



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

***Participación del sistema colinérgico del núcleo  
supraquiasmático en el mantenimiento de las  
funciones ováricas en la mañana del proestro***

**TESIS**

***Que para obtener el título de:***

**BIÓLOGO**

***Presenta:***

**IVAN SALINAS BECERRIL**

***Directora de tesis: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA***



**CIUDAD DE MÉXICO**

**OCTUBRE 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

***Participación del sistema colinérgico del núcleo  
supraquiasmático en el mantenimiento de las  
funciones ováricas en la mañana del proestro***

**TESIS**

***Que para obtener el título de:***

**BIÓLOGO**

***Presenta:***

**IVAN SALINAS BECERRIL**

***Directora de tesis: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA***

***INVESTIGACIÓN REALIZADA GRACIAS AL PROGRAMA***

***UNAM-DGAPA-PAPIIT clave IN217016***





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno **SALINAS BECERRIL IVAN**, con número de cuenta **308299083**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **03 de octubre de 2017** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

**VOCAL** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

**SECRETARIO** M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

**SUPLENTE** Dra. DEYRA DE LOS ÁNGELES RAMÍREZ  
HERNÁNDEZ

**SUPLENTE** Dra. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

*[Handwritten signatures of the jury members]*

El título de la tesis que presenta es: **Participación del sistema colinérgico del núcleo supraquiasmático en el mantenimiento de las funciones ováricas en la mañana del proestro.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad de México, a 15 de agosto de 2017  
*[Signature]*  
**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## AGRADECIMIENTOS

*A mi Dios por darme fuerza y sabiduría en este camino lleno de obstáculos que el día de hoy me permitieron culminar un logro importante en mi vida.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Por darme las herramientas necesarias para ser un profesional íntegro, por ser parte de mi crecimiento académico, personal y profesional.*

*Al proyecto CONACyT 236908 por haber apoyado la investigación de la presente tesis.*

### **A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

- **DRA. PATRICIA ROSAS SAUCEDO**
- **M. en I.B.S.H. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ**
- **DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**
- **DRA. ELIZABETH VIEYRA VALDÉZ**
- **DRA. DEYRA DE LOS ÁNGELES RAMÍREZ HERNÁNDEZ**

*Gracias por ser parte de este logro, por sus consejos y aportaciones a la realización de esta tesis, por su amistad y paciencia.*

*A la Dra. Leticia Morales Ledesma Gracias por su tiempo y paciencia en el desarrollo de esta tesis, por sus consejos de vida y profesionales, por brindarme su amistad en todo este tiempo dentro de su equipo de trabajo, infinitas gracias, fue un placer haber trabajado con usted.*

*Al grupo de trabajo del bioterio y muy especial a la Dra. Adriana, Dra. Elizabeth y al Dr. Román por la proporción y el cuidado de los animales requeridos para la investigación de la presente tesis, por su conocimiento brindado a lo largo del desarrollo de la tesis, gracias.*

*Al Bio. Roberto Chavira, por su apoyo en la cuantificación de hormonas que se usaron en el presente estudio.*

## ***A LA DIVISIÓN DE N.S.Q:***

*Porque en este tiempo hablamos el mismo idioma, nos comprendimos y complementamos, formando un equipo de trabajo excelente, gracias por su amistad, consejos y pláticas constructivas mejorando la visión general de nuestro lenguaje.*

*A la **Dra. Ely Vieyra**. Gracias por todo el conocimiento brindado, por apoyarme y ayudarme en mi trabajo, por haberme aceptado y dado la confianza de trabajar contigo, fue un gusto trabajar juntos pues me llevo de ti mucho de lo que aprendí en laboratorio.*

*A la **Dra. Deyra**. Gracias por tus consejos y apoyo en la comprensión del tema, por tu tiempo cuando tenía dudas y por tu paciencia cuando necesitaba una explicación.*

*A **Julio Cesar**. Gracias amigo por apoyarme y ayudarme, por ser parte de un equipo excelente de trabajo y haberme brindado tu amistad cuando inicio este viaje hacia un mundo circadiano.*

*A **Alondra Grisel** porque en poco tiempo formaste parte del equipo y comprendiste tanto que fue muy grato trabajar junto a ti, gracias por tu tiempo y dedicación.*

*A **David Ramos**. Gracias amigo pues aunque no pudimos trabajar como esperaba, siempre tenías algo nuevo que aportar al equipo.*

## ***A MIS COMPAÑEROS DE LA UNIDAD:***

*Más que un laboratorio este espacio se convierte en un hogar y cada uno de nosotros somos parte de esta familia y yo estoy agradecido de haber pertenecido a ella. Gracias a cada uno de ustedes que hizo posible este logro personal para mí y espero esta familia trascienda más allá de estas 4 paredes pues yo siempre los tendré presente.*

*A la **Dra. Rosa Linares y Dra. Gabriela Rosas**. Por su amistad durante este tiempo, por sus consejos y tiempo dedicado a mejorar mi trabajo.*

*A **Lizz, Julio y Daniel**. Por su amistad cuando recién ingrese al equipo, por ayudarme y haberme integrado al equipo, por los ratos de alegría y risas dentro de laboratorio y por haber permitido que esta amistad trascendiera a lo largo de mi estancia en laboratorio.*

*A **Misael y Azucena**. Gracias por su amistad y por los ratos agradables que pasamos dentro y fuera de laboratorio, por las charlas matutinas y por haberme brindado consejos cuando los necesite.*

*A **Wendy, Rocio Sarahi, Karina, Diana Tanaeri, Diana D., Hugo, Fernanda, y Valeria**. Por los momentos que pasamos dentro de laboratorio, por su amistad y por haber hecho del laboratorio 7 P.B un lugar agradable donde trabajar.*

### ***A MIS COMPAÑEROS DE CARRERA:***

*Gracias por su amistad a lo largo de la carrera, por los momentos agradables en clase y fuera de ellas, me demostraron que la amistad no tiene fecha de vencimiento y espero que fuera de la facultad trascienda nuestra amistad: **Lupita, Lizz, Karen, Eric y Jesús.***

***Elizabeth**, gracias por todos y cada uno de los momentos que vivimos dentro y fuera de la facultad, haberte conocido fue lo más grato de la carrera, siempre serás aquella colega que estuvo en momentos difíciles y en mi crecimiento profesional, miles de gracias.*

### ***A MIS FAMILIARES:***

*Porque sé que han estado en mi camino por una razón y cada consejo que he recibido de ustedes ha servido para ser lo que soy ahora, agradezco su tiempo y dedicación.*

*A **Jennifer Hernández**. Por estar conmigo apoyándome en todo momento, Gracias por ser parte de este logro.*

*A **Antonio Isidoro**. Gracias por ser un apoyo en momentos complicados, gracias por ser parte de este logro y por ser mi ingeniero en sistemas personal.*

***Fam. Mendiola Becerril**. Gracias por todo lo que me han apoyado son una parte importante de este logro pues siempre han estado dándome ánimos para salir adelante, Gracias.*

***Fam. Alvarado Vargas**. Gracias por sus consejos, por su tiempo y apoyo, Gracias.*

## **DEDICATORIAS**

### ***A mi familia:***

*Que siempre estuvo conmigo incondicionalmente y apoyándome en todo momento, por ser parte de este logro tan importante y por ser mi impulso a salir adelante día con día, ayudando a moldearme y ser lo que hoy en día soy. Gracias por todo los amo!!!*

***A mi padre:*** *Por ser un ejemplo perfecto de trabajo, dedicación y valores. Por ser mi poyo en momentos difíciles y ser mi modelo a seguir, por enseñarme el valor del esfuerzo y el trabajo, gracias por su apoyo.*

***A mi madre:*** *Gracias por su amor y apoyo incondicional, por su fortaleza y consejos, por ser mi compañía en noches de desvelo y por ser mi motor que me impulsa cuando no tengo fuerzas para seguir y por ser cómplice en mis metas y logros en la vida.*

***A mi hermano Erick:*** *Gracias hermano por ser mi apoyo académico, por darme el ejemplo de que todo se puede si uno se lo propone, por darme retos y soluciones a la vida, gracias por tus consejos.*

***A mi hermana Laura:*** *Gracias hermana por tu apoyo en momentos difíciles, por tu ejemplo y por tu dedicación en mi enseñanza.*

***A Santiago:*** *Gracias pues aunque sé que pasaran unos años más hasta que puedas leer esto, siempre has alegrado mis días con ese carisma que solo tú tienes.*



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<i>i</i>
<b>RESUMEN</b> .....	<i>ii</i>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<i>iv</i>
<b>1. EJE HIPOTÁLAMO – HIPÓFISIS – OVARIO</b> .....	<b>1</b>
• <i>Hipotálamo</i> .....	<i>1</i>
• <i>Hipófisis</i> .....	<i>5</i>
• <i>Ovario</i> .....	<i>7</i>
○ <i>Foliculogénesis ovárica</i> .....	<i>8</i>
○ <i>Esteroidogénesis ovárica</i> .....	<i>11</i>
- <i>Biosíntesis de las hormonas esteroideas</i> ...	<i>12</i>
- <i>Teoría de la doble célula</i> .....	<i>14</i>
<b>2. NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (NSQ)</b> .....	<b>16</b>
• <i>Ritmos Biológicos</i> .....	<i>16</i>
• <i>Citoarquitectura y Quimioarquitectura</i> .....	<i>17</i>
• <i>Aferencias y Eferencias</i> .....	<i>21</i>
<b>3. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GnRH POR EL NSQ</b> .....	<b>23</b>
• <i>GnRH</i> .....	<i>26</i>
<b>4. SISTEMA COLINÉRGICO</b> .....	<b>28</b>
• <i>Receptores colinérgicos (mAChR) (nAChR)</i> .....	<i>30</i>
• <i>Sistema colinérgico del NSQ</i> .....	<i>32</i>
• <i>Receptores colinérgicos en el NSQ</i> .....	<i>34</i>

<b>5. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS.....</b>	<b>35</b>
• <i>Atropina</i> .....	37
• <i>Carbacol</i> .....	38
<b>6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>40</b>
<b>7. HIPÓTESIS.....</b>	<b>41</b>
<b>8. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
<b>9. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>43</b>
<b>10. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>61</b>
<b>12. CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>13. MODELOS.....</b>	<b>73</b>
<b>14. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>76</b>

## ABREVIATURAS

<b>Acetil – CoA</b> Acetil coenzima A	<b>IGL</b> Hojuela intergeniculada
<b>ACh</b> Acetilcolina	<b>LH</b> Hormona Luteinizante
<b>AHA</b> Área hipotalámica anterior	<b>mAChRs</b> Receptores colinérgicos muscarínicos
<b>ARC</b> Núcleo arqueado	<b>nAChRs</b> Receptores colinérgicos nicotínicos
<b>ATR</b> Atropina	<b>NSQ</b> Núcleo supraquiasmático
<b>AVP</b> Vasopresina-arginina	<b>NSQ-D</b> Núcleo supraquiasmático derecho
<b>AVPV</b> Núcleo anteroventral periventricular	<b>NSQ-I</b> Núcleo Supraquiasmático izquierdo
<b>CCh</b> Carbacol	<b>POA</b> Área preóptica anterior
<b>ChAT</b> Colino acetil transferasa	<b>PRL</b> Prolactina
<b>Er<math>\alpha</math></b> Receptores a estrógenos alfa	<b>PVN</b> Núcleo paraventricular
<b>FSH</b> Hormona folículo estimulante	<b>RNA<sub>m</sub></b> Ácido ribonucleico mensajero
<b>GABA</b> Ácido $\gamma$ aminobutírico	<b>SNC</b> Sistema nervioso central
<b>GLU</b> Glutamato	<b>SNP</b> Sistema nervioso periférico
<b>GnRH</b> Hormona liberadora de gonadotropinas	<b>TRH</b> Tracto retino-hipotalámico
<b>hCG</b> Gonadotropina coriónica humana	<b>VAcHT</b> transportador vesicular de ACh
	<b>VIP</b> Péptido intestinal vasoactivo

## RESUMEN

El núcleo supraquiasmático (NSQ) es una estructura par, localizado en el hipotálamo que controla las funciones circadianas en los mamíferos.

Diversas evidencias describen la participación del NSQ en la secreción de neurotransmisores que estimulan la ovulación y la secreción de hormonas esteroides, uno de los sistemas de neurotransmisión es el colinérgico, por donde transcurre acetilcolina (ACh).

El NSQ se comunica por vías simpáticas y parasimpáticas a órganos periféricos regulando su actividad y garantizando su correcto funcionamiento.

Se ha sugerido que el sistema colinérgico del NSQ participa de manera estimulante en la regulación de las funciones ováricas, ya que el bloqueo de los receptores muscarínicos del NSQ con atropina (antagonista no selectivo), resulta en el bloqueo de la ovulación y disminución de la concentración de las hormonas esteroides. En el presente estudio se analizaron los efectos de la estimulación del sistema colinérgico del NSQ por la administración de carbacol (agonista no selectivo de los receptores colinérgicos) a las 9:00 horas del proestro, sobre las funciones ováricas.

Los resultados del estudio mostraron que la micro-inyección de carbacol en el NSQ-I disminuyó el porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo, mientras que en el ovario derecho no se modificó. El número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho no se modificó en comparación a su grupo con micro-inyección de solución salina. La concentración sérica de progesterona y testosterona disminuyó, mientras que la de estradiol fue mayor.

La micro-inyección de carbacol en el NSQ-D bloqueó la ovulación del ovario izquierdo en el 80% de los animales, mientras que en el ovario derecho el bloqueo fue del 50%. En comparación a su grupo con micro-inyección de solución salina, la concentración sérica de progesterona y estradiol incrementó, mientras que disminuyó la de testosterona.

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, concluimos que la información colinérgica intrínseca y aferente al NSQ, regula la liberación de GnRH y LH y con ello la ovulación. Es posible sugerir una asimetría funcional del sistema colinérgico de los NSQ's, donde el núcleo izquierdo está mayormente implicado en la regulación de la secreción de hormonas esteroides, y el lado derecho en el control de la foliculogénesis y los procesos que culminan en la ovulación.

## INTRODUCCIÓN

En todas las hembras de los mamíferos la fertilidad se mantiene por las señales neuroendocrinas transmitidas entre el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios (Levine, 2015). El control neuroendocrino de los ovarios está regulado por un mecanismo neuro-humoral, que debe de estar sincronizado pues se inicia con la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y de ciertos neurotransmisores que participan en la ovulación (Prieto y Velásquez, 2002).

La ovulación está regulada por un mecanismo circadiano. En los mamíferos el marcapasos circadiano está situado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) orquesta los ritmos circadianos (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). El NSQ es una estructura bilateral localizada en la porción dorsal del hipotálamo anterior, anatómica y funcionalmente se divide en dos porciones: *core* y *shell* (Evans y col., 2011), las cuales contienen principalmente neuronas inmunoreactivas a Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) y a Vasopresina-arginina (AVP), respectivamente.

Las neuronas VIPérgicas y AVPérgicas del NSQ proyectan de manera monosináptica a las neuronas de GnRH localizadas en el área preóptica (POA) (Van der Beek y col., 1997; Horvath y col., 1998). Estas proyecciones estimulan positivamente el aumento de GnRH/LH, además el NSQ envía proyecciones hacia el núcleo anteroventral periventricular (AVPV), donde existen neuronas productoras de glutamato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), galanina, encefalina, neurotensina y kisspeptina, este último un potente neurotransmisor estimulante de la secreción de GnRH.

Diversos sistemas de neurotransmisión regulan la actividad y comunicación del NSQ con el resto del cerebro, entre ellos el colinérgico donde la ACh actúa

como el principal mediador de su función (Earnest y Turek, 1985; Mohan y Radha, 1978; Zatz y Brownstein, 1979 y 1981; Zhang y col., 1993).

Mediante la administración de atropina (ATR) (antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos) se ha determinado el papel del sistema colinérgico del NSQ en la regulación de las funciones ováricas. En la rata adulta la micro-inyección de ATR en el NSQ a las 9:00 o 19:00 h del D1 o proestro resulta en el bloqueo de la ovulación, sólo si se realiza en la mañana del proestro. Resultados que permiten sugerir que la participación del sistema colinérgico en el proceso ovulatorio depende del día del ciclo estral y de la hora del día (Vieyra y col., 2016). Además se sugiere la existencia de un ritmo que regula la secreción de gonadotropinas y por ende de la ovulación (Domínguez y col., 1982).

En roedores la estimulación del NSQ con carbacol (CCh) (agonista no específico de los receptores colinérgicos) causa un avance de fase de la actividad alimenticia y motora (Liu y Gillette, 1996; Buchanans y Gillette, 2005).

En el presente estudio se analizó el papel del sistema colinérgico del NSQ sobre las funciones ováricas, mediante la micro-inyección de carbacol en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o núcleo supraquiasmático derecho (NSQ-D) a las 9:00 h del proestro. Así mismo, se estudió si existe una repuesta asimétrica del sistema colinérgico de los NSQ's en el control de la secreción de hormonas esteroideas y la ovulación.

## MARCO TEÓRICO

### 1. EJE HIPOTÁLAMO – HIPÓFISIS – OVARIO

#### HIPOTÁLAMO

El hipotálamo es una estructura que forma parte del sistema nervioso central (SNC), específicamente del diencefalo. Anatómicamente comprende la región del cerebro que rodea al sector inferior del tercer ventrículo. El hipotálamo está conformado por núcleos encargados de secretar factores u hormonas de liberación y factores de inhibición (Domínguez y col., 1991) (Tabla 1).

El hipotálamo regula las funciones neurales y hormonales importantes para la vida y adaptación del individuo, estas funciones neurales son de tipo conductuales (apetito, sed, conducta sexual y emociones) o neurovegetativas, integradas por parte del sistema simpático (termorregulación y regulación vasomotora) (Cabeza de Flores y Flores, 2005).

El hipotálamo comprende cuatro regiones organizadas rostro-caudalmente (Palkovits, 2000):

- **Área preóptica.** Funcionalmente forma parte del hipotálamo aunque su origen embriológico es diferente, dado que se origina del telencéfalo. En esta área se encuentran el núcleo preóptico periventricular, el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT) y el núcleo preóptico medial (NPM), el cual contiene neuronas que sintetizan GnRH, neurohormona que regulan la secreción de gonadotropinas en la adenohipófisis.



- **Zona anterior o supraóptica.** Se localiza por encima del quiasma óptico, zona donde se encuentran el núcleo supraóptico y el paraventricular que a su vez contiene al núcleo anteroventral periventricular (AVPV), donde se localizan las neuronas de kisspeptina que interactúan con las neuronas de GnRH regulando su secreción.
- **Zona media o Tuberal.** Se reconocen tres partes: hipotálamo medio basal (HMB), el dorsal (HMD) y el lateral (LHT). La región tuberal contiene tres núcleos, el ventromedial, dorsomedial y arcuato, los que proyectan sus axones hacia capilares de la eminencia media, zona donde nace el tallo hipofisario donde se localizan un gran número de neuronas productoras de factores de liberación (Haines, 2004).
- **Zona posterior o mamilar.** Constituida por los núcleos de la amígdala.

Las conexiones aferentes y eferentes de los núcleos hipotalámicos comunican a la estructura con otras áreas del sistema nervioso central. Al hipotálamo se le considera el centro de regulación neuroendocrina, autónoma y homeostática que integra los ritmos y patrones de desarrollo endógeno y genera las respuestas autónomas tempranas y respuestas endocrinas tardías (Cabeza de Flores y Flores, 2005).

**Tabla 1 Principales hormonas liberadoras – inhibidoras hipotalámicas (tomada y modificada de Domínguez y col., 1991).**

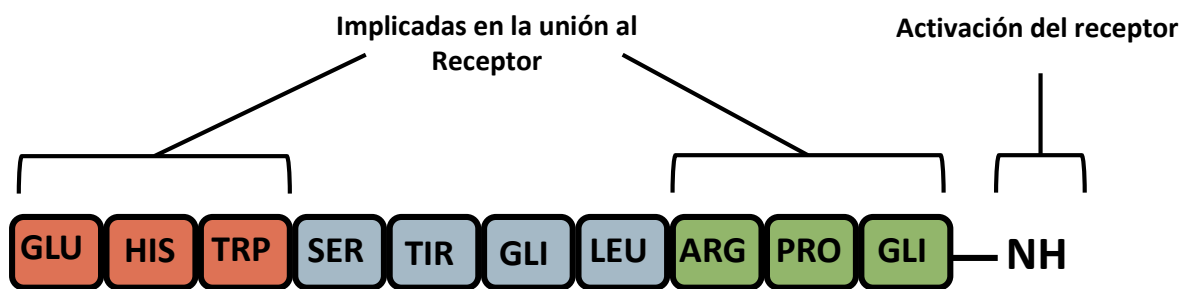
Factores hipotalámicos	Siglas
Hormona liberadora de la Hormona del Crecimiento	GHRH
Hormona inhibidora de la Hormona del Crecimiento o Somatostatina	GHIH o SST
Hormona liberadora de la Tirotropina	TRH
Hormona liberadora de las Gonadotropinas	GnRH
Hormona liberadora de Corticotropina	CRH
Hormona liberadora de Prolactina	PRH
Hormona inhibidora de la Prolactina o Dopamina	PIH o DA

El eje hipotálamo-hipófisis regula funciones endocrinas en el ovario, mediante la comunicación vascular con la hipófisis que se establece por tres sistemas de conexión: a) sistema de vasos portales largos, b) sistema de vasos portales cortos y c) el plexo tangencial del sistema infundibular. Las relaciones vasculares entre el sistema nervioso y la hipófisis conforman lo que se conoce como el sistema porta hipotálamo-hipofisario (Cabeza de Flores y Flores, 2005).

La interacción del hipotálamo con el ovario es estimulada principalmente por la producción y liberación de un decapeptido de cadena sencilla denominada Hormona Liberadora de Gonadotropinas o GnRH (Figura 1). Las neuronas GnRHérgicas tienen un origen embrionario fuera del sistema nervioso central, derivan de la placoda olfatoria durante la gestación temprana y migran hacia el hipotálamo a través de la lámina cribiforme (Prieto y Velázquez, 2002).

En el humano el gen que codifica la GnRH se encuentra en el brazo corto del cromosoma 8, aunque se ha aislado también en rata y ratón. La secuencia de

codificación transcribe una proteína precursora de 92 aminoácidos que origina la GnRH y un péptido de 56 aminoácidos llamado GAP (péptido asociado con GnRH), el cual se le asocia con la regulación de la actividad de GnRH en la hipófisis (Herbison, 2015). La GnRH hipotalámica se libera de forma pulsátil con intervalos de 70-90 minutos, y es regulada por los esteroides gonadales, y dado que la cantidad que se sintetiza es pequeña y su vida media es relativamente corta se ha sugerido que los receptores periféricos son activados mediante un mecanismo autocrino al receptor de la misma célula más que por la GnRH hipotalámica (Prieto y Velázquez, 2002).



**Figura 1.** Representación esquemática de la secuencia lineal de los aminoácidos que conforman la GnRH (Tomado y modificado de Millar y col., 2007).

Se han determinado en diversas especies de vertebrados dos o más iso-formas de GnRH. La GnRH-I considerada como el principal factor de estimulación de la ovulación y secreción de LH; GnRH-II presente en todo el tejido cerebral extrahipotalámico donde se le ha propuesto actúa como neuromodulador que coordina el comportamiento reproductivo y además regula la actividad de la neurona de GnRH-I (Flanagan y col., 1997; Millar, 2003), y la GnRH-III que regula principalmente la secreción de FSH, por lo que algunos autores la llaman FSH-RH (Herbison, 2015).

## HIPÓFISIS

La hipófisis es una pequeña glándula formada por dos componentes principales, la hipófisis posterior o neurohipófisis y la hipófisis anterior o adenohipófisis las cuales están divididas por la *pars intermedia* (Guyton y Hall, 2005; Cabeza de Flores y Flores, 2005).

La hipófisis se forma en una fase temprana de la vida embrionaria por la fusión de dos proyecciones ectodérmicas de origen diferente, donde la neurohipófisis se desarrolla a partir del ectodermo neural, mientras que la adenohipófisis lo hace a partir de una evaginación del ectodermo del estomodeo, que recibe el nombre de bolsa de Rathke. Cuando finaliza el desarrollo embrionario, la hipófisis queda constituida por dos sectores diferenciables; la porción glandular o adenohipófisis y la porción venosa o neurohipófisis (Guyton y Hall, 2005).

La neurohipófisis está constituida por tres partes: lóbulo neural o proceso infundibular, tallo infundibular y eminencia media. Se encuentra formada por la parte distal de los axones de grandes neuronas situadas en los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo, estas neuronas se organizan funcionalmente para producir dos hormonas: la vasopresina u hormona antidiurética (ADH) y la oxitocina. Sus axones largos transportan las hormonas producidas en el citoplasma celular y tras recorrer el tallo hipofisario alcanza la neurohipófisis (Cabeza de Flores y Flores, 2005).

La adenohipófisis consta de tres componentes: *pars distalis*, *pars tuberalis* y *pars intermedia* con lo que conforma casi el 80% de la glándula. Para el caso de la adenohipófisis se estableció que existen grupos celulares específicos que

sintetizan, almacenan y segregan determinados tipos de hormonas en forma de gránulos secretorios (Cabeza de Flores y Flores, 2005).

La adenohipófisis conforma el enlace endocrino entre el hipotálamo y el ovario, mediante la secreción de la hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH) (Guyton y Hall., 2005). La amplitud y longitud de los pulsos de la GnRH van a determinar la síntesis y secreción de estas dos glicoproteínas: la baja frecuencia de pulsos estimula la liberación de FSH mientras que una alta frecuencia de pulsos estimula la de LH (Herbison, 2015).

