



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Participación de los estrógenos sobre la fisiología circadiana de la actividad locomotriz y de la expresión de las proteínas PER1, BMAL y ER β en el núcleo supraquiasmático de *Neotomodon alstoni*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CINTHIA ROCÍO JUÁREZ TAPIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM

DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

TUTORA INVITADA: DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, UAM

CD. MX. ENERO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

Participación de los estrógenos sobre la fisiología circadiana de la actividad locomotriz y de la expresión de las proteínas PER1, BMAL y ER β en el núcleo supraquiasmático de *Neotomodon alstoni*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CINTHIA ROCÍO JUÁREZ TAPIA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM

DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

TUTORA INVITADA: DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, UAM

MÉXICO, CD. MX. ENERO, 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/1128/2018

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de septiembre de 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna JUÁREZ TAPIA CINTHIA ROCÍO con número de cuenta 97146603 con la tesis titulada: "Participación de los estrógenos sobre la fisiología circadiana de la actividad locomotriz y de la expresión de las proteínas PER1, BMAL y ERβ en el núcleo supraquiasmático de *Neotomodon alstoni*", realizada bajo la dirección del DR. MANUEL MIRANDA ANAYA:

Presidente:	DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN
Vocal:	DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL
Secretario:	DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
Suplente:	DR. JOSÉ ALONSO FERNÁNDEZ GUAISTI
Suplente:	DRA. ROSARIO ORTÍZ HERNÁNDEZ

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 22 de noviembre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/grf*

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca: 220328).

Al Proyecto de Investigación UNAM-DGAPA-PAPPIIT-IN212715 y 212118.

A mi tutor, el Dr. Manuel Miranda Anaya, por todo el apoyo, orientación, asesoría, paciencia, acompañamiento, espacio y tiempo brindados, durante este proyecto.

A los miembros del comité tutorial: el Dr. Mauricio Díaz Muñoz por sus invaluable aportes a los comentarios de mi proyecto y a su gentileza de tener siempre las puertas abiertas de su laboratorio para el desarrollo de este proyecto. A la Dra. Pilar Durán Hernández y la Dra. Marcela Arteaga Silva por la orientación brindada al proyecto.

Quiero agradecer al espacio otorgado, durante los experimentos de este proyecto, a la Facultad de Ciencias, su bioterio y su Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (campus UNAM-Juriquilla), al Instituto de Neurobiología, a la FES-Zaragoza, a la UAM-Iztapalapa y al Instituto Nacional de Pediatría.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

El transcurso entre el inicio y el final de esta tesis ha sido un aprendizaje tanto a nivel académico como personal; estuvo lleno de una gama de sensaciones dignas de un recorrido en montaña rusa. Así que, principalmente quiero agradecer a mis más incondicionales: a mi papá Adolfo Juárez, mi mamá Rocío Tapia y mis hermanitos Adolfo Juárez Tapia y Eric Adrián Juárez Tapia.

A mis grandes y más antiguos amigos que, siempre estuvieron ahí para ofrecer un hombro, un par de orejas cuando las cosas no siempre salieron como lo esperaba y cuando fueron acreedoras de celebración: Mario Zermeño, Jacques Pozos, Rubén Galicia y Javier Castañón. A mis amigas que, sin dudarlo, invariablemente conspiraron junto a mí para agarrar inspiración desde su propio andar y sus propias trincheras: Elena Méndez, Xitlalli Villanueva, Esther Hernández, Alejandra Barrios, Karla Cárdenas, Kristel Gopar, mi madrina Victoria Juárez, mi poderosa tía Norma Tapia y mi adorada amazona Vanessa Juárez y mi hermosa Natalia Juárez y Lizeth Lozano.

En el ámbito académico, quiero agradecer profundamente al Dr. Manuel Miranda, por su invaluable apoyo moral, académico y personal durante todo el trayecto de esta tesis. A Irma González por su preciado apoyo, sus risas, comidas y hospedaje compartido. A Moisés Pérez por todo el soporte brindado en las técnicas, las discusiones, el ánimo durante momentos malogrados en los protocolos, los congresos y el gusto por los ritmos. A Camilo Silva por compartir ideas, tonterías, discusiones, burlas y sobre todo por colaborar en la pasión por la cronobiología y la reproducción. A mi querido Hugo Molina por acudir siempre al llamado en “wild land” para contener los enojos y transformarlos en mofas. También quiero agradecer profundamente a Guadalupe Morales por aventurarse junto a mí, en parte de este trabajo.

