/mL), and estradiol (E2, pg/mL) serum levels in rats with left, right, or bilateral sham surgery treatment or with left, right, or bilateral SCN injury treatment. Treatments were performed to rats on proestrus day between 11.00 and 11.30 or 17.00 and 17.30 hours. The animals were sacrificed 24 hours after treatment (n = 8 per group). *P < .05 versus corresponding sham group (1-way analysis of variance test followed by Tukey test).

Table 2. Ovulatory Response of the Animals With Unilateral or Bilateral Injury to the Suprachiasmatic Nucleus (SCN),^a

Groups	Ovulation Rate	11.00 hours		17.00 hours		
		Number of Ova Shed per Ovary		Number of Ova Shed per Ovary		
		Left	Right	Left	Right	
L-sham	12/12	5.5 \pm 0.6	5.8 \pm 0.8	9/9	5.1 \pm 0.7	5.4 \pm 0.7
L-injury	8/10	6.0 \pm 0.7	4.6 \pm 0.3	9/9	6.2 \pm 0.5	6.3 \pm 0.8
R-sham	8/8	5.7 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4	11/11	6.5 \pm 0.4	6.2 \pm 0.6
R-injury	8/11	5.1 \pm 0.5	3.5 \pm 0.5 ^b	11/11	4.5 \pm 0.6 ^d	5.2 \pm 0.8
B-sham	10/10	6.0 \pm 0.5	5.7 \pm 0.5	11/11	4.5 \pm 0.6	5.7 \pm 0.8
B-injury	0/6 ^c	0	0	11/11	5.8 \pm 0.6	6.1 \pm 0.6

^aOvulation rates and numbers of ova shed (means \pm standard error of the means) by the left or right ovary of rats with left (L-sham), right (R-sham), or bilateral (B-sham) sham surgery or with left (L-injury), right (R-injury), or bilateral (B-injury) injury to the SCN. Treatments were performed to rats on proestrus day between 11.00 and 11.30 or 17.00 and 17.30 hours. The animals were sacrificed 24 hours after surgery.

^bP < .05 versus corresponding sham group (Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test).

^cP = .0098 versus corresponding sham group (χ^2 test).

Table 3. Ovulatory Response of the Animals With Unilateral Sectioning of the Superior Ovarian Nerve (SON) Ipsilateral to the Injured Suprachiasmatic Nucleus (SCN).^a

Groups	11.00 hours			17.00 hours		
	Ovulation Rate	Number of Ova Shed per Ovary		Ovulation Rate	Number of Ova Shed per Ovary	
		Left	Right		Left	Right
L-sectioning	13/14	4.8 ± 0.6	6.8 ± 0.7	12/17	4.4 ± 0.7	5.5 ± 0.7
L-injury	8/10	6.0 ± 0.7	4.6 ± 0.3	9/9	6.2 ± 0.5	6.3 ± 0.8
L-injury + L-sectioning	7/11	4.0 ± 0.9	5.0 ± 1.3	12/13	5.4 ± 0.8	6.9 ± 1.0
R-sectioning	14/16	4.1 ± 0.6	4.4 ± 0.7	11/15	5.6 ± 0.6	3.6 ± 0.9
R-injury	8/11	5.1 ± 0.5	3.5 ± 0.5	11/11	4.5 ± 0.6	5.2 ± 0.8
R-injury + R-sectioning	3/10 ^b	5.5 ± 0.4	1.7 ± 0.3 ^c	10/11	6.9 ± 0.9	4.6 ± 0.9

^aOvulation rates and numbers of ova shed (means ± standard error of the means) by the left or right ovary of rats treated with left (L-sectioning) or right (R-sectioning) SON sectioning; with left (L-injury) or right (R-injury) SCN injury or with unilateral SCN injury followed by sectioning of the SON ipsilateral to the injured SCN (L-injury + L-sectioning; R-injury + R-sectioning). Treatments were performed to rats on proestrus day between 11.00 and 11.30 or 17.00 and 17.30 hours. The animals were sacrificed 24 hours after surgery.

^b*P* < .05 versus R-Sectioning (Fisher exact test).

^c*P* < .05 versus right ovary of animals with R-Sectioning or R-Injury (Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney *U* test).