La GnRH para poder ejercer su actividad en los gonadotropos se une a receptores membranales de alta afinidad, acoplados a un segundo mensajero y dependiente de las concentraciones de calcio intra y extracelular que le permite una secreción óptima de las gonadotropinas (Prieto y Velázquez, 2002).

La FSH y la LH están compuestas por dos subunidades denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Un solo gen es el responsable de sintetizar la cadena  $\alpha$ , que es idéntica en ambas hormonas y que además comparten con otras dos glicoproteínas importantes para la reproducción, la hormona estimulante de la tiroides (TSH, por sus siglas en inglés) y la gonadotropina coriónica humana (hCG, por sus siglas en inglés). La unidad  $\beta$  le confiere la actividad biológica específica a cada una (Cabeza de Flores y Flores, 2005).

El ovario es capaz de producir hormonas esteroideas y proteicas, dentro de estas últimas las más estudiadas es la familia de las inhibinas. La inhibina es sintetizada por las células de la granulosa, la cual tiene la función de inhibir la secreción de las gonadotropinas, principalmente de FSH, mientras que la activina la estimula. Estas inhibinas químicamente son heterodímeros glicoproteicos, compuestos de dos subunidades biológicamente activas ( $\alpha$  y  $\beta$ )

unidas por un puente disulfuro, comparten la misma cadena  $\alpha$ , y es la subunidad  $\beta$  la que le confiere especificidad. Otra proteína inhibidora de la FSH, sin ninguna similitud con la inhibina es la folistatina, que *in vitro* tiene la capacidad de inhibir exclusivamente a la FSH, en menor potencia que la inhibina (Cabeza de Flores y Flores, 2005).

## OVARIO

La LH estimula sinérgicamente con la FSH el desarrollo de los folículos y en la fase folicular parece ser responsable de la secreción estrogénica. Su incremento brusco en sangre es responsable de la ruptura folicular y la ovulación, además induce la formación del cuerpo lúteo, su mantenimiento, y la secreción de andrógenos y progesterona por el mismo (Rippe, 2009).

La acción biológica de la FSH es favorecer la mitosis de las células de la granulosa, lo que estimula el crecimiento del folículo ovárico, conduciéndolo hasta diversos grados de maduración y estimula la formación de la teca, para lo cual se encuentran receptores exclusivos para esta hormona en las células de la granulosa. En el ovario induce la formación de nuevos receptores a la propia FSH y a la LH, además de que favorece el incremento en la producción de estradiol ( $E_2$ ) que a su vez provoca mayor proliferación de las células de la granulosa, maduración folicular y un incremento de receptores al propio estrógeno.

Los ovarios son glándulas pares de forma ovoidea del sistema reproductivo, en la mujer el peso oscila entre los 4 a 8 g. Se localizan detrás del peritoneo, sujeto a la parte posterior del mesovario, perteneciente al ligamento ancho y se une al útero por medio del ligamento ovárico (Cabeza de Flores y Barragán, 2005).

El ovario está constituido por 3 regiones: la externa o cortical, interna o medular y el hilio. El compartimento cortical y medular cambia constantemente, tanto en histología como en sus propiedades biológicas, en respuesta a la secreción de gonadotropinas hipofisarias para la formación de hormonas sexuales y la ovulación. El ovario se compone de una cubierta de epitelio celómico, folículos en varios grados de desarrollo o degeneración, vasos linfáticos y sanguíneos y del estroma. El hilio está constituido por dos tipos celulares, las del tejido conectivo que sirven de soporte y las intersticiales que sintetizan esteroides sexuales. El riego arterial proviene de las ramas de las arterias ováricas y uterinas, en el mesovario se ramifica irrigando el estroma de la médula y posteriormente la corteza (Gougeon, 2004; Cabeza de Flores y Barragán, 2005; Levine, 2015).

### FOLICULOGÉNESIS OVÁRICA

El folículo es la unidad funcional del ovario, fue en 1672 cuando De Graff describió los cambios que ocurren en los folículos desde que inicia su maduración hasta que culmina con la ovulación (Figura 2).

Al folículo en su etapa más primitiva se le conoce como folículo primordial, está separado del estroma por la membrana basal y contiene un ovocito primario rodeado de una sola capa de células, que conforman la capa de las células de la pre-granulosa, el folículo primordial es independiente de las gonadotropinas, aunque esta idea aún queda a debate ya que se han encontrado receptores a FSH en los folículos primordiales tardíos (Halpin y Charlton, 1988; Hirshfield, 1994; Gougeon, 2004).

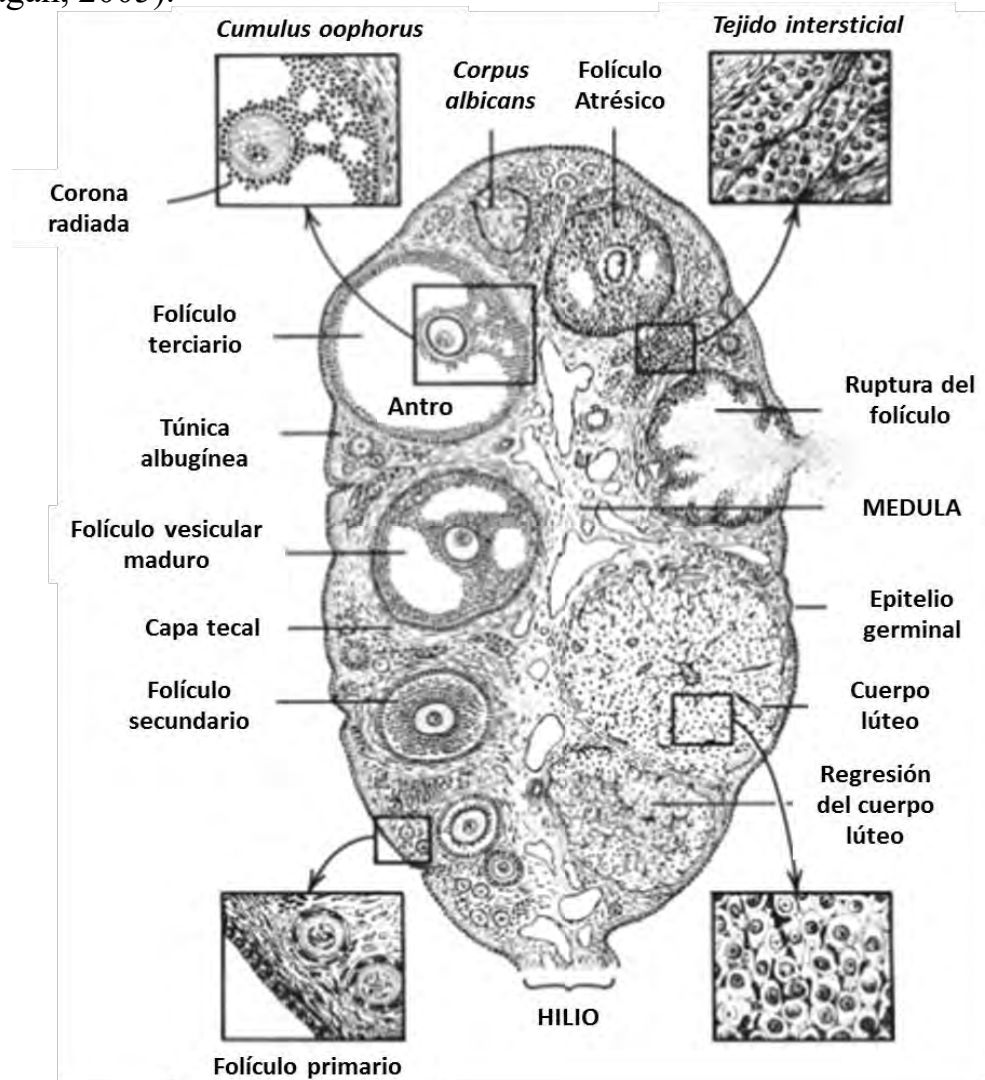
Cuando las células de la granulosa inician su transformación secretan mucopolisacáridos, con lo que aumenta las capas de células que rodea al ovocito constituyendo la zona pelúcida. Prolongaciones citoplasmáticas de las células de la zona pelúcida, mantienen contacto con la membrana del ovocito, y forman un puente para transferir información y nutrientes. Al término de la transformación, las células adquieren forma cuboidal que están separadas del ovocito por la zona pelúcida a esta estructura se le denomina folículo primario. Simultáneamente ocurre la proliferación, no sólo de las células de la granulosa sino también del estroma adyacente localizado por fuera de la membrana basal, produciéndose varias capas celulares a las que se les denomina células de la teca (Amsterdam y Rotmensch, 1987; Cabeza de Flores y Barragán, 2005).

La parte cercana a la membrana basal se le denomina teca interna, mientras que la que se encuentra unida al estroma es la teca externa. En esta estructura a los folículos dependientes de la FSH se le denomina folículos secundarios o preantrales. Al formarse el folículo secundario las células de la granulosa desarrollan receptores a FSH, mientras que en las células de la teca se aprecian los receptores a la LH y la capacidad de biosintetizar esteroides (Gougeon, 2004).

La hipertrofia y transformación de la teca interna trae como consecuencia la aparición de hendiduras llenas de un líquido translucido producido por la granulosa, que contiene albúmina, globulinas, esteroides sexuales en concentraciones mayores a las circundantes además de hormonas proteicas. Estos espacios constituyen el antro folicular, distintivo del folículo maduro o pre-ovulatorio (Cabeza de Flores y Barragán, 2005).



A medida que aumenta el tamaño del antro, se va llenando el espacio con el líquido folicular y el ovocito se desplaza hacia un polo y aunque el folículo continúa su desarrollo hasta el momento de la ovulación, el del ovocito se detiene al formarse el antro hasta el momento de su expulsión. Por efecto de un incremento brusco de LH se rompe el folículo maduro y el ovocito rodeado del *cumulus oophorus* (prolongación de la granulosa) y la corona radiada, es expulsado. Terminado de ser expulsado, vasos de la teca interna penetran la lámina basal y se forma el cuerpo lúteo (Gougeon, 2004; Cabeza de Flores y Barragán, 2005).



**Figura 2. Etapas del desarrollo folicular en el ovario de la rata que culmina con la formación del cuerpo lúteo y la regresión folicular (Tomada y modificada de Levine, 2015).**

## ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA

Además de la liberación del ovocito maduro para su fecundación, el ovario tiene la función de producir hormonas esteroides y proteicas. Los esteroides sexuales se clasifican de acuerdo a su estructura química y su actividad biológica y consiste en tres grandes grupos: estrógenos, progestágenos y andrógenos (Auchus, 2004; Cabeza de Flores y Barragán, 2005).

### **Progestágenos**

Son esteroides de 21 carbonos incluyen a la pregnenolona, progesterona ( $P_4$ ) y 17-OH progesterona, siendo la pregnenolona el precursor más importante de todos los esteroides ováricos y la  $P_4$  es el producto principal del cuerpo lúteo. El ovario de la rata secreta entre 5-15 ng/mL en la mitad de la fase folicular y entre 40-60 ng/mL a mediados de la fase lútea (Smith y Freeman, 1975).

### **Andrógenos**

Son esteroides de 19 carbonos los cuales incluye a la dehidroepiandrosterona (DHEA), la androstendiona (A), la testosterona (T), y la dihidrotestosterona (DHT). Se originan de las células de la teca interna y en menor grado en el estroma, el más abundante es la androstendiona y solo la T y la DHT son capaces de actuar en el mismo receptor androgénico.

### **Estrógenos**

Los estrógenos son esteroides de 18 carbonos caracterizados por un anillo A aromático, un grupo hidroxilo fenólico en C-3 y un hidroxilo o cetona. El más importante y con mayores efectos es el estradiol ( $E_2$ ), aunque también el ovario es capaz de sintetizar estrona ( $E_1$ ) la cual se obtiene a partir de la androstendiona y el estriol ( $E_3$ ), un estrógeno débil producto del metabolismo de  $E_1$  y  $E_2$ .

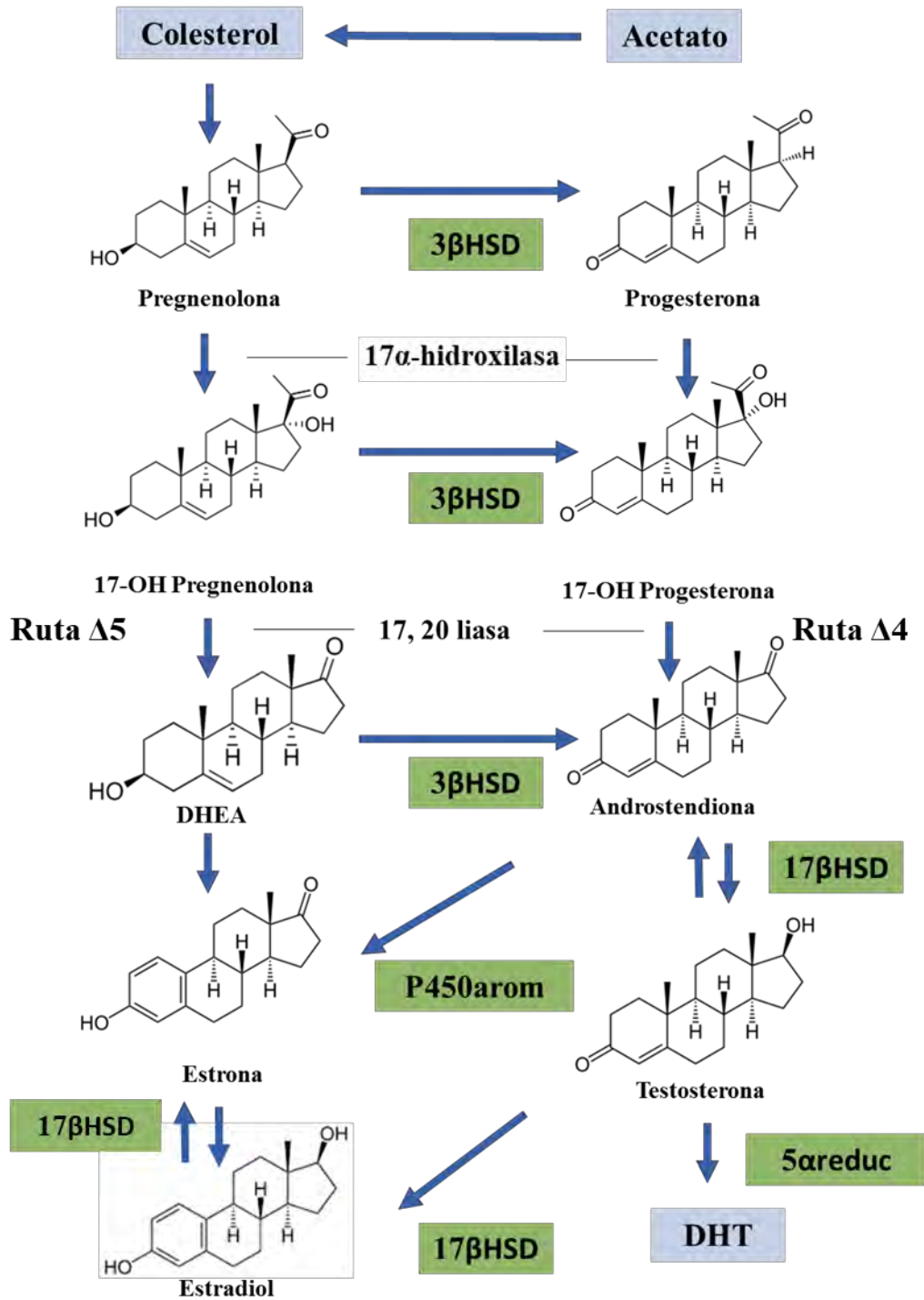
En la rata la secreción del estradiol es de 10-20 pg/mL en la fase folicular y de 40-50 pg/mL en la fase lútea, se eleva bruscamente antes de la ovulación y constituye lo que se le conoce como “pico preovulatorio” (Smith y Freeman, 1975).

### **Biosíntesis de las hormonas esteroides**

El ovario contiene las enzimas necesarias para realizar el proceso esteroidogénico a partir del acetato, formando inicialmente colesterol. El colesterol libre en las células se transporta a la mitocondria para iniciar el proceso de la esteroidogénesis (Auchus, 2004).

En las mitocondrias el colesterol es convertido a pregnenolona, un compuesto de 21C, al romperse su cadena lateral por acción de la 20,22-desmolasa. Esta conversión es el paso inicial de la esteroidogénesis ovárica, la cual es catalizada por un complejo enzimático compuesto por una enzima del citocromo P450 (CYP11), adrenodoxina y flavoproteína A; vía  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$ . La pregnenolona se convierte en  $P_4$  mediante la acción de dos enzimas: la  $3\beta$ -ol-deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) y la  $\Delta$ -isomerasa. Por acción de la  $3\beta$ -HSD, la pregnenolona se convierte a progesterona; por lo general esta ruta se presenta en el cuerpo lúteo (Auchus, 2004).

La pregnenolona también forma andrógenos por la ruta  $\Delta 5$ , que conduce a la síntesis de andrógenos y estrógenos por medio de la vía del citocromo P450,  $17\alpha$ -hidroxilasa, 17, 20 liasa (P450CYP17). Para la síntesis de andrógenos y estrógenos, el folículo utiliza preferentemente la ruta  $\Delta 5$  ya que es más eficiente (Auchus, 2004) (Figura 3).



**Figura 3.** La biosíntesis de hormonas esteroides, por las dos rutas  $\Delta 4$  (cuerpo lúteo) y  $\Delta 5$  (fólculo ovárico). La aromatización de Andostendiona (A), produce Estrona (E1) y la de Testosterona (T) da lugar a Estradiol (E2), a su vez T se interconvierte con A y la E1 con E2, mediante la acción de la enzima 17 $\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ HSD) (Realizada a partir de Cabeza de Flores y Barragán, 2005).

La androstendiona es el principal andrógeno sintetizado en el ovario, aunque se producen pequeñas cantidades de T y DHT. Los andrógenos son los precursores de los estrógenos; esta transformación se logra mediante un mecanismo denominado aromatización. Esta reacción tiene lugar en los microsomas y requiere NADPH, O<sub>2</sub> y de un complejo enzimático de aromatasas (citocromo P450, CYP19).

### Teoría de la doble célula

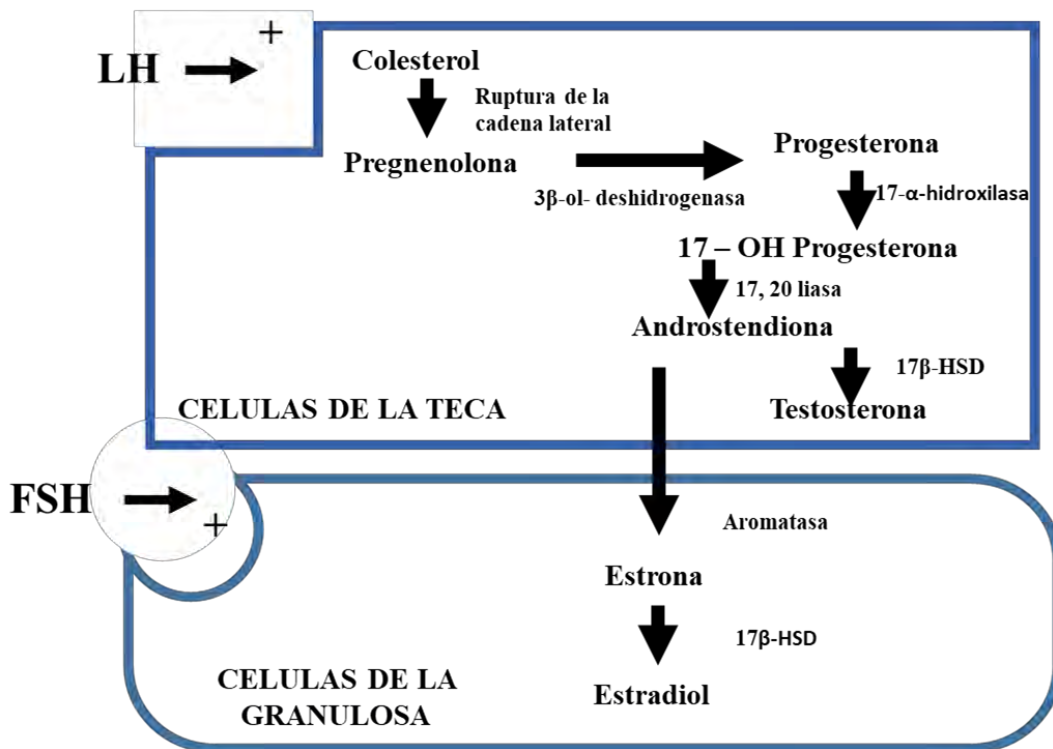
Mediante la técnica de inmuno-histoquímica de localización y expresión del ARNm de las 4 enzimas esenciales en el control reproductivo, se ha establecido que la CYP11 (enzima que interviene en el paso de colesterol a pregnenolona) y la 3 $\beta$ -HSD (de pregnenolona a P<sub>4</sub>) se expresan en células de la teca y de la granulosa de los folículos antrales y preovulatorios, así como en las de la teca y de la granulosa que van a constituir el cuerpo lúteo. En tanto la CYP17 (de pregnenolona a andrógenos) se encuentra solo en células tecaes del folículo antral y preovulatorio y de las tecas luteinizadas del cuerpo lúteo. Por ello es necesaria la interacción de ambos tipos celulares en la biosíntesis de hormonas esteroideas.

La expresión del ARNm de la CYP19 (de andrógenos a estrógenos) es mayor en los folículos maduros, consecuente de la elevación de E<sub>2</sub> en la fase preovulatoria.

La teoría de “dos células-dos hormonas” propone que las células intersticiales de la teca producen andrógenos, principalmente androstendiona y pequeñas cantidades de T, en respuesta al estímulo de la LH, ya que incrementa la concentración de AMP cíclico, regulando la actividad enzimática que

transforma el colesterol a testosterona, posterior a ello, los esteroides de 19 carbonos atraviesan la membrana basal del folículo llegando a las células de la granulosa, ahí se transforman a estrógenos por acción de la aromatasa que es estimulada por la FSH (Hillier y col., 1994) (Figura 4).

Además de la localización de los diferentes sistemas enzimáticos, la biodisponibilidad de los sustratos también es importante. Las células de la granulosa son avasculares, no tienen acceso a las partículas de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) en conjunto con el colesterol y por lo tanto presenta una mínima capacidad para formar P<sub>4</sub> (Flores y Barragán, 2005).



*Figura 4. Teoría de “dos células dos hormonas o doble célula”, la biosíntesis de las hormonas esteroideas se lleva a cabo en el ovario, por acción de las gonadotropinas (Realizada a partir de Cabeza de Flores y Barragán, 2005 y Auchus, 2004).*

## 2. NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

### RITMOS BIOLÓGICOS

La reproducción está regulada por un mecanismo neuro-humoral que debe estar sincronizado, pues se inicia con la secreción de ciertos neurotransmisores los cuales son indispensables para el cortejo y la ovulación (Prieto y Velásquez, 2002). Los mecanismos neuronales que regulan la ovulación están bajo control circadiano en muchas especies, asegurando que el momento de mayor fertilidad coincida con el periodo de máxima motivación sexual (Nequin y col., 1975; Sarkar y col., 1976).

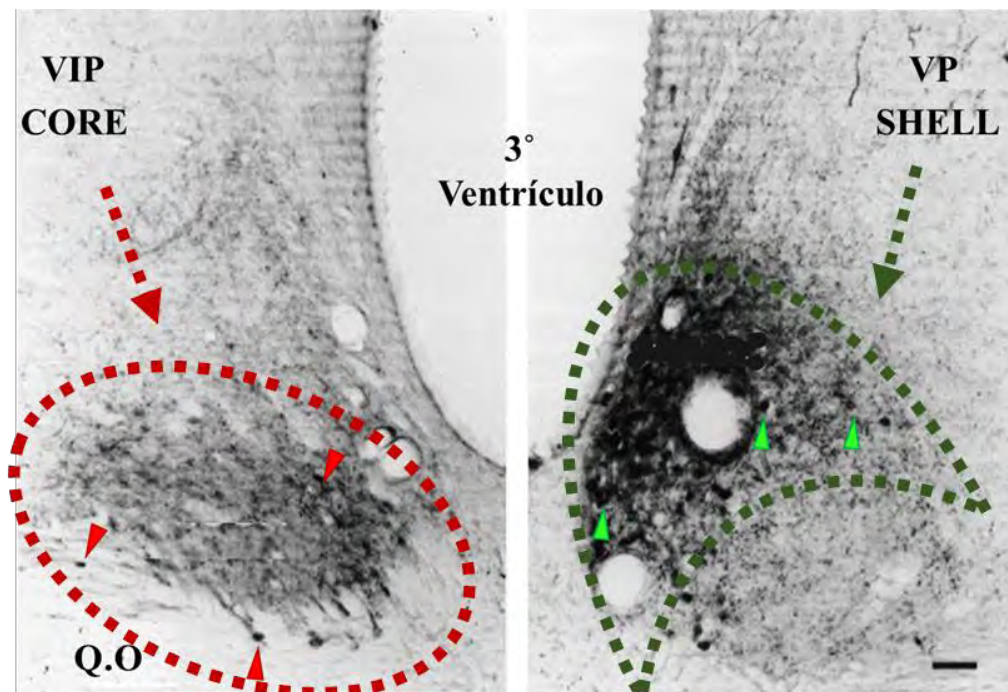
Desde los trabajos pioneros realizados por De Marian en el año 1729 con el patrón de apertura de las hojas de la planta mimosa, hasta el momento del establecimiento del término circadiano en el año 1950, para identificar los ritmos autosostenidos bajo condiciones constantes, se buscaba el marcapasos biológico de los sistemas vivos y su mecanismo de regulación (Golombeck y Rosenstein, 2010).