De manera especial, quiero hacer un agradecimiento a Teresa Bosques por todo el apoyo otorgado durante mis estancias en Juriquilla, por tan grata hospitalidad y por todas las revisiones en los trabajos en inglés que se han desprendido de esta tesis. Deseo hacer un profundo agradecimiento al maestro Enrique Moreno que, desde mi formación en licenciatura siempre ha tenido la amable disposición de comentar mis dudas e inquietudes académicas. A la Dra. Elsa Escamilla por su invaluable apoyo en el término de este trabajo y por refugiarme en su laboratorio. Al maestro Agustín Carmona por toda la asesoría, cuidado y espacio brindado para el bienestar de las ratoncitas. Y al maestro Mario Cárdenas León del laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Un agradecimiento muy afectuoso al técnico Pedro Medina Granados del laboratorio de Biología de la reproducción del Instituto Nacional de Pediatría, por toda su asistencia, apoyo y paciencia para que “amarrara” la inmunohistoquímica.

Gracias a Erik Reyes por el gran y grato acompañamiento desde el inicio hasta el término de éste proyecto de doctorado, por escuchar algunos de los dramas y simpatizar con los logros ocurridos durante este periodo. Quiero agradecer a mis amigos con los que una localidad, la Jardín Balbuena, nos hizo coincidir: a mi entrañable Rizo y su amada Zay, a Charbel, Jorge Coronel, Genaro, Vic, Sele, Paquito, doña Susy. A los integrantes de la churubanda que,

además de compartir el amor y tiempo con nuestros perris, también nos compartimos como humanos y nos echamos porras cuando nos encontramos y tenemos días difíciles, principalmente a Lili, Ernesto, Paty, MaryFer y Val.

Gracias al “Patitas” por todo lo vivido y compartido, por haber sido parte de la manada (Dee Dee Ramona, Lucca, Bowie y nuestros roedores caídos) y por estar para Gizmo. Gracias a Nixie por los domingos de paseo y por llegar hasta el final de esta etapa.

Por último y no menos importante, y aunque jamás lo llegarán a saber, quiero agradecer a todas las ratoncitas que “injustamente” hicieron posible este proyecto y que aún en la consumación de esta pregunta, han dado pie a nuevas inquietudes. Gracias porque durante el desarrollo de este proyecto volví a re-encontrar de mi gusto por la vida no humana.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Los estrógenos y sus mecanismos de acción	5
1.1.1. Diferencias y distribución de los receptores a estrógenos	8
1.1.2. Participación de los estrógenos en el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovario	10
1.2. Los ritmos circadianos y su papel en la fisiología reproductiva de la hembra	13
1.2.1. Sincronización fótica y sus efectos en la reproducción.....	17
1.3. Características generales del núcleo supraquiasmático.....	20
1.3.1. Aferencias y eferencias del núcleo supraquiasmático: énfasis en la comunicación relacionada con el eje neuroendocrino reproductivo de hembras	21
1.3.2. Bases moleculares de la generación de los ritmos circadianos.....	26
1.3.3. Fototransducción en el núcleo supraquiasmático	28
2. ANTECEDENTES	30
2.1 Efectos de los estrógenos sobre el sistema circadiano en hembras	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	35
3. METODOLOGÍA	35
3.1. Mantenimiento de animales.....	35
3.2. Registro de actividad locomotriz y pulsos de luz	36
3.3. Citología vaginal y concentración de estradiol en plasma	36
3.4. Ovariectomía bilateral.....	36
3.5. Inmunohistoquímica.....	37
3.6. Estradiol exógeno	37
3.7. Diseño experimental	38
3.8. Análisis de datos.....	40
4. RESULTADOS	42

