



# *Universidad Nacional Autónoma de México*

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> en el  
Núcleo Supraquiasmático izquierdo o derecho sobre la  
ovulación en la rata adulta**

## **TESIS**

Que para obtener el título de:

**Biólogo**

PRESENTA:

**David Alfonso Ramos Puga**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**



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

Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos  $M_2$  en el  
Núcleo Supraquiasmático izquierdo o derecho sobre la  
ovulación en la rata adulta

## TESIS

Que para obtener el título de:

**Biólogo**

PRESENTA:

**David Alfonso Ramos Puga**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**

INVESTIGACIÓN REALIZADA GRACIAS AL PROGRAMA  
UNAM DGAPA-PAPIIT CON CLAVE IN217016

CIUDAD DE MÉXICO

JUNIO 12, 2018





FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"  
DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno **RAMOS PUGA DAVID ALFONSO**, con número de cuenta **309271345**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **12 de junio de 2018** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

**VOCAL** Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

**SECRETARIO** Dra. JUANA MONROY MORENO

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

**SUPLENTE** Dra. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

El título de la tesis que presenta es: **Efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> del núcleo Supraquiasmático izquierdo o derecho sobre la ovulación en la rata adulta.**

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 18 de mayo de 2018

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NUÑEZ**  
DIRECTOR



RECIBI  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

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

## *Agradecimientos:*

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** gracias por la oportunidad de pertenecer a esta gran institución y poder formarme como profesionalista

Gracias a la **Dra. Lety** por tenerme tanta paciencia y fe en que algún día terminaría, por su guía y las horas de discusión para lograr enriquecer esta tesis. A **Ely**, por enseñarme, compartir su experiencia y ayudarme en cada oportunidad que pudo; a las doctoras **Deyra, Gaby, Rosa** porque siempre me orientaron y me dieron un buen consejo para mejorar mi trabajo.

A **Huguito** por el gran apoyo que me ha brindado desde que llegó al laboratorio y por su gran disposición por hacer un poco más. A **Misael** por ayudarme tanto en el laboratorio como en las materias que compartimos. Gracias a **Azu** por ser la primera en llevarme de a poco por el mundo de la investigación. A **Naye, Susan, Chío, Kari, Julio, Iván, Alejandro, Tania, Daniel, Liz, Ricardo, Alina, Norma, Martha, Fernanda y Wendy**.

Al personal del bioterio, en especial a la **Dra. Ely**, al **Dr. Román** y a la **Dra. Adriana**.

A la **Biol. Silvia** por el apoyo y la gran forma de enseñarme a trabajar.

Al **Maestro Cuapio** por el tiempo y la dedicación que me ha brindado.

Y a mis sinodales la **Dra. Lety, Dra. Deyra, Dra. Ely, Dra. Esther** y la **Dra. Juanita** por sus comentarios y observaciones que enriquecen esta tesis.

Al **Dr. Roberto Chavira**.

A todos mis compañeros y amigos de la carrera en particular a **Mandy, Ivonne, Alejandra, Adrián y Alexandre**.

Y a los profesores que ayudaron a que continuara en esta carrera **Rigo, Juan**, y la **Dra. Dolores**.

A mis padres, mi hermano y mi familia por siempre estar conmigo y dar todo de sí para que pudiera seguir adelante en mis propósitos.

Gracias a **Sandy** por ser y hacer de todo por mí. Y a la **Sra. Margarita** por hacer otro tanto.

*Dedicatoria:*

*A mis padres y a mi hermano.*

*A mi familia.*

*"Esto no es una tesis"*

## Contenido

Resumen .....	1
Introducción .....	3
Marco Teórico .....	6
Ovario .....	6
Asimetría ovárica.....	11
Ciclo reproductivo .....	13
La reproducción y el núcleo supraquiasmático.....	16
El núcleo supraquiasmático .....	19
El núcleo supraquiasmático y el sistema colinérgico .....	27
Receptores muscarínicos en el NSQ.....	29
Planteamiento del problema .....	31
Hipótesis .....	32
Objetivos .....	33
Método .....	34
Resultados .....	38
Efecto de la microinyección de metocramina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho sobre la ovulación .....	38
Efecto de la microinyección de metocramina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho sobre la concentración sérica de progesterona.....	41
Efecto de la microinyección de metocramina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho sobre la concentración sérica de estradiol .....	42
Masa ovárica y el peso del útero en los animales con microinyección de metocramina.....	43
Efecto de la microinyección de metocramina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho con hemiovariectomía ipsilateral, sobre la ovulación .....	44
Efecto de la microinyección de metocramina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho y hemiovariectomía ipsilateral sobre la concentración de progesterona .....	46
Efecto de la microinyección de metocramina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho con hemiovariectomía ipsilateral sobre la concentración de estradiol.....	47
Masa ovárica y el peso del útero .....	48
Discusión.....	49
Conclusiones .....	58
Referencias.....	59

## RESUMEN

El núcleo supraquiasmático, es una estructura hipotalámica pareada considerada como el "reloj biológico" de los mamíferos, ya que regula las señales temporales externas e internas y modula diversas funciones fisiológicas. Algunos estudios muestran que el daño de esta estructura genera una desregulación de los ritmos neuroendocrinos y la falta de ovulación. El sistema colinérgico del núcleo supraquiasmático regula de manera estimulante la ovulación vía los receptores muscarínicos. Además, se ha planteado que existe una comunicación neural del núcleo supraquiasmático a los ovarios.

Se han descrito cinco receptores muscarínicos (y todos están presentes en el núcleo supraquiasmático), en el presente estudio se evaluó la participación de los receptores muscarínicos del tipo M<sub>2</sub> en el núcleo supraquiasmático en la regulación de la ovulación, el número de ovocitos liberados y la concentración sérica de progesterona y estradiol. Para lo cual se utilizó a la rata adulta con microinyección de metoctramina, antagonista de los receptores muscarínicos M<sub>2</sub>, en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho a las 09:00h del día del proestro. Como grupo de comparación se utilizaron ratas microinyectadas con solución salina (vehículo). Para estudiar la comunicación entre el núcleo supraquiasmático y los ovarios, se utilizó la rata con microinyección de metoctramina seguida a la hemicastración del mismo lado de la microinyección, y como grupo de comparación se utilizó al animal hemiovariectomizado. Todos los animales fueron sacrificados al presentar estro vaginal.

Los resultados muestran que la microinyección de metoctramina disminuye el porcentaje de animales ovulantes y que independientemente del lado microinyectado libera un menor número de ovocitos. No se encontró una relación directa entre la concentración de progesterona y la ovulación. La concentración de



estradiol disminuyó en los animales con la microinyección de metocramina en cualquiera de los núcleos.

Los animales a los que se les realizó la microinyección en el NSQ seguida de la hemiovariectomía ipsilateral mostraron una disminución en el número de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados.

Los resultados nos indican que durante la mañana del proestro, el sistema colinérgico del núcleo supraquiasmático, a través de los receptores M<sub>2</sub>, tiene un efecto estimulante que permite que se lleve a cabo la ovulación durante el estro y la biosíntesis de estradiol. Estos resultados nos permiten sugerir que existe una comunicación del núcleo supraquiasmático, izquierdo y derecho, hacia el ovario izquierdo que regula la ovulación de manera estimulante.

## INTRODUCCIÓN

El Núcleo Supraquiasmático (**NSQ**) es una estructura pareada localizada en la base del hipotálamo anterior y dorsal al quiasma óptico (*Meijer y col., 2007; Meijer y Michel, 2015; Yan y Okamura, 2002*). En los mamíferos, esta estructura ha sido llamada el "marcapasos maestro", debido a que tiene la capacidad de mantener los ritmos biológicos internos y sincronizados con los ritmos de luz del ambiente en el que se desarrollan. Este proceso se lleva a cabo a través de la información lumínica que recibe directamente de la vía del Tracto Retino-Hipotálamico y de manera indirecta vía el Núcleo Geniculo Lateral (*Meijer y col., 1986; Johnson y col., 1988; Ikeda, 2004; Golombeck y Rosenstein, 2010; Bedont y Blackshaw, 2015*).

Estudios realizados en roedores muestran la participación del NSQ en la regulación neuroendócrina, de los eventos que culminan con la reproducción (*van der Beek, 1996*). La reproducción es regulada por el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-gónada, que depende de la liberación pulsátil de la Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (**GnRH**), la cual, durante la tarde del proestro, estimula la liberación de la Hormona Luteinizante (**LH**) y la Hormona Estimulante del Folículo (**FSH**) por parte de la hipófisis, lo que culminará con la ovulación en la mañana del estro (*van der Beek, 1996*). Esta liberación de GnRH está mediada por la retroalimentación positiva que ejercen los esteroides gonadales en hipotálamo e hipófisis (*van der Beek y col., 1997*).

En la rata hembra, la lesión del NSQ elimina el ritmo diurno de la liberación de prolactina, gonadotrofinas, modifica el comportamiento sexual (*van der Beek, 1996*), interrumpe el ciclo estral y evita el pico preovulatorio de LH, necesario para la ovulación (*Golombeck y Rosenstein, 2010*).

Se ha sugerido que el NSQ, vía la secreción del Polipéptido Intestinal Vasoactivo, ejerce un efecto estimulante en las neuronas GnRH que, a su vez, produce el pico de LH (*Tonsfeldt y Champpell, 2012*).

La participación de los esteroides ováricos en la regulación de los ritmos biológicos se sugirió al observar que, en el hámster ovariectomizado con reemplazo hormonal, el incremento en la concentración de estrógenos reduce la desincronización de los ritmos del NSQ producidas por la luz constante (efectos que son contrarrestados por la administración de progesterona). Sin embargo, a pesar de que las neuronas GnRH y el NSQ poseen receptores a estrógenos, se plantea que la señal de los esteroides gonadales en la sincronización del núcleo está mediada principalmente a través de otras neuronas hormona-sensitivas a estos esteroides (*van der Beek, 1996*). En la rata hembra, el implante de atropina (antagonista no específico de los receptores muscarínicos de acetilcolina) en el hipotálamo lateral anterior interrumpe el ciclo ovárico y se prolonga la fase del diestro; mientras que, en hipotálamo medio basal *in vitro*, concentraciones nanomolares de acetilcolina (ACh), estimulan la liberación de GnRH (*Turi y col., 2008*).

En el NSQ están presentes las enzimas que catalizan la síntesis y degradación de la ACh, la colino-acetiltransfera (CAT) y la acetilcolinesterasa (AChE) respectivamente; y los dos tipos de receptores con los que interactúa ACh, muscarínicos y nicotínicos (*van der Zee y col., 1991*).

La microinyección de atropina directamente en el NSQ durante la mañana del proestro resulta en el bloqueo de la ovulación, de lo que se concluye que son los receptores muscarínicos a ACh los que median este efecto (*Vieyra y col., 2016*).

El efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos del NSQ sobre la ovulación ocurre a través del nervio vago, el cual, comunica a este núcleo con los ovarios (*García, 2016*). Sin embargo, la información disponible no da indicios del tipo de receptor muscarínico a través del cual podría estar regulando la señal colinérgica

que estimula la ovulación, ni si la comunicación que tiene el NSQ con los ovarios es contra o ipsilateral. Por lo que en el presente estudio se analizó si, en la mañana del proestro, el receptor muscarínico M<sub>2</sub> (uno de los dos receptores más abundantes en el NSQ) participa en los eventos que culminan con la ovulación y si la comunicación entre el NSQ y los ovarios es contralateral.

## MARCO TEÓRICO

### OVARIO

Los ovarios son un par de glándulas de color rojo grisáceo de forma ovoidea, con una superficie irregular debido a la presencia de los folículos ováricos que contiene; también se pueden observar surcos o cicatrices debido a las rupturas de dichos folículos (*Geneser, 2000*).

Los ovarios tienen dos funciones, la producción de hormonas esteroides y proteicas y la gametogénesis (*Peters y McNatty, 1980*). En estas glándulas se produce el folículo dominante, los cambios hormonales responsables de la pubertad y la función reproductiva (*Erickson y Shimasaki, 2001; Harrison, 2010*).

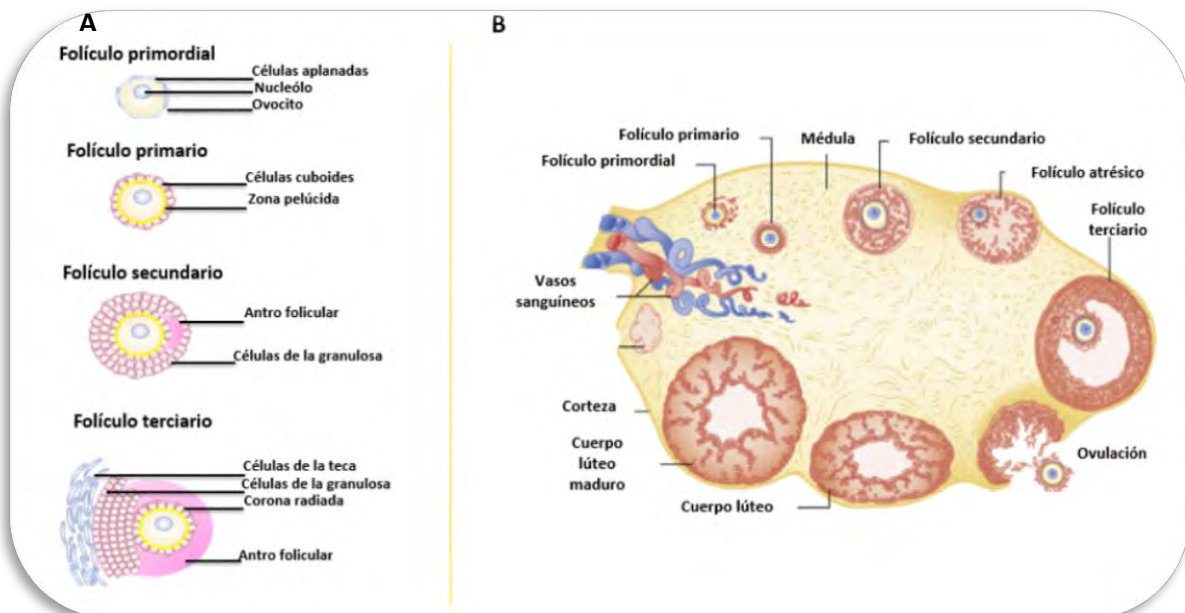
El ovario está compuesto por una **corteza**, formada por el estroma de tejido conectivo cuyas células se asemejan a pequeñas células musculares lisas. Es en la corteza donde están incluidos los folículos ováricos (*Geneser, 2000*).

Por debajo de esta corteza (y sin que haya entre ellas una separación visible) se encuentra la **médula** que se compone de tejido conectivo y abundantes vasos sanguíneos, vías linfáticas y fibras nerviosas. La médula está en estrecha relación con el **hilio** por donde ingresan los vasos y nervios (*Geneser, 2000*).

El ovario está compuesto por un tejido en constante transformación, formado por tres compartimentos que interactúan de forma integrada para cumplir con las funciones del ovario (*Yen y col., 2001*).

#### Folículos ováricos

El folículo es la unidad anátomo-funcional del ovario y está formado por un ovocito y una capa de epitelio circundante (*Geneser, 2000; Yen y col, 2001*) (**Figura 1**). El ovocito es una célula redonda con núcleo redondo y localización excéntrica que contiene un nucléolo grande (*Geneser, 2000*). Las células que darán origen al ovocito se desarrollan durante la vida fetal en la región del epiblasto (*Strauss y Williams, 2014*).



**Figura 1. A)** Representación esquemática de la foliculogénesis donde se muestran los estadios de folículo primordial, primario, secundario y terciario o preovulatorio. **B)** Esquema de la foliculogénesis y estructura del ovario. Tomado y modificado de Strauss y Williams, 2014.

La foliculogénesis es el proceso de maduración de los folículos, este proceso es continuo y culmina en la ovulación o la atresia (Ryan y Lee, 1976). Los folículos atraviesan por varias etapas de desarrollo comenzando por los folículos primordiales, seguido de los folículos primarios, secundarios y finalmente los folículos terciarios (Strauss y Williams, 2014).

En la etapa fetal y en el desarrollo postnatal temprano el ovocito comienza la meiosis hasta la profase de la primera división, deteniéndose en el estadio de dictioteno a causa de factores locales y permanece en este estadio hasta que el folículo comienza a crecer y madurar (Geneser, 2000; Levine, 2015). A su vez, es circundado por células epiteliales aplanadas (células foliculares) formando una cápsula. Estos son llamados folículos primordiales (Levine, 2015). Estos folículos se encuentran principalmente en

la periferia de la corteza y son los más numerosos, constituyendo la reserva de folículos en reposo (*Van Voorhis, 1999*).

El folículo primordial madura y se transforma en folículo primario, en el cual, el ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares aplanadas pasan a ser cúbicas y luego cilíndricas; adquieren un aspecto granular y proliferan por división mitótica formando un epitelio estratificado (capa de las células de la granulosa) separado por una membrana basal de las células de la teca, una capa de tejido conectivo circundante. En esta etapa el ovocito primario continúa con la meiosis, gracias al súbito incremento en la secreción de LH, haciendo que el folículo se divida y reparta sus cromosomas de manera equitativa pero el citoplasma de manera desigual, generándose el primer cuerpo polar compuesto por el núcleo y un escaso citoplasma (*Geneser, 2000*). También es hasta esta etapa de desarrollo que el folículo es independiente de gonadotrofinas y su desarrollo es más bien por miembros de la familia de factores de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (*Levine, 2015*).

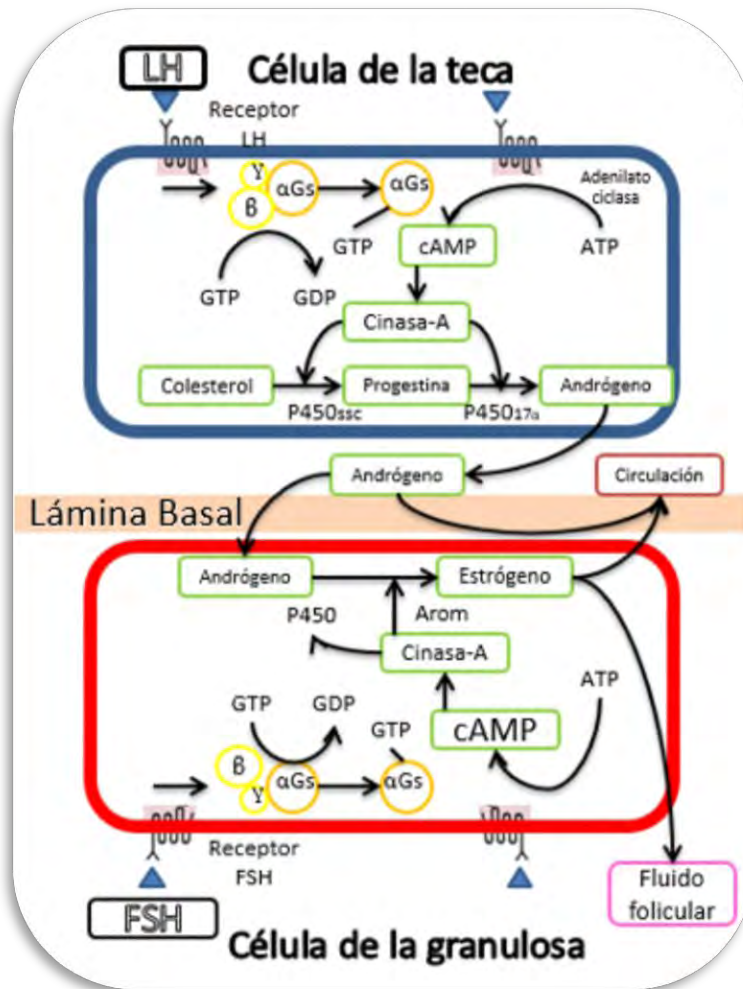
Durante el crecimiento del ovocito, éste comienza a secretar una glucoproteína que conformará la zona pelúcida que lo separará de las células de la granulosa circundantes. La zona pelúcida sirve como el sitio de contacto inicial con el espermatozoide y, después de la fertilización, se convierte en una barrera evitando la polispermia; además, es esencial para la implantación del embrión en el útero (*Geneser, 2000; Strauss y Williams, 2014*). Mientras el folículo se va desarrollando migra a la profundidad de la corteza (*Geneser, 2000*).