Un ritmo biológico es la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos regulares de tiempo, que se relaciona con ciclos geofísicos como la noche y el día, el verano y el invierno resultantes de la rotación y traslación de la Tierra, respectivamente (Saderi y col., 2013). El ritmo más estudiado es la alternancia entre el día y la noche a la que la mayoría de las especies son sensibles, aunque existen ciclos geofísicos mayores a 24 horas como los ciclos de las mareas (circa-mareales), días lunares (circa-lunares) los cuales en conjunto se denominan infradianos y a los ciclos menores a 24 horas se les denominan ultradianos (respiración, latidos etc.) (Aschoff, 1960; Golombeck y Rosenstein,

2010) los ritmos biológicos están determinados genéticamente y son una propiedad conservada en todos los seres vivos.

### CITOARQUITECTURA Y QUIMIOARQUITECTURA

En los mamíferos el núcleo supraquiasmático (NSQ) regula los ritmos biológicos (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). El NSQ es una estructura bilateral localizada dorsal al quiasma óptico y ventrolateral al tercer ventrículo. Mediante estudios de citoarquitectura se ha descrito como una pequeña y compleja agregación de neuronas que en la rata oscilan entre los 8,000 y 11,000 neuronas (Moore y col., 2002; Evans y col., 2011). Anatómica y funcionalmente se divide en dos porciones completamente diferenciadas llamadas *core* y *shell* (Evans y col., 2011) (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura del NSQ de la rata, donde se aprecia el patrón de distribución de las neuronas de VIP (flechas rojas) y AVP (flechas verdes), las cuales dividen al NSQ en dos porciones: CORE Y SHELL. Q.O = Quiasma óptico (Tomada y modificada de Van Esseveldt y col., 2000).



*Core* presenta neuronas de forma esférica, pequeñas, con una baja densidad y un número elevado de posiciones somáticas. Esta área contiene principalmente neuronas inmunoreactivas a VIP y al péptido liberador de gastrina (GRP, por sus siglas en inglés), en menor cantidad a sustancia P (SP) y neurotensina (NTS). Esta región del NSQ ocupa un volumen aproximado de  $0.0014 \pm 0.0002$  mm<sup>3</sup>, que representa al 43% del área total del supraquiasmático (Moore y col., 2002).

En tanto *shell*, contiene neuronas más pequeñas en comparación de *core*, con núcleos grandes. En esta región se han reportado neuronas inmunoreactivas a AVP y a calretinina (CAR) y en menor cantidad a encefalina (ENK, por sus siglas en inglés) y a somatostatina (SS, por sus siglas en inglés). Esta región ocupa un volumen de aproximadamente  $0.0022 \pm 0.0004$  mm<sup>3</sup> y 57% del supraquiasmático (Moore y col., 2002; Mahoney y Smale, 2005).

Los ritmos biológicos se generan endógenamente (Lehman y col., 1987) y son sensibles a la regulación de varios sistemas neuroquímicos (Whatts y Swanson, 1897; Gillete y Mitchell, 2002; Lehman y col., 2010) dentro de las cuales se incluyen proyecciones glutamatérgicas de la retina (Moore y Lenn, 1972; Ebling, 1996) e inervación colinérgica desde el tronco cerebral y cerebro anterior basal (Bina y col., 1993) las cuales se ha sugerido sincronizan al NSQ con el entorno externo (Hattan y col., 2002; Panda y col., 2002; Provencio y col., 2002; Morin y Allen, 2006).

En los mamíferos el NSQ regula a los osciladores periféricos localizados en las células de diversos tejidos (Reppert y Weaver, 2002; Schibler y Sassone-Corsi, 2002; Dibner y col., 2010). Los osciladores son sistemas capaces de generar un orden temporal en las actividades del organismo, persistiendo en un periodo regular y utilizan estas oscilaciones como referencia temporal interna para

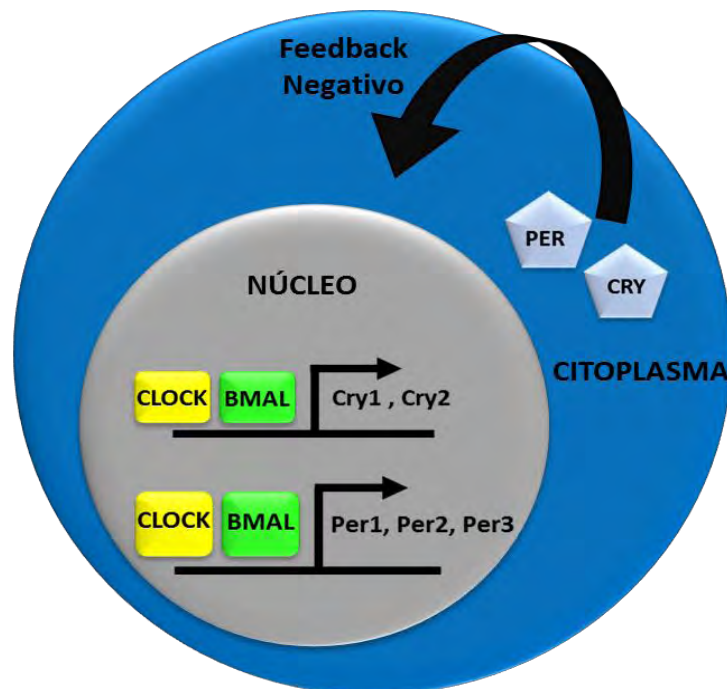
regular el ritmo biológico de muchas funciones corporales: dormir, despertar, secreción de hormonas, temperatura corporal entre otras (Reppert y Weaver, 2002; Brown y Piggins, 2009).

Por estudios realizados por Moore y Klein en 1974, se ha establecido al NSQ como el oscilador central de los ritmos biológicos. En la rata la lesión bilateral del NSQ modifica las variaciones diurnas y circadianas de serotonina (5-HT) y de N-acetiltransferasa proveniente de la glándula pineal, neurotransmisores involucrados en la actividad diurna y control del sueño en los mamíferos, con lo que los autores postularon al NSQ como el principal regulador del ciclo sueño-vigilia (Moore y Klein, 1974).

En la rata la lesión bilateral del NSQ elimina el ritmo circadiano de la actividad locomotora y de alimentación y modifica el patrón de liberación de corticosterona que es liberada por la mañana (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). En los animales con lesión del NSQ el trasplante del núcleo proveniente de un animal en estado fetal restablece algunos de los ritmos eliminados por la lesión (Aguilar y col., 1997).

Estudios en *Drosophila melanogaster* permitieron identificar un pequeño número de genes involucrados en generar y mantener el ritmo circadiano en estos insectos, aunque un mecanismo similar puede ocurrir en los mamíferos. A este grupo de genes se les denominó genes reloj o “*clock genes*”, posteriormente se identificaron genes homólogos a partir de hamsters y ratones mutantes. En los mamíferos se han descrito al menos nueve genes reloj denominados; *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Clock*, *Bmal1*, *Caseína cinasa le (Ckle)* y *Rev-Erb* (Reppert y Weaver; 2002).

El mecanismo molecular del reloj circadiano central en el NSQ y los osciladores circadianos periféricos, involucran la interacción de señales positivas y negativas que regulan la transcripción rítmica de los genes reloj. Este grupo de genes se encarga de controlar la actividad circadiana de todos los seres vivos (Reppert y Weaver, 2002; Martinek y col., 2001). La expresión de estos genes se regula por medio de dos asas de activación/represión transcripcional. El asa de señales positivas está controlada por los genes *clock* y *bmal1*, mientras que el asa negativa por los genes *Per* y *Cry* (Reppert y Weaver, 2002) (Figura 6).



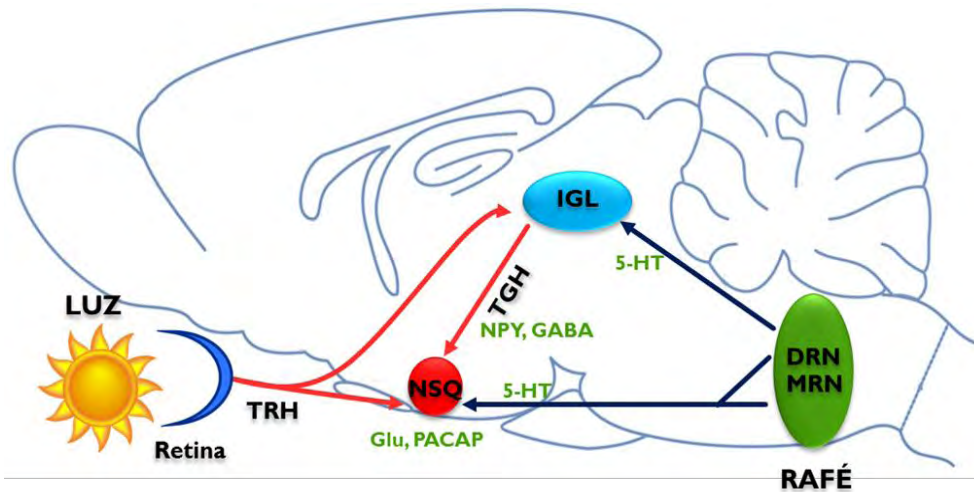
**Figura 6. Modelo simplificado de los mecanismos intracelulares responsables de la generación del ritmo circadiano en mamíferos. El proceso inicia cuando las proteínas CLOCK y BMAL1 dimerizan para impulsar la transcripción de los genes PER ( $PER_1$ ,  $PER_2$ ,  $PER_3$ ) y CRY ( $CRY_1$  Y  $CRY_2$ ). A su vez PER y CRY se traslocan al citoplasma y se traducen a sus respectivas proteínas. El ciclo de retroalimentación toma  $\pm$  24 horas lo que conduce a un ritmo circadiano intracelular (Tomada y modificada a partir de Williams y Kriegfeld, 2012).**

## AFERENCIAS Y EFERENCIAS

El sistema de sincronía circadiana consta de aferencias visuales al NSQ que regulan su función metabólica interna para un perfecto sistema efector de la información circadiana en todo el organismo (Moore y Speh, 1993). La información fótica ingresa por la retina donde se localizan fotoreceptores especializados para la función circadiana, los cuales contienen melanopsina (fotopigmento que traduce la información lumínica en información química). La melanopsina estimula al glutamato (GLU) (Meijer y Rietveld, 1989) y al péptido activador del adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP), información que viaja a través de los axones del quiasma óptico de donde se forma también el Tracto Retino-Hipotalámico (TRH) vías que llegan al NSQ.

Por otro lado el TRH también inerva a la Hojuela Intergeniculada (IGL) de donde surgirá el Tracto Geniculo-Hipotalámico, que proyectará directamente a la zona del Core en el NSQ y por medio de NPY envía información no fótica (Van den Pol y Tsujimoto, 1985).

Además de las vías fóticas, el NSQ recibe información sensorial de los núcleos dorsal de rafé (DRN, por sus siglas en inglés) y el núcleo medial del rafé (MRN, por sus siglas en inglés) localizados en el complejo del Rafé, y del núcleo paraventricular del tálamo, que transmiten información no fótica como ruido, temperatura y movimiento (Dibner y col., 2010) (Figura 7).

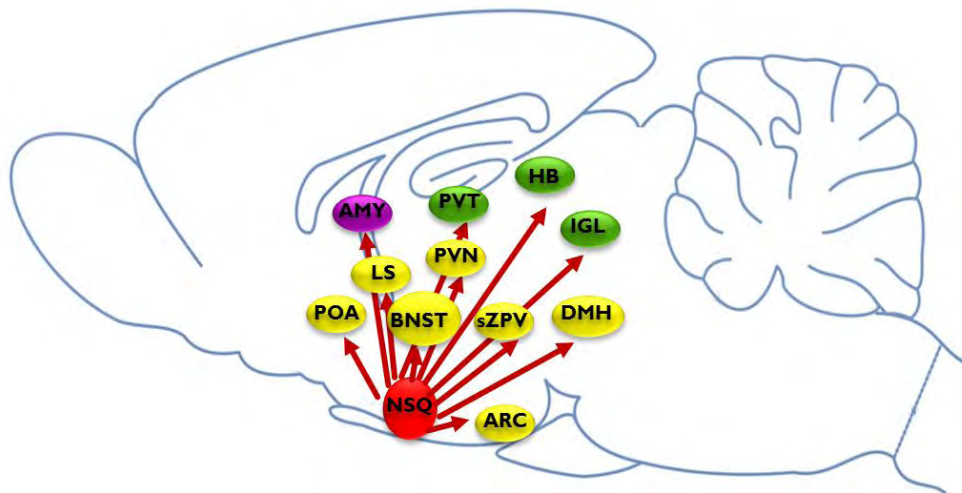


**Figura 7. Principales vías aferentes del Núcleo Supraquiasmático (NSQ). Las flechas rojas muestran las vías fóticas que ingresan al NSQ y las flechas azules las vías no fóticas provenientes del rafé (Tomada y modificada a partir de Dibner y col., 2010).**

Para que en el organismo el NSQ pueda funcionar como un marcapasos circadiano, la señal fótica debe ser transmitida hacia otros sistemas. Las conexiones del NSQ con otras estructuras cerebrales se han establecido mediante estudios de inyecciones con trazadores anterógrados y retrógrados, los cuales muestran las conexiones eferentes que presentan en diferentes zonas cerebrales (Watts y Swanson, 1987).

Dentro del hipotálamo las terminales con mayor densidad de fibras se encuentran en la zona sub-praventricular (sZPV), rostral en el área preóptica (POA, por sus siglas en inglés), núcleo de la estría terminal (BNST), septum lateral (LS), en la zona del hipotálamo dorsomedial (DMH) y en el núcleo arqueado (ARC) (Dibner y col., 2010).

En el tálamo, los axones del supraquiasmático inervan al núcleo paraventricular (PVN) y a la IGL. También se han descrito proyecciones hacia zonas más distantes como la habénula (HB) y la amígdala (AMY), aunque el patrón de proyecciones puede variar dependiendo la especie estudiada (Morin y Allen, 2006, 2007; Dibner y col., 2010) (Figura 8).



*Figura 8. Principales eferencias del NSQ. Los núcleos en amarillo son las conexiones hacia el hipotálamo, los núcleos verdes hacia el tálamo y el morado hacia la amígdala (Para las abreviaturas revisar el texto) (Tomada y modificada a partir de Dibner y col., 2010).*

### 3. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GnRH POR EL NSQ

Se han identificado conexiones directas entre el NSQ y las neuronas GnRHérgicas localizadas en POA, así como conexiones indirectas mediante neuronas adyacentes a las neuronas GnRHérgicas de POA (Van der Beek y col., 1997; de la Iglesia y col., 2003). La actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, se controla mediante dos mecanismos: uno endocrino o de retroalimentación negativa, donde los esteroides sexuales proveniente de los folículos ováricos mantienen baja la concentración de LH a lo largo de la mayor

parte del ciclo ovulatorio, y el proporcionado por una señal nerviosa que viaja desde el NSQ (Miller y col., 2004).

Turek y colaboradores (1987) y Watts y colaboradores (1989), demostraron la participación de los estrógenos en el mantenimiento de los ritmos circadianos de locomoción y en el control de la secreción de la LH, FSH y la prolactina. Al realizar una ovariectomía, la secreción de las gonadotropinas y la actividad locomotora mostraron un desplazamiento o un bloqueo, que más tarde se restablecía con la administración de 17- $\beta$  estradiol. Los autores concluyeron que se requiere de la retroalimentación positiva, establecida por los estrógenos para que se produzca la secreción de GnRH y el inicio de la ovulación.

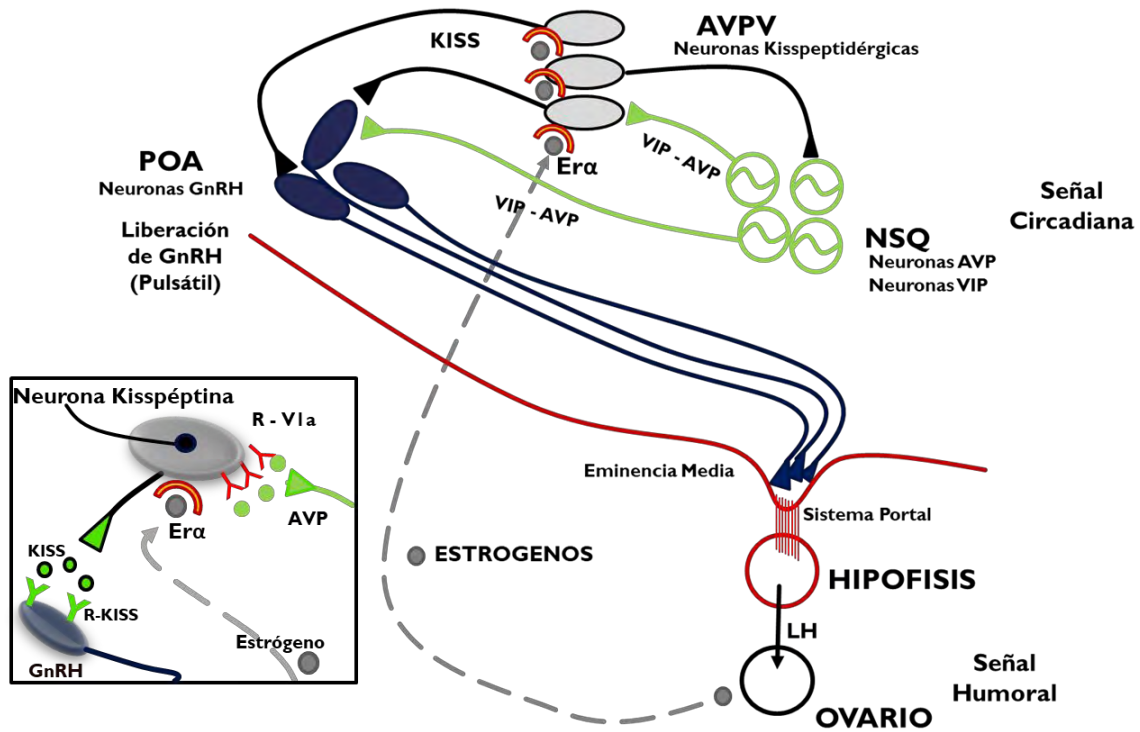
En muchas especies de ovulación espontánea, la señal que va a iniciar la secreción preovulatoria de LH en el día del proestro está controlada por el NSQ, momentos antes de la ovulación (Legan y Karsch, 1975; Gibson y col., 1988). De la Iglesia y colaboradores (2000) reportaron que la actividad locomotora y el aumento de LH en el día del proestro se asocian con la activación unilateral del sistema GnRHérgico, ipsilateral al NSQ activado, lo que confirmó una comunicación nerviosa entre el NSQ y el sistema GnRHérgico.

Tanto el sistema GnRHérgico como varios sistemas neuroquímicos que regulan a estas neuronas reciben información del NSQ y operan sinérgicamente para controlar con precisión los eventos neuroendocrinos necesarios para la ovulación. Las neuronas VIPérgicas y AVPérgicas del NSQ proyectan de manera monosináptica a las neuronas de GnRH (Van der Beek y col., 1997; Horvath y col., 1998), que expresan el receptor VPAC2 y V1a afines a VIP y AVP respectivamente (Smith y col., 2000; Ostrowski y col., 1994; Funabashi y col., 2000), estas proyecciones estimulan positivamente el aumento de GnRH/LH.

Dado que las neuronas GnRHérgicas no expresan el receptor  $\alpha$  de los estrógenos ( $E\alpha$ ), (mediador de los efectos de retroalimentación positiva de estradiol) (Herbison y Theodosis, 1992; Dorling y col., 2003), se ha planteado a la región de AVPV (anteroventral periventricular) como el sitio de integración de las señales circadianas y de la retroalimentación de los estrógenos para la perfecta secreción de GnRH, ya que en ratas ovariectomizadas, tratadas con estradiol, la administración de anti-estrógenos en AVPV inhibe el pico preovulatorio de LH (Petersen y Barraclough, 1989).

El NSQ envía proyecciones hacia la región AVPV, donde existen neuronas productoras de glutamato, ácido  $\gamma$  amino butírico (GABA), galanina, encefalina, neurotensina y kisspeptina, este último un potente neurotransmisor estimulante de la secreción de GnRH y que proyectan hacia el área de POA y al NSQ. Las neuronas kispertidérgicas presentan receptores a V1a afines a AVP y a  $E\alpha$ , conjuntando las señales ováricas con las circadianas (Herbison, 2008). Por lo que se concluye que el NSQ controla las funciones ováricas (de la Iglesia y col., 2003; Smarr y col., 2012; Williams y col., 2011) (Figura 9).





**Figura 9.** Esquema de la conexión entre el (NSQ), el área preóptica (POA) donde se localizan las neuronas GnRHérgicas. La conexión puede ser directa por VIP y AVP o indirecta por el núcleo anteroventral periventricular donde se encuentran las neuronas de kisspeptina y que se ha planteado son las que conjunta las señales necesarias para la liberación de GnRH incluyendo las del ovario vía los estrógenos y la circadiana desde el NSQ. En el recuadro: Las neuronas de kisspeptina contienen receptores a AVP (V1a) y a los receptores Erα, para proyectar hacia las de GnRH que tiene receptores KISS (Tomada y modificada de de la Iglesia y col., 2006).

### GnRH

Los cuerpos celulares neurales de la GnRH pueden encontrarse en cualquier lugar a lo largo de un eje que se extiende desde los bulbos olfatorios hasta los núcleos septal medial y el área preóptica, hasta las zonas ventrales del área hipotalámica anterior (AHA) y el hipotálamo medio basal (MBH), en la banda diagonal de broca, área periventricular y en el núcleo arcuato.

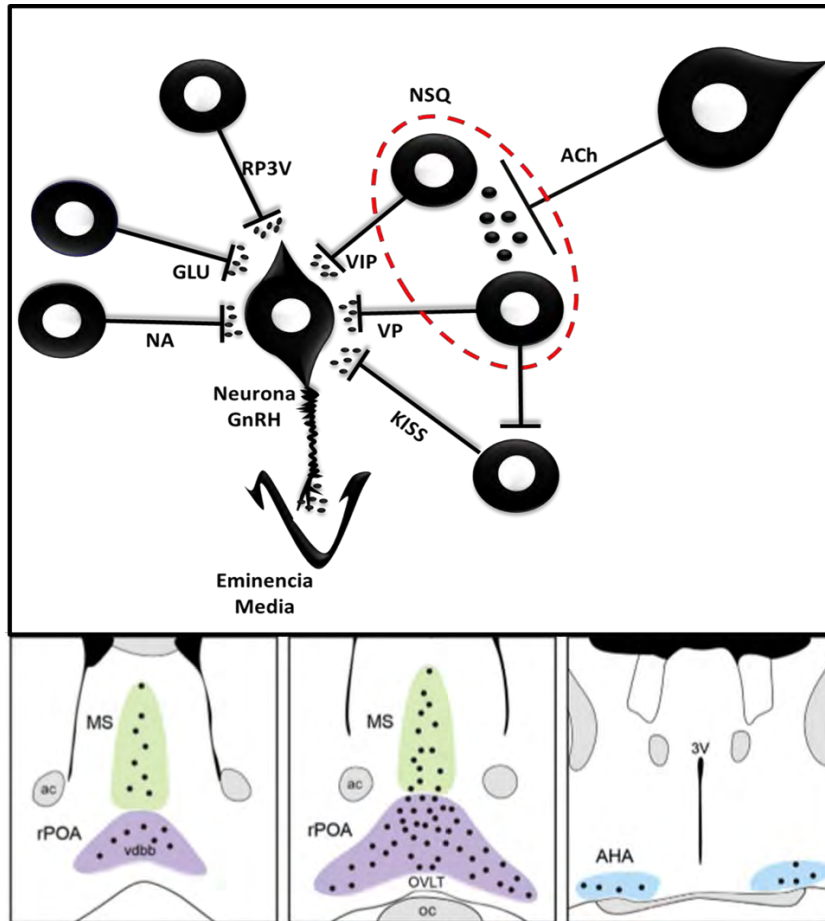
Esta distribución se denomina algunas veces patrón de “Y invertido” (Silverman y col., 1994; Herbison, 2015) (Figura 10).

En el SNC hay evidencias de la presencia de receptores a GnRH, lo que ha llevado a sugerir que esta hormona actúa como un neurotransmisor o un neuromodulador que participa en la regulación de conductas reproductivas y en la estimulación de la ovulación (Prieto y Velásquez, 2002).

La configuración del receptor tiene los rasgos característicos de los receptores acoplados a proteína G; consiste de una sola cadena de aminoácidos con una amina extracelular, siete segmentos hidrofóbicos transmembranales conectados por asas extra e intracelulares y termina con un grupo carboxilo intracelular (Prieto y Velásquez, 2002).

El sitio de proyección principal de las neuronas GnRH es la zona externa de la eminencia media donde la GnRH se libera en la circulación portal hipofisaria. Los estudios de rastreo retrógrado han revelado que entre el 50% y 70% del total de proyecciones neuronales desemboca en la eminencia media (Herbison, 2015).