4.1. Cambios citológicos y en la concentración circulante de E2 en plasma a lo largo del ciclo estral en <i>N. alstoni</i>	42
4.2. La actividad locomotriz presenta cambios en amplitud relacionados con la progresión del ciclo estral en LO 12:12.....	43
4.3. La ovariectomía acorta τ , incrementa el perfil diario de actividad y retrasa el inicio de la fase de actividad	44
4.4. La ovariectomía incrementa la magnitud del cambio de fase inducido por luz en el inicio de la noche subjetiva	49
4.5. La ovariectomía cambia los perfiles diarios de expresión de las proteínas PER1, BMAL1 y ER β en el NSQ de <i>N. alstoni</i>	50
4.6. La ovariectomía cambia la dirección de la relación entre las proteínas del reloj con el perfil diario de actividad locomotriz	58
4.7. El BE incrementa la IR-BMAL1 en el NSQ de hembras OVX durante el ZT3.	59
5. DISCUSIÓN	60
6. CONCLUSIÓN	71
7. LITERATURA CITADA	73
III. ANEXO 1: Artículo de revisión publicado: Juárez-Tapia, Cinthia R. y Miranda-Anaya, M. (2016) El reloj circadiano ovárico: un segundero en la fisiología de la reproducción. <i>Entreciencias: Diálogos en la Sociedad del Conocimiento</i> , 4 (10), 147-163. Dx.doi.org/10.21933/J.EDSC.2016.10.183	89
ANEXO 2. Artículo publicado: Juárez-Tapia, Cinthia R. & Miranda-Anaya, M. (2017) Ovariectomy influences the circadian rhythm of locomotor activity and the photic phase shifts in the volcano mouse. <i>Physiology and Behavior</i> , 182: 77-85. Doi:10.1016/j.physbeh.2017.10.002.....	106
ANEXO 3. Curva de concentración de E2 en plasma después de inyección de BE2 en una hembra OVX de <i>N. alstoni</i>	115

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis del estradiol.	5
Figura 2. Homología entre los dominios que constituyen a los receptores nucleares a estrógenos.	9
Figura 3. Retroalimentación positiva y negativa del estradiol sobre el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovario.	11
Figura 4. Organización del sistema circadiano en mamíferos.	14
Figura 5. Parámetros empleados para el estudio de los ritmos circadianos.	15
Figura 6. Interacciones entre el NSQ y los componentes del eje HHO.	25
Figura 7. Asas de regulación del reloj molecular y expresión en antifase de PER1 y BMAL1.	27
Figura 8. Línea temporal que esquematiza el protocolo y la progresión del registro del ritmo de actividad locomotriz libre en las hembras de <i>N. alstoni</i> en las diferentes condiciones de iluminación.	39
Figura 9. Protocolo para caracterizar los efectos del BE en el NSQ.	40
Figura 10. Citología Vaginal y progresión del ciclo estral en <i>N. alstoni</i>	42
Figura 11. El ciclo estral se refleja en la citología vaginal y en la amplitud diaria de actividad locomotriz en <i>N. alstoni</i>	43
Figura 12. Relación entre actividad locomotriz en LO 12:12 y periodos infradianos.	44
Figura 13. La ovariectomía cambia parámetros del ritmo circadiano de la actividad locomotriz en <i>N. alstoni</i>	45
Figura 14. La ovariectomía tiene efectos en el inicio de actividad y la distribución de la acrofase.	46
Figura 15. La ovariectomía aumenta la actividad locomotriz diaria en condiciones LO 12:12.	47
Figura 16. La ovariectomía acorta τ y reduce la amplitud del ritmo circadiano de la actividad locomotriz en OO.	49
Figura 17. La ovariectomía incrementa la amplitud del cambio de fase en el inicio de la noche subjetiva.	50
Figura 18. Perfil diario del promedio de número de células IR para PER1 y BMAL1 en hembras OVX y sham y ajuste por cosinor.	52
Figura 19. Patrón de inmunoreactividad para PER1 en el NSQ de hembras <i>N. alstoni</i>	53
Figura 20. Patrón de Inmunoreactividad para BMAL1 en el NSQ de hembras <i>N. alstoni</i>	54
Figura 21. Perfiles diarios de PER1 y BMAL1 en hembras sham y OVX.	55
Figura 22. Perfiles diarios de ER β en hembras sham y OVX de acuerdo con el número de píxeles.	56
Figura 23. Patrón de Inmunoreactividad para ER β en el NSQ de hembras <i>N. alstoni</i>	56
Figura 24. Acrofases de PER1, BMAL1 y ER β en <i>N. alstoni</i>	58
Figura 25. Efecto de la inyección de BE o vehículo sobre las IR-PER e IR-BMAL en el NSQ de hembras OVX.	60
Figura 26. Modelo propuesto de acuerdo con los resultados obtenidos sobre los efectos de la OVX.	68
Tabla 1. Comparación de los valores obtenidos en los dos tipos de análisis de las células IR para PER1, BMAL1 y ER β en el NSQ de hembras sham y OVX.	587

Tabla 2. Valores del factor de correlación entre actividad locomotriz, PER1, BMAL1 y ER β en hembras *N. alstoni* sham y OVX. 58

ABREVIATURAS

Las siguientes abreviaturas están de acuerdo con sus siglas en inglés, salvo en los casos que se indique lo contrario.