SCN injury at 17.00 hours. Rats in the unilateral and bilateral SCN injury treatment groups showed similar progesterone and estradiol levels as its corresponding sham surgery group. Rats with left SCN injury treatment showed higher testosterone levels than its corresponding sham surgery group. Such difference was not observed in rats with right or bilateral SCN injury treatment (Figure 5).

The 2-way ANOVA test shows that unilateral SCN injury treatment at 11.00 hours resulted in higher testosterone levels than in animals treated at 17.00 hours ($F_{1, 25} = 44.46$; $P < .0001$) but no apparent effects were observed between treatments and hours ($F_{1, 25} = 1.187$, $P = .2863$). Animals with bilateral SCN injury treatment at 11.00 hours showed higher estradiol levels than rats treated at 17.00 hours ($F_{1, 31} = 13.85$, $P < .0008$) and significant effects between treatments and hours ($F_{2, 31} = 3.490$; $P < .0429$).

Effects of Unilateral SON Sectioning to Animals With Unilateral SCN Injury Treatment

Ovulation. Similar ovulation rate and number of ova shed were observed between rats treated with left SCN injury, left SON sectioning, or left SCN injury followed by left SON sectioning at 11.00 or 17.00 hours (Table 3). Rats with right SCN injury followed by right SON sectioning treatment at 11.00 hours showed a lower ovulation rate than the animals with only right SON sectioning, whereas the number of ova shed was lower than in rats treated with only right SON sectioning or right SCN injury (Table 3).

Ovarian morphology. Figure 3 shows the large preovulatory follicles in nonovulating rats treated at 11.00 hours with right SCN injury followed by right SON sectioning (Figure 3C) showed signs of atresia and free ova in the follicular antrum, while atretic follicles were observed in animals treated at 17.00 hours (Figure 3D).

Effects of the SON sectioning to animals with SCN injury on hormone levels

SCN injury + SON sectioning treatment at 11.00 hours. Progesterone levels were higher in rats treated with left SCN injury followed by left SON sectioning than in rats with only left SCN injury treatment. Progesterone levels were lower in rats treated with right SCN injury followed by right SON sectioning than in rats with left SCN injury followed by left SON sectioning treatment. Regardless of the SCN side treated, testosterone and estradiol levels were lower in rats treated with unilateral SCN injury followed by unilateral SON sectioning than rats with unilateral SCN injury treatment only (Figure 6).

SCN injury + SON sectioning treatment at 17.00 hours. No difference in progesterone levels was observed between animals with unilateral SCN injury followed by unilateral SON sectioning treated and rats with unilateral SCN injury or unilateral SON sectioning.

Testosterone levels in rats with left SCN injury followed by left SON sectioning were lower than in left SCN injury or left SON sectioning groups treated; the animals with right SCN injury followed by right SON sectioning showed lower testosterone levels than the animals treated with right SON sectioning.

Estradiol levels were higher in rats treated with right SCN injury followed by right SON sectioning than in rats treated with right SCN injury or right SON sectioning or with left SCN injury followed by left SON sectioning (Figure 6).

The 2-way ANOVA test shows that animals treated with right SCN injury followed by right SON sectioning at 11.00 hours showed lower estradiol levels than rats treated at 17.00 hours ($F_{1, 23} = 12.91$; $P < .0015$) and with significant effects between treatments and hours ($F_{1, 23} = 20.74$; $P < .0001$).

Discussion

Present results indicate that on proestrus day the neural signals arising from the right or both SONs regulate on stimulating