En tanto las neuronas de GnRH poseen múltiples aferencias que regulan su secreción, principalmente recibe aferencias de noradrenalina, glutamato, del complejo RP3V, de la zona AVPV por medio de KP y de VIP y AVP del NSQ (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema de la conexión neural que recibe la neurona de GnRH. La neurona de GnRH recibe múltiples vías de información que regulan su función y secreción (Realizada a partir de Silverman y col., 1994; Herbison 2008) Abajo: La distribución “Y invertida” de las neuronas de GnRH por el área POA – AHA y septo medial (MS) (Tomado de Herbison, 2008).

#### 4. SISTEMA COLINÉRGICO

Uno de los primeros neurotransmisores descritos y caracterizados es la ACh, la cual se considera como un neurotransmisor clásico de la inervación parasimpática ya que se encuentra ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y periférico, donde se calcula que entre el 5 %-10% de la

sinapsis que ocurre en el sistema nervioso central participa el sistema colinérgico (Perri y col., 1999).

La acetilcolina que existe en las terminales colinérgicas es sintetizada en el citoplasma de la neurona a partir de la colina y de la acetil coenzima A (acetil-CoA), mediante la acción de la enzima colinoacetiltransferasa (ChAT) (González y Flórez, 1997). Dicha enzima comparte espacio en las terminales nerviosas, en estrecha relación con la síntesis y liberación de acetilcolina, aunque también se ha encontrado en menor cantidad en el resto de la estructura neuronal.

La colina de la cual se sintetiza la ACh proviene de tres fuentes: a) del hígado donde inicialmente se sintetiza, penetra en la terminal presináptica colinérgica a través de un sistema de transporte de baja afinidad, común a la mayoría de las células, o a través de un sistema de recaptura específico de colina de alta afinidad (SRAA); b) a partir del metabolismo de la fosfatidilcolina de membrana; c) del espacio sináptico, a partir de la hidrólisis de la ACh por la acetilcolinesterasa (AChE). El origen de la acetil CoA, se ha planteado deriva de la glucosa, del citrato y del acetato. La síntesis de acetil-CoA, tiene lugar en las mitocondrias, catalizada por el complejo piruvato-deshidrogenasa (González y Flórez, 1997).

Cuando se lleva a cabo la síntesis de ACh en las terminales neurales, este neurotransmisor es almacenado en tres formas: 1) disuelta de forma libre en el citoplasma; 2) en el interior de vesículas sinápticas, algunas veces asociado a uno o varios neurotransmisores y 3) asociado lábilmemente a membranas, lo cual le permite desprenderse con facilidad (González y Flórez, 1997).

El almacenamiento de la ACh en el interior de las vesículas sinápticas se realiza mediante el transportador vesicular de ACh (VAChT), cuya estructura primaria está compuesta de por doce dominios transmembranales con los dominios amino y carboxilo terminal en el citoplasma, similar a la estructura del ChAT por lo que se sugiere un mecanismo de co-expresión (González y Flórez, 1997).

Cuando la ACh es liberada al espacio sináptico por las altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular, esta es captada por la neurona pos-sináptica uniéndose a sus receptores colinérgicos localizados en la superficie celular, para cumplir una función efectora. En tanto la ACh que no se une a los receptores es hidrolizada en el espacio sináptico en un proceso de reciclaje (González y Flórez, 1997; Mendoza, 2008).

### **RECEPTORES COLINÉRGICOS MUSCARÍNICOS (mAChR) Y NICOTÍNICOS (nAChR).**

Los receptores colinérgicos se dividen en dos categorías: muscarínicos y nicotínicos, ambos receptores son activados por la ACh, pero son morfológicamente y funcionalmente diferentes (Mendoza, 2008; Albuquerque y col., 2009) (Figura 11).

Los receptores muscarínicos están distribuidos ampliamente en el sistema nervioso central repartidos de forma irregular, en dendritas y terminaciones axónicas tanto de neuronas colinérgicas como no colinérgicas y en el sistema nervioso periférico en el corazón, músculo y entre otros órganos periféricos, estos receptores son activados y desencadenan una función efectora dependiente del órgano blanco activado (Flores y Segura, 2005).

Se han caracterizado cinco subtipos de receptores muscarínicos (desde mAChR1 a mAChR5) según su estructura y afinidad por los antagonistas

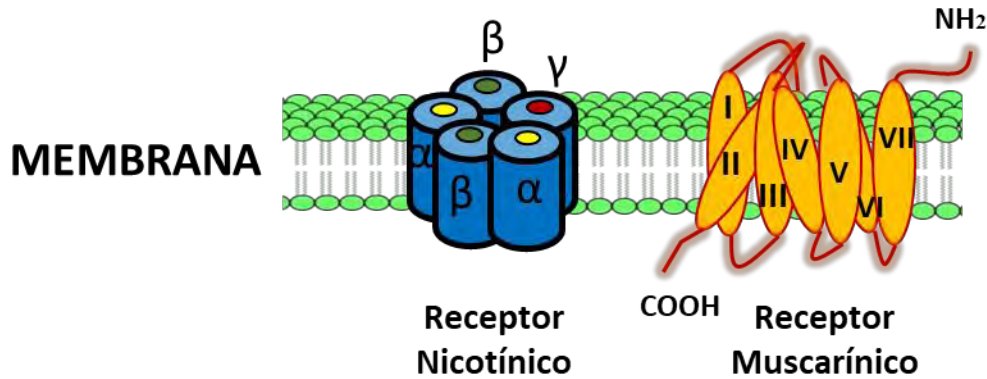
(Taylor y Brown, 1999). Pertenecen a la gran familia de receptores de membrana que presentan siete dominios trans membranales asociados a proteínas G. Dependiendo de la naturaleza de la proteína G, esta interacción activa el sistema de segundos mensajeros a través de tres vías fundamentales: inhibición de la enzima adenilciclasa, estimulación de la hidrólisis de fosfoinosítidos y regulación de la apertura de un canal iónico.

De acuerdo al sistema de activación se han clasificado a los receptores en dos grandes subgrupos: a) M1, M3, M5 donde estos están acoplados a la estimulación de fosfolipasa C (PLC), operado por un grupo de proteínas  $G_{q/11}$  y b) M2, M4, que funcionan por la inhibición de la acetilcolina mediada por proteínas  $G_{i/o}$  (González y Flórez, 1997).

Los receptores nicotínicos pertenecen a la familia de los canales iónicos dependientes de voltaje de las que también forman parte otros neurotransmisores como el GABA, la glicina o el glutamato. Son los encargados de mediar la rápida transmisión sináptica tanto en el SNC como SNP (1-10 mseg.). La estructura primaria está formada por cuatro subunidades glucoprotéicas de 55 kD independientes, que se encuentran en una relación estequiométrica  $2\alpha, \beta, \gamma$  y  $\delta$  que se asemeja a un pentágono con un poro central (González y Flórez, 1997).

La activación del receptor nicotínico provoca la apertura del canal y el aumento de la permeabilidad iónica para cationes monovalentes y divalentes de diámetro inferior a  $8 \text{ \AA}$ ; por lo cual  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  pasan con facilidad y en menor grado  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , lo que desencadena una respuesta inmediata y de corta duración, de forma que un pulso de ACh de 1 mseg de duración provoca en la placa motriz

una respuesta que dura 10 mseg (Taylor y Brown, 1999; González y Flórez, 1997).



*Figura 11. Estructura de los receptores nicotínicos y muscarínicos de acetilcolina. El receptor nicotínico está conformado por 5 subunidades (2 $\alpha$ , 2 $\beta$  y 1 $\gamma$ ), formando un poro, mientras que el receptor muscarínico consta de 7 unidades transmembranales, un extremo amino terminal y uno carboxilo (Tomado y modificado de González y Flórez, 1997; Cortes-Romero y col., 2011).*

## EL SISTEMA COLINÉRGICO DEL NSQ

Se han postulado diversos sistemas cerebrales como los encargados de influir en la comunicación del NSQ con el resto del cerebro, se ha sugerido a la acetilcolina como uno de los mediadores. La acetilcolina es de los primeros neurotransmisores sugeridos para desempeñar un papel clave en la ritmicidad circadiana (Mohan y Radha, 1978; Zatz y Brownstein, 1979 y 1981; Earnest y Turek, 1985; Zhang y col., 1993).

El sistema colinérgico está funcionalmente ligado al sistema circadiano. Se han proporcionado evidencias de un papel de señalización colinérgica en la regulación y el mantenimiento de los ritmos circadianos a través de las enzimas de síntesis, degradación y del transportador de acetilcolina, presentes en la

estructura del NSQ. La secreción de la ACh, es mayor durante la vigilia y actividad motora y su liberación disminuye durante el sueño (Davis y Sadik, 2006).

Brownstein y colaboradores (1975) fueron los pioneros en demostrar la presencia de ChAT en el supraquiasmático, diez años después Van den Pol y Tsujimoto (1985) reportaron la presencia de fibras positivas de ChAT en el NSQ. Sofroniew y colaboradores (1982) mapearon algunas neuronas periféricas al NSQ dentro del hipotálamo, y reportaron la presencia de neuronas inmunoreactivas a ChAT en el área magnocelular, supraóptico, paraventricular y fuera del hipotálamo en el prosencéfalo basal.

En general los estudios de localización de ChAT mostraron que su patrón de distribución es más denso en la parte dorsal que en la ventral del NSQ, además de que dicho patrón coincide con la distribución de AChE (Hedreen y col., 1985). El transportador vesicular de la acetil colina VACHT (por sus siglas en inglés) es necesario para el almacenamiento de ACh en las vesículas. En el NSQ de la rata Sprague-Dawley el VACHT se distribuye de manera similar con ChAT (Castillo-Ruiz y Nunes, 2007). Estudios de localización de las fibras colinérgicas del hipotálamo mostraron que la naturaleza de las células del NSQ es típicamente bipolar y que recibe múltiples fibras positivas a ChAT (Ichikawa e Hirata, 1986; Rao y col., 1987; Tago y col., 1987).

Además, el NSQ recibe información colinérgica del prosencéfalo del septo medial, núcleo basal, banda diagonal y neuronas colinérgicas del tronco encefálico de los núcleos tegmentales, parabigeminales, pedunculopontinos y laterodorsales (Bina y col., 1993).



## RECEPTORES COLINÉRGICOS EN EL NSQ

Mediante el uso de ligandos radioactivos se ha mostrado en el NSQ la presencia de los receptores colinérgicos del tipo muscarínico, desde el mAChRM1 al mAChRM5 (Kobayashi y col., 1978; Rotter y col., 1979), más adelante el equipo de Van der Zee (1991) y Carsi-Gabrenas (1997) usando un anticuerpo monoclonal (M35), que se une a todos los receptores muscarínicos, corroboró la existencia de los receptores en el NSQ. Sin embargo, no fue de manera clara la presencia de los receptores colinérgicos hasta que se dispuso de la técnica de RT – PCR que hizo evidente la expresión de los 5 subtipos de mAChRs en el NSQ (Yang y col., 2010).

El uso de anticuerpos selectivos para los mAChRs, hizo evidente que todas las neuronas del NSQ expresan al menos el receptor mAChRM1, y que mAChRM2 está predominantemente expresado en las terminales del axón de las neuronas aferentes al NSQ, lo que estaría indicando que el mAChRM2 modula la liberación de la ACh que ingresa al NSQ (Van der Zee, 1999). Los mAChRM3, mAChRM4 y mAChRM5 que se ha sugerido actúan como moduladores de la respuesta a la ACh. Aproximadamente el 8%-10% de las neuronas del NSQ expresan una gran cantidad de receptores colinérgicos (principalmente M1 y M2) mientras que en el 90% de las neuronas restante se aprecia una cantidad casi indetectable de los 5 subtipos de mAChRs, incluyendo a los mAChRM3, mAChRM4 y mAChRM5 (Van der Zee y col 1991; 2004).

Los receptores nicotínicos dentro del NSQ coinciden con el patrón de distribución de las neuronas y fibras colinérgicas, lo que sugiere que los nAChRs podrían estar asociados funcionalmente con las neuronas colinérgicas locales del NSQ actuando en la transmisión sináptica (Fuchs y Hoppens, 1987; Miller y col., 1987).

## 5. AGONISTAS Y ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS

La clasificación de los receptores colinérgicos en el sistema nervioso se realizó basada en la actividad farmacológica de dos alcaloides que mimetizan parcialmente la acción de la ACh: la nicotina, obtenida del tabaco y la muscarina, que se encuentra en el hongo *Amanita muscaria*. La identificación de la D-Tubocurarina y la atropina como antagonistas de los efectos de la nicotina y muscarina respectivamente permitió realizar agonistas y antagonistas específicos para cada receptor colinérgico tanto nicotínico como muscarínico (Mendoza, 2008).

La clasificación de los agonistas colinérgicos muscarínicos aún no es precisa pero la que más aceptación tiene toma en cuenta la afinidad por los distintos subtipos de receptores, dentro de los cuales se derivan dos grandes grupos homogéneos: a) de acción directa y b) de acción indirecta. Los agonistas se encargan de la activación de los receptores colinérgicos periféricos o centrales ya sean nicotínicos, muscarínicos o ambos, a la vez que ejercen efectos directos, puede desencadenar efectos indirectos (Brown y Taylor, 2006).

Los agonistas de acción directa activan directamente a los receptores muscarínicos potencializando la acción efectora de la misma acetilcolina. La unión agonista-receptor promueve la transición del receptor en un estado basal inactivo a un estado activo en el cual puede permitir el paso de cationes (canales nicotínicos) o activar a la proteína G (receptores muscarínicos) (Brown y Taylor, 2006).

Los agonistas de acción indirecta, actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa, enzima que degrada la ACh (80-150  $\mu$ seg), lo que desencadena un incremento local de la concentración de ACh en las terminales colinérgicas, por lo cual se

activan receptores muscarínicos y nicotínicos (Tabla 2). En tanto los agonistas de los nAChRs son derivados naturales igual que la nicotina (Mendoza, 2008).

Tabla 2. Agonistas colinérgicos muscarínicos (Tomada y modificada de Gonzáles y Flores, 1997 y Mendoza, 2008)

a) <i>De acción Directa</i>	1. Esteres de la colina	Acetilcolina, metacolina, carbacol, betanecol
	2. Alcaloides naturales	Muscarina, pilocarpina, arecolina
	3. Fármacos de síntesis	Oxotemorina, McNA343, L689660, xanomelina
b) <i>De acción Indirecta</i>	1. Derivados carbámicos	Eserina, prostigmina, piridastigmina
	2. Alcoholes simples	Edrofonio, demecario, ambenonio
	3. Compuestos organofosforados	Ecotiopato, isoflurofato, paratión, paraoxón

Los antagonistas colinérgicos o también denominados anticolinérgicos, son fármacos que inhiben los impulsos nerviosos de los nervios parasimpáticos de manera selectiva, ya que bloquean la unión del neurotransmisor acetilcolina a su receptor en células nerviosas, dentro de este grupo se dividen en dos categorías: alcaloides naturales o sintéticos, de las cuales una de las más estudiadas es la ATR (Mendoza, 2008).

## ATROPINA

La atropina (ATR) deriva de la *Atropa belladonna*, un arbusto de la familia *Solanaceae*. La atropina es un fármaco capaz de bloquear la acción del sistema parasimpático gracias a dos características farmacodinámicas que son importantes (Mendoza, 2008):

1. Su afinidad por los receptores muscarínicos es mayor que la de la ACh. Por lo tanto, la atropina va a competir con la ACh endógena para ocupar estos receptores.
2. La atropina sólo se une a los receptores muscarínicos y no tiene efectos de estimulación en ellos, ya que carece de actividad intrínseca.

Algunas evidencias experimentales han mostrado la participación del sistema colinérgico en la regulación de las funciones ováricas (Domínguez y col., 1982; Flores y col., 2005; Vieyra y col., 20016). En ratas cíclicas la administración de ATR a diferentes horas (9:00, 13:00, 17:00 y 21:00 h) y a diferentes concentraciones resulta en la disminución de la cuota ovulatoria o el bloqueo total de la ovulación dependiendo del día del ciclo, hora de administración y de la concentración. En los animales con bloqueo de la ovulación la administración de hCG, hormona que emula la LH, es capaz de restablecer la respuesta ovulatoria. Este conjunto de evidencias permitió postular la participación de la ACh en el control de la secreción de la LH, en la existencia de un ritmo en la secreción de gonadotropinas que resulta en la ovulación (Domínguez y col., 1982).

Partiendo de los resultados del equipo de Domínguez (1982), al establecer un modelo con bloqueo de los receptores colinérgicos en el área preóptica media (POA) con cristales de ATR, se observa un bloqueo de la ovulación en el día

del diestro 2 y estro mostrando una respuesta asimétrica de ambos ovarios ante el bloqueo en POA-AHA (Cruz y col., 2014).

También se ha mostrado que la información colinérgica del NSQ participa en la regulación de las funciones ováricas, ya que la micro-inyección de ATR en el NSQ izquierdo o derecho a las 9:00 h del proestro bloquea la ovulación, bloqueo que se restablece con la administración de LHRH sintética, apoyando la idea de que la acetilcolina del NSQ modula de manera estimulante los procesos que culminan con la ovulación (Vieyra y col., 2016).

### CARBACOL

El carbacol es un éster de carbamilcolina, resistente a la hidrólisis por AChE o por esterasas de colina inespecíficas, tiene una vida media prolongada (aproximadamente 8 h). El carbacol mantiene considerablemente la actividad nicotínica sobre ganglios del sistema nervioso autónomo, se plantea que sus acciones periféricas y ganglionares se deban al menos en parte a la liberación de ACh endógena desde las terminales de fibras colinérgicas (Heller y Taylor, 2004).

En roedores, la estimulación *in vivo* del NSQ con carbacol causa un desplazamiento de fase de actividad motora y de la ingesta de alimento, dependiente de la concentración administrada (Buchanans y Guillette, 2005; Liu y Gillette, 1996). Sin embargo, en estudios *in vitro* en cortes de tejido del NSQ se ha reportado que el carbacol inhibe a más del 50% de las neuronas del NSQ y sólo el 25% es activado por este mismo agonista, mientras que el restante no responde a tal estímulo (Shibata y col., 1983; Kow y Pfaff, 1984, Yang y

col., 2010). Las diferencias de los resultados entre los estudios *in vivo* e *in vitro* han dado lugar a lo que se le ha denominado la paradoja carbacol.

Por estudios *in vitro*, se ha demostrado que la administración de carbacol, reproduce los efectos de la luz en las neuronas del NSQ, mostrándose con un incremento en el disparo neural y en el potencial de membrana de las neuronas (Nishino y koizumi, 1977; Zatz y Brownstein, 1979; Wee y col., 1981; Mistlblerger y Rusak, 1986; Murakami y col., 1986; Keefe y col., 1987; Earnes y col., 1991; Zhang y col., 1993) y cuando se administra ATR previo a la administración de carbacol, estos efectos de luz no se presentan, con lo cual se demostró la participación del sistema colinérgico en la actividad neural del NSQ (Kow y Pfaff, 1984; Lui y Gillette, 1996).

## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El sistema circadiano orquestado por el NSQ es fundamental para la sincronización de los procesos neuroendocrinos que regulan la esteroidogénesis, la ovulación y la conducta sexual indispensable para el cortejo.

Uno de los sistemas que regula la función del NSQ es el sistema colinérgico, el cual regula la actividad metabólica, trófica y endocrina de sus neuronas.

La regulación que ejerce el sistema colinérgico del NSQ sobre la ovulación varía en función de la hora del día y de la etapa del ciclo estral. En la mañana del proestro la regula de manera estimulante y no participa por la tarde del mismo día del ciclo estral.

En el presente estudio se analizó la participación del sistema colinérgico del NSQ a las 9:00 horas del día del proestro, vía la activación de los receptores muscarínicos y nicotínicos, sobre las funciones del ovario. Para ello, se realizó la estimulación de los receptores colinérgicos con carbacol, un agonista no selectivo de los receptores colinérgicos.

## 7. HIPÓTESIS

Dado que el sistema colinérgico regula de manera estimulante la actividad trófica y metabólica del núcleo supraquiasmático y a su vez las proyecciones del supraquiasmático estimulan la síntesis de GnRH, entonces la microinyección de carbacol, agonista no selectivo de los receptores colinérgicos, en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho resultará en el incremento de la respuesta ovárica.



## **8. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto de la estimulación farmacológica con carbacol de los receptores colinérgicos del núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho a las 9:00 horas del proestro sobre la respuesta ovárica.

### **Objetivos Particulares**

1. Evaluar los efectos de la micro-inyección de carbacol en el NSQ izquierdo o derecho a las 9:00 horas del proestro sobre:
  - Porcentaje de animales ovulantes
  - Número de ovocitos liberados por ovario
  - Concentración de hormonas esteroides ováricas (P<sub>4</sub>, T, E<sub>2</sub>)
2. Realizar un análisis comparativo sobre la respuesta ovárica de animales con micro-inyección de carbacol entre el NSQ izquierdo y derecho sobre la respuesta ovárica.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizaron ratas hembra adultas vírgenes de la cepa CII-ZV con un peso aproximado de 230-260 gramos con libre acceso al agua y alimento (Purina S.A, México), mantenidas en un régimen de iluminación de 14 horas de luz por 10 horas de obscuridad y una temperatura  $22\pm 2$  °C. Cada uno de los animales se manipuló de acuerdo a lo establecido por la Ley Mexicana de Protección Animal para el uso de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999). El comité de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, aprobó el uso del protocolo experimental para la realización del presente estudio. En todo procedimiento de manipulación y cirugía se esforzó para minimizar el número de ratas requeridas y el sufrimiento de las mismas.

El ciclo estral de los animales fue monitoreado por la toma diaria de muestra epitelial vaginal entre las 8:00 y 8:30 de la mañana y sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron al menos dos ciclos regulares consecutivos de cuatro días de duración.

En el proestro se realizaron todos los procedimientos quirúrgicos, de acuerdo a los siguientes grupos experimentales:

Para descartar si la sola sedación del animal modificaba los parámetros a cuantificar en el estudio, un grupo de 10 animales a las 9:00 horas del proestro fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Pisabental, PISA Agropecuaria S.A de C.V México) a una concentración de 25 mg/Kg de peso corporal vía intraperitoneal (i.p.). Los animales fueron sacrificados a las 9:00 horas del estro inmediato.

## Micro-inyección en el núcleo supraquiasmático

Las ratas fueron anestesiadas y posteriormente colocadas en un aparato estereotáxico (instrumento de David Kopf, Tujunga, CA.). Se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm de longitud rostrocaudal en el dorso de la cabeza del animal, se retiró el exceso de tejido del cráneo con ayuda de una solución 1:1 de agua destilada-agua oxigenada para observar el punto de referencia Bregma (unión de los huesos parietales con los frontales). Para localizar al NSQ izquierdo y derecho en el plano dimensional del cráneo de la rata se usaron las coordenadas estandarizadas a partir del Atlas de Paxinos y Watson (2004) tomando como punto de referencia el Bregma: para el lado izquierdo Antero-posterior (A-P) -0.3mm, Medio-lateral (M-L) +0.2mm y Ventral (V) -9.1mm y para el lado derecho A-P -0.3mm M-L -0.4mm y V -9.1mm. Utilizando un micromotor y una fresa de acero inoxidable se perforó el cráneo para la inserción de la aguja de micro-inyección (27Gx13mm) hacia el NSQ izquierdo o derecho. La aguja se conectó a una jeringa Hamilton de 25  $\mu$ L la cual se colocó en una bomba de micro-inyección (CMA/100; BAS, Stockolm, Sweden) con un tubo de teflón (0.65mm, 0.12mm; Bioanalytical Systems, Inc, West Lafayette, IN).

Grupo de 10 ratas en el día del proestro fueron anestesiadas a las 9:00 horas y micro-inyectadas, en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D), con un volumen de 0.3 $\mu$ L de una solución 50 $\mu$ M de carbacol (CCh) (Carbamylcholine choride; Sigma St. Louis) disuelta en solución salina (NaCl al 0.9%, PISA). En otro grupo se microinyectaron 0.3 $\mu$ L de solución salina que fungió como el grupo vehículo (Grupo Vh), en el NSQ-I o NSQ-D. En todos los grupos la velocidad de la inyección fue de 0.3  $\mu$ L por minuto. Al finalizar

el proceso de microinyección se procedió a limpiar la zona y a suturar la herida. Terminada la cirugía las ratas fueron regresadas a condiciones de bioterio y sacrificadas al presentar el estro vaginal.

Otro grupo control estuvo formado por 10 ratas sin ninguna manipulación, sacrificadas en el día del estro a las 9:00 horas.

### **Procedimiento de autopsia**

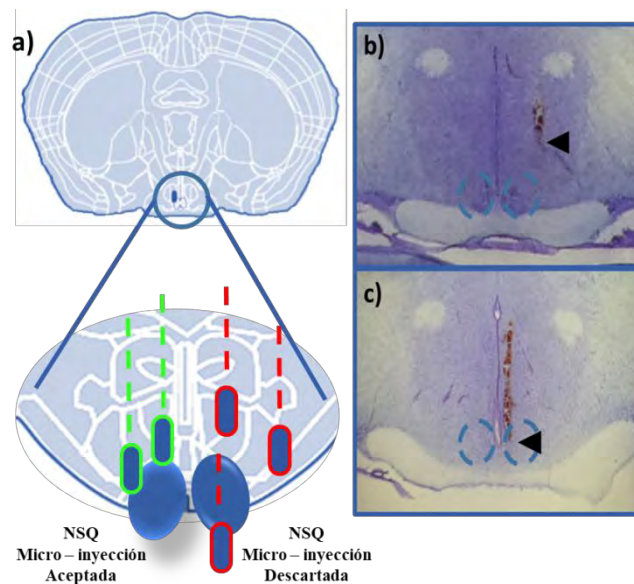
Los animales fueron sacrificados por decapitación, la sangre recolectada y mantenida en un periodo de reposo de 15 minutos para centrifugarla a 3,500 rpm por 15 minutos, el suero fue guardado en tubos eppendorf de 1.5 mL a -20°C hasta la fecha de la cuantificación hormonal. Se disecaron y pesaron el útero y los ovarios, en los oviductos con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon, Modelo C-PS) se buscaron y contaron el número de ovocitos liberados por ovario.