3 β -HSD	enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa
5HT	Serotonina
Ang	angiotensina II
AA-NAT	enzima N-acetiltransferasa
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	análisis de varianza
AP-1	proteína activadora 1
ARC	núcleo arqueado
ArKO	knockout a la aromatasa P450
AVP	vasopresina arginina, también llamada hormona antidiurética (ADH)
AVPV	núcleo anteroventral periventricular
BE	benzoato de estradiol (por su traducción al español)
bHLH	basic-Helix-Loop-Helix
BMAL1	proteína codificada por el gen <i>bmal1</i> (<i>brain and muscle Arnt-like</i>)
BSTc	núcleo del lecho de la estria terminal
Ca/CREs	elementos de respuesta a calcio/cAMP
Ca ⁺	ión de calcio
CALB	Calbindina
CARL	Calretinina
CCG	genes controlados por el reloj molecular
c-Fos	proteína codificada por el gen <i>Fos</i>
cGMP	monofosfato de guanosina cíclico
c-Jun	proteína codificada por el gen <i>Jun</i>
CKI ϵ/δ	caseína cinasas Epsilon y Delta
Clock	gen que codifica a la proteína CLOCK y que significa <i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
CREB	elementos de respuesta de unión a cAMP
CRF	curva de respuesta de fase (por su traducción al español)
CRY	proteína codificada por el gen <i>Cry</i> , <i>cryptochrome</i> (criptocromo)
CT	tiempo circadiano
dm	Dorsomedial
DMV	Núcleo hipotalámico dorsomedial
DNA	ácido desoxirribonucleico
E1	Estrona
E2	Estradiol

E3	Estriol
ECG	factor de crecimiento epidermal
ER, ER α , ER β	receptores a estrógenos, receptor a estrógenos alfa, receptor a estrógenos beta
ERE	elementos de respuesta a estrógenos
ERKO, α ERKO, β ERKO	<i>knockout</i> de receptores a estrógenos, <i>knockout</i> en el ER α , <i>knocout</i> en el ER β
FSH	hormona folículo estimulante
GABA	ácido gama aminobutírico
GAL	Galanina
GDX	Gonadectomía
GLU	Glutamato
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas
GnIH	hormona inhibidora de gonadotropinas
GRP	péptido liberador de gastrina
HHO	Hipotálamo-hipófisis-ovario (por su traducción al español)
HIOMT	enzima hidroxil-dil-O-metiltransferasa
IFG-1	factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGL	hojuela intergeniculada
IMC	columna intermediolateral de la médula cervical
IHQ	inmunihostoquímica (por su traducción al español)
ipRGCs	células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles
IR	Inmunorreactiva
Kiss1	Kisspeptina
KO	<i>Knockout</i>
LHA	hipotálamo lateral
LL, LO	Luz-Luz, Luz-Oscuridad
LSV	núcleo septal lateral, parte ventral
MAPK/ERK	proteínas cinasas activadas por mitógenos
MBH	hipotálamo basal medial
mENK	met-enkefalina
ME	eminencia media
MPO	área medial preóptica
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NERKI	<i>knock in</i> al ER α , cuya mutación lo hace incapaz de responder al estrógeno por la vía clásica.
NF- κ B	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células
NMDA	receptores N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NPY	neuropéptido Y
NR	receptores nucleares
NSQ	núcleo supraquiasmático (por su traducción al español)
NT	Neurotensina
OO	Oscuridad-Oscuridad
OVX	Ovariectomía
PAS	<i>Period-Arnt-Single-minded</i>
PB	núcleo parabranquial