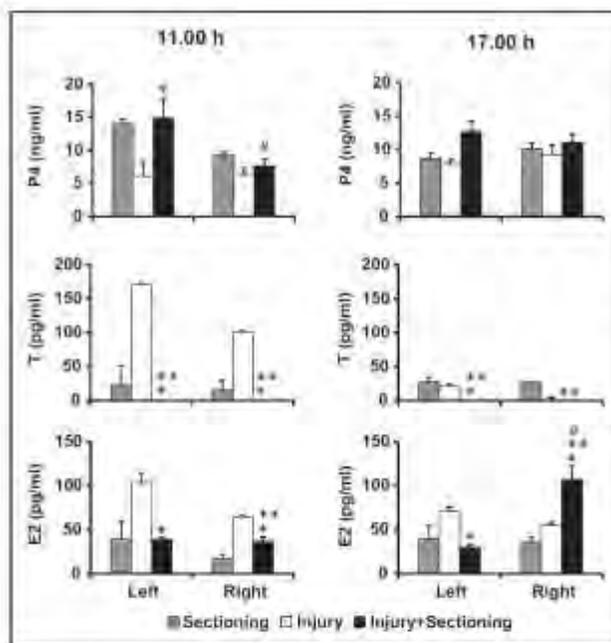


Figure 6. Effects on hormones levels resulting from the unilateral injury to the suprachiasmatic nucleus (SCN) followed by unilateral sectioning of the superior ovarian nerve (SON). Mean \pm standard error of the mean of progesterone (P4, ng/mL), testosterone (T, pg/mL), and estradiol (E2, pg/mL) serum levels in rats treated with left or right SCN injury, left or right SON sectioning, or unilateral SCN injury followed by unilateral sectioning of the SON ipsilateral to the injured SCN (left or right injury + sectioning). Treatments were performed to rats on proestrus day between 11.00 and 11.30 or 17.00 and 17.30 hours. The animals were sacrificed 24 hours after treatment ($n = 8$ per group). * $P < .05$ versus corresponding SCN injured group; ** $P < .05$ versus right sectioning group; # $P < .05$ versus left injury + sectioning (1-way analysis of variance followed by Tukey test).

way ovulation process, with a greater effect on the afternoon of proestrus. Hormone secretion is regulated differently on stimulating or inhibitory ways depending on the hormone studied and the time of day.

We have previously shown that in adult rats, the unilateral or bilateral sectioning of the SON resulted in lower ovulation rates and number of ova shed by ovulating animals.²³

Injecting human chorionic gonadotropin (hCG) to adult rats with unilateral or bilateral SON sectioning treatment did not restore ovulation rates nor the number of ova shed by denervated ovaries.^{23,24} In prepubertal rats with unilateral or bilateral SON sectioning, injecting hCG or pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) or the sequential injection of PMSG followed 56 hours later with hCG did not restore ovulation.²⁵ The results of these studies suggest that the neural innervation provided by the SON modulates the reactivity of the follicular compartment to gonadotropins.

In the present study, the lower number of ova observed in rats treated with unilateral or bilateral SON sectioning at 11.00 or 17.00 hours suggests that for the normal response of

preovulatory follicles to LH requires some types of neural information arriving through the SON. Since ovulation rates were not modified in rats treated at 11.00 but were lower in animals treated at 17.00 hours, we presume that the reduced follicular growth and lack of new corpora lutea are due to a lower sensitivity of the follicles to gonadotropins, and not to a failure in gonadotropins secretion.

According to Espey,²⁶ LH induces ovarian hyperemia, vasodilatation, edema, and even extravasation of blood in ovulatory follicles. Zackrisson et al²⁷ concluded that acute blood flow reduction during the ovulatory interval reduces ovulation rate in the rat. Electrical stimulation of the SON decreases ovarian blood flow.¹⁰ The SON carries fibers containing NA, NPY, and VIP.² Both NA and NPY stimulate the vasoconstriction of ovarian arteries, suggesting that a decrease in the ovarian blood supply may be related to increases in NA and NPY.³⁸ The electroacupuncture at the level of the segment from which the ovarian sympathetic nerve emerge (T9–T10 and L3–L5) increases NPY concentrations in the follicular fluid.³⁹ According to Yao et al,⁴⁰ VIP induced a dose-related relaxation of NA-precontracted vessels, while NPY markedly reversed the relaxations induced by VIP. Then, we presume that the lower ovulation rates and number of ova shed observed in rats with right or bilateral SON sectioning treatment at 17.00 hours were caused by the lack of NA resulting from SON sectioning treatment and the rearrangement of neural factors that modify the sensibility of the follicles to gonadotropin required for ovulation to occur.

Consequently, the present results may extend our knowledge concerning the neural regulation of ovulatory functions after the LH peak (17.00 hours of proestrus). This study is the first to show that after the LH peak the neural information from SON is crucial for successful ovulation. Thus, it is possible that circadian signals may regulate these ovarian neuroendocrine changes necessary for ovulation, perhaps through neural signals from SCN.