Para corroborar que el sitio de micro-inyección estuviera en la zona del NSQ, el cerebro de los animales (Vh y CCh), fue recolectado y fijado en una solución al 10% de formaldehído por 8 días, posteriormente se realizaron cortes coronales a 100 µm con ayuda de un vibrátomo (Serie 3000; Technical Products International, Inc., St Louis, MO) que fueron montados en porta objetos con gelatina al 2% disueltas en Fenol al 0.5%. Los cortes de cerebro fueron teñidos con la técnica de tinción de Nilss (Violeta de Cresilo al 1%). Sólo aquellos animales en los cuales la micro-inyección se encontró dentro de la zona del supraquiasmático se incluyeron en el presente estudio (Figura 12).

Para cuantificar las hormonas esteroides progesterona (ng/mL), testosterona (pg/mL) y estradiol (pg/mL) se utilizó la técnica inmunoenzimática de ELISA, con ayuda de kits comerciales DRG Instruments GmbH (Alemania).

### Análisis de resultados

Los resultados del presente estudio fueron expresados como la media y el error estándar de la media y fueron sometidos a un análisis estadístico donde el porcentaje de animales ovulantes (número de animales ovulantes/número de animales por grupo x 100) se analizó con la prueba de probabilidad exacta de Fisher, el número de ovocitos liberados fue analizado por la prueba U de Mann-Whitney. La concentración sérica de hormonas esteroides ( $P_4$ , T,  $E_2$ ) se analizó por la prueba “t” de Student y en todos los casos se consideraron las diferencias como significativas cuando el valor de p fuera igual o menor a 0.05. El análisis estadístico se realizó mediante el software Graphpad InStat 3.



**Figura 12.** a) esquema que representa las trayectorias posibles efectivas (Verde) e inefectivas (Rojo) de la micro-inyección en el NSQ sea izquierdo o derecho. En el estudio solo se incluyeron animales los cuales la micro-inyección haya quedado dentro del NSQ (Verde). b) Corte histológico (60  $\mu$ m) de un animal el cual la trayectoria de micro-inyección esta por fuera del NSQ (Flecha negra). c) corte histológico donde la trayectoria queda dentro del NSQ (Flecha negra)

## 10. RESULTADOS

Para descartar que los efectos de la micro-inyección en el NSQ hayan sido por la sedación con PB, en un grupo experimental se procedió a evaluar las funciones ováricas después de la inyección intraperitoneal con el barbitúrico.

### Ovulación

La inyección de PB en la mañana del proestro no modificó el porcentaje de animales ovulantes, ni el número de ovocitos liberados por ovario, en comparación al grupo testigo absoluto (TA) (Figura 13).

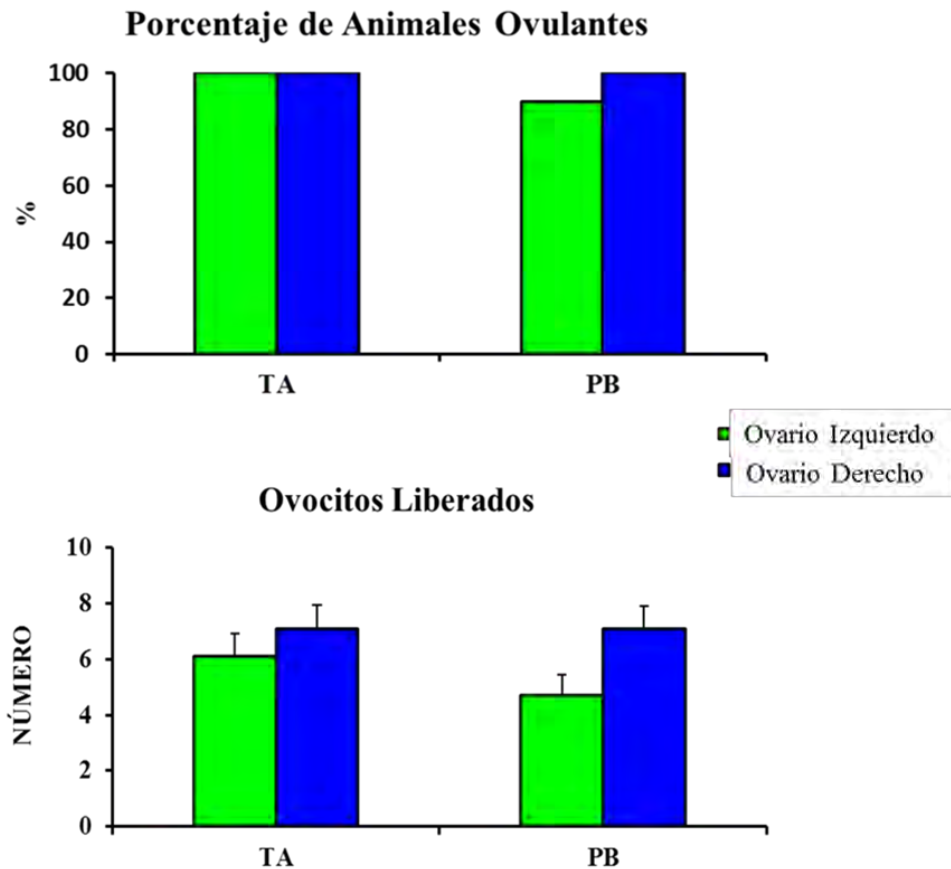
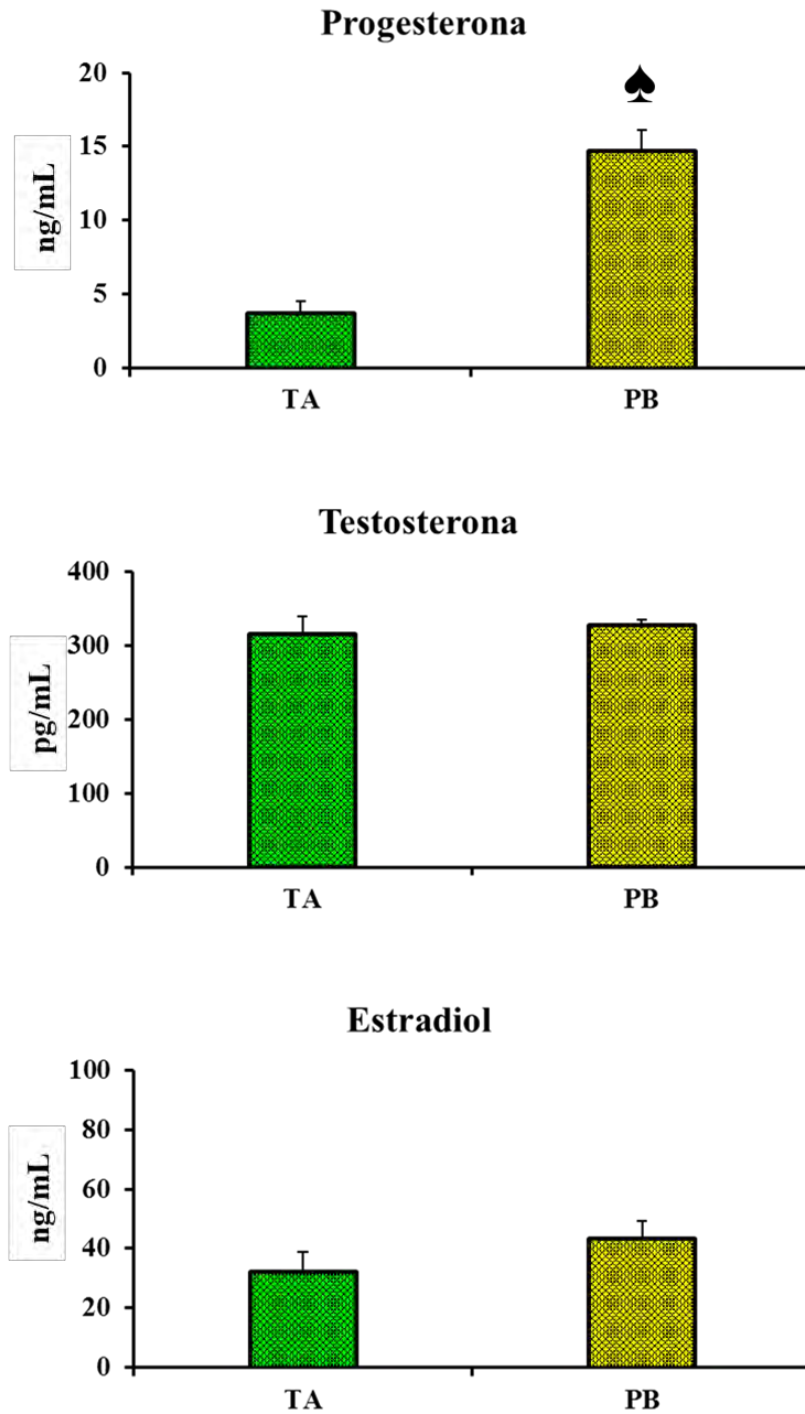


Figura 13. Porcentaje de animales ovulantes y la media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales testigo (TA) o con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PB) realizado entre las 9:00-10:00 h del proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal.

### **Hormonas Esteroides**

En comparación al grupo testigo, la administración intraperitoneal de PB en la mañana del proestro, resultó en el aumento en la concentración sérica de progesterona, mientras que, la concentración sérica de testosterona y estradiol no se modificó (Figura 14).



♠  $p < 0.05$  vs. su respectivo TA (Prueba “t” de Student)

Figura 14. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol de animales testigo absoluto (TA) o con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PB) realizado a las 9:00 h. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal.



## EFFECTO DE LA MICRO-INYECCIÓN DE SOLUCIÓN SALINA EN EL NSQ IZQUIERDO O DERECHO A LAS 9:00 h DEL PROESTRO, SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA

### Ovulación

La micro-inyección de Vh en el núcleo supraquiasmático izquierdo (Vh NSQ-I) o derecho (Vh NSQ-D), realizada a las 9:00 h del día del proestro, no modificó el porcentaje de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados por ovario respecto al grupo con PB (Figura 15).

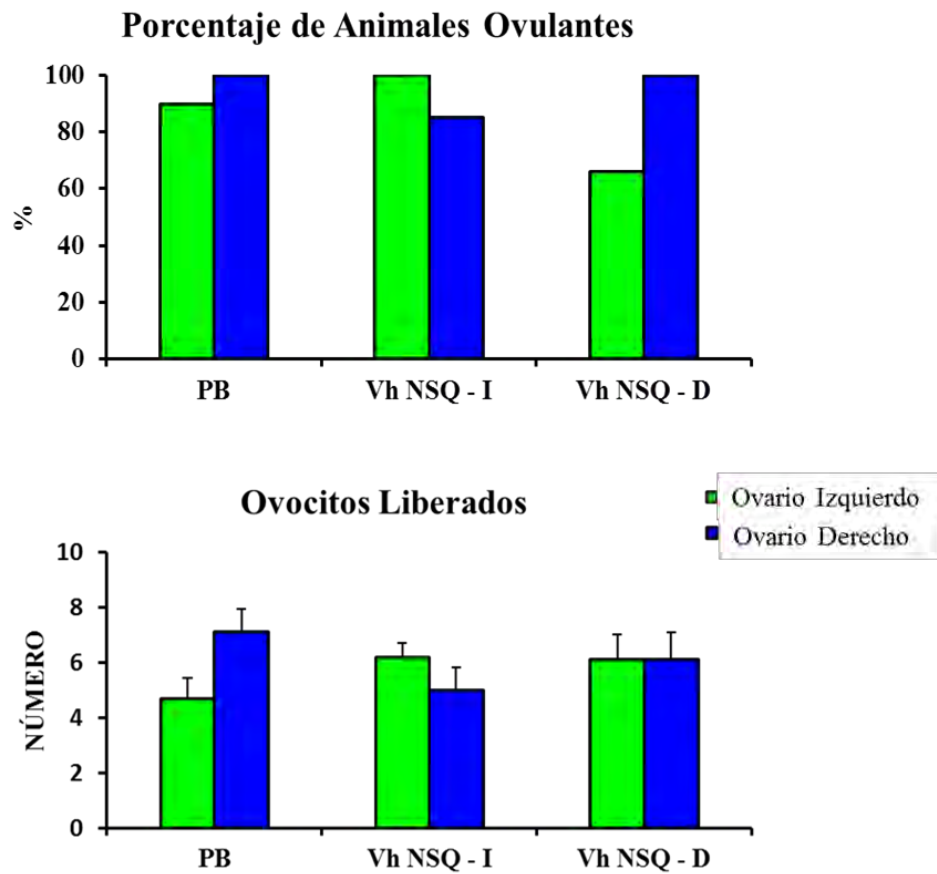
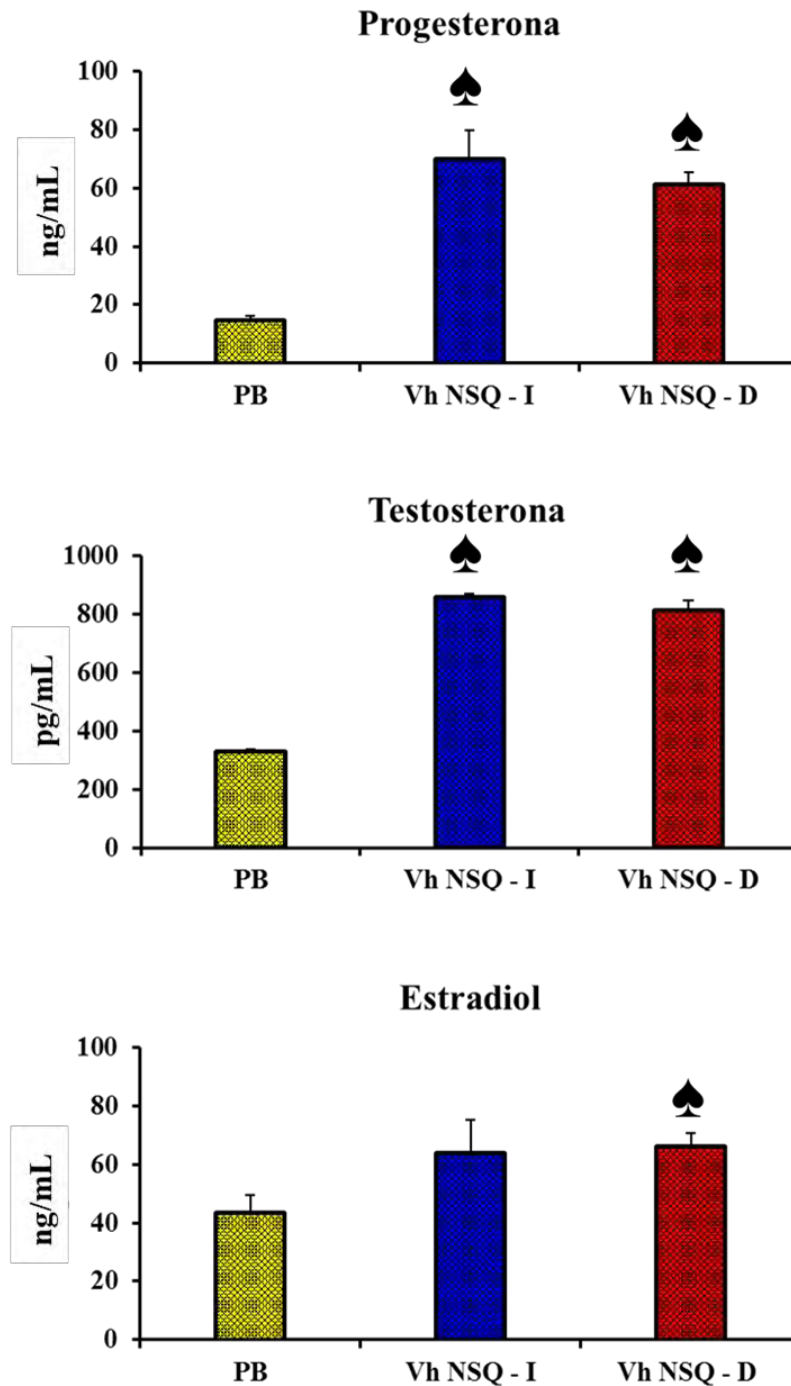


Figura 15. Porcentaje de animales ovulantes y la media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales con inyección intraperitoneal de PB, de animales con micro-inyección de solución salina en el núcleo supraquiasmático izquierdo (Vh NSQ-I) o derecho (Vh NSQ-D) realizado entre las 9:00-10:00 h del proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal.

### **Hormonas Esteroides**

Comparado con el grupo con inyección intraperitoneal de PB, la microinyección de solución salina en el núcleo supraquiasmático izquierdo (Vh NSQ-I) resultó en una mayor concentración sérica de progesterona y testosterona, mientras que no se modificó la concentración de estradiol (Figura 16).

La administración de solución salina en el núcleo supraquiasmático derecho (Vh NSQ-D), resultó en una mayor concentración de progesterona, testosterona y estradiol, en comparación al grupo con PB (Figura 16).



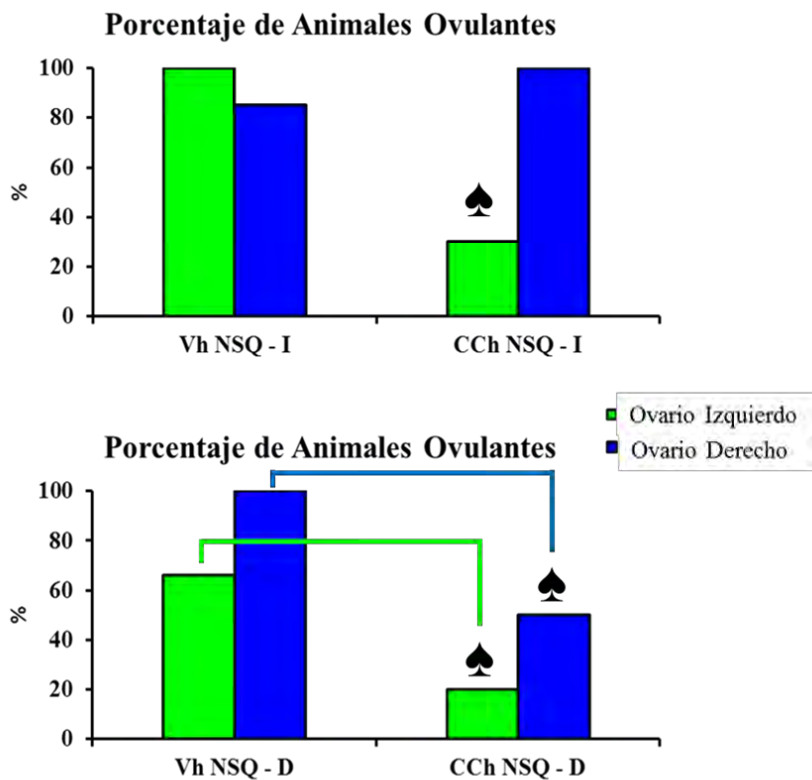
♠  $p < 0.05$  vs. grupo con PB (Prueba “t” de Student)

Figura 16. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol de animales con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PB), o de animales con micro-inyección de solución salina en el núcleo supraquiasmático izquierdo (Vh NSQ-I) o derecho (Vh NSQ-D) realizada entre las 9:00-10:00 h del proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal.

## EFFECTO DE LA MICRO-INYECCIÓN DE CARBACOL EN EL NSQ IZQUIERDO O DERECHO A LAS 9:00 h DEL PROESTRO SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA

### Ovulación

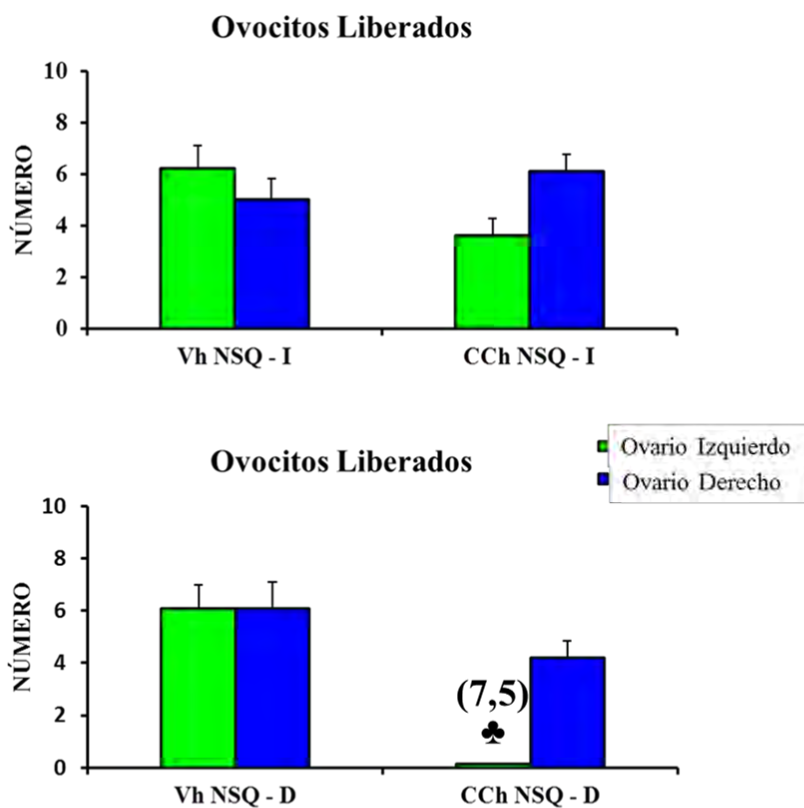
La micro-inyección de carbacol en el lado izquierdo (CCh NSQ-I), resultó en la disminución del porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo, respecto al grupo Vh NSQ-I, donde sólo el 25% de los animales ovularon, mientras que en el ovario derecho no se modificó dicho parámetro (Figura 17). La micro-inyección de carbacol en el núcleo supraquiasmático derecho (CCh NSQ-D) resultó en un menor porcentaje de animales ovulantes por ambos ovarios, respecto al grupo con Vh NSQ-D (Figura 17).



♠  $p < 0.05$  vs. su respectivo Vh (Prueba exacta de Fisher)

Figura 17. Porcentaje de animales ovulantes en el grupo con micro-inyección de solución salina (Vh) o carbacol (CCh) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) realizado entre las 9:00-10:00 h del proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro post-cirugía.

La micro-inyección de carbacol en el núcleo supraquiasmático izquierdo (CCh NSQ-I) no modificó el número de ovocitos liberados por los ovarios, respecto a su grupo con micro-inyección de solución salina (Figura 18). En el grupo con CCh NSQ-D, los dos animales ovulantes liberaron 7 y 5 ovocitos respectivamente por el ovario izquierdo, mientras que por el ovario derecho no se modificó dicho parámetro (Figura 18).



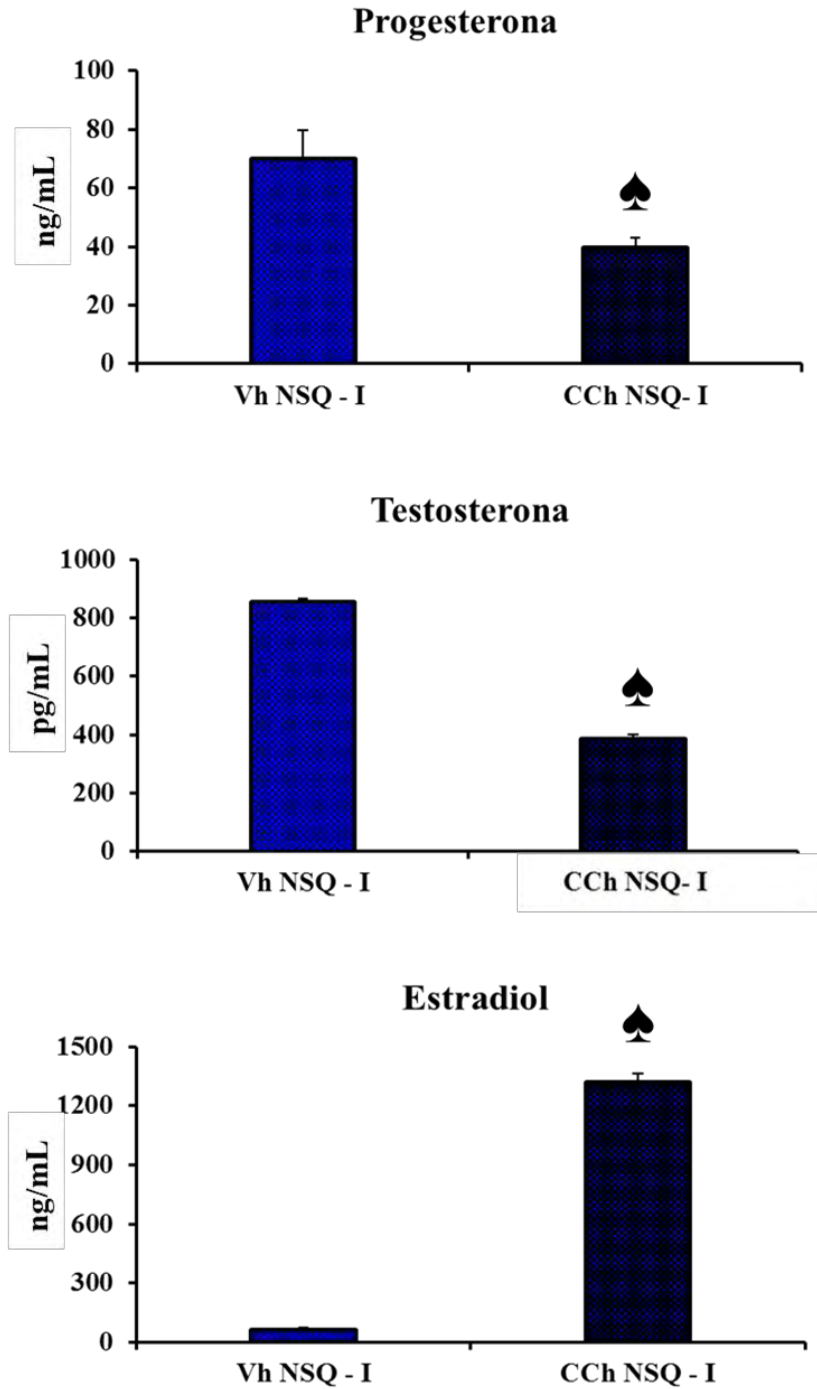
♣ No. de ovocitos liberados por los 2 animales ovulantes

Figura 18. Media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados de animales con micro-inyección de solución salina o carbacol (CCh) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) realizado entre las 9:00-10:00 h del proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal post-cirugía.