Cuando el folículo primario pasa de tener una sola capa de células cuboides a múltiples capas, es nombrado folículo secundario o preantral (*Levine, 2015*). Estas células de la granulosa ya poseen receptores a FSH, estrógenos y andrógenos; mientras que las células de la teca adquieren sus receptores a LH (*Strauss y Williams, 2014*). Con el crecimiento del folículo y bajo la influencia de LH, FSH y TGF- $\beta$ , comienzan a aparecer pequeñas zonas irregulares llenas de líquido que aumentan

de tamaño hasta fusionarse y dar origen a una cavidad semilunar llena de líquido, el antro folicular (*Geneser, 2000; Levine, 2015*). El líquido de este antro folicular es secretado por las células de la granulosa y es de aspecto claro y viscoso. Gradualmente el ovocito adopta una posición excéntrica, rodeado por una capa de células de la granulosa que conforman el cúmulo oóforo. Por su parte, la teca folicular se diferencia en teca interna (que adquiere una gran vascularización) y teca externa. Este folículo secundario detiene su meiosis en la metafase de la segunda división meiótica (*Geneser, 2000*).

Las células de la granulosa no reciben aporte sanguíneo directo, y están separadas de las células de la teca interna por la lámina basal. De las células de la teca vascularizadas se obtiene la testosterona para la reacción de aromatización que produce la principal hormona esteroide del ovario: el estradiol. La síntesis de esta hormona requiere de la colaboración de las células de la granulosa y de la teca adyacentes (*Harrison, 2010; Strauss y Williams, 2014*). El precursor de todas las hormonas esteroideas es el colesterol, este se encuentra unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y es captado de la sangre circundante por endocitosis mediada por receptores, y una cantidad menor es sintetizada *de novo* a partir de acetato. En las células de la teca, bajo el control de la LH, el colesterol es el punto inicial para la síntesis de androstenediona y testosterona (*Geneser, 2000; Harrison, 2010*). Ambos esteroides pasan a través de la lámina basal hacia las células de la granulosa, las cuales tienen grandes cantidades de aromatasa que, bajo la regulación de FSH, biotransforman los andrógenos en estrógenos (*Harrison, 2010*) (Figura 2).





**Figura 2.** Sistema de las dos células para la síntesis de estradiol en el folículo. La LH y FSH estimulan la adenilato ciclasa a través de receptores acoplados a proteínas G. El AMP cíclico (cAMP) generado del ATP activa la protein-cinasa-A (Cinasa-A) para estimular la expresión de las respectivas enzimas esteroidogénicas en las células de la teca y la granulosa. Guanosin difosfato (GDP); Guanosin trifosfato (GTP); Aomatasa (Arom). Tomada y modificada de Strauss y Williams, 2014

El folículo terciario o preovulatorio es el estadio de crecimiento máximo del folículo y forma una elevación en la superficie ovárica, el estigma. En este estadio se liberan las células de la parte basal del cúmulo oóforo y, poco antes de la ovulación, el ovocito fluye libremente en el líquido folicular, rodeado por la zona pelúcida y una nube de células de la granulosa, la corona radiada. Al ovular, el folículo terminará la meiosis sólo en caso de que la fecundación se lleve a cabo y esto dará lugar a la formación de un segundo cuerpo polar (Geneser, 2000; Levine, 2015).

La ovulación marca el momento en el que el resto del folículo se transforma rápidamente en el cuerpo lúteo. Cuando el ovocito es expulsado junto con el líquido folicular, el folículo se colapsa y se forman pliegues característicos en la pared como

consecuencia de la contracción de la teca externa; por su parte, las células de la granulosa tienen una diferenciación terminal que origina una amplia población de células lúteas que conforman al cuerpo lúteo (*Geneser, 2000; Strauss y Williams, 2014*). Estas células luteinizadas tienen una gran capacidad para sintetizar progesterona (*Strauss y Williams, 2014*). En el ovario pueden estar presentes tres o más generaciones de cuerpos lúteos, aunque, estos cuerpos lúteos "viejos" son considerados no-funcionales (*Levine, 2015*). Durante la fase lútea tardía, la actividad secretora del cuerpo lúteo comienza a disminuir (*Smith, 2010*).

Muy pocos folículos presentes en el ovario al momento de nacer son destinados a la ovulación. Esta disminución es producto de la atresia, y ocurre de manera natural y por alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (*Levine, 2015*).

El proceso de foliculogénesis es controlado por factores de crecimiento secretados por el ovocito. A la fecha, se han identificado 5 factores de crecimiento en los ovocitos de mamífero: el factor de crecimiento diferencial-9 (**GDF-9**), la proteína morfogénica ósea-15 (**PMB-15**), la PMB-6, el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 2 (**TGF- $\beta$ 2**) y el factor de crecimiento del fibroblasto-8 (**FGF-8**). Hay evidencias de que estos factores de crecimiento actúan en la proliferación de las células de la granulosa y modulan su respuesta a la FSH (*Harrison, 2010*).

#### ASIMETRÍA OVÁRICA

Los órganos pareados, como los ovarios, a pesar de ser similares morfológicamente, no son idénticos en funcionamiento ni en su regulación (*Domínguez y col., 1998*). La asimetría más evidente de los ovarios está presente en aves, las cuales sólo desarrollan el ovario izquierdo (*Domínguez y col., 2003*). En la mujer, el ovario derecho ovula dos veces más a menudo que el izquierdo y también recibe una mayor inervación (*Potashnik y col., 1987*). En ratas, el ovario izquierdo libera en promedio una mayor cantidad de ovocitos que el derecho (*Domínguez y col., 2003*).

Domínguez y col (1998), proponen que existe una comunicación de tipo nerviosa entre el ovario izquierdo y derecho necesaria para la liberación de LH y la respuesta normal de los ovocitos a la hormona y que durante la tarde del proestro, el ovario izquierdo envía una señal al ovario derecho que sirve de relevo antes de que esta señal llegue al hipotálamo para modular la respuesta de los ovarios a la LH y que se dé la ovulación.

Se ha planteado que la esta asimetría ovárica es debido a la información nerviosa que reciben los ovarios. El modelo del animal hemiovariectomizado es utilizado para analizar la existencia de la asimetría funcional entre los ovarios y estudiar las conexiones neurales entre éstos y el sistema nervioso central.

En ratas adultas hemiovariectomizadas con autoinjerto de ovario, éste no presenta signos de ovulación, resultados que permitieron a los autores sugerir que para que se produzca la ovulación se requiere que el ovario se encuentre inervado (Domínguez y Riboni, 1971). La inervación del ovario a través del Nervio Ovárico Superior (NOS) regula la respuesta de éste a las gonadotrofinas ya que, en la rata adulta, seccionar esta entrada neural disminuye o bloquea totalmente la ovulación; respuesta que varía dependiendo del día del ciclo en que se realiza la cirugía (Chávez y Domínguez, 1994).

Chávez y col (1987), mostraron que en la rata en estro con vagotomía izquierda y hemiovariectomía, el ovario izquierdo *in situ* presentaba un incremento en la tasa de animales ovulantes, en la hipertrofia compensatoria del ovario y el número de ovocitos liberados; mientras que con el ovario derecho *in situ*, estos parámetros disminuyeron. Con la vagotomía derecha se produce una disminución en la hipertrofia compensadora del ovario sin importar que ovario permanezca *in situ*. Con estos resultados, los autores concluyeron que en la rata hemiovariectomizada, el ovario derecho muestra una mayor capacidad para regular los sistemas

compensatorios que el ovario izquierdo y que la información del nervio vago que llega a los ovarios izquierdo y derecho es distinta.

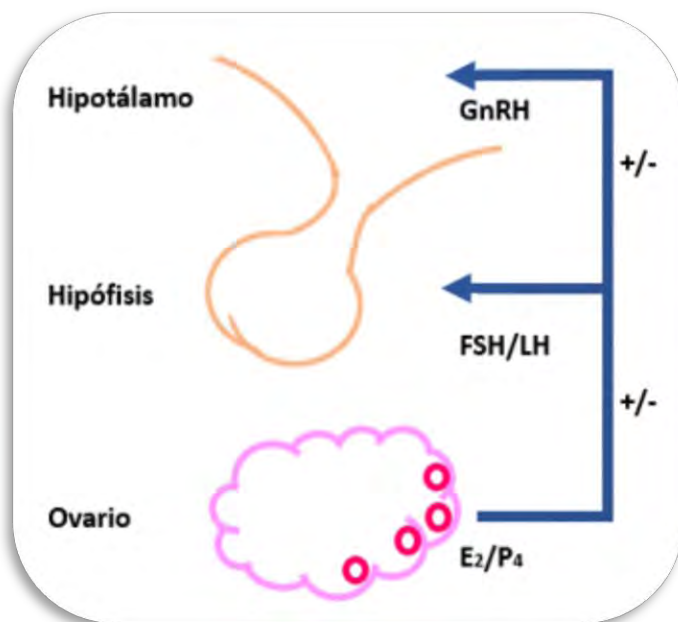
La comunicación entre el sistema nervioso central y los ovarios también se ha estudiado por medio de trazadores transneuronales —como el virus de la pseudorabia o el virus del herpes porcino 1, HVP-1— que al inyectarse en el ovario marcan neuronas de la médula espinal, el tallo cerebral (en los núcleos vagales, el área postrema, los núcleos piramidales, los núcleos caudales del rafe, el locus coeruleus, entre otros), el hipotálamo (Núcleo paraventricular (PVN), núcleo arqueado (ARC), la zona incierta y el hipotálamo anterior), y algunas estructuras telencefálicas (la amígdala y la estría terminal) *(Gerendai y col., 2002)*. También se ha sugerido una comunicación entre NSQ y los ovarios a través del nervio vago que regula de manera estimulante la ovulación durante el día del proestro *(García, 2016)*.

#### CICLO REPRODUCTIVO

La rata es un mamífero de ovulación espontánea no estacional, lo que quiere decir que su ciclo ovárico es continuo a lo largo de todo el año *(Levine, 2015)*. Su ciclo estral consiste en tres fases que describen los eventos ováricos: 1) la fase folicular que es el periodo en el cual el folículo madura, se incrementa la cantidad de estradiol secretado, y se produce el ovocito maduro 2) la de ovulación, que es el proceso en el cual ocurre la ruptura del folículo y el ovocito maduro es liberado dentro del oviducto 3) y la fase lútea, en la que el cuerpo lúteo secreta progesterona para el mantenimiento uterino, la implantación del embrión y el embarazo. Cuando no ocurre la fertilización y la preñez, el cuerpo lúteo degenera, y las concentraciones de progesterona caen; esta es la señal para iniciar con una nueva fase folicular *(Smith, 2010)*.

El ciclo ovárico y la fertilidad son mantenidos por señales hormonales entre el cerebro, la hipófisis y los ovarios (**Figura 3**), que funcionan como un solo eje

hipotálamo-hipófisis-ovario (Levine, 2015). La función reproductiva requiere de la integración dinámica, funcional y temporal, de las señales hormonales en este eje, que resulta en ciclos repetitivos de desarrollo folicular, ovulación y preparación del revestimiento endometrial del útero para la implantación del huevo y que pueda ocurrir la concepción (Harrison, 2010). En el caso de la rata este ciclo ocurre entre 4 o 5 días: el estro, es el día en que ocurre la ovulación y es el único momento en el que es receptiva y permite el coito; metaestro y diestro, son el periodo de recuperación en los que cesan los cambios del tracto reproductivo acontecidos durante el estro; y el proestro, en el cual, el animal se prepara para la reproducción (van der Beek, 1996; Levine, 2015).

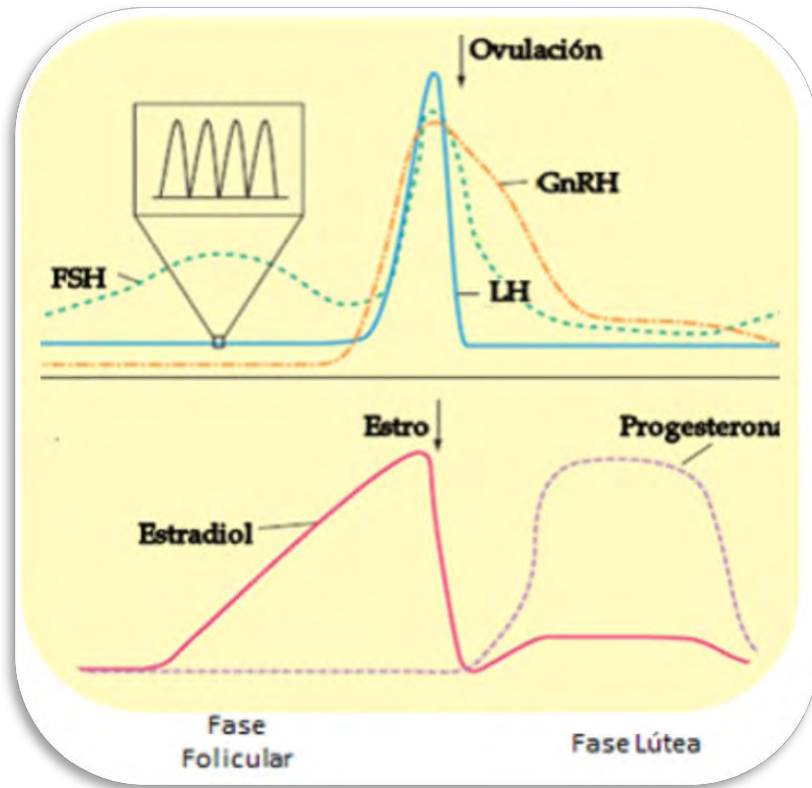


**Figura 3.** Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en el que se muestran las hormonas liberadas por los componentes de este eje. La relación entre cada una de las partes puede ser tanto positiva (+) como negativa (-) dependiendo del día del ciclo y del momento del día.

Las funciones del sistema reproductivo inician con la secreción pulsátil de GnRH desde el hipotálamo hacia el sistema portal hipofisario. La GnRH regula la síntesis y liberación de FSH y LH por parte de las células gonadotrofas de la hipófisis anterior hacia la circulación. La FSH y la LH estimulan el desarrollo folicular, la ovulación y la

formación del cuerpo lúteo, así como la secreción coordinada de estradiol ( $E_2$ ), progesterona ( $P_4$ ), inhibina A e inhibina B por parte del ovario (Hall, 2014; Levine, 2015). Las hormonas ováricas tienen un efecto de retroalimentación tanto en el hipotálamo como en la hipófisis; la baja concentración de  $E_2$  afecta la amplitud de los pulsos de GnRH inhibiendo la secreción de gonadotropinas. El  $E_2$  es el esteroide ovárico más potente que inhibe la secreción de LH, sin embargo, posee un efecto estimulante desde el diestro-2 hasta la mañana del proestro, al incrementar la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH e incrementar la respuesta de la hipófisis a esta neurohormona, lo que produce el pico de LH durante la tarde del proestro (van der Beek, 1996; Hall, 2014; Levine, 2015). Por otra parte, la  $P_4$  aumenta durante la tarde del proestro, lo que facilita la acción positiva de retroalimentación del  $E_2$  en al menos dos vías. La primera, favoreciendo el pico de LH en el día del proestro y la segunda, bloqueándolo durante los otros días del ciclo (van der Beek, 1996). La  $P_4$  ejerce su efecto a nivel del hipotálamo disminuyendo los pulsos de secreción de GnRH (Hall, 2014; Levine, 2015).

Para el correcto funcionamiento del sistema reproductivo es necesaria la secreción pulsátil de GnRH, ya que ésta estimula la secreción (también pulsátil) de LH y FSH (Figura 4). La frecuencia y amplitud de la secreción pulsátil de GnRH controla diferencialmente la liberación de gonadotropinas: la liberación constante de GnRH está asociada con la supresión de éstas (Hall, 2014). Durante la tarde del proestro la concentración de LH comienza a incrementarse rápidamente hasta alcanzar un pico entre las 17:00h a y 19:00h de este día, después de lo cual, cae a concentración basal en la mañana del estro, manteniéndose baja durante el resto del ciclo. La FSH sigue un patrón semejante al de LH, sin embargo, aunque también decae su concentración después de la ovulación, la FSH tiene un segundo pico que alcanza su máximo incremento en la mañana del estro y poco tiempo después cae a concentraciones basales (Levine, 2015).



**Figura 4.** Representación del patrón de secreción hormonal durante el ciclo estral. Las hormonas mostradas son la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), la Hormona Luteinizante (LH), la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) y las hormonas esteroideas liberadas por el ovario (Estradiol y Progesterona). También se señala el día de la ovulación, el día del estro. Tomado y modificado de Smith, 2010

#### LA REPRODUCCIÓN Y EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

Los sistemas fisiológicos deben integrar señales del ambiente, diarias y estacionales, para poder coordinar varios de los procesos requeridos en la ovulación, el apareamiento, el desarrollo embrionario y el parto (*Kennaway y col., 2012; Boden y col., 2013*).

Existen evidencias del papel central del NSQ en la regulación de los ritmos neuroendocrinos relacionados a la reproducción. La lesión del NSQ abaten los ritmos de secreción de prolactina, gonadotrofinas, el ciclo estral y la respuesta a hormonas esteroideas, así como la receptividad sexual y el momento de la ovulación (*van der Beek, 1996; Mahoney y col., 2004*).

La integración de las señales endócrinas y circadianas por el NSQ en la tarde del proestro desencadena la cascada de eventos en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario para su funcionamiento sincronizado, logrando un incremento en la liberación de

GnRH por la terminal nerviosa hacia la eminencia media, lo que estimula el pico de LH que inducirá, a su vez, la ovulación (*Meijer y col., 1986; Kennaway y col., 2012; Levine, 2015*).

Para que el sistema neuronal responsable de la secreción pre-ovulatoria de LH funcione correctamente necesita de: 1) las neuronas GnRH; 2) neuronas sensibles a las hormonas ováricas que transmitan los efectos estimulantes de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> a las neuronas GnRH; y 3) un órgano de sincronización circadiana (el NSQ) que coordine temporalmente el sistema GnRH y el subsecuente pico de LH al momento apropiado del ciclo luz-obscuridad (*van der Beek, 1996*).