PCAP	péptido activador del adenilato ciclasa
PER1	proteína codificada por el gen <i>Per</i> (<i>Period</i>)
PI3K/AKT	fosfatidilinositol-3-cinasa
PKA	proteína cinasa A
PKC	proteína cinasa C
PKG	proteína cinasa G
POA	área preóptica hipotalámica
PPN	núcleo peduncular
PPT	área pretectal
PVN	núcleo paraventricular del hipotálamo
PVT	tálamo paraventricular
ROR	receptores huérfanos relacionados con los factores de ácido retinoico
Rev-Erb α	miembro de la familia de receptores nucleares de Rev-ErbA, el cual actúa como represor transcripcional.
RTH	tracto retinohipotalámico
SCG	ganglio cervical superior
SP-1	proteína específica 1
SPZ	zona subparaventricular
V1a	receptor a vasopresina 1 ^a
VIP	péptido intestinal vasoactivo
vl	Ventrolateral
vLGN	núcleo geniculado ventrolateral
VMH	núcleo hipotalámico ventromedial
WT	<i>wild type</i>
ZI	zona incerta
ZT	tiempo del <i>Zeitgeber</i> (sincronizador)
Ψ	letra griega usada para designar la relación de fase
τ	letra griega usada para designar el periodo endógeno

I. RESUMEN

La reproducción en las hembras requiere de una coordinación fina y una coincidencia temporal precisa en la que se corresponden eventos cíclicos como la ovulación, la maduración del ovocito y la receptividad sexual. Este ajuste implica a un pico del estradiol que precede a la liberación del ovocito, y esta misma señal influye sobre el reloj circadiano para regular la liberación de gonadotropinas en el momento óptimo. La correcta progresión del ciclo estral en roedores requiere de la participación del núcleo supraquiasmático (NSQ), ya que éste presenta comunicación con los diferentes elementos del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) además de que posee receptores a estrógenos (ER).

Se emplearon hembras del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*, para analizar la regularidad del ciclo estral asociada a los cambios en los patrones del registro de actividad locomotriz ambulatoria, así como los efectos de la ausencia de ovarios en las propiedades del ritmo circadiano de actividad locomotriz y sobre las proteínas de reloj PER1, BMAL1 y los receptores a estrógenos beta (ER β) en el NSQ. Por otra parte, se evaluó el efecto del BE sobre las proteínas del reloj.

En este roedor se puede prescindir del uso de rueda de actividad como apoyo para los registros del ritmo circadiano de actividad. De tal forma que, los resultados obtenidos muestran que las hembras intactas presentan una variación en el inicio de actividad locomotriz, conocida en otras especies como *scalloping* (*ribeteo*), que se caracteriza por cambios en la amplitud de la actividad diaria sincronizada a un fotoperiodo LO 12:12 y está asociada con la progresión del ciclo estral, mientras que cuando las hembras son ovariectomizadas (OVX), se pierde esta coincidencia. En condiciones constantes de oscuridad (OO) las hembras OVX reducen la cantidad total de actividad y acortan el valor del periodo (τ) del ritmo circadiano de actividad locomotriz, además aumentan la sensibilidad fótica al cambio de fase durante la primera mitad de la noche subjetiva.

En el NSQ de hembras intactas, las proteínas de PER1, BMAL1 y ER β presentaron un perfil diario que se modificó por la OVX, pues el ritmo de PER1 cambió de ser unimodal a bimodal, BMAL1 cambió de acrofase y aumentó el número de células inmunorreactivas (IR). Mientras que el ER β , que en controles era bimodal, cambió en las ratonas OVX a unimodal con acrofase temprana. Los cambios observados sobre las proteínas de reloj ante la baja presencia de

estradiol en plasma sugieren que éste tiene un efecto diferencial sobre la maquinaria molecular del reloj, pues en las hembras con ovarios existe una relación positiva del ritmo diario de actividad con el de PER1, así como de BMAL1 con ER β , mientras que en las hembras OVX prácticamente se pierden ambas relaciones.

Cuando se inyectó estradiol exógeno y se observaron sus efectos en el NSQ de hembras de *N. alstoni* durante el *Zeitgeber time* (ZT3), obtuvimos que tanto el vehículo como el BE, incrementaron el número de células IR-PER1, pero en BMAL1 sólo lo hizo el BE.