### **Hormonas Esteroides**

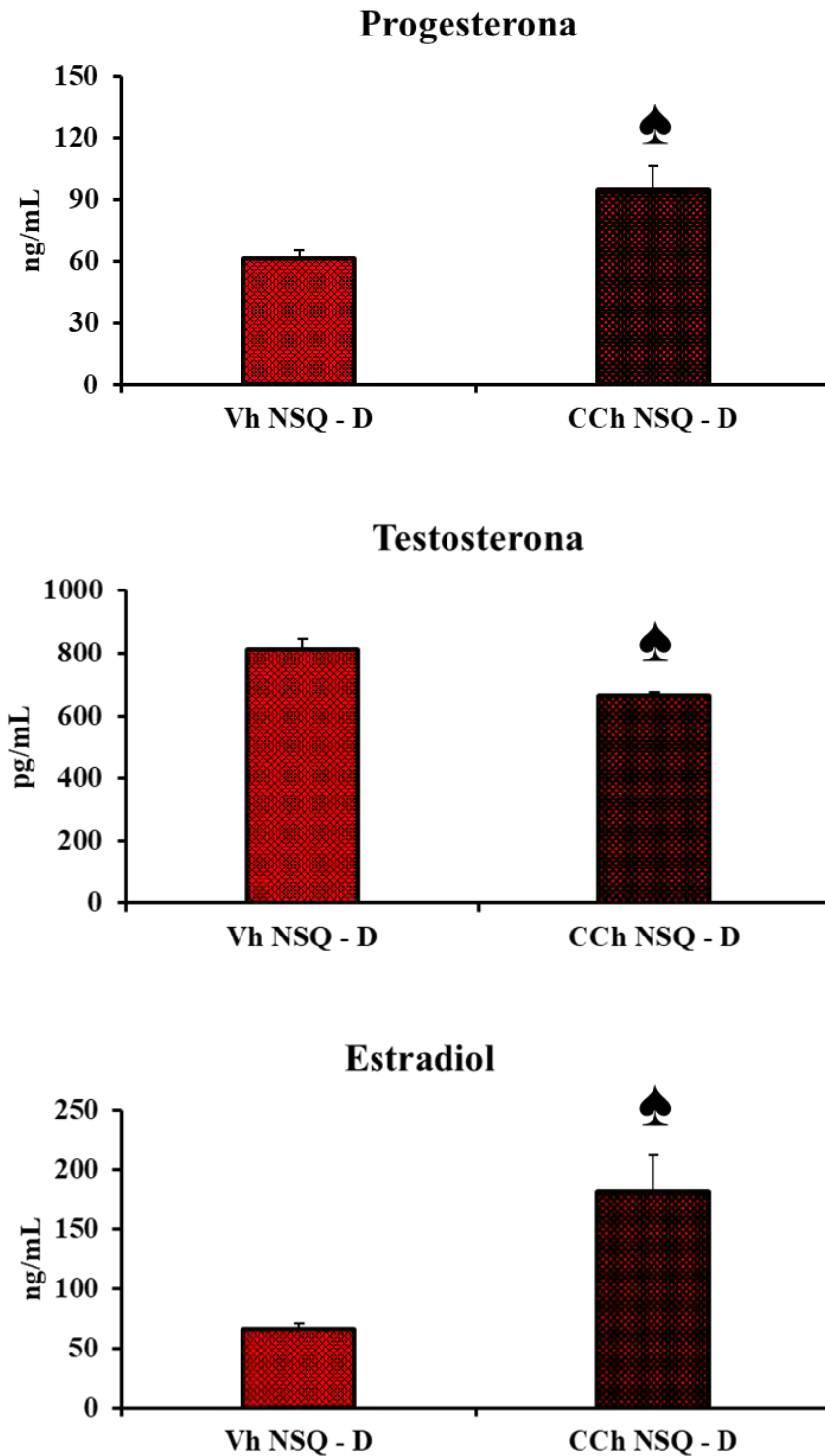
La micro-inyección de carbacol en el núcleo supraquiasmático izquierdo (CCh NSQ-I), resultó en una menor concentración sérica de progesterona y testosterona, en comparación al grupo Vh NSQ-I (Figura 19), mientras que la concentración de estradiol fue mayor (Figura 19).

En comparación con su respectivo grupo con vehículo, la micro-inyección de carbacol en el núcleo supraquiasmático derecho (CCh NSQ-D), resultó en un incremento significativo de la concentración de progesterona y estradiol, mientras que la concentración de testosterona fue menor (Figura 20).



♠  $p < 0.05$  vs. su respectivo Vh (prueba “t” de Student)

Figura 19. Media  $\pm$  e.e.m de la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol de animales con micro-inyección de solución salina (Vh) o de carbacol (CCh) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) realizado entre las 9:00-10:00 h del día del proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro post-cirugía.



♠  $p < 0.05$  vs. su respectivo Vh (Prueba “t” de Student)

Figura 20. Media  $\pm$  e.e.m de la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol de animales con micro-inyección de solución salina (Vh) o de carbacol (CCh) en el núcleo supraquiasmático derecho (NSQ-D) realizado entre las 9:00-10:00 horas del día del proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro post-cirugía.



## EFFECTO COMPARATIVO DE LA MICRO-INYECCIÓN DE CARBACOL EN EL NSQ IZQUIERDO O DERECHO A LAS 9:00 h DEL PROESTRO SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA

### Ovulación

En el grupo con micro-inyección de carbacol en el núcleo supraquiasmático derecho (CCh NSQ-D), el porcentaje de animales ovulantes por el ovario derecho, fue menor que el observado con la micro-inyección del lado izquierdo, pero la cuota ovulatoria fue similar en los dos grupos (Figura 21).

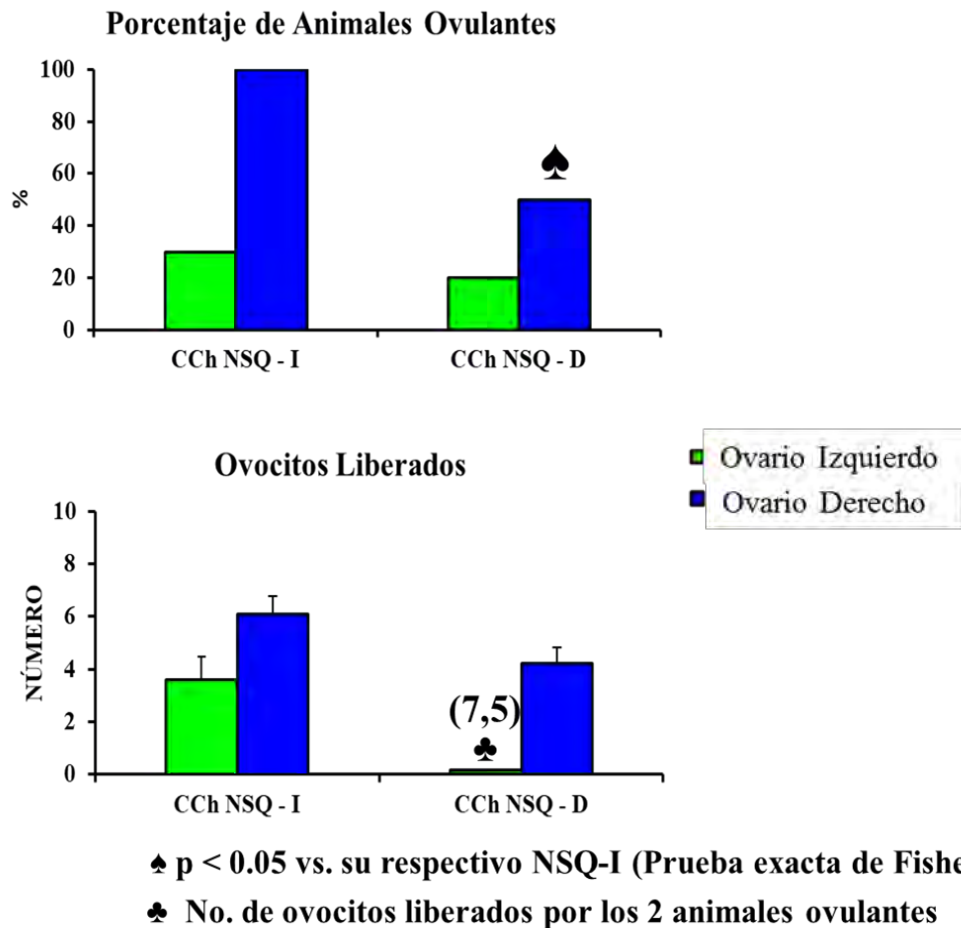
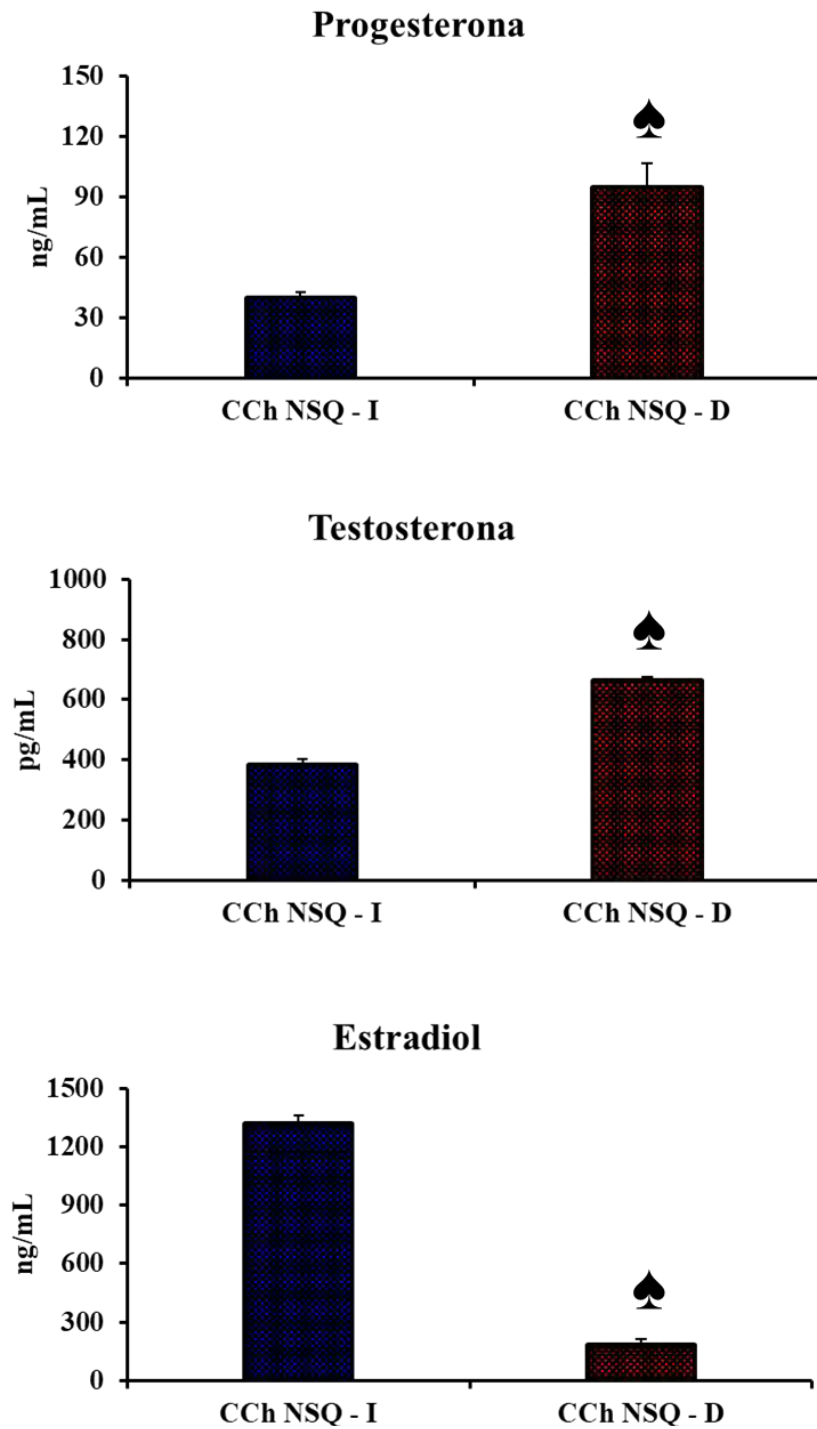


Figura 21. Porcentaje de animales ovulantes y la media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberados de animales con micro-inyección de carbacol (CCh) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) realizado entre las 9:00-10:00 h del proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro post-cirugía.

### **Hormonas esteroideas**

La concentración sérica de progesterona y testosterona fue más alta en los animales con micro-inyección de carbacol en el núcleo supraquiasmático derecho (CCh NSQ-D), en comparación al grupo con micro-inyección del lado izquierdo (CCh NSQ-I), efecto inverso se observó en la concentración de estradiol, donde el valor más alto correspondió al grupo con micro-inyección del lado izquierdo (Figura 22).



♠  $p < 0.05$  vs. su respectivo CCh NSQ - I (Prueba “t” de student)

Figura 22. Media  $\pm$  e.e.m de la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol de animales con micro-inyección de carbacol (CCh) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) y derecho (NSQ-D) realizado entre las 9:00.10:00 horas del día del proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro post-cirugía.

## 11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con base en los resultados obtenidos se sugiere que la estimulación del sistema colinérgico del NSQ, inhibe la respuesta ovulatoria y regula la secreción de progesterona de manera diferencial, dependiendo del núcleo estimulado. En la rata adulta a las 9:00 horas del proestro la actividad circadiana del sistema colinérgico del NSQ es esencial para el correcto funcionamiento del ovario.

Los barbitúricos son fármacos depresores del sistema nervioso central con propiedades sedativas, hipnóticas y anestésicas (Ito y col., 1996). Cuando se administra un barbitúrico (Nembutal o Pentobarbital) en ratas cíclicas a diferentes horas (9:00, 11:00, 12:45, 17:00, 19:00 y 21:00 h), a lo largo del ciclo estral, se produce un bloqueo de la ovulación y disminución del desarrollo folicular, que depende de la hora y día del ciclo a la cual se realice la administración, ya que a las 12:45 y 17:00 h del diestro 1, diestro 2 o estro, la administración del barbitúrico resulta en el bloqueo de la ovulación en el 80% de los animales, mientras que en proestro este efecto se produce a las 11:00 o 12:45 h. Se ha postulado que el barbitúrico actúa de manera inhibitoria sobre las neuronas GnRHérgicas o directamente sobre los gonadotropos que sintetizan LH, ya que la administración simultánea de la hormona coriónica humana (hCG), restablece la ovulación (Everett y Sawyer, 1950; Domínguez y Smith, 1974). Aunque no se descarta que la falta de ovulación se deba a una menor concentración de LH como resultado del desfase del ciclo estral (Everett y Sawyer 1950).

Ito y colaboradores (1996) plantean que el PB puede estar actuando sobre las neuronas GnRHérgicas de manera directa, o bien, a través de las inter-neuronas

que establecen contacto con las GnRHérgicas. Al respecto se sabe que las neuronas que sintetizan opiodes, la  $\beta$ -endorfina y el ácido  $\gamma$  amino butírico (GABA) inhiben la liberación de GnRH, mientras que, kisspeptina y noradrenalina la estimulan (Flores y Flores, 2005; Prieto y Velázquez, 2002; Smarr y col., 2012).

Se ha atribuido el efecto del barbitúrico a su acción sobre la neurona GABAérgica, la cual inhibe la liberación de GnRH lo que explicaría el bloqueo de la ovulación (Ito y col., 1996). Al parecer el efecto del PB sobre la secreción de GnRH va a depender del día del ciclo estral y de la hora, ya que en el presente estudio la sedación con 25 mg/Kg de peso corporal de PB a las 9:00 h del proestro no afectó la respuesta ovulatoria, similar a lo reportado con anterioridad (Lagunas, 2014; García, 2016; Vieyra y col., 2016). No descartamos que los efectos del PB también dependan de la dosis utilizada, al respecto, Domínguez y Smith (1974) mostraron que a las 9:00 h del proestro una dosis de 50 mg/kg p.c., produce un bloqueo parcial en la ovulación.

La función ovárica implica la formación de ovocitos capaces de ser fecundados y la secreción de hormonas esteroides. La secreción de progesterona, testosterona y estradiol varía a lo largo del ciclo estral dependiendo de la fase del desarrollo folicular en la que se encuentre el ovario (Levine, 2015). De acuerdo a Brown y colaboradores (1976) el aumento en la secreción de progesterona observado en el día del proestro puede ser atribuido a las adrenales, en respuesta a la influencia de las hormonas reproductivas. En la fase luteal la secreción de progesterona incrementa por la acción del cuerpo lúteo momentos después de la ovulación. Lagunas (2014) y García (2016), mostraron que la inyección de PB a las 9:00 horas del proestro, disminuye la secreción de

progesterona 24 horas después de la administración, lo que ha sido atribuido a una menor actividad de la glándula adrenal.

En el presente estudio la sedación con PB en la mañana del proestro no modificó el número de ovocitos liberados al estro vaginal, sin embargo la concentración de progesterona fue tres veces más alta que la de un animal intacto. Partiendo del hecho de que el número de cuerpos lúteos es el reflejo del número de los ovocitos liberados, asumimos que la mayor secreción de progesterona provenga de la adrenal.

Se ha descrito que el PB puede inducir disminución en la concentración de estradiol, probablemente en respuesta a la disminución en la secreción de GnRH hipotalámico o de LH a nivel hipofisario (Lagunas, 2014; García 2016). En el presente estudio no se observó efecto del barbitúrico sobre la secreción de estradiol, al momento no contamos con una explicación para esta discrepancia.

La ovulación requiere la temporización de diversos procesos fisiológicos y endocrinos, dentro de los que se encuentran la secreción de hormonas y neurotransmisores esenciales para el crecimiento, maduración folicular y la expulsión del ovocito. Se ha descrito al NSQ como el marcapasos circadiano que controla diversos procesos fisiológicos, entre ellos la ovulación (Watts y col., 1989; De la Iglesia y col., 2003; Van de Beek y col., 1997). La integridad del NSQ es esencial para el control de las funciones circadianas, ya que al realizar la lesión del NSQ hay un desplazamiento de la actividad motora y un cambio en la secreción de diversos neurotransmisores involucrados en la actividad diurna y control del sueño en los mamíferos (Stephan y Zucker, 1972; Moore y Eichler, 1972; Moore y Klein, 1994).

En el hámster dorado y la rata, la actividad circadiana de la LH es abolida por la lesión del NSQ (Turek y col., 1987, Watts y col., 1989), lo cual plantea la participación del NSQ en la regulación de la ovulación. Ramírez y colaboradores (2016) mostraron que a las 11:00 horas del proestro la lesión térmica bilateral del NSQ produce la anovulación en el 100% de los animales. Estas evidencias sugieren que se requiere de la integridad del NSQ para que se lleve a cabo la ovulación.

En el presente estudio la micro-inyección de solución salina en el NSQ izquierdo o derecho no modificó la respuesta ovulatoria, similar a lo reportado con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (Lagunas, 2014; García, 2016). Resultados que nos permiten pensar que no se alteró la integridad del núcleo por la introducción de la aguja de micro-inyección o por la administración de la solución salina.

La micro-inyección de solución salina en el NSQ izquierdo o derecho resulta en el incremento en la concentración de hormonas esteroides. En el proceso inflamatorio inducido por la lesión neural se ha observado que ocurre un reclutamiento de células especializadas en el proceso inflamatorio como las células T y macrófagos (Lemke y col., 2017), los cuales liberan citocinas, que afectan la secreción de GnRH (Tomaszewska-Zaremba y Herman, 2009). Las citocinas derivadas del SNC de los mamíferos pueden modular la reproducción mediante sus efectos directos en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Rivest y Rivier, 1993). De manera que, al micro-inyectar la solución salina probablemente se estaría modificando el ambiente intrínseco cerebral y con ello la secreción de los neurotransmisores implicados en la regulación de la secreción de hormonas esteroides.

Los ritmos circadianos están sincronizados con el medio ambiente por señales externas principalmente el ciclo luz/oscuridad. El NSQ mediante conexiones con el sistema nervioso central y periférico es crítico en la sincronización con diversos órganos y tejidos (Stephan y Zucker, 1972; Klein y col., 1992; Herzog y col., 2007; Dibner y col., 2010). Se han planteado diversos sistemas de neurotransmisión como mediadores de la comunicación entre el NSQ con el resto del cerebro, donde la ACh es uno de los neurotransmisores clásicos en este proceso (Mohan y Radha, 1978; Zatz y Brownstein, 1979 y 1981; Earnes y Turek, 1985; Zhang y col., 1993).

Desde los trabajos de Everett y colaboradores (1950), se permitió asociar al sistema circadiano con la función ovárica. Domínguez y colaboradores (1982), postularon que en la rata adulta cíclica la ovulación es regulada de manera estimulante por el sistema colinérgico, y que la participación de éste sistema sigue un patrón circadiano, donde la acetilcolina estimula la liberación de GnRH hipotalámica; hipótesis que se ve apoyada por el hecho de que en los animales con bloqueo de la ovulación, inducido por la inyección de atropina, el remplazo de LH por la administración de hCG restablece la ovulación, mostrando que la liberación tónica de las gonadotropinas a lo largo del ciclo estral está bajo un control del sistema muscarínico (Domínguez y col., 1982).

El grupo de Bina (1993), mostró que diversas áreas del SNC (tronco cerebral y cerebro anterior basal) proyectan información colinérgica hacia el NSQ, llegando principalmente al área del “core” la cual recibe información fótica de la retina (Meijer y Rietveld, 1989; Van den Pol y Tsujimoto, 1985). La lesión con ácido quinolínico del NBM (núcleo de naturaleza colinérgica que proyecta



al NSQ), resulta en una disminución en la expresión de VIP y AVP en el NSQ así como la disminución del tamaño neuronal. Estas evidencias permiten plantear que la ACh es esencial en el mantenimiento trófico, el metabolismo y la secreción de los neurotransmisores del NSQ (Madeira, 2004).

En la mañana del proestro el bloqueo de los receptores muscarínicos del NSQ izquierdo o derecho, por la micro-inyección de atropina, produce bloqueo de la ovulación, efecto que no se presenta si la microinyección se realiza por la tarde del proestro o por la mañana-tarde del diestro 1. Estas evidencias apoyan la idea de la acción temporizada del sistema colinérgico del NSQ en la regulación de los mecanismos que conllevan a la ovulación (Vieyra y col., 2016). De igual manera, se ha sugerido que existe una lateralización del sistema colinérgico de POA-AHA que regula la ovulación (Cruz y col., 2014).

En el presente estudio se observó que la estimulación de los receptores colinérgicos del NSQ-I con carbacol, agonista no selectivo de los receptores colinérgicos, bloquea la ovulación por parte del ovario izquierdo (ipsilateral al núcleo estimulado) en el 70% de los animales, mientras que la estimulación del NSQ-D, causó un decremento en la tasa ovulatoria por ambos ovarios. Esta respuesta es semejante a cuando se microinyecta ACh en el NSQ-Derecho a las 09:00 h del proestro (Vieyra 2017).

Se ha planteado que el NSQ contiene 11,000 neuronas distribuidas en al menos 8 neurotransmisores, los de mayor expresión son GABA, VIP y AVP, donde GABA modula directamente la secreción de los demás neurotransmisores (Moore y Leak, 2002; Moldavan y col., 2015). Elgueta y colaboradores (2014) mostraron que en células ganglionares la ACh es capaz de unirse a los

receptores nicotínicos y estimular la liberación de GABA. Nuestros resultados nos llevan a pensar que al administrar carbacol en el NSQ izquierdo o derecho se estaría activando las neuronas GABAérgicas (neurotransmisor inhibitorio), y de esta manera se inhibiría la actividad de las neuronas VIPérgicas y AVPérgicas lo que explicaría una menor secreción de GnRH y por ende una menor respuesta ovulatoria (Modelo 1).