En la rata, la mayoría de las neuronas que sintetizan GnRH están localizadas en el área preóptica (POA) y en la banda diagonal de Broca (DBB); también algunas se encuentran en el área hipotalámica anterior (AHA) y más rostralmente, a través del nervio vomeronasal y el bulbo olfatorio. La población total de las neuronas que producen GnRH en el prosencéfalo de la rata es de 1300 a 1500 células y más del 70% de las neuronas GnRH envían proyecciones a la eminencia media; además, se han identificado receptores a GnRH en áreas extrahipotalámicas (*van der Beek, 1996*).

Se han reportado efectos estimulantes de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en la síntesis de GnRH (*Christian y Moenter, 2008*). La liberación preovulatoria de LH es regulada temporalmente por E<sub>2</sub>, ya que, en ratas hembras con implante de E<sub>2</sub>, se produce el pico de LH por varios días consecutivos y dicho pico se presenta al final del día (*Tonsfeld y Chappell, 2012*).

En general se acepta que ni las neuronas del NSQ ni las neuronas GnRH poseen receptores a E<sub>2</sub> (RE), sin embargo, estudios *in vitro* usando neuronas de GnRH inmortalizadas señalan que al menos algunas de estas neuronas pueden expresar RE funcionales, (*van der Beek, 1996*). Además, ahora se sabe que el NSQ contiene receptores que monitorean la concentración de E<sub>2</sub> en plasma (*Boden y col., 2013*). Los esteroides ováricos han mostrado modular la amplitud, la fase y el periodo de los



ritmos circadianos (*van der Beek, 1996*). En la actualidad se cree que el E<sub>2</sub> modula la función del hipotálamo tanto por vías directas como indirectas (*Williams, 2009*).

Durante la tarde del proestro, el sistema GnRH recibe señales desde áreas externas al hipotálamo que también modifican la frecuencia, la amplitud y la ocurrencia del pico de GnRH y por tanto el de LH (*van der Beek, 1996*). Los sistemas neuronales serotoninérgico, GABAérgico y neurotensina en POA; el del Neuropeptido Y (NPY) y endorfinas del ARC; y el sistema noradrenérgico del tronco encefálico, además de hacer sinapsis con neuronas GnRH, contienen receptores tanto a estrógenos (RE) como a P<sub>4</sub> (RP) siendo estos sistemas los candidatos para modular la liberación de LH dependiente de esteroides (*van der Beek, 1996*). Los núcleos Periventriculares Anteroventrales (AVPV) también han mostrado tener RE, y sus fibras envían Kisspeptina (Kiss1) hacia POA, donde estimula la liberación de GnRH (*Tonsfeldt y Champbell, 2012; Boden y col., 2013*).

El NSQ sintetiza y libera vasopresina (AVP), previo al incremento en la liberación de GnRH que culmina con la ovulación (*Tonsfeldt y Chappel, 2012*). Existe una comunicación directa entre el NSQ y las neuronas GnRH a través de neuronas que contienen Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) (*Tonsfeldt y Chappel, 2012; Boden y col., 2013*). Se ha observado que la liberación de VIP por parte del NSQ incrementa la liberación de GnRH (*Boden y col., 2013*). Cerca del 40% de las neuronas GnRH presentan receptores a VIP y la aplicación directa de este neuropéptido en cortes de cerebro, produce un efecto excitatorio de estas neuronas que depende del tiempo y la concentración de E<sub>2</sub> (*Christian y Moenter, 2008*).

Por medio de trazadores retrógrados se ha mostrado la vía directa del NSQ con las neuronas GnRH, y se ha sugerido que existe un relevo en la zona subParaVentricular (subPVN), en el Núcleo Paraventricular (PVN) y en el área Periventricular (PEVN). Estas áreas se encuentran rodeando al NSQ y reciben fibras de VIP y AVP desde este

núcleo. Además, la subPVN parece proyectar a las mismas regiones que el NSQ, pero aparentemente son mucho más extensas (*van der Beek, 1996*).

El NSQ también proyecta a células que contienen Hormona Inhibidora de Gonadotropinas (GnIH) del núcleo dorsomedial, el cual proyecta a POA inhibiendo la liberación de GnRH (*Boden y col., 2013*). Por otro lado, se ha encontrado que existen fibras de GnRH que llegan al NSQ desde el POA, sugiriendo un asa de retroalimentación del sistema ya que estas fibras GnRH incrementan su actividad con altas concentraciones de E<sub>2</sub> (*van der Beek, 1996*).

#### EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

Los ritmos circadianos —del latín *circa dies*, "alrededor del día", por su duración de aproximadamente 24h— se presentan en diversas funciones fisiológicas y conductuales como patrones diarios (*Jiang y col., 1997*). Estos ritmos son la expresión externa del sistema de sincronización de un reloj biológico (o circadiano) de los seres vivos. En los mamíferos se ha mostrado que dicho reloj se encuentra en el NSQ, el cual participa en la generación de los ritmos biológicos, que se sincronizan con los periodos de luz-obscuridad del ambiente (*Card y Moore 1984; Ralph y Lehman, 1991; Liu y col., 1997; Aguilar-Roblero y col., 2004*). Dicha sincronización se logra a través de la información lumínica captada por los fotorreceptores localizados en la retina y que es transmitida de manera directa por el tracto retino-hipotalámico (RHT) y de manera indirecta desde del Núcleo Geniculado Lateral (GLN) (*Meijer y col., 1986; Johnson y col., 1988; Ikeda, 2004; Golombeck y Rosenstein, 2010*).

Cuando el NSQ es extirpado completamente se observa la pérdida de los ritmos circadianos endógenos, que se restablecen mediante el trasplante del NSQ, pero con la periodicidad que poseía el donador (*Ralph y Lehman, 1991*). Se ha observado que el cultivo del NSQ completo o de sus neuronas aisladas presenta ritmos con una oscilación circadiana, donde cada célula presenta un ritmo de actividad eléctrica

propia (Gillette, 1996; Jiang y col., 1997). Las células del NSQ muestran un aumento sostenido de su tasa de actividad eléctrica al encontrarse en un entorno iluminado. La actividad disminuye al suprimir la luz, lo que indica que la actividad del núcleo se encuentra regulada por las señales lumínicas (Meijer y col., 1986).

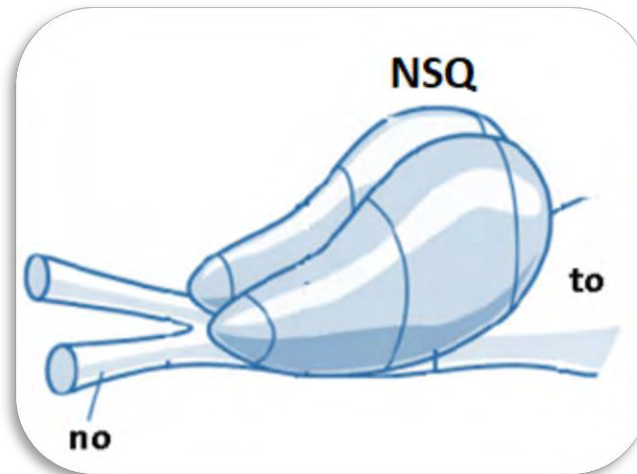
Sin embargo, la luz es sólo una de las tantas señales que adelantan o retrasan los ritmos circadianos. En roedores, otros factores descritos son el ejercicio, la temperatura externa, la disponibilidad de alimento y la manipulación (Horikawa y col., 2000; Bedont y Blackshaw, 2015). El Tálamo Paraventricular (PVT) transmite información no-lumínica (tal como ruidos, temperatura o movimiento) hacia el NSQ que también podrían ejercer su efecto en la sincronización de los ritmos circadianos (Aguilar-Roblero y col., 2004).

El NSQ utiliza señales neuronales y factores humorales en la sincronización del organismo con las señales externas; así, parte de los ritmos son controlados por factores secretados por el NSQ como el VIP, AVP y la procinectina 2 (PK2), mientras que otros ritmos, como el reproductivo, dependen de una conexión neural con distintas áreas y núcleos del hipotálamo (Tonsfeldt y Chappell, 2012; Boden y col., 2013).

#### Anatomía del NSQ

El NSQ es una estructura pareada, presente a ambos lados de la línea media, dorsal al quiasma óptico, en la base del hipotálamo anterior. En la rata, cada núcleo es fusiforme con un largo rostrocaudal de  $730 \pm 68 \mu\text{m}$ . Rostralmente el NSQ está rodeado por el área perisupraquiasmática (periNSQ), una zona distinta del área hipotalámica anterior que continúa caudalmente por los bordes lateral y dorsal de los márgenes del NSQ hasta el área retroquiasmática, la cual forma el borde caudal del NSQ. En su porción media tiene un diámetro de  $300 \mu\text{m}$  y su volumen es de  $0.036 \pm 0.006 \text{mm}^3$  (Moore y col., 2002). En la rata, la forma del NSQ, en secciones coronales, es plano justo sobre el quiasma óptico a nivel rostral, mientras que, en su

parte media se vuelve elíptico, más ancho en el plano dorsoventral que en el mediolateral; y a nivel caudal, es más alargado en el eje dorsoventral y muy delgado del lado que corre paralelo al tercer ventrículo (Figura 5) (Yan y Okamura, 2002).



**Figura 5.** Forma del núcleo Supraquiasmático (NSQ) de la rata y su posición respecto al nervio óptico (no) y el tracto óptico (to). Figura tomada y modificada de Yan y Okamura, 2002

El NSQ está compuesto de entre 8,000 a 10,000 células de cada lado de la línea media, aunque se sabe que estas células no son homogéneas, ya que cada una de ellas posee un ritmo circadiano intrínseco —por lo que son llamadas *células reloj*- (van den Pol y Tsujimoto, 1985; Welsh y col., 1995). Aún se desconoce el mecanismo por el cual estos ritmos individuales se conjugan para mostrar un ritmo único (Liu y col., 1997).

La población heterogénea de los tipos celulares presentes en el NSQ expresa y libera distintos neuropéptidos. La mayoría de sus neuronas sintetizan ácido gamma aminobutírico (GABA), el cual parece mediar la señalización interna del núcleo y ser su principal neurotransmisor (Ikeda y col., 2003). En ratas, la AVP es sintetizada aproximadamente en el 37% de sus neuronas. VIP se sintetiza en el 25% de las células y se expresa principalmente en las regiones dorsal y medial ventrolateral del NSQ —

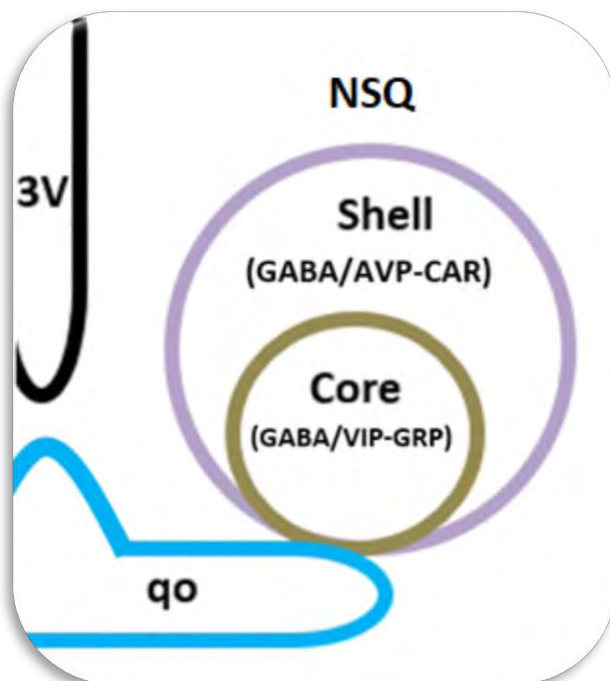
se ha notado que tanto la secreción de AVP como de VIP se da en ciclos de aproximadamente 24h—(Inouye y Shibata, 1994). El Péptido Liberador de Gastrina (GRP) y la Calretina (CAR) son expresados en la parte media, en aproximadamente el 14% de las neuronas supraquiasmáticas. En menor medida (<5%) se expresan neuronas productoras de metencefalina, somatostatina (SS), Calbidina, Angiotensina II, Sustancia P y Neurotensina (Tonsfeldt y Chappell, 2012). El grupo de Shibata (1983), mostró en estudios *in vitro*, que la actividad eléctrica de las neuronas del NSQ son inhibidas parcialmente por la adición de algunos neurotransmisores, mientras que el glutamato (Glu) puede estimularla (cuadro 1).

**cuadro 1.** Efecto de distintos neurotransmisores sobre la actividad eléctrica de neuronas del NSQ realizado a partir de la información de Shibata y col, 1983. Como se observa GABA es el neurotransmisor que inhibe la mayoría de las neuronas del NSQ mientras que taurina, serotonina (5-HT), noradrenalina (NA), dopamina (DA) lo hacen en menor medida, mientras que sólo el Glu las estimula y la glicina (Gli) no presenta ninguna actividad sobre las neuronas

NEUROTRANSMISOR	ESTIMULA	INHIBE	SIN RESPUESTA
GABA		90%	
TAURINA		42%	
5-HT		30%	
NA		22%	
DA		26%	
Glu	50%		
Gli			96%

Mediante el análisis de ultra y citoarquitectura, y con base en las aferencias y el fenotipo neural del NSQ, se ha mostrado que cada núcleo contiene dos subdivisiones anatómicas (Figura 6). Una denominada "Core" correspondiente a la región ventrolateral del NSQ y que contiene neuronas grandes con gran cantidad de organelos. Estas neuronas tienen una extensa arborización dendrítica y reciben fibras directas de la retina (que producen VIP y GRP co-localizados con GABA) y de manera indirecta reciben fibras provenientes del tracto geniculohipotalámico (GHT), que

contienen NPY, y de los núcleos dorsales del rafe que transportan serotonina (5-HT) (Card y Moore, 1984; Reghunandana y col., 1993; Inouye y Shibatta, 1994; Morin, 2007). La otra región es denominada "Shell" y es la zona dorsomedial que está caracterizada por pequeñas neuronas alargadas con núcleo grande y escaso citoplasma y organelos; mientras que sus arborescencias dendríticas son restringidas. Está definida por células productoras de AVP y una pequeña población productora de CAR (co-localizadas con GABA). Esta área también recibe innervación no-lumínica desde la región cortical y subcortical del encéfalo (Card y Moore, 1984; Reghunandana y col., 1993; Moore y col., 2002; Yan y Okamura, 2002; Yan y Silver, 2002; Morin, 2007). Cuando se compara el total de la población neuronal del NSQ por la técnica inmunocitoquímica, Shell contiene el 57% de las neuronas y el Core el 43% restante (Moore y col., 2002).



**Figura 6.** Se muestra el núcleo Supraquiasmático (NSQ) con sus principales divisiones, Shell (en la parte dorsomedial) y Core (porción ventrolateral), con sus principales neurotransmisores. 3V, tercer ventrículo; qo, quiasma óptico; GABA, ácido gama-aminobutírico; AVP, vasopresina; CAR, calretina; VIP, péptido intestinal vasoactivo; GRP, péptido liberador de gastrina.

Los péptidos sintetizados en el Core (VIP y GRP) responden a estímulos lumínicos, pero su concentración no varía en oscuridad constante; por su parte, los péptidos

sintetizados en Shell (AVP), muestran ritmos endógenos sin responder a la luz. Por este comportamiento se cree que el Core se relaciona más con la sincronización de los ritmos con las señales lumínicas del ambiente, mientras que la región Shell está más involucrada con la generación del ritmo interno (*Inouye y Shibata, 1994*).

El NSQ izquierdo y derecho se comunican mediante vasopresina, GRP, VIP, GABA y SS. Pero, a pesar de la gran densidad de axones entre el núcleo izquierdo y derecho del NSQ, al realizar la lesión en medio de ambos núcleos no se produce la pérdida del ritmo circadiano (*van den Pol y Tsujimoto, 1985*).

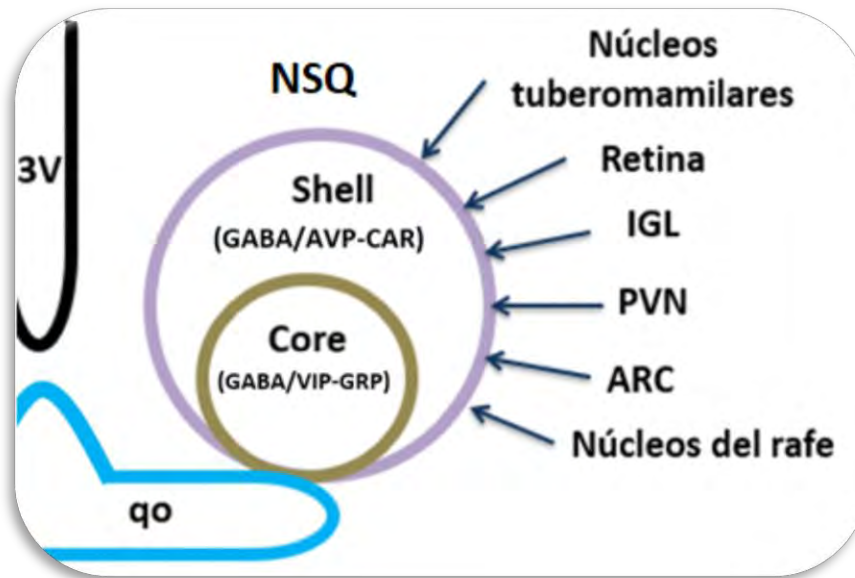
#### Aferencias al NSQ

El NSQ presenta una aferencia principal, el RHT, el cual transmite información lumínica directa desde una pequeña porción de ganglios celulares de la retina que llegan al Core (*Meijer y col., 1986; Ikeda, 2004; Golombeck y Rosenstein, 2010*). El RHT libera glutamato. Este tracto también presenta somas con inmunorreactividad a VIP (*Card y Moore, 1984*). En la sinapsis entre el RHT y el NSQ se expresan receptores serotoninérgicos (*Ikeda, 2004*) y los tres tipos de receptores glutamatérgicos (AMPA, cainato y NMDA) (*Aguilar-Roblero y col., 2004; Ikeda, 2004*).

Una vía secundaria a través de la cual el NSQ recibe información de los ciclos luz-obscuridad del ambiente es a través del GHT que surge de la hojuela intergeniculada (IGL) que se encuentra en el núcleo geniculado lateral (LGN). El GHT libera GABA, NPY y endorfinas dentro del NSQ y presenta inmunorreactividad al Polipéptido Pancreático Aviar (APP) (*Card y Moore, 1984; Moore y col., 2002; Aguilar-Roblero y col., 2004; Ikeda, 2004*).

Una tercera proyección del NSQ son las fibras serotoninérgicas provenientes tanto de la IGL como de los núcleos medial y dorsal del rafe que proyectan al Core del NSQ. Se sabe que estas aferencias serotoninérgicas desde el rafe hasta el NSQ son

esenciales en los cambios de fase del núcleo (*Inouye y Shibata, 1994; Moga y Moore, 1997; Moore y col., 2002; Aguilar-Roblero y col., 2004*) (Figura 7).



**Figura 7.** Se muestran las principales aferencias que arriban al NSQ, sin indicar si es en la zona del Shell o del Core. 3V, tercer ventrículo; qo, quiasma óptico; IGL, hojuela intergeniculada; PVN, núcleo paraventricular; ARC, núcleo arqueado.