In the classical study by Everett and Sawyer,⁴¹ the scientists proposed that in rats on proestrus day, between 14.00 and 16.00 hours, there is "a 24-hour periodicity in the 'LH-release apparatus' of female rats, disclosed by barbiturate sedation." In other days of the estrous cycle, the presence of such periodicity in the LH-release apparatus was described by Dominguez and Smith.⁴² According to Terasawa et al,²² rats on proestrus treated with bilateral SCN injury in the morning (9.00–10.00 hours) did not show changes in ovulation the next day, though ovulation was blocked when the treatment was performed between 12.00 and 14.00 hours.²⁷ In the present study, rats with bilateral SCN injury treatment at 11.00 hours did not ovulate, suggesting that between 11.00 and 14.00 hours the signals from both SCN are essential for GnRH secretion and ovulation. This fact is supported by the observed restoration of ovulation after injecting LH-RH to animals with bilateral SCN injury.

In rats on proestrus day, the unilateral SCN injury (left or right) treatment at 09.00 hours resulted in anovulation.⁴³ Such effect was not observed in the present study, suggesting that the neural signals from the SCN that participate in ovulation regulation vary along the time of day.

In the present study, the right ovary of rats with right SCN injury treatment released lower numbers of ova, suggesting that the neural signals from the right SCN participate in regulating ovulation in a stimulating and lateralized way. This regulatory information may be carried through the SON, since right SON sectioning to animals with right SCN injury treatment at 11.00 hours increased the inhibitory effect on ovulation rate and number of ova shed by the right ovary resulting from the right SCN injury treatment.

Experimental data have suggested that the brain controls ovarian functions through multisynaptic pathways and that the left ovary receives denser innervation from the brain stem and the hypothalamus than the right ovary.⁴⁴

Zhang and Aguilar-Roblero²⁵ showed the presence of a clear rhythm in the mean firing frequency in *in vitro* neurons from both SCN sides of male rats. When Zhang and Aguilar-Roblero compared the data between each side of the SCN they observed that the electrical activity from the left SCN was basically unimodal while was bimodal of the right side of SCN. These results were interpreted as a suggestion of asymmetrical activity patterns from each side of the SCN, supporting the hypothesis of independent oscillators in each SCN, and that the observed asymmetry could reflect a functional lateralization of brain organization.

In the present study, the effects on ovulation resulting from the SCN injury do not parallel the changes observed on steroid levels. This suggests that although the endocrine signals that regulate ovulation and hormones secretion are the same, the regulatory neuroendocrine mechanisms are dissimilar.

During the morning of proestrus, activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis results in increases in adrenocorticotropic hormone, corticosterone, and progesterone serum levels.⁴⁵ We have previously shown that in rats on proestrus day, the adrenals are the main source of progesterone levels.^{9,46} Consequently, we presume that the lower progesterone levels observed in rats with left SCN injury treatment is due to lower adrenal progesterone secretion.

Since the left SCN injury treatment at 11.00 hours did not modify testosterone levels, the low level of testosterone observed in rats with the right SCN injury treatment suggests that the neural information arriving to the ovaries from the right SCN is necessary for regulating testosterone secretion.

Similarly, since unilateral SCN injury treatment did not modify estradiol levels, it appears that the neural information from either SCN is sufficient to maintain normal estradiol secretion levels.

Present findings indicate that, irrespective of the time of day, the unilateral or bilateral SON sectioning did not modify progesterone; the bilateral SON sectioning treatment at 17.00 hours yielded higher testosterone levels; and estradiol levels were modified according to time of treatment and the nerve sectioned. As was proposed by Flores et al.,⁹ the present findings suggest that changes in ovarian steroid hormone levels resulting from SON denervation reflect changes in ovarian sensitivity to LH and that the effects also depend on the time of day of treatments.

According to Gerendai et al.,²⁴ Domínguez and Cruz-Morales,⁴⁷ and Cruz et al.,⁴⁸ the SON and the vagus nerve are neural pathways connecting the central nervous system and the ovaries. In the present study, we explored if the SCN uses to SON as part of one of the neural pathway regulating ovarian steroid hormones secretion. We found that unilaterally SON sectioning modifies the neural signals from the SCN regulating progesterone, testosterone, and estradiol secretion. These results suggest that the SON is one of the neural pathways connecting the SCN and the ovaries.