Las evidencias anteriores permiten señalar a VIP y AVP como dos neurotransmisores claves para que se lleve a cabo la ovulación. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que en la tarde del proestro, la inervación AVP que surge del NSQ estimula la liberación preovulatoria de LH (Palm y col., 1999), en tanto que en ratones hembra knock out para VIP la respuesta ovulatoria se reduce (Loh y col., 2014).

No descartamos que la menor respuesta ovulatoria se deba a un cambio en la actividad eléctrica de las neuronas del NSQ. La administración *in vitro* de carbacol al NSQ inhibe su actividad en el 55% de las neuronas, el 21% es activada y el 24% restante no responde (Yang y col., 2010). Aunado a esto se ha reportado que el carbacol induce avances de fase dependientes del sistema circadiano (Liu y Gillette, 1993).

Se ha descrito que vía el nervio vago existe una conexión entre el NSQ y las adrenales (Buijs y col., 1993). El nervio vago es de naturaleza colinérgica e inerva principalmente a la adrenal, hígado y útero (Gerendai y col., 2000; Buijs col., 2003) y participa en el control de las funciones ováricas (Cruz y col., 1986, Morales-Ledesma y col., 2004; 2007; Leliavski y col., 2015). En el presente estudio, la estimulación de los receptores colinérgicos del NSQ-I resulta en un

decremento aproximado del 50% de la concentración sérica de P4 y T, resultados que podrían atribuirse a que al estimular el sistema colinérgico del NSQ-I, disminuye el efecto estimulante de VIP y AVP y por ende la respuesta de la adrenal es menor (Modelo 2). Nuestros resultados nos permiten sugerir que la respuesta de la adrenal izquierda y derecha es diferente, ya que cuando el carbacol se micro-inyecta en el lado derecho del NSQ incrementa la concentración sérica de progesterona, lo que nos indica que la adrenal derecha es más sensible a la información VIPérgica y AVPérgica del núcleo, lo que se traduce en una mayor secreción de progesterona (Modelo 3). No descartamos que en estos animales, en donde disminuyó la respuesta ovulatoria, se haya producido la luteinización de los folículos lo que explicaría el aumento en la progesterona, idea que necesita ser corroborada.

Existen varias evidencias que apoyan la comunicación nerviosa entre la adrenal y el sistema nervioso central (Dallman y col., 1976; Tóth, 2008). Según Bailey (1987) ratones hembra adultos intactos muestran patrones de oscilación diurna de los niveles séricos de progesterona en los días de proestro y diestro. En ratas en estos mismos días del ciclo, se observan niveles máximos de P4 al final del periodo de luz, patrón que no se puede observar en animales adrenalectomizados. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que las glándulas suprarrenales son responsables del incremento en la concentración periférica de progesterona (Flores y col., 2005). De Geyter y colaboradores (2002) mostraron que la corteza suprarrenal es la principal fuente de P4 en la fase preovulatoria. En ratas adultas ovariectomizadas en el día del D1 disminuye la concentración sérica de P4 y cuando ésta se realiza en el día del proestro disminuye, por lo que postulan que las suprarrenales son la principal

fuelle de P4 cerca de la ovulación y los ovarios en la fase folicular tardía (De Geyter y col., 2002).

En el presente estudio se observó que la estimulación del NSQ-I o NSQ-D por la microinyección con carbacol incrementó la concentración sérica de estrógenos. Por estudios *ex vivo* donde se tiene al ganglio mesentérico superior-plexo ovárico y ovario, se ha mostrado que la administración de ACh al ganglio celiaco estimula la secreción de estradiol. Resultados que llevaron a los autores a sugerir que el sistema colinérgico se encuentra modulando de manera estimulante la secreción de estradiol (Vega-Orozco y col., 2010). Con estas evidencias sugerimos que el carbacol al unirse a sus receptores en el NSQ estimula una vía neural que llega hasta el ganglio celíaco mesentérico superior (GCMS), lugar donde se originan las neuronas que forman al plexo ovárico, que resulta en una mayor secreción de estradiol (Modelo 2 y 3).

En roedores y en primates no humanos se ha sugerido el papel de las hormonas gonadales en la maduración de la ritmicidad circadiana (Melo y col., 2010; Hagenauer y col., 2011<sup>a</sup> y 2011<sup>b</sup>; Hagenauer y Lee, 2011; Hummer y col., 2012; Sellix y col., 2013). En ratones macho, la falta de testosterona, resultado de una gonadectomía, afecta drásticamente los ritmos de actividad locomotora, marca una alteración del comportamiento circadiano y una disminución considerable en el número de receptores a andrógenos (AR), en diferentes regiones cerebrales donde típicamente se encuentran en gran cantidad. En éste modelo experimental el remplazo sistémico de andrógenos por el implante de una cápsula de silastic de liberación prolongada, restaura la respuesta circadiana y el número de receptores AR en las regiones cerebrales donde la gonadectomía las disminuye (Daan y col., 1975; Karatsoreos y col., 2007; Iwahana y col., 2008; Butler y

col., 2012). La disminución en la concentración sérica de testosterona estaría inhibiendo la expresión de receptores AR en el cerebro, con lo cual estaría interactuando con el sistema circadiano y modificando su secreción y actividad en el sistema periférico. Evidencias que indican que los parámetros del NSQ se ven afectados por mecanismos dependientes de AR (Karatsoreos y col., 2007; Blatner y Mahoney, 2012). En el NSQ, principalmente en la zona Shell, se expresan receptores a estrógeno ( $E\alpha$ ), (Vida y col., 2008). El estrógeno en ratas macho no participa directamente en el control del periodo circadiano, pero en hembras si lo hace (Zucker y col., 1980)

Los NSQ's presentan variaciones circadianas en la actividad eléctrica de sus neuronas; el NSQ-D presenta una onda bimodal mientras que en el NSQ-I es unimodal. Evidencias que llevan a plantear que cada NSQ puede actuar como un oscilador independiente (Zhang y Roblero, 1995). Por lo que es posible sugerir una asimetría funcional de ambos supraquiasmáticos.

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, sugerimos que la información colinérgica intrínseca y aferente al NSQ, regula la actividad de la población neural presente en el supraquiasmático y por consiguiente la liberación de GnRH y LH que facilita la ovulación así como neuromodular la actividad intrínseca de ACh del NSQ que regula sistemas periféricos específicamente la ovulación.

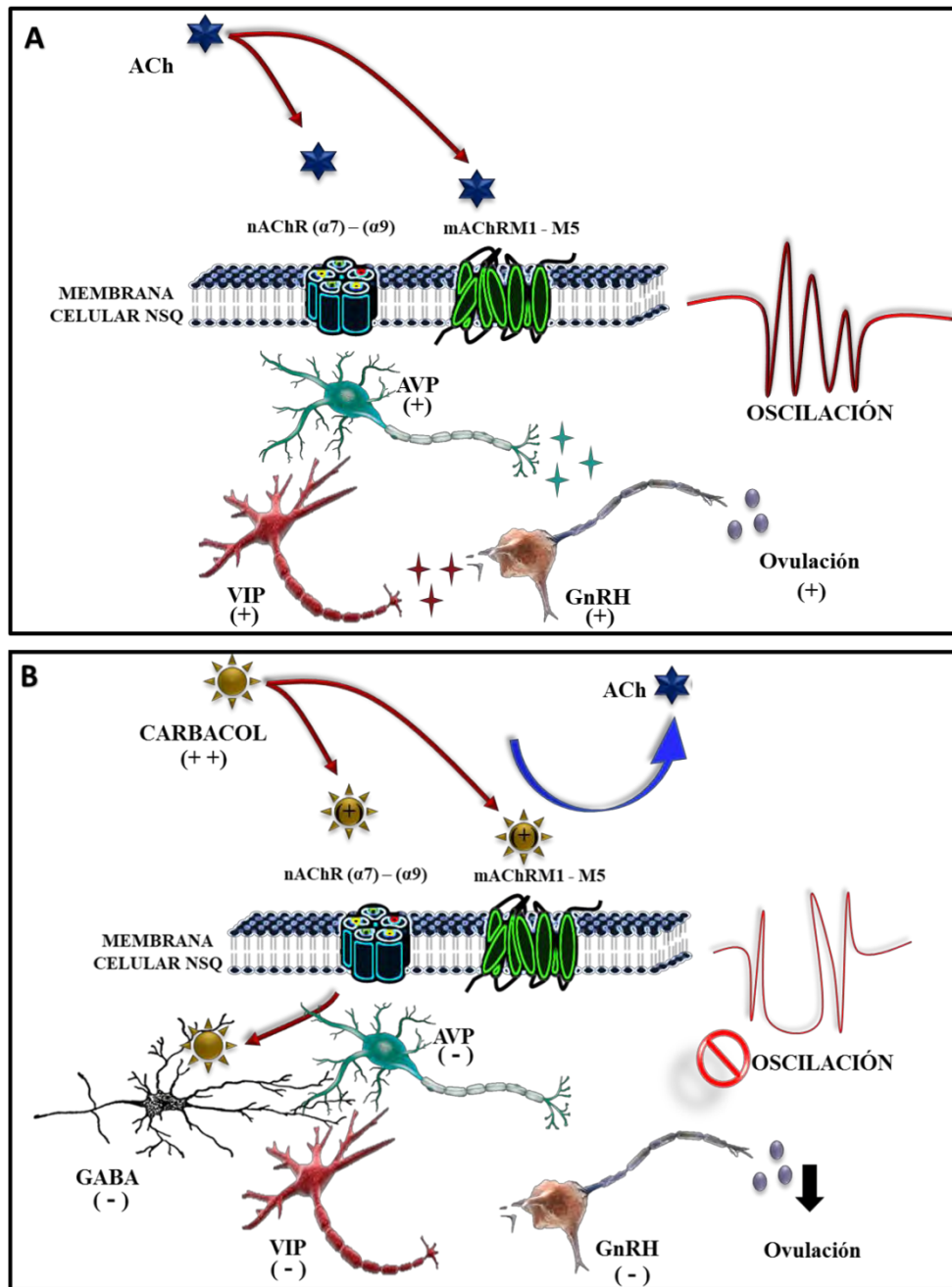
Es posible sugerir una asimetría funcional de los NSQ's, ya que el NSQ-I estaría mayormente implicado en la regulación de la secreción de progesterona y testosterona, y el lado derecho con el control de la foliculogénesis y los procesos neurales que culminan en la ovulación. Las conexiones entre el sistema nervioso

central y periférico regulan la función ovárica, mediante diversos sistemas uno de los cuales es el sistema colinérgico, interactuando con otros sistemas, interacción que depende de la sensibilidad de dichos sistemas a la acción colinérgica a lo largo del ciclo estral y de la hora del día y estado endocrino del animal.

## 12. CONCLUSIONES

- La actividad del sistema colinérgico del NSQ en la mañana del proestro es esencial para el mantenimiento de la ovulación y la secreción de hormonas esteroideas.
- La participación del sistema colinérgico de los NSQ's es asimétrica en la regulación de las funciones ováricas. El sistema colinérgico del NSQ-I modula de manera inhibitoria la secreción de progesterona mientras que el derecho participa de manera estimulante.
- El NSQ-D regula la ovulación en ambos ovarios y el NSQ-I la regula sólo en el ovario izquierdo.

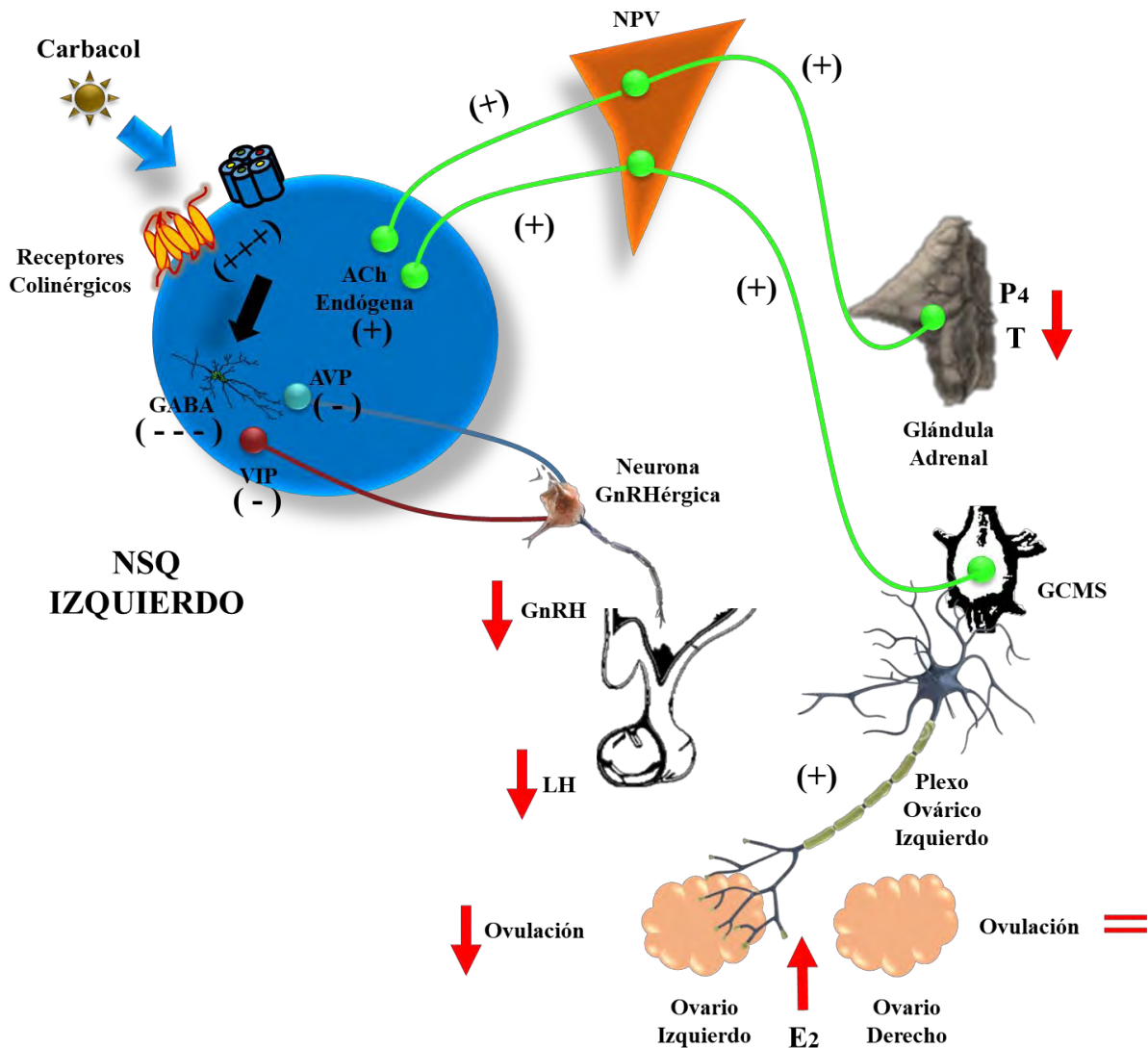
### 13. MODELO 1



**Figura 23.** Esquema que representa la acción de la acetilcolina (ACh) y carbacol (CCh) sobre las neuronas VIPérgicas y AVPérgicas del NSQ así como de la GnRH y la ovulación. A) La ACh se une a los receptores nAChR's y a los mAChR's en la membrana del NSQ generando una respuesta estimulante sobre la secreción de VIP y AVP, neurotransmisores que proyectan hacia las neuronas de GnRH en POA – AHA generando un patrón de oscilación y estimulando la ovulación. B) El carbacol al estimular los receptores nAChR's y mAChR's, por un tiempo más prolongado estaría activando las neuronas GABAérgicas (inhibitorias) con lo cual inhibiría la actividad de VIP y AVP, perdiéndose así el patrón de oscilación de la GnRH y con ello la disminución de la ovulación.



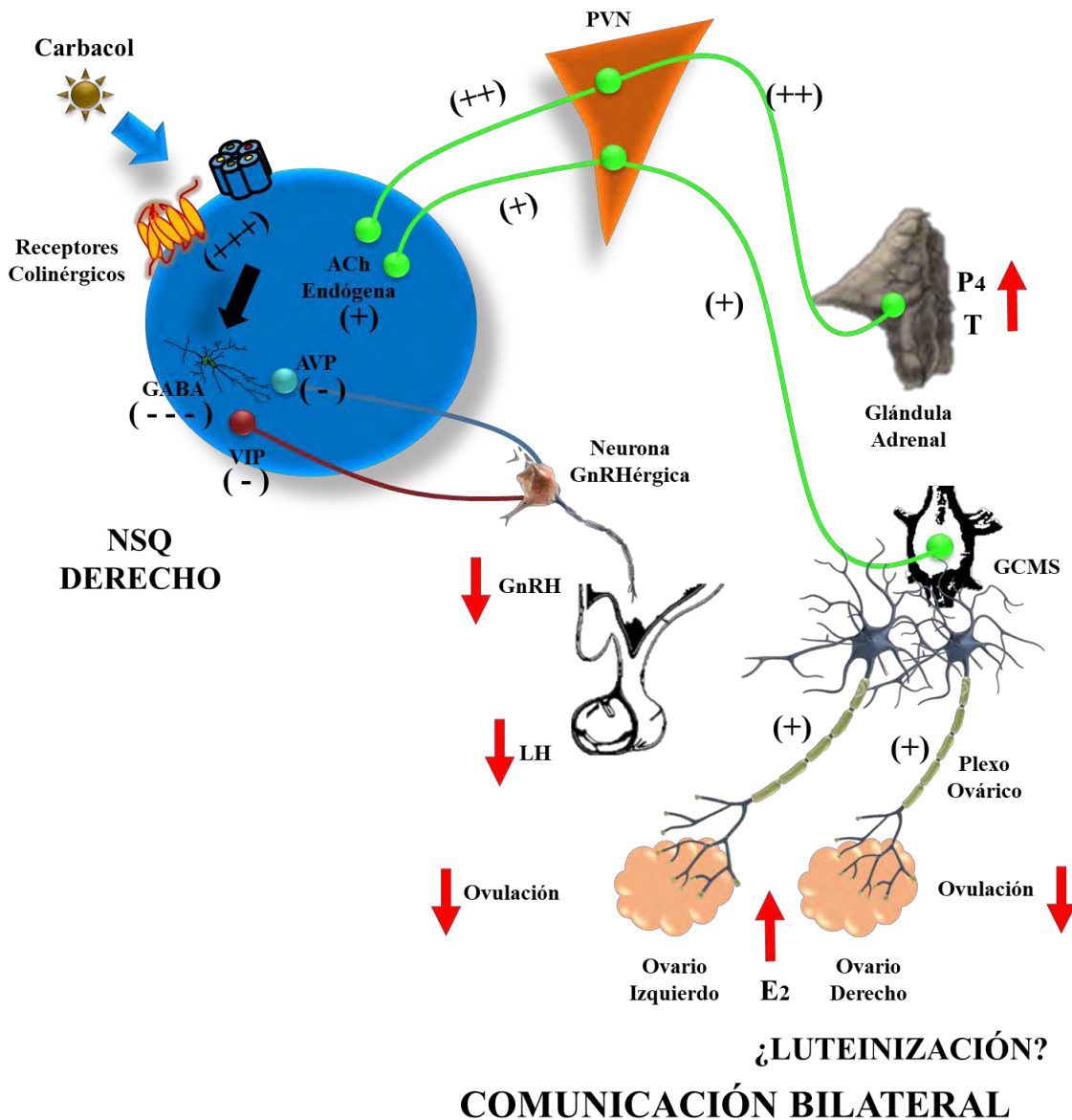
## MODELO 2



## COMUNICACIÓN IPSILATERAL

Figura 24. Esquema que representa la acción del Carbacol en las neuronas VIPérgicas, AVPérgicas y colinérgicas del NSQ Izquierdo. La estimulación de los receptores colinérgicos (mAChR's y nAChR's) del NSQ-I desencadena la inhibición de las neuronas VIPérgicas y AVPérgicas y por consiguiente de la secreción de GnRH y LH y con ello de la ovulación por el ovario izquierdo mostrando una comunicación ipsilateral, mientras que la misma estimulación activa la vía nerviosa colinérgica del NSQ al NPV desencadenado la inhibición de la secreción de progesterona y testosterona por la adrenal y estimulando por medio del GCMS y el plexo ovárico la de estradiol por parte del ovario.

### MODELO 3



*Figura 25. Esquema que representa la acción del Carbacol en las neuronas VIPérgicas, AVPérgicas y colinérgicas del NSQ Derecho. La estimulación de los receptores colinérgicos (mAChR's y nAChR's) del NSQ-D desencadena la inhibición de las neuronas VIPérgicas y AVPérgicas y por consiguiente de la secreción de GnRH y LH y con ello de la ovulación por el ovario izquierdo y derecho mostrando una comunicación hacia ambos ovarios (Bilateral), mientras que la misma estimulación activa la vía nerviosa colinérgica del NSQ al NPV desencadenado la estimulación de la secreción de progesterona y testosterona por la adrenal e inhibiendo la secreción de estradiol debido posiblemente a la falta de ovulación y a la inhibición de la vía GCMS – Plexo ovárico – Ovario. No se descarta que el incremento de la secreción de progesterona se deba a una luteinización de los folículos preovulatorios.*

## 14. BIBLIOGRAFÍA

- **Aguilar RR., Escobar C., Torner C., Granados FD., Salazar JA., Caldelas I. (1997).** Mecanismos generales de regulación fisiológica: Acoplamiento de sistemas en oscilación. En: M Hiriart, J García Sarzosa, E Martínez, S Velázquez (Ed.). Actualización en Fisiología. p. 241 – 254. México. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.
- **Albuquerque EX., Pereira EF., Alkodon M., Rogers SW. (2009).** Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Phys Rew.* 89:73 – 120.
- **Amsterdam A., Rotmensch S. (1987).** Structure function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr Rev.* 8:309 – 337.
- **Aschoff J. (1960).** Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 25:11 – 28.
- **Auchus RJ. (2004).** The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol Metab.* 15:432 – 440.
- **Bailey KJ. (1987).** Diurnal progesterone rhythms in the female mouse. *J Endocrinol.* 112:15 – 21.
- **Bina KG., Rusak B., Semba K. (1993).** Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *J Comp Neurol.* 335:295 – 307.

- **Blattner MS., Mahoney MM. (2012).** Circadian parameters are altered in two strains of mice with transgenic modifications of estrogen receptor subtype 1. *Genes Brain Behav.* 11:828 – 836.
- **Brown JH., Taylor P. (2006).** Agonistas y antagonistas de los receptores muscarínicos. En: Hardman A., Limbird L., Goodman A (Ed.). *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* p. 163 – 183. México. McGraw-Hill Interamericana.
- **Brown TM., Piggins HD. (2009).** Spatiotemporal heterogeneity in the electrical activity of suprachiasmatic nuclei neurons and their response to photoperiod. *J Biol Rhythms.* 24:44 – 54.
- **Brownstein M., Kobayashi R., Palkovits M., Saavedra JM. (1975).** Choline acetyltransferase levels in diencephalic nuclei of the rat. *J Neurochem.* 24:35 – 43.
- **Buchanan GF., Gillette MU. (2005).** New light on an old paradox: site-dependent effects of carbachol on circadian rhythms. *Exp Neurol.* 193:489 – 585.
- **Buijs RM., La Fleur SE., Wortel J., Van Heyningen C., Zuiddam L., Mettenleiter TC., Kalsbeek A., Nagai K., Nijima A. (2003).** The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol.* 464:36 – 48.

- **Butler MP., Karatsoreos IN., LeSauter J., Silver R. (2012).** Dose-dependent effects of androgens on the circadian timing system and its response to light. *Endocrinol.* 153:2344 – 2352.
  
- **Cabeza de Flores A., Barragán Vigil AM. (2005).** Ovario. En: Flores Lozano F., Cabeza de Flores A., Zaccari E. (Ed.). *Endocrinología.* p. 329 – 379. México. Méndez Editores.
  
- **Cabeza de Flores A., Flores Lozano F. (2005).** Hipófisis Anterior. En: Flores Lozano F., Cabeza de Flores A., Zaccari E. *Endocrinología.* (Ed.) p. 61 – 84. México. Méndez Editores.
  
- **Carsi-Gabrenas JM., Van der Zee EA., Luiten PG., Potter LT. (1997).** Non-selectivity of the monoclonal antibody M35 for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res Bull.* 44:25 – 31.
  
- **Castillo-Ruiz A., Nunez AA. (2007).** Cholinergic projections to the suprachiasmatic nucleus and lower subparaventricular zone of diurnal and nocturnal rodents. *Brain Res.* 1151:91 – 101.
  
- **Cortes RC., Galindo F., Galicia IS., Flores A. (2011).** GABA: ¿dualidad funcional? Transición durante el neurodesarrollo. *Rev Neurol.* 52:665-675.

- **Cruz ME., Chávez R., Domínguez R. (1986).** Ovulation follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Rev Invest Clin.* 38:167 – 171.
- **Cruz ME., Flores A., Domínguez R. (2014).** The cholinergic system of the preoptic-anterior hypothalamic areas regulates the ovarian follicular population in an asymmetric way. *Endo.* 47:913 – 935.
- **Dallman MF., Engeland WC., Shinsako J. (1976).** Compensatory adrenal growth: a neurally mediate reflex. *Am J Physiol.* 2:408 – 422.
- **Dann S., Damassa D., Pittendrigh CS., Smith ER. (1975).** An effect of castration and testosterone replacement on a circadian pacemaker in mice (*Mus musculus*). *Proc Natl Acad Sci.* 72:3744 – 3747.
- **Davis B., Sadik K. (2006).** Circadian cholinergic rhythms: implications for cholinesterase inhibitor therapy. *Dement Geriatr Disord.* 21:120 – 129.
- **De Geyter C., De Geyter M., Huber PR., Nieschlag E., Holzgreve W. (2002).** Progesterone serum levels during the follicular phase of the menstrual cycle originate from the crosstalk between the ovaries and the adrenal cortex. *Hum Reprod.* 17:933–939.