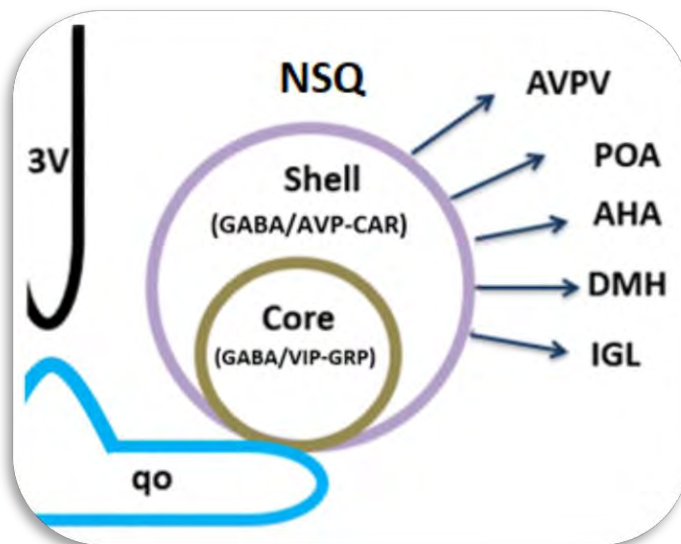
El NSQ recibe fibras histaminérgicas de las neuronas tuberomamilares del hipotálamo posterior (*Inouye y Shibata, 1994*). También posee conexiones aferentes con varias regiones hipotalámicas incluyendo neuronas del Núcleo Paraventricular (PVN), la zona subparaventricular, el núcleo hipotalámico ventromedial, el área hipotalámica posterior y el ARC que se distribuyen tanto al Shell como al Core (*Moga y Moore, 1997; Moore y col., 2002; Boden y col., 2013*).

#### Eferencias del NSQ

El NSQ muestra eferencias que se distribuyen principalmente en el hipotálamo adyacente, POA, AHA, la zona subparaventricular, el área retroquiasmática, las áreas hipotalámicas tuberales y posterior —incluyendo el núcleo dorsomedial (DMH)—, y tiene limitadas proyecciones al prosencéfalo, el hipotálamo medio, IGL y la sustancia gris periacueductal (*Moore y col., 2002*).



De entre las señalizaciones eferentes descritas del NSQ está la de vasopresina, cuyas eferencias provienen de la región Shell del NSQ y llegan a los AVPV, los cuales liberan Kiss (*Mahoney y col., 2004; Tonsfeldt y Chappell, 2012; Boden y col., 2013*). El NSQ tiene proyecciones nerviosas que llegan al núcleo Paraventricular medial y al tálamo lateral y que contienen vasopresina, neurofisisina y VIP. Los axones de vasopresina además proyectan hacia el órgano vascular de la lámina terminal, el hipotálamo dorsomedial (*van den Pol y Tsujimoto, 1985; Inouye y Shibata, 1994*) y el LGN (*Inouye y Shibata, 1994*). Esta señalización con vasopresina ha sido implicada en la regulación del eje reproductivo (Hipotálamo-Hipófisis-Gónada) (**Figura 8**) (*Williams y col., 2011*).



**Figura 8.** Se muestran las principales eferencias que surgen del NSQ, sin indicar si es de la zona de Shell o del Core. 3V, tercer ventrículo; qo, quiasma óptico; IGL, hojuela intergeniculada; AVPV, núcleo anteroventral periventricular; POA, área preóptica hipotalámica; AHA, área hipotalámica anterior; DMH, núcleo dorsomedial hipotalámico

Otra vía de comunicación del NSQ, es a través de VIP, la cual representa una conexión directa entre neuronas del NSQ con las neuronas GnRH (*Inouye y Shibata, 1994; Tonsfeldt y Chappell, 2012*). Un sitio fuera del hipotálamo que recibe proyecciones desde el NSQ es el septum lateral (*Inouye y Shibata, 1994*).

VIP y GRP se localizan en la región de Core y en algunas ocasiones los péptidos se co-localizan en la misma neurona. (*Inouye y Shibata, 1994*).

## EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO Y EL SISTEMA COLINÉRGICO

La acetilcolina (**ACh**) es uno de los principales neurotransmisores en el hipotálamo de los mamíferos (*Trachsel y col., 1995*). La regulación directa del NSQ por parte del sistema colinérgico es sustentada por estudios neuroanatómicos en los que se han encontrado las enzimas que sintetizan y degradan ACh (acetilcolinoesterasa (**AChE**) y colino acetiltransferasa (**CAT**), respectivamente) tanto en el NSQ como en zonas adyacentes (*van den Pol y Tsujimoto, 1985; van der Zee y col., 1991*). Estudios por radio ligando, así como con técnicas de inmunocitoquímica han mostrado la presencia tanto de receptores colinérgicos nicotínicos como muscarínicos en el NSQ de rata (*van der Zee y col., 1991*).

Las principales proyecciones colinérgicas descritas en el NSQ son directamente desde el tallo cerebral, y de la base del prosencéfalo anterior; y de manera indirecta a través de circuitos colinérgicos extra supraquiasmáticos (*Trachsel y col., 1995; Yang y col., 2010*). De la base del prosencéfalo recibe información colinérgica de la sustancia innominada y los núcleos basales magnocelulares, también desde el septum medial y de la banda diagonal de Broca. En el tallo cerebral se han localizado neuronas colinérgicas provenientes de distintos núcleos como el núcleo tegmental pedúnculo-pontino (**PPT**), el tegmento mesopontino, el núcleo parabigeminal (**PBg**), y el núcleo tegmental laterodorsal (**LDT**) (*Bina y col., 1993*).

Existe una variación circadiana en la concentración de ACh en el sistema nervioso central. Estudios de microdiálisis mostraron que en ratas mantenidas durante 3 ciclos de luz-oscuridad de 12h/12h, hay una variación diaria de liberación de ACh en la corteza frontal, donde la máxima concentración se produce durante la fase de oscuridad, y, en la fase lumínica, la concentración disminuye hasta un tercio de la observada durante la noche. Cuando los animales son expuestos a condiciones de oscuridad constante, estas fluctuaciones en la liberación de ACh son mantenidas

durante al menos 3 ciclos, lo que sugiere que la liberación de ACh está bajo el control circadiano independiente de las señales lumínicas (*Kametani y Kawamura, 1991*).

En los mamíferos la ACh es considerada el "transmisor de la vigilia" dado que es liberado durante el periodo de actividad y su liberación disminuye durante el sueño REM; lo que hace suponer que los patrones de actividad, los ritmos circadianos y la neurotransmisión colinérgica están estrechamente acoplados (*Hut y Van der Zee, 2011*).

Por estudios farmacológicos, utilizando agonistas colinérgicos, se ha sugerido que la ACh regula los efectos de la luz sobre los ritmos circadianos de la actividad motora del ratón, de la actividad de la enzima N-acetiltransferasa en la hipófisis de rata, y la ovulación (*Kow y Pfaff, 1984*).

En la rata, los pulsos de luz producen cambios de fase de los ritmos circadianos (*Meijer y col., 1986*). La luz cambia el momento en el que comienzan los ritmos de actividad en los roedores. El carbacol, un agonista colinérgico no selectivo, mostró un efecto similar al producido por la luz, lo que permitió sugerir al sistema colinérgico como mediador de los ciclos circadianos en el NSQ (*Bina y Rusak, 1996; Liu y Gillette, 1996*).

Evidencias experimentales plantean la importancia del sistema colinérgico en la regulación de los ciclos circadianos. La exposición a pulsos de luz incrementa la concentración de ACh en el NSQ (*Murakami y col., 1984*). Este incremento es a partir de la síntesis *de novo* en el NSQ (*Bina y col., 1998*). En el NSQ *in vitro*, tanto la ACh como el carbacol, adelantan la fase del ritmo en la tasa de disparo de las neuronas (*Liu y Gillette, 1996*). En este mismo modelo, la ACh presenta un efecto inhibitorio sobre la actividad eléctrica de las células del NSQ (*Kow y Pfaff, 1984*) que puede ser bloqueada por atropina (ATR), un antagonista muscarínico no selectivo de los receptores muscarínicos, por lo que se ha sugerido que los receptores muscarínicos son los principales mediadores de los ritmos circadianos (*Liu y Gillette, 1996; Yang y*

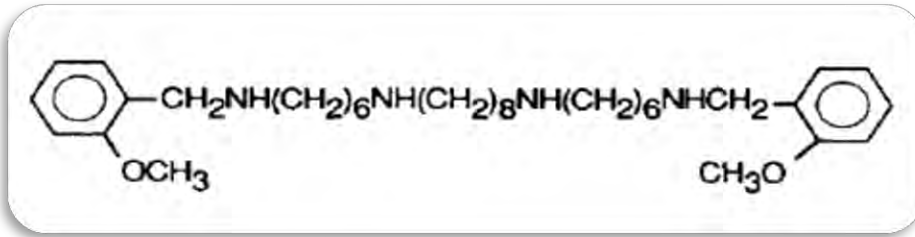
*col., 2010*); por el contrario, en estudios *in vivo*, la ACh y la nicotina presentan un efecto excitatorio en las células del NSQ (*Yang y col., 2010*).

#### RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN EL NSQ

La ACh interactúa con los 5 tipos de receptores muscarínicos, del M<sub>1</sub> a M<sub>5</sub>, que poseen una gran semejanza estructural y sólo han podido ser diferenciados por técnicas moleculares (*Bonner, 1989*).

El estudio de las funciones de cada uno de los receptores se ha realizado con el uso de agonista y antagonistas selectivos, sin embargo, aun cuando se habla de que son altamente selectivos muestran afinidad por otros subtipos (*Wess y col., 1995*). Uno de los antagonistas más utilizados para el estudio de los receptores muscarínicos es la pirenzepina, un antagonista de los receptores de tipo muscarínico, que posee una gran afinidad por receptores M<sub>1</sub>, pero que también presenta, en menor medida, afinidad por los receptores M<sub>2</sub>. Un fármaco con gran afinidad y alta especificidad por los receptores M<sub>2</sub> es la metoctramina (**Met**) (*Melchiorre, 1988*).

La metoctramina (N,N'-bis[6-[(2-metoxibenzil)amino]hexil]-1,8-octanediamina tetrahidroclorido) es una polimetileno tetraamina derivada de la benextramina, un antagonista  $\alpha$ -adrenérgico con actividad antagónica a receptores M<sub>2</sub> (*Melchiorre, 1988; Michel y Whiting, 1988*). La metoctramina (**Figura 9**) muestra gran afinidad y alta selectividad por los receptores M<sub>2</sub>, y por a su alta polaridad no atraviesa la barrera hematoencefálica (*Stillman y col., 1993*). Este fármaco comparte el sitio de acción con la ATR (*Melchiorre y col., 1987*) y tiene un comportamiento dual: competitivo a bajas concentraciones ( $\leq 1\mu\text{M}$ ) y alostérico a altas concentraciones ( $> 1\mu\text{M}$ ) (*Giraldo y col., 1987*).



**Figura 9.** Estructura química de la metoctramina (Melchiorre y col, 1987)

En el NSQ se encuentran presentes los 5 receptores muscarínicos (M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub>), aunque los dos más abundantes son los receptores M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> (Bina y col., 1993). En general se cree que, en el sistema nervioso central, los receptores M<sub>1</sub> tienen una localización post-sináptica y son excitatorios, mientras que los receptores M<sub>2</sub> son pre-sinápticos autorreceptores y promueven la inhibición en la liberación de ACh (Bina y col., 1998). Stillman y colaboradores (1993), apoyan la idea de que los receptores M<sub>2</sub> están presentes de manera pre-sináptica, ya que en la rata adulta, la administración de metoctramina (16μM) en el hipocampo resulta en el aumento de la liberación de ACh. Por el contrario, cuando se colocan rebanadas de la corteza frontal en presencia de un agonista de los receptores M<sub>2</sub>, tal como la oxotremorina, disminuye la concentración de ACh, efecto que no se observa en presencia de metoctramina (Torocsik y Vizi 1991).

La microinyección unilateral de ATR en el NSQ durante la mañana del proestro, disminuye la tasa de animales ovulantes, independientemente del núcleo inyectado. Esta respuesta se ha atribuido a una alteración de los pulsos de GnRH, ya que al reemplazar esta señal con LHRH sintética la ovulación se presenta en el 77% de los animales. Estos resultados permitieron sugerir a los autores que la información colinérgica del NSQ, mediada por los receptores muscarínicos, participa en la regulación de la ovulación (Vieyra y col., 2016).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El NSQ participa en la regulación de la secreción pulsátil de GnRH y por tanto de la ovulación. En este núcleo se sintetiza y degrada la ACh, y se encuentran todos los tipos de receptores muscarínicos ( $M_1$ - $M_5$ ) con los que interactúa este neurotransmisor. Se ha mostrado que la información colinérgica del NSQ, mediada por los receptores muscarínicos, durante la mañana del proestro modula de manera estimulante la ovulación, ya que el bloqueo de estos receptores por la microinyección de ATR en el NSQ resulta en la disminución de la tasa de animales ovulantes.

Sin embargo, debido a que la ATR es un antagonista muscarínico no selectivo, aún se desconoce si alguno de los receptores muscarínicos tiene una participación preponderante en la regulación de las funciones ováricas. En el NSQ, el receptor muscarínico  $M_2$  se encuentra con amplia distribución, pero se desconoce su participación en la regulación de los procesos que culminan con la ovulación. Por lo que en el presente estudio se analizó si el bloqueo de los receptores muscarínicos  $M_2$  del NSQ modifica la respuesta ovulatoria y la concentración sérica de hormonas esteroideas y si existe una respuesta asimétrica por parte de los NSQ ante el bloqueo de sus receptores  $M_2$  en el animal con o sin hemiovariectomía.

## HIPÓTESIS

Si durante la mañana del proestro, la ACh en el NSQ regula de manera estimulante la ovulación, vía la activación de los receptores muscarínicos  $M_2$ , entonces, el bloqueo de este receptor en el animal con ambas gónadas o hemiovariectomizado, bloqueará la ovulación al estro vaginal.

## OBJETIVOS

### General

Analizar la participación de los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> del NSQ en la regulación de las funciones ováricas en el animal con ambas gónadas o con hemiovariectomía.

### Particulares

- Analizar los efectos del bloqueo unilateral de los receptores M<sub>2</sub> en el NSQ a las 9:00h del proestro sobre:
  - La tasa de animales ovulantes
  - Número de ovocitos liberados por animal ovulante
  - La concentración sérica de progesterona y estradiol
- Analizar los efectos del bloqueo unilateral de los receptores M<sub>2</sub> en el NSQ seguido de la hemiovariectomía ipsilateral al bloqueo a las 9:00h del proestro sobre:
  - La tasa de animales ovulantes
  - Número de ovocitos liberados por el ovario remanente
  - La concentración sérica de progesterona y estradiol



## MÉTODO

Se utilizaron ratas hembra adultas de 90 días de edad de la cepa CII-ZV, entre 230 y 260g de peso corporal (pc), mantenidas con fotoperiodo de 14h luz y 10h oscuridad (con las luces encendidas de 5:00h-19:00h). A temperatura constante de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , con alimento (Purina S.A, México) y agua *ad libitum*. Se siguieron las normas de la ley de protección animal para el uso de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999).

El ciclo estral se monitoreó por medio del frotis vaginal diario y se usaron únicamente aquellos animales que presentaron al menos 2 ciclos consecutivos de 4 días.

Para responder si el sistema colinérgico, a través de los receptores muscarínicos  $M_2$  del NSQ, regula las funciones ováricas se diseñó el siguiente experimento:

### **Grupo con microinyección de Metocramina (M NSQ-I; M NSQ-D)**

En el día del proestro vaginal, entre las 9:00h y las 10:00h, los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con Pentobarbital sódico (**Pb**) (30mg/kg p.c.). Los animales se colocaron en un aparato Estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) donde se les afeitó la cabeza y se realizó una incisión desde la altura de los ojos hasta las orejas para localizar el punto bregma, a partir del cual, basado en las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2004), se ubicó el sitio del NSQ izquierdo (NSQ-I: antero posterior=-0.3; lateral=-0.3; ventral=-9.1) o derecho (NSQ-D: antero posterior=-0.3; lateral=+0.3; ventral=-9.1) en ese punto se realizó una perforación con ayuda de un taladro odontológico (marathon SDE-H35SP1, Corea). A través del orificio se introdujo una aguja mariposa de un sistema de infusión (25G x3/4´) conectada, por medio de un tubo de teflón, a una jeringa Hamilton de 25µL colocada en la bomba de microinyección (CMA/100, Suecia) y se administraron 16µM (0.348ng) de metocramina (Sigma Chemical Co., San Louis MO., USA)

(bloqueador altamente selectivo a receptores  $M_2$ ) disuelta en 0.3 $\mu$ L de solución salina. Otro grupo fue microinyectado con 0.3 $\mu$ L de solución salina que sirvió como vehículo (Vh). El flujo de microinyección fue de 0.3 $\mu$ L/min. Al terminar la administración del fármaco la aguja permaneció en su sitio durante un minuto. La aguja fue retirada y la cabeza del animal suturada.

#### **Grupo con microinyección de Metoctramina seguida de la hemiovariectomía ipsilateral al núcleo inyectado (M NSQ-I+Ho; M NSQ-D+Ho)**

Para evaluar la posible comunicación entre el NSQ y el ovario, realizada la microinyección de metoctramina en el NSQ, se procedió a extirpar el ovario ipsilateral al núcleo microinyectado. Para ello, del mismo lado en que se encuentra el núcleo microinyectado, se realizó una incisión debajo de la última costilla cortando piel, músculo y peritoneo, el ovario fue expuesto, se ligó el útero y se procedió a extirpar el ovario. Se introdujo el útero a la cavidad abdominal y se suturó músculo y piel.

Para descartar el posible efecto de la hemiovariectomía durante la microinyección en el NSQ, se incluyó el grupo de animales a los que sólo se les extirpó el ovario izquierdo (Ho I) o derecho (Ho D).

En los grupos en donde se realizó la hemiovariectomía la ovulación compensadora (OC) se calculó con la siguiente fórmula:

*OC=(ovocitos liberados por el ovario in situ-ovocitos liberados por el ovario extirpado)/ovocitos liberados por el ovario extirpado x100.*

Donde, el número de ovocitos liberados por el Ovario extirpado corresponde al de un animal testigo sacrificado al estro vaginal

La hipertrofia compensadora del ovario (HCO) se calculó con la siguiente fórmula

*HCO=(peso del ovario in situ-peso del ovario extirpado)/peso del ovario extirpado.x100*

Tanto la OC como la HCO se analizaron con la prueba de  $\chi^2$ .

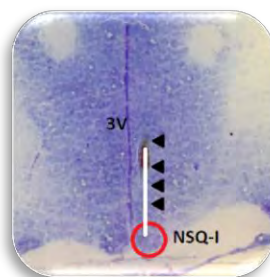
### Grupo Testigo Absoluto (TA):

Este grupo estuvo conformado por animales intactos sacrificados el día del estro vaginal.