Several studies have shown that the neural mechanisms regulating ovarian steroid hormones secretion vary according to the hormone studied.^{31,49} In an *ex vivo* cellae ganglia-SON-ovary left system model on proestrus day, adding NA or acetylcholine to the ganglion compartment predominantly induced the ovarian release of androstenedione and estradiol and inhibited progesterone release.⁵⁰ According to Uchida and Kagitani¹¹ and Kagitani et al.,⁵¹ the electrical stimulation of the right SON affects different neural mechanisms regulating testosterone and estradiol secretion. The activation of alpha1-adrenoceptors decreased testosterone levels, whereas the activation of alpha2-adrenoceptors reduced estradiol secretion. According to the Uchida and Kagitani,¹¹ the lower secretion of estradiol resulting from SON stimulation is independent of the reduction in testosterone secretion.

Rosas et al.⁴² showed that the effects on progesterone, testosterone, and estradiol serum levels resulting from VIPergic stimulation depend on the time elapsed between treatment and autopsy and that these effects vary along the estrous cycle. Twenty four hours after VIPergic stimulation of the left ovary on proestrus day yielded higher testosterone and estradiol levels, while stimulating the right ovary yielded higher estradiol levels.⁵²

According to Garraza et al.,⁵³ overstimulating the ovaries obtained from rats on diestrus-1 or diestrus-2 day with NA, NPY, or VIP for 30 minutes modifies progesterone secretion in different ways, depending on the neurotransmitter used and the day of the cycle treatment was applied. Ovaries from rats on diestrus-1 day incubated with NA, VIP, or NPY yielded lower progesterone levels than controls, whereas ovaries from rats on diestrus-2 yielded higher progesterone levels. The overstimulation with NPY + NA to ovaries from rats on diestrus-1 day resulted in lower progesterone secretion than ovaries treated with NPY alone. In turn, NPY + NA treatment to ovaries obtained from rats on diestrus-2 day blocked the increase of progesterone secretion with NPY alone. Overstimulation with VIP + NA did not modify the effects of VIP alone.⁵³ Then, since the SON provides the ovaries with neural information using NA, VIP, and NPY, the effects of SON sectioning represent the lack of this interaction of neural information using NA, VIP, and NPY as neurotransmitter on steroidogenesis regulation.

Taken together, the present results support Kennaway's¹² and Sellix's¹³ suggestions that the sympathetic innervation of the ovary may be influenced by the SCN and that the SCN modulates the timing of the ovarian clock via autonomic

nervous cues. The present results also suggest that on proestrus day, the SCN regulates steroid hormones secretion by different mechanisms and that these mechanisms vary according to the hormone studied and the time of day. The information from the right SCN carried by the SON plays a stimulatory role in the follicle's reactivity to LH that results in ovulation. Neural information from the left SCN does not appear to be essential for this process.

Authors' Note

D.A.R., R.D., and L.M.-L. planned the experiments. D.A.R., E.V., and A.J.G. performed experiments. D.A.R., E.V., R.D., C.M., and L.M.-L. devised the study, participated in the discussion of the results, and cowrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript. All experiments were carried out in strict accordance with the Mexican Law of Animal Treatment and Protection Guidelines and followed the Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999 specifications.

Acknowledgments

We want to thank for the support given to the realization of this study by the "Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM" and CONACyT. This work is a requirement for obtaining of the degree of Doctor in Biological Sciences. The authors thank Roberto Chavira for participating in performing the RIA's to measure the steroids hormones levels and thank Álvaro Domínguez-González for his assistance in English language editing.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, financial, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT (grant IN-217016) and CONACyT (grant 236908).