- **de la Iglesia HO., Meyer J., Carpino Jr. A., Schwartz WJ. (2000).** Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science*. 290:799 – 801.
- **de la iglesia HO., Meyer J., Schwartz WJ. (2003).** Laterization of circadian pacemaker output: activation of left-and right-side luteinizing hormone releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. *J Neurosci*. 23:7412 – 7414.
- **Dibner CH., Schibler U., Albrecht U. (2010).** The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*. 72:517 – 538.
- **Domínguez R., Smith ER. (1974).** Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinol*. 14:212 – 233.
- **Domínguez R., Riboni L., Zipitria D., Revilla R. (1982).** Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?. *J Endocrinol*. 95:175 – 180.
- **Domínguez R., Cruz M., Chávez R. (1991).** La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: Domínguez R. (Ed.). *Tópicos selectos de Biología de la reproducción*. p. 163-181. Programa Universitario de Investigación en salud. Universidad Nacional Autónoma de México.

- **Dorling AA., Todman MG., Korach KS., Herbison AE. (2003).** Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse. *Neuroendocrinol.* 78,204–209.
- **Earnest DJ., Turek FW. (1985).** Neurochemical basis for the photic control of circadian rhythms and seasonal reproductive cycles: role for acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:4277 – 4281.
- **Ebling FJP. (1996).** The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. *Prog Neurobiol.* 50:109 – 132.
- **Elgueta C., Vielma AH., Palacios AG., Schmachtenberg O. (2015).** Acetylcholine induces GABA release onto bipolar cells through heteromeric nicotinic receptors expressed in A17 amacrine cells. *Front in Cell Neurosc* 9:6
- **Evans JA., Leise TL., Castanon-Cervantes O., Davidson AJ. (2011).** Intrinsic regulation of spatiotemporal organization within the suprachiasmatic nucleus. *PLoS ONE* 6: e15869.
- **Everett JW., Sawyer CH. (1950).** A 24-hour periodicity in the “LH-release apparatus” of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinol.* 47:198 – 218.



- **Flanagan A., Millar P., Illing N. (1997).** Advances in understanding gonadotrophin-releasing hormone receptor structure and ligand interactions. *Rev Reprod.* 2:113 –120.
- **Flores A., Meléndez G., Palafox MT., Rodríguez JO., Barco AI., Chavira R., Domínguez R., Cruz ME. (2005).** The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrine* 28:145 – 151.
- **Flores ME., Segura JE. (2005).** Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínicos y nicotínicos. *Rev Mex Neuro.* 6:315 – 326.
- **Fuchs JL., Hoppens KS. (1987).** Alpha-bugarotoxin binding in relation to functional organization of the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 407:9 – 16.
- **Funabashi T., Shinohara K., Mitsushima D., Kimura F. (2000<sup>a</sup>).** Estrogen increases arginine vasopressin V1a receptor mRNA in the preoptic area of young but not of middle-aged female rats. *Neurosci Lett.* 285:205 – 208.
- **García JC. (2016).** La información vagal regula la actividad ovárica en animales con bloqueo del sistema colinérgico del núcleo supraquiasmático. Tesis para obtener el título de biólogo. FES Zaragoza UNAM.

- **Gerendai I., Tóth IE., Boldogkó Z., Medveczky I., Halász B. (2000).** CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *J Auton Nerv Syst.* 80:40 – 45.
- **Gibson EM., Humber SA., Jain S., Williams WP 3er., Zhao S., Bentley E., Tsutsui K., Kriegsfeld LJ. (2008).** Alterations in amide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinol* 149:4958 – 4969.
- **Gibson MJ., Kokoris GJ., Silverman AJ. (1988).** Positive feedback in hypogonadal female mice with preoptic area brain transplants. *Neuroendocrinol.* 48:112 – 119.
- **Gillette MU., Mitchell JW. (2002).** Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue. Res.* 309:99 – 107.
- **Golombek DA., Rosenstein RE. (2010).** Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90:1063 – 1102.
- **González AM., Flórez J. (1997).** Transmisión colinérgica. Fármacos agonistas colinérgicos. En: Flórez J., Armijo JA., Mediavilla A. (Ed). *Farmacología Humana.* p. 213 – 228. Editorial Masson S.A.

- **Gorgeon A. (2004).** Dynamics of human follicular growth: morphologic dynamic and functional aspects. En: Leung PCK., Adashi EY. The ovary. 2<sup>ed</sup>. P. 25 – 38. San Diego CA. Elsevier.
- **Guyton A., Hall J. (2005).** Hormonas hipofisarias y su control por el hipotálamo. En: Guyton A., Hall J. Tratados de fisiología médica. 10<sup>ed</sup>. p. 1017 – 1029. México. McGraw-Hill Interamericana.
- **Hagenauer MH., King AF., Possidente B., McGinnis MY., Lumia AR., Peckham EM., Lee TM., (2011<sup>a</sup>).** Changes in circadian rhythms during puberty in *Rattus norvegicus*: developmental time course and gonadal dependency. *Horm Behav.* 60:46 – 57.
- **Hagenauer MH., Ku JH., Lee TM. (2011<sup>b</sup>).** Chronotype changes during puberty depend on gonadal hormones in the slow-developing rodent, *Octodon degus*. *Horm Behav.* 60:37 – 45.
- **Hagenauer MH., Lee TM. (2011).** Time for testosterone: the suprachiasmatic nucleus gets sexy. *Endocrinol.* 152:1727 – 1730.
- **Haines D. (2004).** Neurobiología Regional. En: Haines D. Principios de Neurociencia: Aplicaciones básicas y clínicas. p. 470 – 490. Madrid. Elsevier.

- **Halpin DMG., Charlton HM. (1988).** Effects of short-term injection of gonadotrophins on ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) mice. *J Reprod Fertil.* 82:393 – 400.
- **Hattar S., Liao HW., TakaoM., Berson DM., Yau KW. (2002).** Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* 295:1065 – 1070.
- **Hedreen JC., Bacon SJ., Price DL. (1985).** A modified histochemical technique to visualize acetylcholinesterase-containing axons. *J Histochem Cytochem.* 33:134 – 174.
- **Heller JB., Taylor P. (2004).** Agonistas y antagonistas de los receptores muscarínicos. En: Goodman G. (Ed). *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* p. 260 – 290. Vol. 1. 10<sup>Ed.</sup> México. McGraw-Hill Interamericana.
- **Herbison AE. (2015).** Physiology of the adult gonadotropin releasing hormone Neuronal. Network. : In: Knobil E. Neil Jd (Ed). *Physiology of the reproduction.* p. 399 – 443. Vol. 1. 4<sup>Ed.</sup> Oxford Uk. Elsevier.
- **Herbison AE. (2008).** Estrogen positive feedback to gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain Res Rev.* 57:277 – 287.

- **Herbison, AE., Theodosia DT. (1992<sup>b</sup>).** Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neurosci.* 50:283 – 298.
- **Herzog ED. (2007).** Neurons and networks in daily rhythms. *Nat Rev Neurosci.* 8: 790 – 802.
- **Hillier SG., Whitelaw PF., Smyth CD. (1994).** Follicular oestrogen synthesis: the ‘two-cell, two-gonadotrophin’ model revisited. *Endocrinol.* 110:51 – 54.
- **Hirshfield AN. (1994).** Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rat. *Biol Reprod.* 50:421 – 428.
- **Horvath TL., Cela V., Van Der Beek EM. (1998).** Gender-specific apposition between vasoactive intestinal peptide-containing axons and gonadotrophin releasing hormone-producing neurons in the rat. *Brain Res.* 795:277 – 281.
- **Hummer DL., Peckham EM., Lee TM. (2012).** Estradiol acts during a post-puberal sensitive period to shorten free-running circadian period in male *Octodon degus*. *J Neurosci.* 36:3051 – 3058.

- **Ichikawa T., Hirata Y. (1986).** Organization of choline acetyltransferase-containing structures in the forebrain of the rat. *J Neurosci.* 6:281 – 373.
- **Ito T., Suzuki T., Wellman SE., Ing KH. (1996).** Pharmacology of barbiturate tolerance/dependence: GABA A receptors and molecular aspects. *Life Sci.* 59:169 -95.
- **Iwahana E., Karatsoreos I., Shibata S., Silver R. (2008).** Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. *Horm Behav.* 53:422 – 430.
- **Karatsoreos IN., Wang A., Sasanian J., Silver R. (2007).** A role for androgens in regulating circadian behavior and the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinol.* 148:5487 – 5495.
- **Keefe DL., Earnes DJ., Nelson D., Takahashi JS., Turek FW. (1987).** A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks the phase-shifting effects of light on the circadian rhythm of locomotor activity in the golden hamster. *Brain Res* 403:308 – 320.
- **Klein DC., Moore RY., Reppert SM. (1992).** *Suprachiasmatic nucleus; the mind's clock.* Oxford: Oxford university press. p. 400 – 467.

- **Kobayashi RM., Palkovits M., Hruska RE., Rothschild R., Yamamura HI. (1978).** Regional distribution of muscarinic cholinergic receptors in rat brain. *Brain Res.* 154:13 – 23.
- **Kow LM., Pfaff DW. (1984).** Suprachiasmatic neurons in tissue slices from ovariectomized rats: electrophysiological and neuropharmacological characterization and the effects of estrogen treatment. *Brain Res.* 297:275 – 361.
- **Lagunas N. (2014).** Efectos de la micro-inyección de atropina en el núcleo supraquiasmático en el día del proestro sobre las funciones ováricas. Tesis para obtener el título de Biólogo. FES Zaragoza UNAM.
- **Legan SJ., Coon GA., Karsch FJ. (1975).** Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinol.* 96:50 – 56.
- **Legan SJ., Karsch FJ. (1975).** A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinol.* 96:57 – 62.
- **Lehman MN., Silver R., Gladstone WR., Kahn RM., Gibson M., Bittman EL. (1987).** Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci.* 7:1626 – 1638.

- **Lehman MN., Merkle CM., Coolen LM., Goodman RL. (2010<sup>b</sup>).** Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res.* 1364:90 – 102.
- **Lemke A., Penzenstadler C., Ferguson J., Lidinsky D., Hopf R., Bradl M., Redl., Wolbank S., Hausner T. (2017).** A novel experimental rat model of peripheral nerve scarring: reliably mimicking post-surgical complications and recurring adhesion. *Dis Model Mech pii: dmm* 028852.
- **Leviavski A., Dumbell R., Ott V., Oster H. (2015).** Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology. *J Biol Rhythms.* 30:20 – 34.
- **Levine E. (2015).** Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil E, Neil JD (Ed). *Physiology of Reproduction.* p. 1199 – 1239. Vol. 2. 4<sup>ed</sup>. Oxford UK. Elsevier.
- **Liu C., Gillette MU. (1996).** Cholinergic regulation of the suprachiasmatic nucleus circadian rhythm via a muscarinic mechanism at night. *J Neurosci.* 16:744 – 51.
- **Loh DH., Kuljis DA., Azuma I., Wu Y., Truong D., Wang HB., Colwell Cs. (2014).** Disrupted reproduction, estrous cycle, and circadian



rhythms in female mice deficient in vasoactive intestinal peptide. *J Biol Rhythms* 29:355 – 424.

- **Madeira MD., Pereira PA., Silva SM., Cadete-Leite A., Paula-Barbosa MM. (2004).** Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci.* 125:889 – 901.
- **Mahoney MM., Smale L. (2005).** Arginine vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide fibers make appositions with gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor cells in the diurnal rodent *Arvicanthus niloticus*. *Brain Res.* 1049:56 – 164
- **Martinek S., Inonog S., Manoukian AS., Young MW. (2001).** A role for the segment polarity gene shaggy/GSK – 3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell.* 15:769 – 848.
- **Meijer JH., Rietveld WJ. (1989).** Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev.* 69:671 – 707.
- **Melo PR., Belisio AS., Menezes AA., Azevedo CV., (2010).** Influence of seasonality on circadian motor activity rhythm in common marmosets during puberty. *Cronobiol Int.* 27:1420 – 1437.
- **Mendoza N. (2008).** *Farmacología médica.* p. 213 – 220. Facultad de Medicina, México. Editorial Médica Panamericana: UNAM.

- **Millar R. (2003).** GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 14:35 – 43.
- **Millar RP. (2007).** Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling, En: Millar RP. (Ed) *Reproductive Medicine: Molecular Cellular and Genetic Fundamentals.* p. 17 – 35. Fauser. B. C. J. M.
- **Miller JD., Murakami DM., Fuller CA. (1987).** The responses of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and nicotinic stimuli. *J Neurosci* 7:978 – 1064.
- **Miller BH., Olson SL., Turek FW., Levine JE., Horton TH., Takahashi JS. (2004).** Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol.* 14:1367 – 1373.
- **Mistlberger RE., Rusak B. (1986).** Carbachol phase shifts circadian activity rhythms in ovariectomized rats. *Neurosci Lett.* 72:429 – 264.
- **Mohan C., Radha E. (1978).** Circadian rhythms in the central cholinergic system in aging animals. *Adv Exp Med Biol.* 108:275 – 284.
- **Moldavan M., Cravetchi O., Williams M., Irwin RP., Aicher SA., Allen C. (2015).** Localization and expresión of GABA transportes in the suprachiasmatic nucleus. *J Neuronsci.* 42:3018 – 3032.

- **Moore RY., Klein DC. (1974).** Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Brain Res.* 71:17-33.
- **Moore RY., Lenn NJ. (1972).** A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp Neurol.* 146:1 – 14.
- **Moore RY., Speh JC., Leak RK. (2002).** Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 309:89 – 98.
- **Moore RY., Eichler VB. (1972).** Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesion in the rat. *Brain Res.* 42:201 – 206.
- **Moore Ry., Speh JC. (1993).** GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett.* 150:112 – 116.
- **Morales L., Betanzos R., Domínguez R. (2004).** Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepuberal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Arch Med Res.* 35:279 – 283.
- **Morales L., Ricardo B., Bolaños A., Chavira R., Domínguez R. (2007).** Ipsilateral vagotomy to unilaterally ovariectomized pre-puberal rats modifies compensatory ovarian response. *Reprod Biol Endocrinol.* 5:24.

- **Morin LP. (2007).** SCN organization reconsidered. *J Biol Rhythms.* 22:3 – 13.
- **Morin, LP., Allen CN. (2006).** The circadian visual system. *Brain Res Rev.* 51:1 – 60.
- **Murakami N., Furukawa T., Yokawa T., Etoh T., Takahashi K. (1986).** Effects of continuous supply of light or carbachol to the SCN on the rat free-running rhythm. *J Physiol.* 36:411 – 417.
- **Nequin LG., Alvarez J., Schwartz NB. (1975).** Steroid control of gonadotropin release. *J Steroid Biochem.* 6:1007 – 1019.
- **Nishino H., Koizumi K. (1977).** Response of neurons in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus to putative transmitters. *Brain Res.* 120:167 – 239.
- **Ostrowski NL., Lolait SJ., Young WSIII. (1994).** Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinol.* 135:1511 – 1528.
- **Palkovits M. (2000).** Micro and Macroscopic structure, innervations and vasculature of the hypothalamus. En: Conn PM., Freeman ME. *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine.* p. 23 – 31. Human Press.

- **Palm IF., Van Der Beek EM., Wiegant VM., Buijs RM., Kalsbeek A. (1999).** Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesion of the suprachiasmatic nucleus. *Neurosci.* 93:659 – 666.
- **Panda S., Sato TK., Castrucci AM., Rollag MD., Degrip WJ., Hogenesch JB., Provencio I., Kay SA. (2002).** Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science.* 298:2213 – 2216.
- **Petersen SL., Barraclough CA. (1989).** Suppression of spontaneous LH surges in estrogen-treated ovariectomized rats by microimplants of antiestrogens into the preoptic brain. *Brain Res.* 484:279 – 289.
- **Perry E., Walker M., Grace J., Perry R. (1999).** Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness?. *Trends Neurosci.* 22:273 – 353.
- **Prieto B., Velásquez M. (2002).** Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 45:252 – 256.
- **Provencio I., Rollag MD., Castrucci AM. (2002).** Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature.* 415:493.
- **Ramírez DA., Vieyra E., Gonzales AI., Morán C., Domínguez R., Morales-Ledesma (2017).** Both the suprachiasmatic nucleus and the

superior ovarian nerve contribute to the processes of ovulation and steroid hormone secretion on proestrus. *Reprod Sci* 24:844 – 855.

- **Rao ZR., Yamano M., Wanaka A., Tatehata T., Shiosaka S., Tohyama M. (1987).** Distribution of cholinergic neurons and fibers in the hypothalamus of the rat using choline acetyltransferase as a marker. *Neurosci.* 20:923 – 957.
  
- **Reppert SM., Weaver DR. (2002).** Coordination of circadian timing in mammals. *Nature.* 418:935 – 941.
  
- **Rippe AC. (2009).** El ciclo estral. Dairy Cattle Reproduction Conference Minneapolis. p 111 – 117.
  
- **Rivest S., Rivier C. (1993).** Central mechanisms and sites of action involved in the inhibitory effects of CRF and cytokines on LHRH neuronal activity. *Ann N Y Acad Sci.* 697:117 – 141.
  
- **Rotter A., Birdsall NJ., Burgen AS., Field PM., Hulme EC., Raisman G. (1979).** Muscarinic receptors in the central nervous system of the rat. I. Technique for autoradiographic localization of the binding of [3H] propylbenzylcholine mustard and its distribution in the forebrain. *Brain Res.* 180:141 – 206.

- **Sarkar DK., Chiappa SA., Fink G., Sherwood NM. (1976).** Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*. 264:461 – 463.
- **Schibler U., Sassone-Corsi P. (2002).** A web of circadian pacemakers. *Cell*. 111:919 – 922.
- **Sellix MT., Murphy ZC., Menaker M. (2013).** Excess androgen during puberty disrupts circadian organization in female rats. *Endocrinol*. 154:1636 – 1647.
- **Shibata S., Liou SY., Ueki S. (1983).** Different effects of amino acids, acetylcholine and monoamines on neuronal activity of suprachiasmatic nucleus in rat pups and adults. *Neurosci Lett*. 39:187 – 92.
- **Silverman A., Livne I., Witkin JW. (1994).** The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: immunocytochemistry and in situ hybridization. En: Knobil E, Neill JD (Ed). *Physiology of reproduction*. p. 1683–706. 2<sup>ed</sup>. New York. Raven.
- **Smarr BL., Morris E., de la Iglesia HO. (2012).** The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of *Kiss1* and the luteinizing hormone surge. *Endocrinol*. 153:2839 – 2850.

- **Smarr BL., Morris E., de la Iglesia HO. (2012).** The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of Kiss1 and the luteinizing hormone surge. *Endocrinol.* 153:2839 – 2889.
- **Smith MS., Freeman ME., Neill JD. (1975).** The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinol.* 96:219 – 245.
- **Smith MJ., Jiennes L., Wise PM. (2000).** Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. *Endocrinol.* 141:4317 – 4320.
- **Sofroniew MV., Eckenstein F., Thoenen H., Cuello AC. (1982).** Topography of choline acetyltransferase-containing neurons in the forebrain of the rat. *Neurosci Lett.* 33:7 – 12.
- **Stephan FK., Zucker I. (1972).** Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 69:1583 – 1586.
- **Turek FW., Losee-Olson S., Swann JM., Horwath K., Van Cauter E., Millette JJ. (1897).** Circadian and seasonal control of neuroendocrine-gonadal activity. *J Steroid Biochem.* 27:573 – 582.



- **Taylor P., Brown JH. (1999).** Acetylcholine. En: Basic Neurochemistry. Siegel GJ., Agranoff BW., Alberts RW., Fisher SK., Uhler MD. (Eds). p. 213 – 242. New York. Lippincott-Raven.
- **Tago H., McGeer PL., Bruce G., Hersh LB. (1987).** Distribution of choline acetyltransferase-containing neurons of the hypothalamus. Brain Res. 415:49 – 62.
- **Tomaszewska-Zaremba D., Hernan A. (2009).** The role of immunological system in the regulation of gonadoliberin and gonadotropin secretion. Reprod Biol. 9:11 – 23.
- **Tóth IE., Wiesel O., Tóth DE., Boldogkői Z., Halász B., Gerendai I. (2008).** Transneuronal retrograde viral labeling in the brain stem and hypothalamus is more intense from the left than from the right adrenal gland. Micros Res Tech. 71:503 – 509.
- **Van den Pol AN., Tsujimoto TJ. (1985).** Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. Neurosci. 15:1049 – 1086
- **Van der Beek EM., Horvath TL., Wiegant VM., Van den Hurk R., Buijs RM. (1997).** Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. J Comp Neurol. 384:569 – 579.

- **Van der Zee EA., Streefland C., Strosberg AD., Schroder H., Luiten PG. (1991).** Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors in cholinceptive neurons of the suprachiasmatic region in young and aged rats. *Brain Res.* 542:348 – 52.
  
- **Van der Zee EA., Biemans BA., Gerkema MP., Daan S. (1999).** Distribution of m1 and m2 muscarinic acetylcholine receptors in rat suprachiasmatic nucleus. *Soc Neurosci Abstr.* 25:1886.
  
- **Van der Zee EA., Biemans BA., Gerkema MP., Daan S. (2004).** Habituation to a test apparatus during associative learning is sufficient to enhance muscarinic acetylcholine receptor – immunoreactivity in rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci Res.* 78:508 – 519.
  
- **Vega – Orozco A., Sosa Z., Delgado S., Casais M., Rastrilla AM. (2010).** Involvement of ganglionic cholinergic receptors on the steroidogenesis in the luteal phase in rat. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 120:45 – 52.
  
- **Vida B., Deli L., Hrabovszky E., Kalamatianos T., Caraty A., Coen CW., Liposits Z y Kallo I. (2010).** Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *J Neuroendocrinol.* 22:1032 – 1039.

- **Vieyra E., Ramírez DA., Lagunas N., Cárdenas M., Chavira R., Damián-Matsumura P., Trujillo A., Domínguez R., Morales-Ledesma L. (2016).** Unilaterally blocking the muscarinic receptors in the suprachiasmatic nucleus in proestrus rats prevents preovulatory LH secretion and ovulation. *Reprod Biol Endocrinol.* 14:34.
- **Watts AG., Sheward WJ. Whale D., Fink G. (1989).** The effects of knife cuts in the sub-paraventricular zone of the female rat hypothalamus on oestrogen-induced diurnal surge of plasma prolactin and LH. And circadian Wheel-running activity. *J Endocrinol.* 122:593 – 604.
- **Watts AG., Swanson LW. (1987).** Efferents projection of the suprachiasmatic nucleus II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *J Comp Neurol.* 258:230 – 252.
- **Wee BE., Anderson KD., Kouchis NS., Turek FW. (1992).** Administration of carbachol into the lateral ventricle and suprachiasmatic nucleus (SCN) produces dose-dependent phase shifts in the circadian rhythms of locomotor activity. *Neurosci Lett.* 137:211 – 216.
- **Williams WP 3er., Kriegsfeld LJ. (2012).** Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. *Front Endocrinol.* 3:60.

- **Williams, WP 3er., Jarjisian SG., Mikkelsen JD., Kriegsfeld LJ. (2011).** Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinol.* 152:595 – 606.
- **Yang JJ., Wang YT., Cheng PC., Kuo YJ., Huang RC. (2010).** Cholinergic modulation of neuronal excitability in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol.* 103:1397 – 1806.
- **Zatz M., Brownstein MJ. (1979).** Intraventricular carbachol mimics the effects of light on the circadian rhythm in the rat pineal gland. *Science.* 203:358 – 61.
- **Zatz M., Brownstein MJ. (1981).** Injection of alpha-bungarotoxin near the suprachiasmatic nucleus blocks the effects of light on nocturnal pineal enzyme activity. *Brain Res.* 213:438 – 42.
- **Zhang L., Aguilar-Roblero R. (1995).** Asymmetrical electrical activity between the suprachiasmatic nuclei *in vitro*. *Neuroreport.* 6:537 – 577.
- **Zhang Y., Zee PC., Kirby JD., Takahashi JS., Turek FW. (1993).** A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks light - induced fos immunoreactivity inspecific regions of the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 615:107 – 12.

- **Zucker I., Fitzgerald KM., Morin LP. (1980).** Sex differentiation of the circadian system in the Golden hamster *Am. J. Physiol.* 238:R97 – R101.



LA ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN EN  
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN A.C.



Otorga la presente  
CONSTANCIA

A

**SALINAS-BECERRIL, IVÁN, VIEYRA-VALDEZ, E.,  
MORÁN-RAYA, C., DOMÍNGUEZ-CASALÁ, R.  
Y MORALES-LEDESMA, L.**

Por la presentación del trabajo

**“EL SISTEMA COLINÉRGICO DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO PARTICIPA  
DE MANERA ESTIMULANTE EN LA OVULACIÓN ESPONTÁNEA”**

**XLI Reunión Anual de la AIBIR**

CEIEPAA-UNAM, Tequisquiapan, Qro. Del 22 al 25 de mayo de 2016

Dra. Maricela Luna Muñoz  
Presidente

Dra. Carmen Aceves Velasco  
Secretaria