### Procedimiento de autopsia

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación al presentar el estro vaginal posterior a la cirugía. Los ovarios y el útero fueron extraídos, se eliminó la grasa adherida y se pesaron en una balanza analítica. La sangre fue colectada y centrifugada (3500 rpm/15 min). El suero fue separado en alícuotas y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la cuantificación de hormonas (progesterona y estradiol) por el método de quimioluminiscencia (P<sub>4</sub>: intraensayo: 6.7; intraensayo: 7.9; E<sub>2</sub>: intraensayo: 7.1; interensayo: 8.3). Además, a cada animal se le extrajeron los oviductos para cuantificar la cantidad de ovocitos liberados con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon, modelo C-PS, Japón).

Para poder observar la trayectoria de la aguja durante la microinyección, los cerebros fueron extraídos y colocados en formaldehído al 10% durante al menos 8 días. Posterior a esto, en un vibrátomo se realizaron cortes coronales seriados a  $100\mu\text{m}$  de espesor que contenían al NSQ y fueron teñidos con la técnica de Nissl. Solo se utilizaron aquellos animales en los que la trayectoria de aguja estuvo dentro del NSQ.



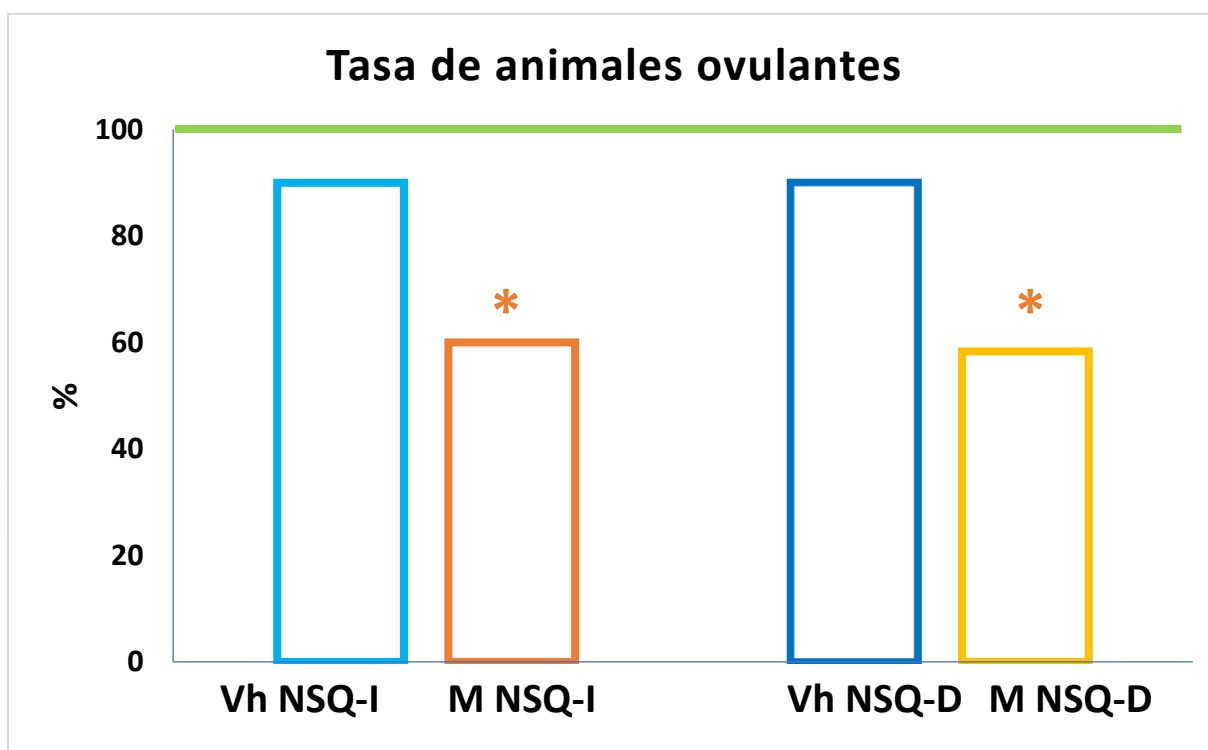
### Análisis Estadístico

La tasa de ovulación (número de animales ovulantes/el número de animales tratados) se analizó por la prueba exacta de Fisher para proporciones. El número de ovocitos liberados se analizó usando la prueba de Kruskal-Wallis seguida de Dunn. El peso de los órganos y la concentración de hormonas en suero fueron analizados por la prueba de ANDEVA seguida de una prueba de Tukey. Cuando se compararon dos grupos se utilizó una prueba "t" de *Student*. Todo el análisis estadístico se realizó usando el programa estadístico *GraphPad Instant 3*. Se consideraron estadísticamente significativas, aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05 ( $p < 0.05$ )

## RESULTADOS

### EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE METOCTRAMINA EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO IZQUIERDO O DERECHO SOBRE LA OVULACIÓN

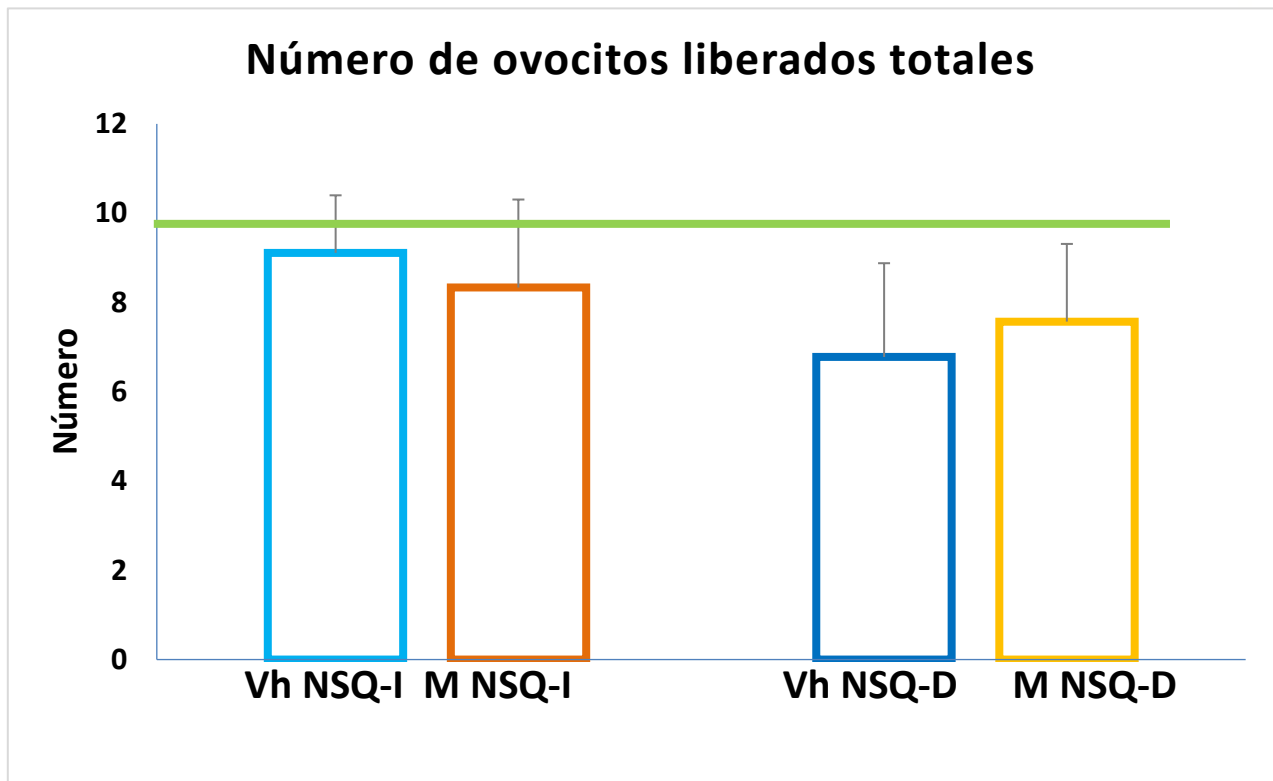
Todos los animales que conformaron el grupo de animales testigo ovularon al estro vaginal. La microinyección de **Vh** en el NSQ no modificó la tasa de animales ovulantes, comparado con el **testigo**. La tasa de animales ovulantes de los grupos con microinyección de metoctramina en el NSQ izquierdo (**M NSQ-I**) o derecho (**M NSQ-D**) fue menor al grupo testigo absoluto, sin llegar a ser estadísticamente significativo en comparación a los animales con Vh (**Gráfica 1**).



\*  $p < 0.05$  vs TA (Prueba exacta de Fisher)

**Gráfica 1.** Porcentaje de animales ovulantes del grupo testigo absoluto (línea verde), de animales microinyectados con vehículo (Vh) o metoctramina (M) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) en el día del proestro y sacrificados al estro vaginal.

El número de ovocitos liberados totales no se modificó por la microinyección de Vh o metoctramina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho (Gráfica 2).

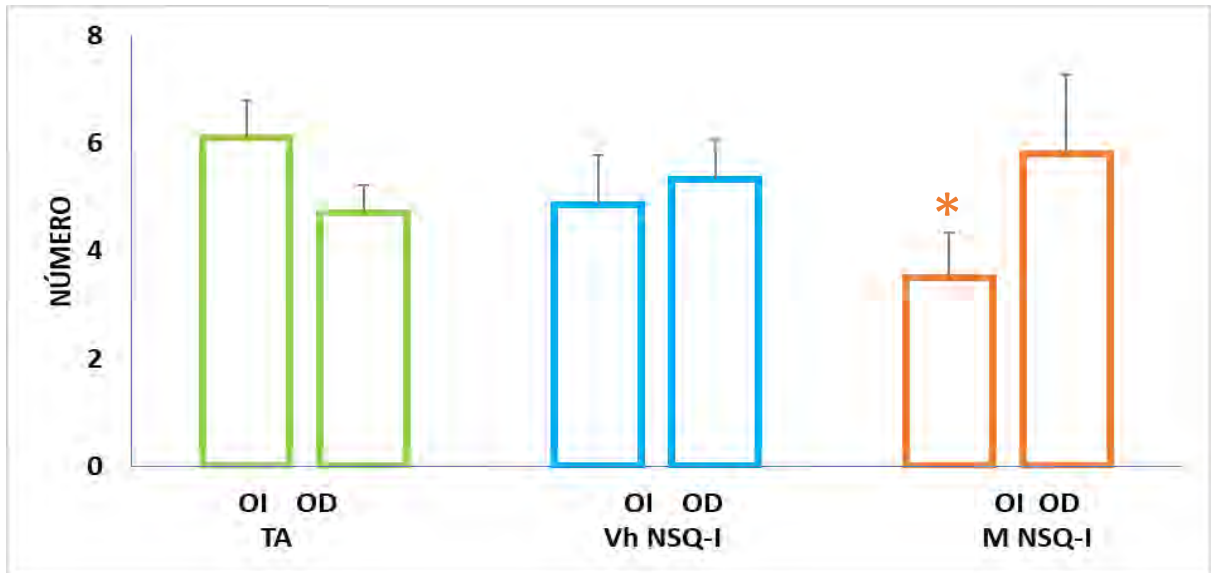


**Gráfica 2.** Media  $\pm$  eem del número total de ovocitos liberados del testigo absoluto (línea verde), grupos con microinyección de vehículo (Vh) o metoctramina (M) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) en el día del proestro y sacrificados al estro vaginal.

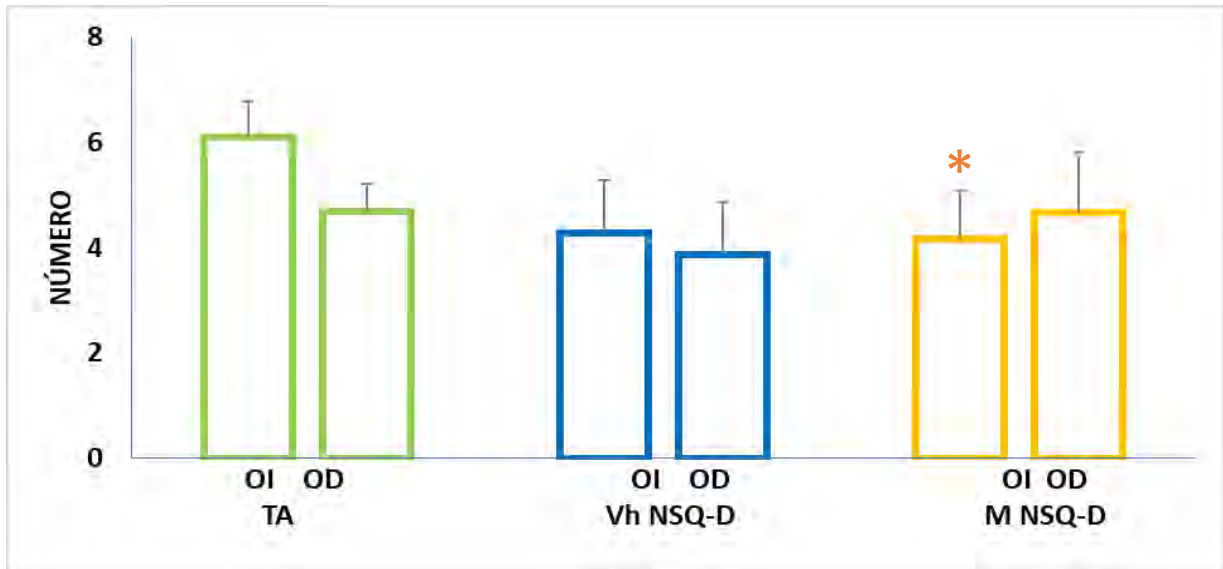
Se analizó el número de ovocitos liberados por ovario, y se observó que la microinyección de Vh en el NSQ no modificó el número de ovocitos liberados por ovario, comparado con el testigo. La microinyección de metoctramina en el NSQ-I disminuyó el número de ovocitos liberados por parte del ovario izquierdo, respecto al grupo testigo absoluto y no llegó a ser estadísticamente significativo al ser comparado con el Vh; mientras que la cuota ovulatoria del ovario derecho (contralateral a la microinyección) no se vio afectada (Gráfica 3A). En comparación

con el testigo, la microinyección de metoctramina en el NSQ-D disminuyó el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo; sin que se modificara los liberados por el ovario derecho (Gráfica 3B).

A)



B)

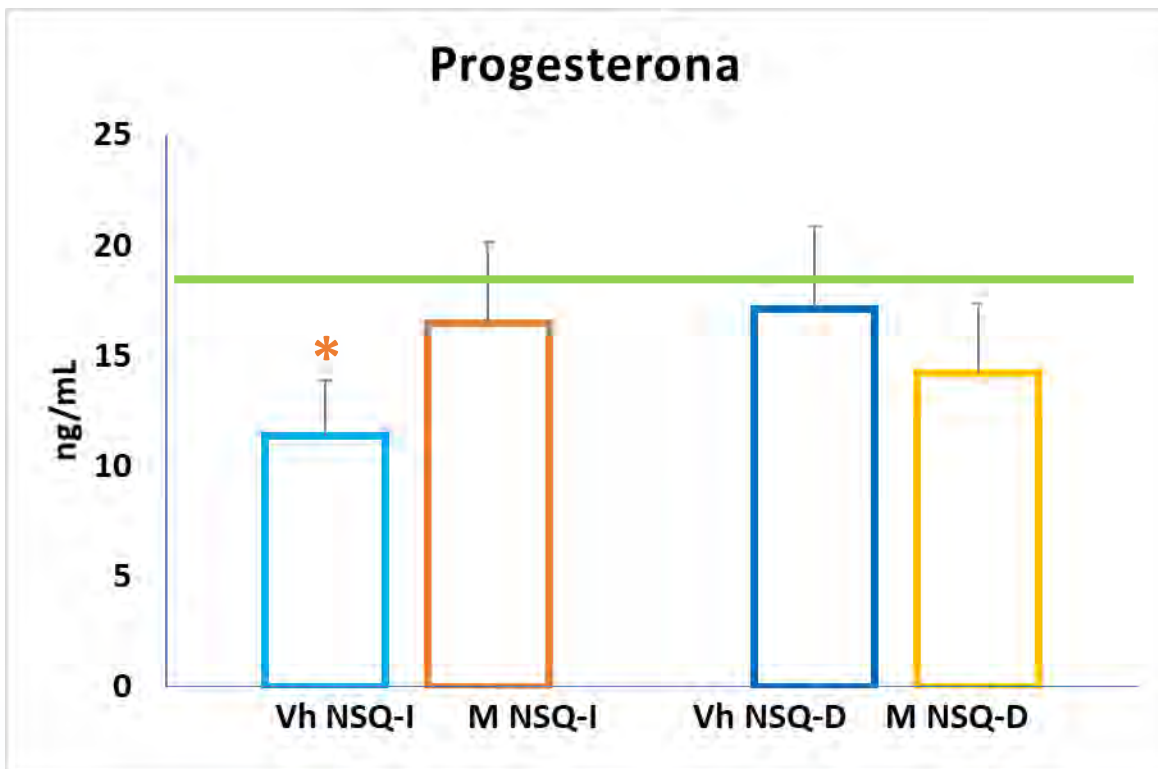


\*  $p < 0.05$  vs TA (Prueba Kruskal-Wallis seguida de Dunn's)

**Gráfica 3. Mediana** del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho de los grupos con microinyección en el núcleo supraquiasmático izquierdo (A) o derecho (B) con vehículo (Vh) o metoctramina (M) en el día del proestro y sacrificadas al estro vaginal.

## EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE METOCTRAMINA EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO IZQUIERDO O DERECHO SOBRE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE PROGESTERONA

La concentración sérica de progesterona fue menor en el grupo con Vh en el NSQ izquierdo comparada con el grupo TA. La microinyección de metoctramina no modificó la concentración de P<sub>4</sub> comparado con el grupo Vh (Gráfica 4).



\*  $p < 0.05$  vs TA (ANDEVA seguida de Tukey)

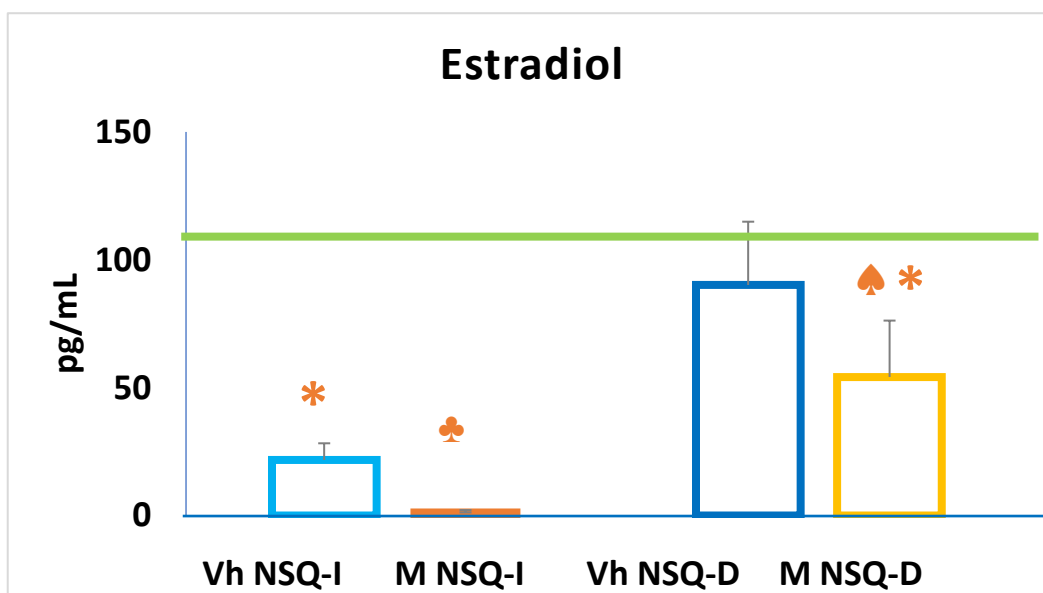
**Gráfica 4. Media  $\pm$  sem** de la concentración sérica de progesterona (ng/mL) de animales testigo absoluto (línea verde), con microinyección de vehículo (Vh) o metoctramina (M) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) en el día del proestro y sacrificadas al estro vaginal.



## EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE METOCTRAMINA EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO IZQUIERDO O DERECHO SOBRE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DE ESTRADIOL

La concentración sérica de estradiol disminuyó significativamente en los animales con microinyección de Vh en el NSQ-I en comparación con el testigo absoluto. La microinyección con metoctramina resultó en una concentración menor de la hormona respecto al grupo con Vh (Gráfica 5).

La microinyección de Vh en NSQ-D, no modificó la concentración de estradiol respecto el grupo testigo. Al comparar los dos grupos con bloqueo de los receptores M<sub>2</sub>, se observó que la concentración de estradiol es mayor en los animales microinyectados del lado derecho (Gráfica 5).



\*  $p < 0.05$  vs TA (ANDEVA seguida de Tukey); ♣  $p < 0.05$  vs Vh NSQ-I (ANDEVA seguida de Tukey); ♠  $p < 0.05$  vs Vh NSQ-I o M NSQ-D respectivamente (ANDEVA seguida de Tukey)

**Gráfica 5. Media ± eem** de la concentración de sérica de estradiol (pg/mL) del testigo absoluto (línea verde), con microinyección de vehículo (Vh) o metoctramina (M) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) en el día del proestro y sacrificadas al estro vaginal.

## MASA OVÁRICA Y EL PESO DEL ÚTERO EN LOS ANIMALES CON MICROINYECCIÓN DE METOCTRAMINA

La microinyección en el núcleo supraquiasmático con Vh o metoctramina no modificó la masa ovárica. La microinyección de Vh en el núcleo supraquiasmático derecho incrementó el peso del útero, respecto al testigo absoluto. La microinyección de metoctramina en el lado derecho del NSQ resultó en un menor peso del útero, respecto al grupo inyectado con Vh (cuadro 2).

**cuadro 2.** Media±sem de la masa ovárica y el peso del útero de los animales testigo absoluto, con microinyección de vehículo (Vh) o metoctramina (M) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) en el día del proestro y sacrificadas al estro vaginal

GRUPOS	MASA OVÁRICA (mg/100 g pc)		ÚTERO (mg)
	OI	OD	
TA	10.75±0.51	10.38±0.54	140.75±7.93
<b>Micro-inyección</b>			
Vh NSQ-I	10.97±0.67	11.09±0.58	145.82±8.24
Vh NSQ-D	11.3±0.59	10.65±0.47	163.45±7.93*
M NSQ-I	11.8±0.6	11.11±0.57	139.15±4.7
M NSQ-D	10.71±0.77	10.85±0.62	139.4±5.4*

\* p<0.05 vs TA (ANDEVA seguida de Tukey)

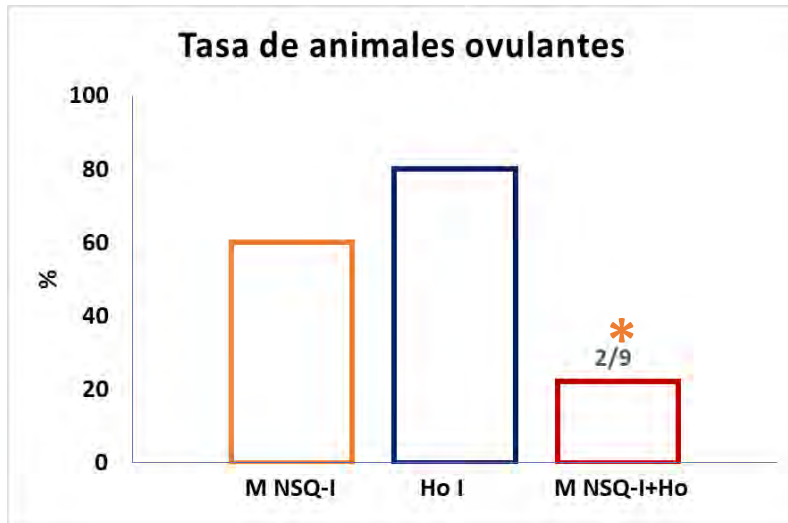
♣ p<0.05 vs Vh NSQ-I (ANDEVA seguida de Tukey)

● <0.05 vs Vh NSQ-D (ANDEVA seguida de Tukey)

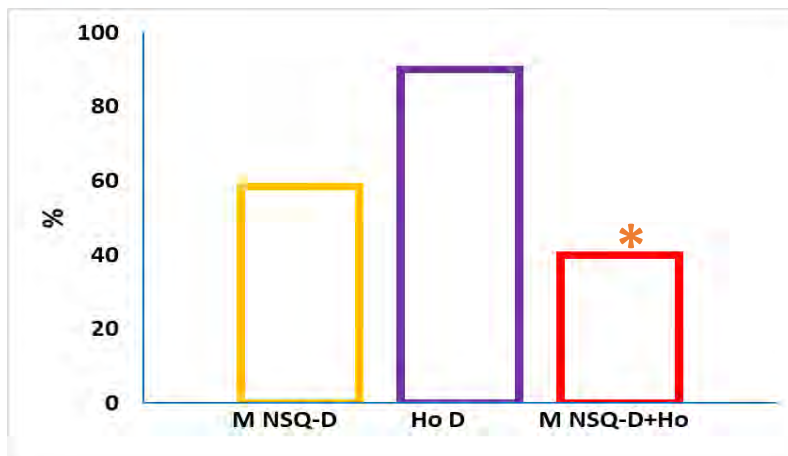
## EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE METOCTRAMINA EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO IZQUIERDO O DERECHO CON HEMIOVARIETOMÍA IPSILATERAL, SOBRE LA OVULACIÓN

El 100% de los animales intactos (testigo) ovularon en la mañana del estro. La hemiovariectomía izquierda o derecha no modificó el porcentaje de animales ovulantes respecto al grupo testigo. En los animales con microinyección de metoctramina en el lado izquierdo o derecho del NSQ seguida de la hemiovariectomía, se observó un menor porcentaje de animales ovulantes en comparación con el grupo hemiovariectomizado (**Gráfica 6**).

A)



B)



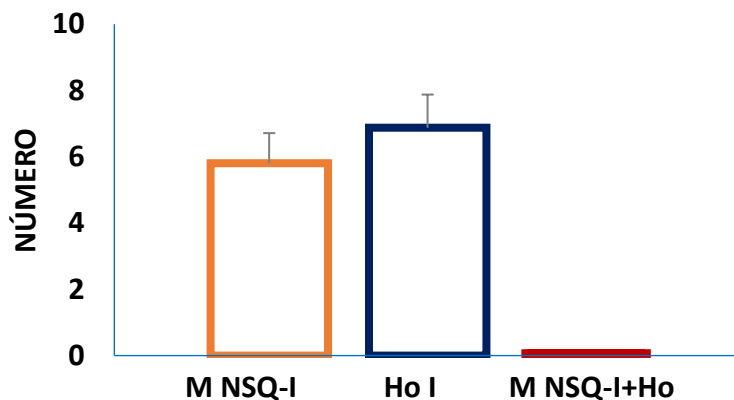
\*  $p < 0.05$  vs Ho (Prueba exacta de Fisher)

**Gráfica 6.** Porcentaje de animales ovulantes del grupo con microinyección en el núcleo supraquiasmático izquierdo (A) o derecho (B) de metoctramina (M NSQ), hemiovariectomía (Ho), o la microinyección seguida de la hemiovariectomía (M NSQ +Ho) realizada en el día del proestro y sacrificadas al estro vaginal.

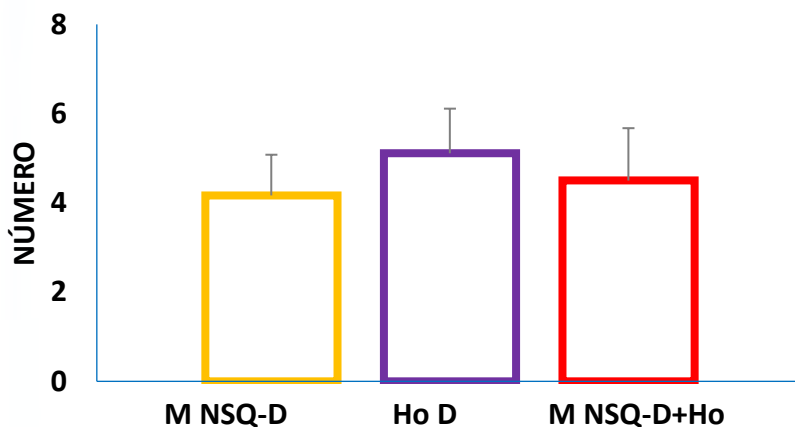
El ovario derecho *in situ* presentó una ovulación compensadora del 11.47%; mientras que en el ovario izquierdo *in situ* fue de 8.51%. La microinyección de metoctramina en el núcleo supraquiasmático izquierdo seguida de la hemiovariectomía mostró disminución en el número de ovocitos liberados por parte del ovario *in situ*. En el grupo con la microinyección en el núcleo derecho seguida de la hemiovariectomía, el número de ovocitos liberados fue similar al grupo hemiovariectomizado (Gráfica 7).

A)

### Ovocitos liberados



B)

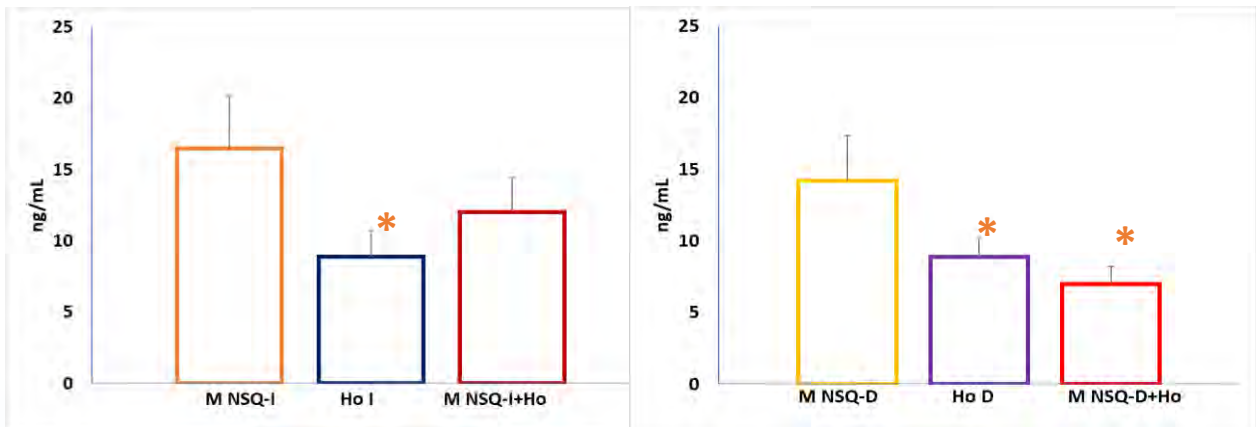


**Gráfica 7. Media  $\pm$  eem** del número de ovocitos liberados por el ovario derecho (**panel A**) o izquierdo (**panel B**) de los grupos con microinyección en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho con metoctramina (**M NSQ**), hemiovariectomía (**Ho**), o la conjunción de la microinyección y la hemiovariectomía (**M NSQ +Ho**) realizada en el día del proestro y sacrificadas al estro vaginal.

## EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE METOCTRAMINA EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO IZQUIERDO O DERECHO Y HEMIOVARIETOMÍA IPSILATERAL SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROGESTERONA

La concentración sérica de progesterona en los animales intactos fue de  $18.42 \pm 3.48$  ng/mL. La hemiovariectomía izquierda o derecha disminuyó la concentración de progesterona comparado contra el grupo testigo (Ho I:  $8.89 \pm 1.84$  ng/mL; Ho D:  $8.89 \pm 1.25$  ng/mL vs TA:  $18.42 \pm 3.48$  ng/mL,  $p < 0.05$ ). Sólo la microinyección de metoctramina en el núcleo derecho seguida de la hemiovariectomía derecha, disminuyó la concentración de la hormona comparada con el grupo con microinyección de metoctramina en el lado derecho (**Gráfica 8**).

### PROGESTERONA

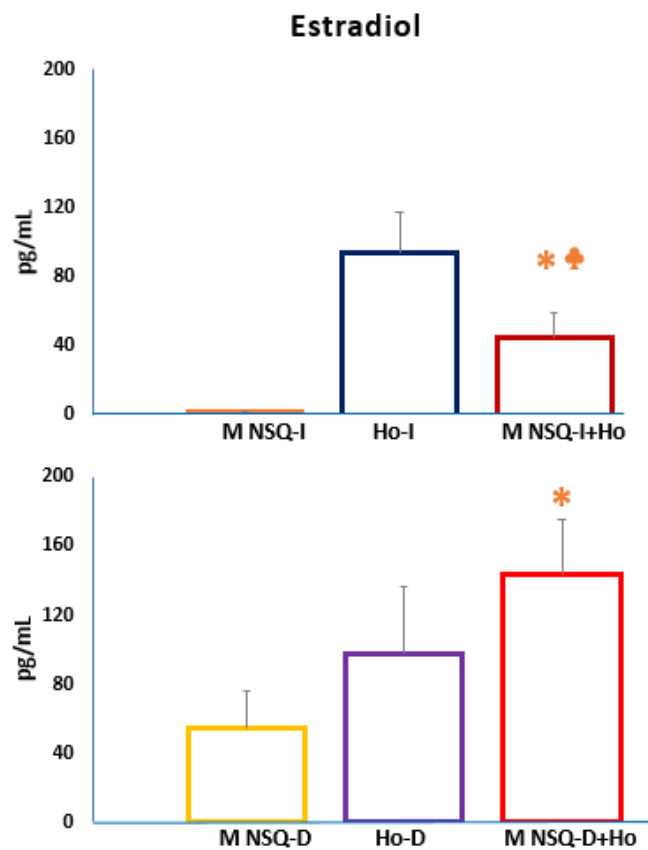


\*  $p < 0.05$  vs M NSQ (ANDEVA seguida de Tukey)

**Gráfica 8. Media  $\pm$  eem** de la concentración de sérica progesterona (ng/mL) de ratas con microinyección de metoctramina (M) en el lado izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D), hemiovariectomía izquierda (Ho I) o derecha (Ho D) o la microinyección izquierda seguida de la hemiovariectomía (M NSQ-I+Ho) o la microinyección derecha seguida de la hemiovariectomía (M NSQ-D+Ho) en el día del proestro y sacrificadas al estro vaginal

## EFFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE METOCTRAMINA EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO IZQUIERDO O DERECHO CON HEMIOVARIETOMÍA IPSILATERAL SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL

La microinyección de metoctramina en el NSQ-I seguido de la hemiovariectomía ipsilateral a la microinyección disminuyó significativamente la concentración de estradiol comparado con el grupo con hemiovariectomía izquierda, pero fue mayor comparada con el grupo con metoctramina en el NSQ-I. La microinyección de metoctramina en el NSQ-D seguida de la hemiovariectomía incrementó la concentración de estradiol comparado con el grupo con metoctramina en el NSQ-D (Gráfica 9).



\* $p < 0.05$  vs M NSQ-I o M NSQ-D; ♣ $p < 0.05$  vs Ho (ANDEVA seguida de Tukey)

**Gráfica 9.** Media  $\pm$  error de la concentración de estradiol (pg/mL) del grupo con microinyección de metoctramina (M) en el lado izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D), hemiovariectomía izquierda (Ho I) o derecha (Ho D) o la microinyección izquierda seguida de la hemiovariectomía (M NSQ-I+Ho) o la microinyección derecha seguida de la hemiovariectomía (M NSQ-D+Ho) en el día del proestro y sacrificadas al estro vaginal

## MASA OVÁRICA Y EL PESO DEL ÚTERO

Con respecto al grupo testigo absoluto, la hemiovariectomía derecha incrementó el peso del ovario *in situ* y muestra una hipertrofia compensadora del ovario de 3.44%. La hemiovariectomía izquierda, con o sin microinyección de metocramina, incrementó la masa del ovario remanente, e indujo una HCO de 12.91% y 8.19%, respectivamente (**Tabla 3**).

La hemiovariectomía no modificó el peso del útero comparado con el testigo absoluto. La microinyección de metocramina en el núcleo supraquiasmático izquierdo en el animal con Ho incrementó el peso del útero respecto al testigo absoluto y la hemiovariectomía izquierda (**cuadro 3**).

**cuadro 3. Medias** de la masa ovárica, la hipertrofia compensadora del ovario (HCO) y el peso del útero de los grupos con hemiovariectomía izquierda (Ho I) o derecha (Ho D) o microinyectados en el núcleo Supraquiasmático seguida de la hemiovariectomía del lado izquierdo (M NSQ-I+Ho) o derecho (M NSQ-D+Ho) en el día del proestro y sacrificadas al estro vaginal

GRUPOS	MASA OVÁRICA (mg/100 g pc)			ÚTERO (mg)
	OI	OD	HCO (%)	
TA	10.75±0.51	10.38±0.54	-	140.75±7.93
<b>Hemiovariectomía</b>				
Ho I	-	12.57±0.17 *	8.19	127.56±6.1
M NSQ-I+Ho	-	12.63±0.73 *	12.91	171.37±8.53 **
Ho D	13.09±0.13 *	-	3.44	147.19±5.44
M NSQ-D+Ho	11.15±0.46 *	-	1.88	153.75±11.7

\* p<0.05 vs TA (ANDEVA seguida de Tukey)

● p<0.05 vs Ho D (ANDEVA seguida de Tukey)

♣ p<0.05 vs Ho I (ANDEVA seguida de Tukey)

## DISCUSIÓN

### Efecto de la metoctramina en el animal intacto

Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que en la mañana del proestro, el sistema colinérgico del NSQ, vía los receptores muscarínicos M<sub>2</sub>, participa en la regulación de la secreción de estradiol. Resultados que permiten sugerir la existencia de una vía de comunicación neural entre el NSQ y los ovarios.

El sistema colinérgico del NSQ, vía los receptores muscarínicos, ejerce un efecto estimulante en los mecanismos que facilitan la ruptura del folículo preovulatorio y la salida del ovocito. Si en la mañana del proestro se bloquean estos receptores por la microinyección de atropina en el NSQ izquierdo, se bloquea la ovulación sólo en el 40% de los animales, mientras que si la microinyección se realiza en el lado derecho el bloqueo es del 89% (*Vieyra y col., 2016*). Los autores señalan que el bloqueo se produce por la disminución de la señal de GnRH que resulta en una menor secreción de LH.