References

- Herbison AE. Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network. In: Neill JD, ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier; 2006:1415-1482.
- Miller BH, Takahashi JS. Central circadian control of female reproductive function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;4:195-203.
- Lawrence II Jr, Burden HW. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec*. 1980;196(1):51-59.
- Klem CM, Burden HW. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett*. 1988;85(2):217-222.
- Dissen GA, Ojeda SR. Ovarian innervation. In: Knobil E, Neill JD, eds. *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego, CA: Academic Press; 1999:583-589.
- Aguado LI. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc Rev Tech*. 2002;59(6):462-473.
- Chávez R, Morales L, González ME, Domínguez R. Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies. *Med Sci Res*. 1994;22:789-790.
- Aguado LI, Ojeda SR. Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology*. 1984;114(5):1944-1946.
- Flores A, Velasco J, Gallegos AI, Mendoza FD, Everardo PM, Cruz ME. 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. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:34.
- Kagitani F, Uchida S, Hotta H. Effects of electrical stimulation of the superior ovarian nerve and the ovarian plexus nerve on the ovarian estradiol secretion rate in rats. *J Physiol Sci*. 2008;58(2):133-138.
- Uchida S, Kagitani F. Effects of electrical stimulation of autonomic nerves to the ovary on the ovarian testosterone secretion rate in rats. *Aulan Neurosci*. 2014;180:48-52.
- Kennaway DJ. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum Reprod Update*. 2005;11(1):91-101.
- Sellix MI. Circadian clock function in the mammalian ovary. *J Biol Rhythms*. 2015;30(1):7-19.
- Cruz ME, Jaramillo LP, Domínguez R. Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J Endocrinol*. 1989;123(3):437-439.
- Williams WP III, Kriegsfeld LJ. Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. *Front Endocrinol*. 2012;3:60.
- Simonneaux V, Bahougné T. A multi-oscillatory circadian system times female reproduction. *Front Endocrinol*. 2015;6:157.
- Antunes-Rodrigues J, McCann SM. Effects of supra-chiasmatic lesions on the regulation of luteinizing hormone secretion in the female rat. *Endocrinology*. 1967;81(3):666-670.
- Brown-Grant K, Raisman G. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the supra-chiasmatic nuclei in female rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1977;198(11312):279-296.
- Wiegand SJ, Terasawa E, Bridson WE, Goy RW. Effects of discrete lesions of preoptic and supra-chiasmatic structures in the female rat. Alterations in the feedback regulation of gonadotropin secretion. *Neuroendocrinology*. 1980;31(2):147-157.
- Wiegand SJ, Terasawa E. Discrete lesions reveal functional heterogeneity of supra-chiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology*. 1982;34(6):395-404.
- Ma YJ, Kelly MJ, Ronnekleiv OK. Pro-gonadotropin-releasing hormone (pro-GnRH) and GnRH content in the preoptic nucleus/supra-chiasmatic nucleus lesioned rats. *Endocrinology*. 1990;127(6):2654-2664.
- Terasawa EI, Wiegand SJ, Bridson WE. A role for medial preoptic nucleus on afternoon of proestrus in female rats. *Am J Physiol*. 1980;238(6):E533-E539.
- Kimura F, Kawakami M. Reanalysis of the preoptic afferents and efferents involved in the surge of LH, FSH and prolactin