En nuestro estudio, el bloqueo temporal de los receptores muscarínicos M<sub>2</sub> del NSQ inducido por la microinyección de metoctramina, mostró un bloqueo de la ovulación en el 40% de los animales, independientemente del núcleo microinyectado. Dado que la respuesta ovulatoria entre los animales tratados en el NSQ izquierdo con atropina y los tratados con metoctramina es la misma, se puede sugerir que la señal de GnRH que regula la secreción de LH es mediada por los receptores M<sub>2</sub>, sin embargo, no se puede descartar que en dicha regulación participen los receptores M<sub>1</sub>, dado que la metoctramina posee afinidad por este receptor (*Michel y Whitinh, 1988*).

En el presente estudio se observó que, independientemente del NSQ microinyectado, el bloqueo en la ovulación es similar; esta respuesta difiere a la reportada por Vieyra y colaboradores (*2016*), quienes mostraron una respuesta



asimétrica. Esta discrepancia podría ser atribuida al hecho de que la atropina se une a todos los receptores muscarínicos ( $M_1$ - $M_5$ ), mientras que la metoctramina bloquea preferentemente a los  $M_2$ .

En aquellos animales microinyectados con metoctramina que ovularon, independientemente del lado de la microinyección, el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo fue menor; mientras que el ovario derecho tiene un efecto compensatorio, ya que el número de ovocitos liberados totales es semejante al del grupo testigo. Estas evidencias permiten sugerir que ambos núcleos supraquiasmáticos envían una señal neural estimulante, mediada por los receptores  $M_2$ , hacia el ovario izquierdo para que se lleve a cabo la ovulación. La ovulación del ovario derecho en respuesta a la microinyección de metoctramina en el NSQ (izquierdo o derecho), podría indicar que existe una vía de comunicación entre los ovarios, que iría del ovario izquierdo al derecho (**Modelo 1**). Esta idea ya ha sido propuesta por Domínguez y colaboradores (1998), quienes mostraron que la inyección de xilocaína en la bursa del ovario izquierdo resulta en la disminución del número de ovocitos liberados por ambos ovarios, mientras que la xilocaína en la bursa del ovario derecho no presenta este efecto.

El sistema colinérgico del NSQ no parece participar en los primeros pasos de la biosíntesis de las hormonas esteroides, ya que la concentración de progesterona no se ve modificada por el bloqueo de los receptores muscarínicos  $M_2$ .

El NSQ parece regular de manera estimulante la biosíntesis de estradiol, ya que, cuando se realiza la microinyección de metoctramina en el NSQ izquierdo, la concentración de estradiol se encuentra en los límites de detección del ensayo. Si la microinyección de metoctramina se realiza en el NSQ derecho la concentración de estradiol cae a la mitad de la del grupo testigo. Esto nos indica que la información colinérgica del NSQ (sobre todo del núcleo izquierdo) modula de manera estimulante la biosíntesis del estradiol.

## Análisis de la comunicación entre el NSQ y el ovario

La hemiovariectomía no modificó la tasa de animales ovulantes, sin embargo, observamos que cuando el ovario derecho permanece *in situ* libera un mayor número de ovocitos que cuando permanece el ovario izquierdo, mostrando una ovulación compensadora del 12%; mientras que en el ovario izquierdo *in situ* es del 9%.

Chávez y Domínguez (1994), observaron que en ratas hemiovariectomizadas a las 9:00h del proestro, después de seis días postcirugía, la tasa de animales ovulantes era igual al de un grupo testigo. Respecto al número de ovocitos liberados, cuando el ovario derecho permaneció *in situ* presentó una ovulación compensadora del 81%; mientras que en el ovario izquierdo fue del 51%. Los autores explican la asimetría como resultado del aporte noradrenérgico que recibe cada ovario. En este antecedente se muestra una ovulación compensatoria 6 días después de la hemiovariectomía, y en el presente estudio se observó que esta ovulación compensadora comienza a presentarse desde las 24 horas postcirugía. Sin embargo, hay evidencias de que no sólo depende del período transcurrido sino también del día del ciclo y de la hora en la que se practica la hemiovariectomía. Flores y colaboradores (1990), realizaron la hemiovariectomía a las 7:00h del día del proestro y no observaron hipertrofia del ovario remanente a las 5h, 12h, 24h, 48h, 72h o 96h postcirugía. Sin embargo, sí se observa cuando se realiza en el diestro 1 (72h y 96h postcirugía) o en el diestro 2 (96h postcirugía).

Al realizar la hemiovariectomía, el ovario remanente sólo es capaz de sintetizar la mitad de la concentración de progesterona que produce el animal testigo, lo que podría indicar que en la mañana del estro, los ovarios son responsables de la síntesis de esta hormona. Respecto a esto, se ha reportado que durante el periodo previo a la ovulación el principal aporte de esta hormona es el ovario (De Geyter, 2002).

En el presente estudio se observó que independientemente del ovario extirpado, la concentración de estradiol es semejante a la del grupo testigo. Previamente se mostró que al realizar la hemiovariectomía a las 13h del día del proestro y sacrificar una hora después, la concentración de estradiol disminuía (Cruz y col., 2006; Flores y col., 2011). Comparado con lo obtenido en este estudio, los resultados podrían indicar que, 24h después de la cirugía, el ovario remanente desarrolla un mecanismo compensador que le permite sintetizar la misma concentración que cuando están presentes ambos ovarios. Estudios previos han reportado que los ovarios son la principal fuente de estradiol durante el ciclo estral (Barco y col., 2003; Flores y col., 2008). En los animales con microinyección de metocramina seguida de la hemiovariectomía mostramos un bloqueo de la ovulación del ovario remanente. Cuando la microinyección es del lado izquierdo y permanece *in situ* el ovario derecho, el bloqueo de la ovulación se da en el 80% de los animales; mientras que con la microinyección del lado derecho y ovario izquierdo *in situ*, el bloqueo fue del 60%.

Dado que el porcentaje de animales que ovulan por el ovario *in situ* en los animales microinyectados es menor que en el animal hemiovariectomizado, se puede sugerir que existe una comunicación neural contralateral entre el NSQ y los ovarios. Aunque no podemos descartar que se deba a una menor concentración de GnRH y de LH.

La diferente respuesta entre el animal microinyectado con metocramina cuando tiene los dos ovarios o sólo uno, puede deberse a que la extirpación de una de las gónadas causa disminución en la expresión de los receptores a hormonas esteroides en varias regiones del hipotálamo (incluyendo el NSQ), altera el ritmo circadiano (Model y col., 2015); incrementa la densidad de procesos astrocíticos y disminuye el número de sinapsis en el NSQ (Karatsoreos y col., 2011). Estas evidencias hacen pensar que en el animal hemiovariectomizado con bloqueo de los receptores M<sub>2</sub>, la baja respuesta ovulatoria sea el producto de la disminución en la expresión de los

receptores a estrógenos, lo que resulta en la alteración de la secreción de GnRH y de las gonadotrofinas.

Cuando se realiza la microinyección de metoctramina en el NSQ izquierdo seguida de la hemicastración ipsilateral se puede considerar que el bloqueo de la ovulación es total, ya que sólo ovularon dos animales y cada ovario remanente libera un ovocito. Mientras que si la microinyección de metoctramina se realiza en el NSQ derecho seguida de la hemiovariectomía, el ovario remanente libera un número de ovocitos igual al ovario izquierdo del grupo testigo. Al realizar la hemiovariectomía derecha, con o sin la microinyección de metoctramina, no se observa una liberación compensatoria de ovocitos. Estos resultados nos llevan a sugerir que existe una comunicación neural del sistema colinérgico del NSQ, mediada por los receptores M<sub>2</sub> de ambos NSQ hacia el ovario izquierdo. Se ha planteado que la comunicación nerviosa del NSQ con los ovarios sea vía el nervio vago, donde el nervio vago izquierdo ejerce un efecto de tipo estimulante en los mecanismos que regulan la ovulación (García, 2016). Sin embargo, no podemos descartar que la comunicación neural sea a través del nervio ovárico superior, ya que, Chávez y Domínguez (1994), obtuvieron resultados semejantes a los nuestros, en los que observaron que, durante el proestro, al tener el ovario derecho *in situ* y la sección del nervio ovárico superior, se presenta una disminución significativa en la tasa de animales ovulantes y la liberación de un sólo ovocito por parte del ovario remanente.

Existen evidencias de que el sistema colinérgico participa en los mecanismos que conllevan a la hipertrofia compensadora. Monti y colaboradores (1970), observaron que el implante de ATR en el hipotálamo durante 14 días, inhibe la hipertrofia compensadora; de igual manera, al eliminar la información que transporta el nervio vago, se bloquea la hipertrofia (Burden y Lawrence, 1977; Trkulja y Lackovic, 2001). Los autores llegaron a la conclusión de que el desarrollo de la hipertrofia compensadora del ovario podía deberse tanto a la regulación hormonal del eje hipotálamo-

hipófisis-ovario como a la comunicación neural que existe entre el sistema nervioso y los ovarios.

Cuando se realiza la microinyección de metocramina (independientemente del lado en que se realice) y la hemiovariectomía ipsilateral, se observó disminución en la concentración de progesterona semejante a la del animal hemiovariectomizado, que puede ser explicada por la extirpación del ovario.

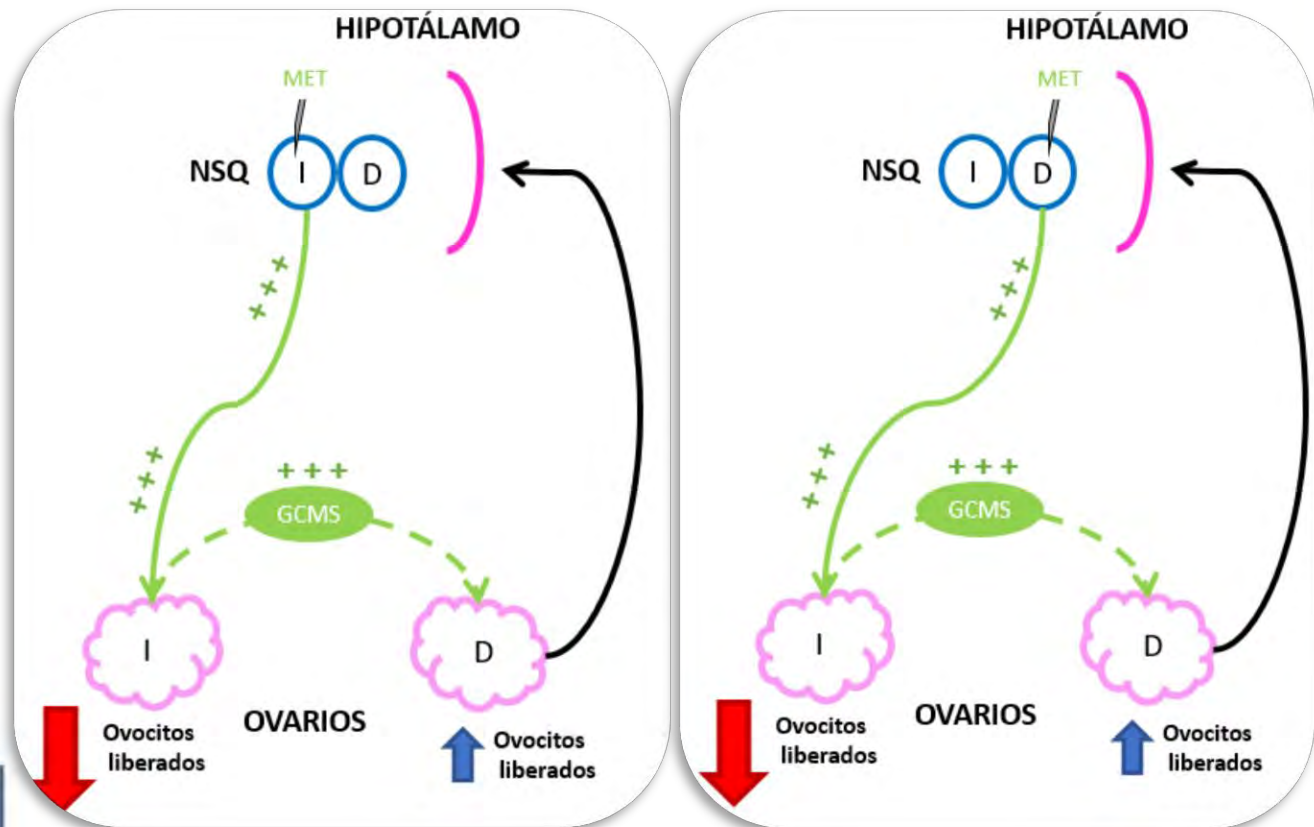
Cuando se realiza la microinyección de metocramina en el NSQ izquierdo seguido de la hemiovariectomía, el ovario remanente, a diferencia del animal sólo con la microinyección de metocramina, es capaz de sintetizar la mitad de la concentración de estradiol que presenta el grupo testigo absoluto. Cuando se microinyecta metocramina en el NSQ derecho seguido de la hemiovariectomía, el ovario izquierdo recupera la respuesta compensadora en la síntesis de estradiol ya que la concentración es semejante a la del testigo. Con estos resultados podemos sugerir que, al bloquear los receptores  $M_2$  del NSQ-izquierdo, la señal colinérgica que estimula la síntesis de estradiol no llega a los ovarios, pero dado que al realizar la hemiovariectomía del ovario izquierdo observamos incremento en la concentración de estradiol, creemos que debe existir una comunicación del ovario izquierdo al derecho, que es de tipo inhibitorio cuando están bloqueados los receptores  $M_2$  del NSQ (**Modelo 2**).

La microinyección de metocramina en el NSQ-derecho disminuye a la mitad la concentración de estradiol, sin embargo, cuando después de la microinyección se realiza la hemiovariectomía, la concentración de estradiol es incluso mayor que en el grupo testigo absoluto. Este comportamiento podría ser explicado por una comunicación del ovario derecho hacia el izquierdo que regula de manera inhibitoria la síntesis de estradiol. Al realizar la microinyección de metocramina en el NSQ-derecho seguida de la hemiovariectomía, esta comunicación inhibitoria hacia el

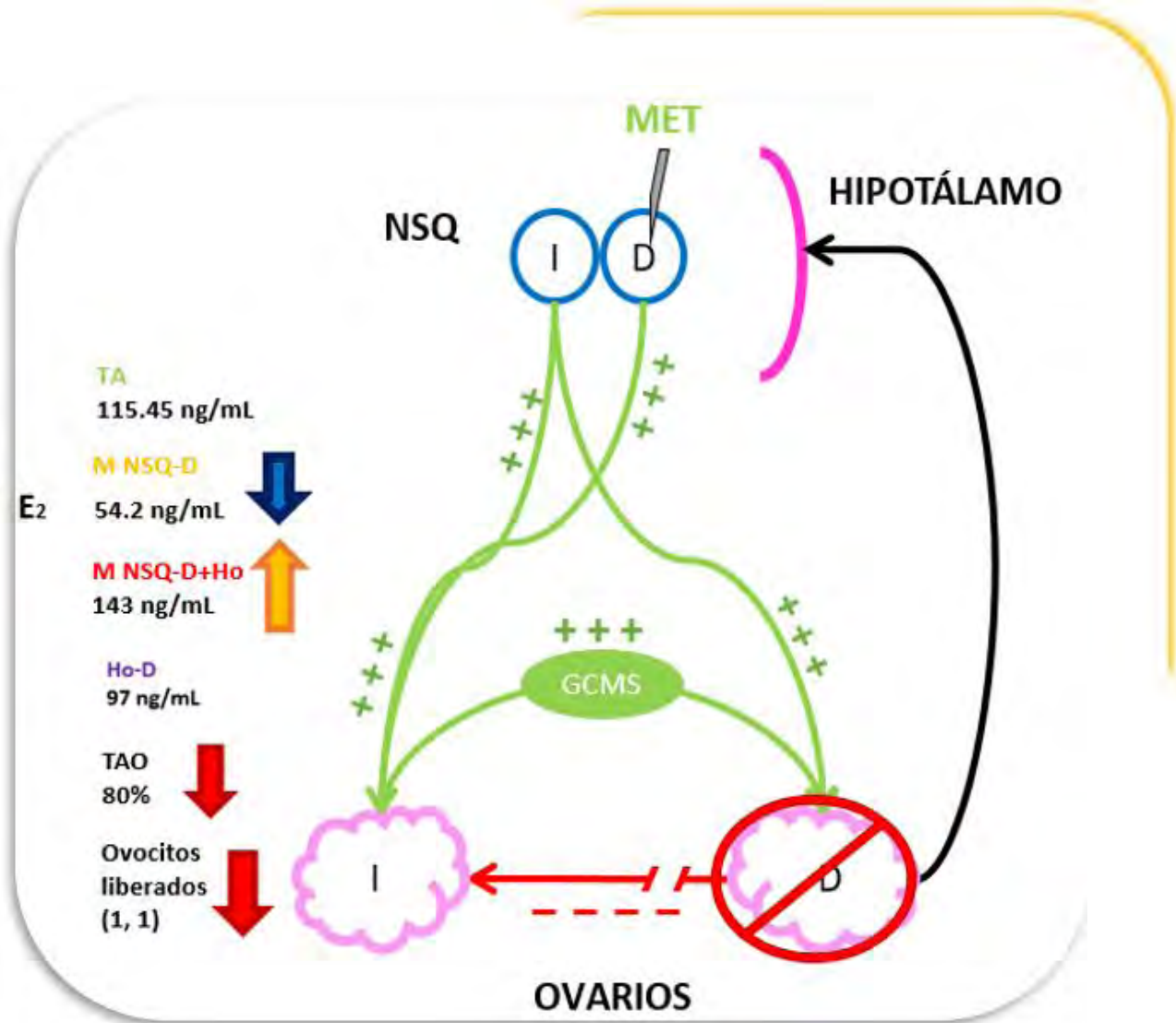
ovario izquierdo se pierde, por lo que su producción de estradiol incrementa (Modelo 3).