- release in the proestrous rat. *Neuroendocrinology*. 1978;27(1-2):74-85.
24. 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(2):179-188.
 25. Zhang L, Aguilar-Roblero R. Asymmetrical electrical activity between the supra-chiasmatic nuclei in vitro. *NeuroReport*. 1995;6(3):537-540.
 26. de la Iglesia HO, Meyer J, Carpino A Jr, Schwartz WJ. Antiphase oscillation of the left and right supra-chiasmatic nuclei. *Science*. 2000;290(5492):799-801.
 27. 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 humoral pathway. *J Neurosci*. 2003;23(19):7412-7414.
 28. Bartness TJ, Song CK, Demas GE. SCN efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *J Biol Rhythms*. 2001;16(3):196-204.
 29. Kalsbeek A, La Fleur S, Van Heijningen C, Buijs RM. Supra-chiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J Neurosci*. 2004;24(35):7604-7613.
 30. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:517-549.
 31. Morales-Ledesma L, Vieyra E, Ramírez DA, et al. Effects on steroid hormones secretion resulting from the acute stimulation of sectioning the superior ovarian nerve to pre-pubertal rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;10:88.
 32. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. New York, NY: Elsevier Academic Press; 2004.
 33. Chávez R, Carrizosa L, Domínguez R. Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Med Sci Res*. 1991;19:41-42.
 34. Domínguez R, Cruz ME, Chávez R. Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. In: Hirshfield AN, ed. *Growth Factors and the Ovary*. New York, NY: Plenum Press; 1989:321-325.
 35. Morales L, Chávez R, Ayala ME, Domínguez R. Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration. *J Endocrinol*. 1998;158(2):213-219.
 36. Espey L. Ovulation as an inflammatory reaction—a hypothesis. *Biol Reprod*. 1980;22(1):73-106.
 37. Zackrisson U, Mikami M, Peterson MC, Nilsson B, Janson PO, Brämström M. Evidence for the involvement of blood flow-related mechanisms in the ovulatory process of the rat. *Hum Reprod*. 2000;15(2):264-272.
 38. Markiewicz W, Jaroszewski JJ, Bossowska A, Majewski M. NPY: its occurrence and relevance in the female reproductive system. *Folia Histochem Cytobiol*. 2003;41(4):183-192.
 39. Stener-Victoria E, Kobayashi R, Kurosawa M. Ovarian blood flow responses to electro-acupuncture stimulation at different frequencies and intensities in anaesthetized rats. *Auton Neurosci*. 2003;108(1-2):50-56.
 40. Yao W, Sheikh SP, Olesen B, Jørgensen JC. Vascular effects and cyclic AMP production produced by VIP, HM, PHV, PACAP-27, PACAP-38, and NPY on rabbit ovarian artery. *Peptides*. 1996;17(5):809-815.
 41. 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.
 42. Domínguez R, Smith ER. Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology*. 1974;14(3):212-223.
 43. Silva CC, Benitez DP, Monroy J, Ayala ME, Flores A, Domínguez R. Unilateral lesion of the supra-chiasmatic nucleus performed at diestrus-2 or proestrus induces a blockade of ovulation in the rat [abstract]. *I Congreso de FALAN and LV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*. México, Cancún: Poster TH142; 2012. Web site. <http://www.smef.org.mx/sitio/documentos/memorias2012.pdf>
 44. Tóth IE, Wiesel O, Boldogkői Z, Bálint K, Tapaszti Z, Gerendai I. Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microsc Res Tech*. 2007;70(8):710-718.
 45. Fraites MJ, Cooper RL, Buckalew A, Jayaraman S, Mills L, Laws SC. Characterization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to atrazine and metabolites in the female rat. *Toxicol Sci*. 2009;112(1):88-99.
 46. Flores A, Meléndez G, Palafox MT, et al. The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine*. 2005;28(2):145-151.
 47. Domínguez R, Cruz-Morales SE. The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinol Metabol Syndrome*. 2011;S4:001. doi:10.4172/2161-1017.S4-001.
 48. Cruz ME, Olvera E, Pérez MJ, et al. Effects of unilaterally microinjecting ethanol in the preoptic-anterior hypothalamic areas of rats on ovulation. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(6):1611-1621.
 49. Morales-Ledesma L, Ramírez DA, Vieyra E, et al. Effects of acute unilateral ovariectomy to pre-pubertal rats on steroid hormones secretion and compensatory ovarian responses. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:41-48.
 50. Delgado SM, Escudero CG, Casais M, et al. Ovarie physiology in the first oestral cycle: influence of noradrenergic and cholinergic neural stimuli from coeliac ganglion. *Steroids*. 2010;75(10):685-694.
 51. Kagitani F, Uchida S, Hotta H. The role of alpha adrenoceptors in the vascular and estradiol secretory responses to stimulation of the superior ovarian nerve. *J Physiol Sci*. 2011;61(3):247-251.
 52. Rosas G, Ramírez MI, Linares R, Trujillo A, Domínguez R, Morales-Ledesma L. Asymmetric steroidogenic response by the ovaries to the vasoactive intestinal peptide. *Endocrine*. 2015;48(5):968-977. doi:10.1007/s12020-014-0449-x.
 53. Garraza MH, Aguado LJ, De Bortoli MA. In vitro effect of neuropeptides on ovary or coeliac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat. *Med Sci Monit*. 2004;10(12):BR440-BR446.