A)

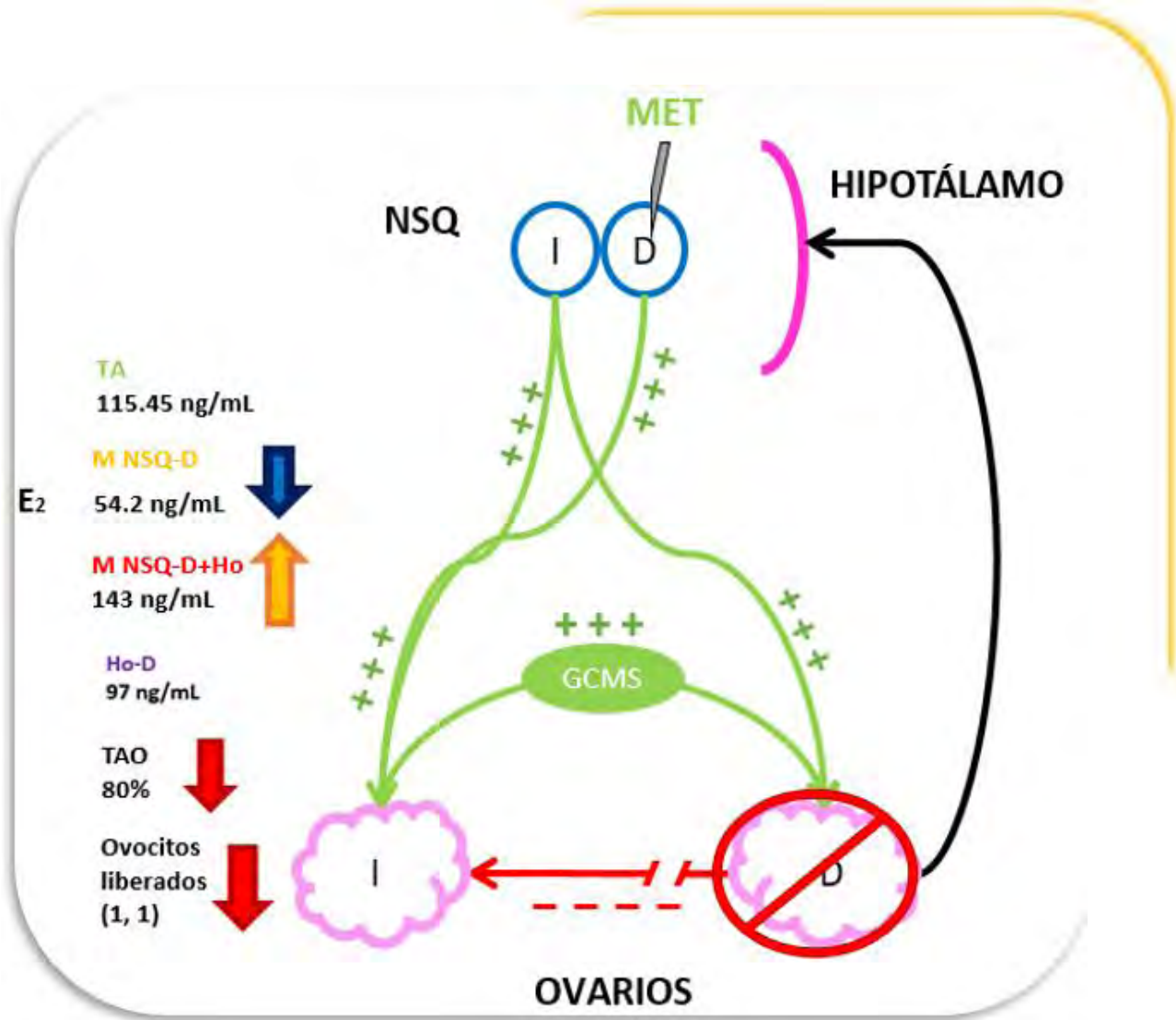
B)



**Modelo 1.** A las 9h del día del proestro, el sistema colinérgico vía los receptores  $M_2$  del núcleo supraquiasmático izquierdo (A) o derecho (B), envían una señal de tipo estimulante (+) que es bloqueada por la microinyección con metoctramina (MET). La señal viaja del NSQ hacia el ovario izquierdo, que a su vez se comunica con el ovario derecho para que se lleve a cabo la ovulación.



**Modelo 2.** Con los resultados obtenidos con la microinyección de metoprolamina en el NSQ-izquierdo seguida de la hemiovariectomía, observamos el bloqueo de la ovulación en el ovario *in situ*, por lo que creemos que debe existir una comunicación contralateral del NSQ-izquierdo hacia el ovario derecho que estimula (+) tanto la ovulación como la síntesis de estradiol.



**Modelo 3.** Con los resultados obtenidos de la microinyección en el NSQ-derecho seguida de la hemiovariectomía, se observa el bloqueo de la ovulación del ovario *in situ*, confirmando la comunicación contralateral del NSQ-derecho al ovario izquierdo. En este grupo, la concentración de estradiol se incrementa al doble comparado con el grupo sólo con microinyección de metoprolamina, llegando a ser incluso mayor a la que presenta el grupo testigo. Esto nos lleva a plantear la existencia de una comunicación del ovario derecho hacia el izquierdo, que regula la secreción de estradiol de manera inhibitoria (-) y que se ve interrumpida al realizar la hemiovariectomía.



## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio nos llevan a concluir que:

- La información colinérgica que llega al NSQ a las 9:00h del día del proestro y que es mediada por los receptores M<sub>2</sub>, no es relevante en los procesos que culminan con la ovulación.
- La información colinérgica que modulan los receptores M<sub>2</sub> en el NSQ, no participan en la secreción de progesterona.
- La síntesis de estradiol es regulada de manera estimulante por la información colinérgica del NSQ mediada por los receptores M<sub>2</sub>.
- En el animal hemiovariectomizado, los receptores M<sub>2</sub> del NSQ modulan de manera estimulante la ovulación.
- La síntesis de estradiol en el animal con bloqueo de los receptores M<sub>2</sub> seguido de la hemiovariectomía depende del ovario que permanece *in situ*.

## REFERENCIAS

- Aguilar-Roblero R, Guadarrama P, Mercado C, Chávez JL. 2004. El núcleo Supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. *UNAM* 321-33
- Barco AI, Flores A, Chavira R, Damián-Matsumura P, Domínguez R, Cruz ME. 2003. Asymmetric effect of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the in situ ovary. *Endocrine* (21) 3, 209-215
- 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. *The Journal of comparative neurology* 335, 295-307
- Bina KG, Rusak B. 1996. Muscarinic receptors mediate carbachol-induced phase shifts of circadian activity rhythms in Syrian hamsters. *Brain research* 743, 202-211
- Bina KG, Rusak B, Wilkinson M. 1998. Daily variation of muscarinic receptors in visual cortex but not suprachiasmatic nucleus of Syrian hamsters. *Brain Research* 797, 143-153
- Bedont JL, Blackshaw S. 2015. Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks. *Front Syst Neurosci* 9:74.
- Boden MJ, Varcoe TJ, Kennaway DJ. 2013. Circadian regulation of reproduction: From gamete to offspring. *Progress in biophysics and molecular biology* 113, 387-397
- Bonner TI. 1989. The molecular basis of muscarinic receptor diversity *Trends Neuroscience* 12, 148-151
- Burden HW, Lawrence IE. 1977. The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology* 23, 368-378
- Card JP, Moore RY. 1984. The suprachiasmatic nucleus of the Golden hamster: Immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. *Neuroscience* 13, 415-431
- Chávez R, Cruz ME, Domínguez R. 1987. Difference in the ovulation rate of the right of left ovary in unilaterally ovariectomized rats effect of ipsi and contralateral vagus nerves on the remaining ovary. *Journal of Endocrinology* 113, 397-401
- Chávez R, Domínguez R. 1994. Participation of the superior ovarian nerve in the of regulation compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle. *Journal of Endocrinology* 140, 197-201
- Christian CA, Moenter SM. 2008. Vasoactive Intestinal polypeptide can excite gonadotropin-releasing hormone neurons in a manner dependent on estradiol and fated by time of day. *Endocrinology* 149, 3130-3136
- Cruz ME, Flores A, Palafox MT, Meléndez G, Rodríguez JO, Chavira R, Domínguez R. 2006. The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reproductive biology and endocrinology* 4:43
- De Geyter C, De Geyter M, Huber PR, Nieschlg E, Holzgreve W. 2002. Progesterone serum levels during the follicular phase of menstrual cycle originate from the crosstalk between the ovaries and the adrenal cortex. *Human Reproductive* 17 (4), 933-939
- Domínguez R, Cruz ME, Morán C. 1998. Differential effects of ovarian local anaesthesia during pro-oestrus on ovulation by the right or left ovary in normal and hemiovariectomized adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 113, 185-190

- Domínguez R, Morales L, Cruz ME. 2003. Ovarian asymmetry. *Annu Rev Biomed Sci* 5, 95-104
- Domínguez R, Riboni L. 1971. Failure of ovulation in autografted ovary of hemispayed rat. *Neuroendocrinology* 7, 164-170
- Erickson GF y Shimasaki S. 2001. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertility and Sterility*. 76 (5) 943-949
- Flores A, Morales L, Ulloa-Aguirre A, Domínguez R. 1990. Acute changes in serum levels of luteinizing hormone, ovulation and follicular growth induced by stress, unilateral ovariectomy or mechanical stimulation of the ovarian pedicle at different stages of the oestrus cycle of the rat. *Medical. Science. Res* 18, 819-821.
- Flores A, Gallegos AI, Velasco J, Mendoza FD, Montiel C, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. 2008. The acute effects of bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, testosterone and estradiol serum levels depend on the surgical approach and the day of the estrous cycle when they are performed. *Reproductive biology and endocrinology*, 6:48
- Flores A, Velasco J, Gallegos AI, Mendoza FD, Everardo PM, Cruz ME, Domínguez R. 2011. Acute effects of unilateral sectioning the superior ovarian nerve of rats with unilateral ovariectomy on ovarian hormones (progesterone, testosterone and estradiol) levels vary during the estrous cycle. *Reproductive biology and endocrinology*, 9:34
- García JC. 2016. La información vagal regula la actividad ovárica en animales con bloqueo del sistema colinérgico del núcleo Supraquiasmático. Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM
- Gillette MU. 1996. Regulation of entrainment pathways by the suprachiasmatic circadian clock: sensitivities to second messengers. *Progress in Brain Research, Elsevier*, Capítulo 9. vol 111. 121-133pp
- Geneser F. 2000. Órganos de la reproducción. *En Histología Panamericana* .614-626
- Gerall AA, Napoli AM, Cooper UC. 1973. Daily and hourly estrous running in intact, spayed and estrone implanted rats. *Physiology and Behavior* 10, 225-229
- Gerendai I, Kocsis K, Halasz B. 2002. Supraespal connections of the ovary: Structural and functional aspects *Micro Res Tech* 59, 474-483 (Abstr)
- Giraldo E, Micheletti R, Montagna E, Giachetti A, Viganó MA, Ladinsky H, Melchiorre C. 1987. Binding and functional characterization of the cardioselective muscarinic antagonist methoctramine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 244, 1017-1020
- Golombek DA, Rosenstein RE. 2010. Physiology of circadian entrainment. *Physiol Rev* 90, 1063-1102
- Hall JE. 2014. Chapter 8: Neuroendocrine control of the menstrual cycle. En: *Endocrinology of reproduction*. 141-160
- Harrison. 2010. Reproductive endocrinology. En: *Endocrinology Mc Graw Hill* 186-200
- Horikawa K, Yokota S, Fuji K, Akiyama M, Moriya T, Okamura H, Shibata S. 2000. Nonphotic entrainment by 5-HT 1A/7 receptor agonist accompanied by reduced *Per1* and *Per2* mRNA levels in the Suprachiasmatic Nuclei. *The Journal of Neuroscience* 20(15), 5867-5873
- Hut RA, Van der Zee EA. 2011. The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. *Behavioural brain research* 221, 466-480

- Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, Miyawaki A, Allen CN. 2003. Circadian dynamics of cytosolic and nuclear  $Ca^{2+}$  in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* 38, 253-264.
- Ikeda M. 2004. Calcium dynamics and circadian rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons. *The Neuroscientist* 10, 315-324.
- Inouye SIT, Shibata S. 1994. Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience Research* 20, 109-130.
- Jiang ZG, Yang Y, Liu ZP, Allen CN. 1997. Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *Journal of Physiology* 499.1, 141-159
- Johnson RF, Moore RY, Morin LP. 1988. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Research* 460, 297-313
- Kametani H y Kawamura H. 1991. Circadian rhythm of cortical acetylcholine release as measured by in vivo microdialysis in freely moving rats. *Neuroscience Letters*. 132; 263-266
- Karatsoreos IN, Butler MP, LeSauter J, Silver R. 2011. Androgens modulate structure and function of the suprachiasmatic nucleus brain clock. *Neuroendocrinology* 152, 1970-1978
- Kennaway DJ, Boden MJ, Varcoe TJ. 2012. Circadian rhythms and fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 349, 56-61.
- Levine JE. 2015. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil and Neill's physiology of reproduction. *Elsevier* 1199-1257.
- Kow LM, Pfaff DW. 1984. Suprachiasmatic neurons in tissue slices from ovariectomized rats: electrophysiological and neuropharmacological characterization and the effects of estrogen treatment. *Brain Research* 297, 275-286.
- Liu C, Gillette M. 1996. Cholinergic regulation of the suprachiasmatic nucleus circadian rhythm via a muscarinic mechanism at night. *The Journal of Neuroscience* 16 (2), 744-751
- Liu C, Weaver DR, Strgatz S, Reppert S. 1997. Cellular construction of a circadian clock: period determination in the suprachiasmatic nuclei. *Cell* 91, 855-860
- Mahoney MM, Sisk C, Ross HE, Smale L. 2004. Circadian regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone neurons and the preovulatory surge in luteinizing Hormone in the diurnal rodent, *Arvicanthis niloticus*, and in a nocturnal rodent, *Rattus norvegicus*. *Biology of reproduction* 70, 1049-1054.
- Meijer JH, Groos GA, Rusak B. 1986. Luminance coding in a circadian pacemaker: the suprachiasmatic nucleus of the rat and the hamster. *Brain Research* 382, 109-118
- Meijer JH, Michael S, Vansteensel MJ. 2007. Processing of daily and seasonal light information in the mammalian circadian clock. *General and Comparative Endocrinology* 152, 159-164
- Meijer JH, Michel S. 2015. Neurophysiological analysis of the suprachiasmatic nucleus: a challenge at multiple levels. *Methods in Enzymology* 552, 75-102
- Melchiorre C, Angeli P, Lambrecht G, Mutschler E, Picchio MT, Wess J. 1987. Antimuscarinic action of methoctramine, a new cardioselective M-2 muscarinic receptor antagonist, alone and in combination with atropine and gallamine. *European Journal of Pharmacology* 144, 117-124.
- Melchiorre C. 1988. Polymethylene tetramines: a new generation of selective muscarine antagonists. *Elsevier* 9, 216-220

- Michel AD, Whiting R. 1988. Methoctramine, a polymethylene tetraamine, differentiates three subtypes of muscarinic receptor in direct binding studies. *European Journal of Pharmacology* 145, 61-66
- Model Z, Butler MP, Le Sauter J, Silver R. 2015. *Suprachiasmatic nucleus as the site of androgen action on circadian rhythms*. *Hormones and Behavior* 73, 1-7
- Moga MM, Moore RY. 1997. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *The Journal of Comparative neurology* 389, 508-534
- Monti JM, Sala MA, Otegui JT, Benedetti WL, Griñó E. 1970. Inhibition of ovarian hypertrophy by implants of atropine in the hypothalamus. *Experientia* 26, 1263-1264
- Moore RY, Speh JC, Leak RK. 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309, 89-98
- Morin LP. 2007. SCN organization reconsidered. *Journal of biological rhythms* 22, 3-13
- Murakami N, Takahashi K, Kawashima K. 1984. Effect of light on the acetylcholine of the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Research* 311, 358-360
- Peters H y McNatty K. 1980. *The ovary*. Granada Publishing. En: Vieyra VE. 2011. Un estudio de efectos los agudos y sub-agudos de la sección del nervio ovárico superior, en ratas prepúberes con ovariectomía unilateral, sobre el inicio de la pubertad y las funciones del ovario. UNAM
- Potashnik G, Insler V, Meizner J. 1987. Frequency, sequence, and side of ovulation in women menstruating normally. *British Medical Journal* 240, 219
- Ralph MR, Lehman. 1991. Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends of Neuroscience* 14(8), 362-366
- Reghunandana V, Reghunandana R, Singh PI. 1993. Neurotransmitters of the suprachiasmatic nucleus: role in the regulation of circadian rhythms. *Progress in Neurobiology* 41, 647-655
- Ryan RJ, Lee CY. 1976. The role of membrane bound receptors. *Biology of Reproduction* 14, 16-29
- Shibata S, Liou SY, Ueki S. 1983. Effect of amino acids and monoamines on the neuronal activity of suprachiasmatic nucleus in hypothalamic slice preparations. *Journal of Pharmacology* 33, 1225-1231
- Smith MS. 2010. Estrus and menstrual cycles: neuroendocrine control. *Encyclopedia of neuroscience*.1-5.
- Stillman MJ, Shukitt-hale B, Kong RM, Levy A, Lieberman HR. 1993. Elevation of hippocampal extracellular acetylcholine levels by methoctramine. *Brain Research Bulletin* 32, 385-389
- Strauss III JF, Williams CJ. 2014. Chapter 9: The ovarian life cycle. En: *Yen and Jaffe's Reproductive endocrinology* 7° edición. 157-191
- Tonsfeldt K, Chappell P. 2012. Clocks on top: The role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 349, 3-12.
- Torocsik A, Vizi ES. 1991. Presynaptic effects of methoctramine on release of acetylcholine. *Neuropharmacology* 30, 293-298
- Trachsel L, Heller HC, Miller JD. 1995. Nicotine phase-advances the circadian neuronal activity rhythm in rat suprachiasmatic nuclei explants. *Neuroscience*. 65 (3), 797-803

- Turi GF, Liposits Z, Hrabovszky E. 2008. Cholinergic afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons of the rat. *Neurochemistry International* 52, 723-728
- Trkulja V, Lackovic Z. 2001. Vagal influence on compensatory ovarian growth is important only briefly after hemicastration. *Experimental biology and medicine* 226(8), 776-781
- van der Beek EM. 1996. Circadian control of reproduction in the female rat. *Progress in brain Research* 11, 295-320
- van der Beek EM, Wiegant VM, van Oudheusden HJC, van der Donk HA, van den Hurk R, Buijs RM. 1997. Synaptic contacts between gonadotropin-releasing hormone-containing fibers and neurons in the suprachiasmatic nucleus and perichiasmatic area: an anatomical substrate for feedback regulation? *Brain Research* 755, 101-111.
- van den Pol AN, Tsujimoto KL. 1985. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15, 1049-1086.
- van der Zee EA, Streefland C, Strsberg AD, Schöder H, Luiten PGM. 1991. Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors in cholinergic neurons of the suprachiasmatic region in young and aged rats. *Brain research*, 542, 348-352
- Van Voorhis BJ. 1999. Follicular steroidogenesis. En: *Encyclopedia of reproduction. Academic Press* 389-395
- 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 pre-ovulatory LH secretion and ovulation. *Reproductive Biology and Endocrinology* 14(34),
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14, 697-706
- Wess J, Blin N, Mutschler E, Blüml K. 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling. *Life Sciences* 5, 915-922
- Williams. 2009. Capítulo 15: Endocrinología de la reproducción. En: *Ginecología de Williams* 1° edición. *Mc Graw Hill* 330-365
- Williams W, Jarjisian S, Mikkelsen J, Kriegsfeld L. 2011. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 152 (2), 595-606
- Yan L, Okamura H. 2002. Gradients in the circadian expression of *Per1* and *Per2* genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *European journal of Neuroscience* 15, 115-1162
- Yan L, Silver R. 2002. Differential induction and localization of mPer1 and mPer2 during advancing and delaying phase shifts. *European Journal of Neuroscience* 16(8), 1531-1540
- Yang JJ, Wang Y, Cheng P, Kuo Y, Huang R. 2010. Cholinergic modulation of neuronal excitability in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neurophysiology* 103, 1397-1409
- Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri. 2001. Hormonas esteroides: metabolismo y mecanismo de acción. En: *Endocrinología de la reproducción. 4° Edición. Panamericana.* 118-143