Nuestros resultados comprueban que en las hembras OVX de *N. alstoni*, la ausencia de hormonas ováricas modifica el τ , la amplitud, la acrofase y los cambios en la respuesta de fase inducidos por luz en la actividad locomotriz ambulatoria. De acuerdo con el coeficiente de correlación, existe una relación del perfil diario de actividad locomotriz con el de PER1 en el NSQ, y esto desaparece en hembras OVX, así como la relación en antifase de PER1-BMAL1. Por otra parte, la administración aguda de BE en el grupo OVX generó un aumento de células IR-BMAL1, sin embargo, el vehículo tuvo el mismo efecto sobre IR-PER1.

El presente estudio sugiere que los efectos producidos por la OVX en la respuesta circadiana de la actividad locomotriz pueden relacionarse con los cambios obtenidos en el perfil diario de las proteínas PER1 y BMAL1 en el NSQ, y que podrían modularse principalmente por el estrógeno y su interacción con el ER β . Finalmente, nuestros resultados aportan información novedosa e importante de la interacción del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) con el sistema circadiano en las hembras.

II. ABSTRACT

The reproduction in females requires fine coordination and a precise temporal coincidence of physiological events such as ovulation, maturation of the oocyte and the correspondent sexual receptivity. These changes involve a peak of estradiol preceding the oocyte liberation and the influence of a circadian clock in the timing of gonadotropins releasing. In rodents, the estrous cycle requires the communication of the suprachiasmatic nucleus (SCN) with different elements of the neuroendocrine axis hypothalamic-pituitary-ovarian (HPO) and receives signaling through estrogen receptors (ER).

In the present study we analyze the changes in the circadian patterns that drive the ambulatory locomotor activity, the clock proteins PER1, BMAL1, and the estrogen receptor (ER β) in the SCN of intact and ovariectomized mice *Neotomodon alstoni*, in an environment without the activity wheel. Also, we test the effect of estradiol benzoate (EB) in clock proteins in the SCN of ovariectomized mice.

The results obtained show that, in intact females, a variation in the onset of the locomotor activity known as scalloping was observed in entrained circadian rhythms. It is characterized by changes in the amplitude of the daily activity synchronized to a photoperiod LD 12:12 in association with the progression of the estrous cycle; whereas in the ovariectomized mice (OVX), this relation is lost. In constant darkness, OVX females reduced the total amount of activity, shorten the free-running circadian period (τ) of the locomotor activity, and reduce the photic sensitivity to photic phase shifting during the first half of the subjective night.

The clock proteins of PER1, BMAL1, and ER β in SCN showed a daily profile in intact mice different than the observed in ovariectomized mice in which protein PER1 presented a bimodal pattern, BMAL1 cycle shifted its acrophase and increased the amount of immunoreactivity (IR) cells; while the cycle of ER β advanced its acrophase. The changes in the clock proteins when the concentration of estradiol in plasma is minimal or absent, suggest its influence upon the molecular machinery of the circadian clock. In intact females, there is a positive relationship between the daily rhythm of activity with the daily profile of PER1, as well as BMAL1 with ER β , whereas in OVX females both relationships were lost.

When OVX mice were injected either with vehicle or EB at Zeitgeber Time 3, an increase in the number of IR-PER1 cells was observed in both groups. However, increasing in the amount of IR-BMAL1 cells were observed only after the BE injections but in the vehicle.

Our results indicate that the absence of ovarian hormones in the OVX females of *N. alstoni* modifies the t, amplitude, acrophase, and changes of phase response induced by light in ambulatory locomotor activity. According to the correlation coefficient analysis, there is a relation of the daily profile of locomotor activity and the amount of PER1 in the SCN that is missing in OVX females as well as the phase of PER1-BMAL1 cycles that may be modulated by estrogen and its interaction with ER β . Finally, our results contribute to different and essential information about the interaction of the neuroendocrine hypothalamus-pituitary-ovary axis with the circadian system in females of the volcano mouse.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los estrógenos y sus mecanismos de acción

Los estrógenos son hormonas esteroides, los cuales son lípidos simples cuya estructura química deriva del ciclopentano-perhidrofenantreno. En el interior de las mitocondrias, la biosíntesis de estas hormonas es a partir del colesterol (figura 1), cuando éste pierde 6 carbonos se convierte a C21 pregnenolona, debido a dos hidroxilaciones que están mediadas por el citocromo P450sccc (CYP11) (Urlep & Rozman, 2013). La enzima conocida como proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StaR, por sus siglas en inglés) facilita el flujo del colesterol en las mitocondrias (Stocco & Clark, 1996).

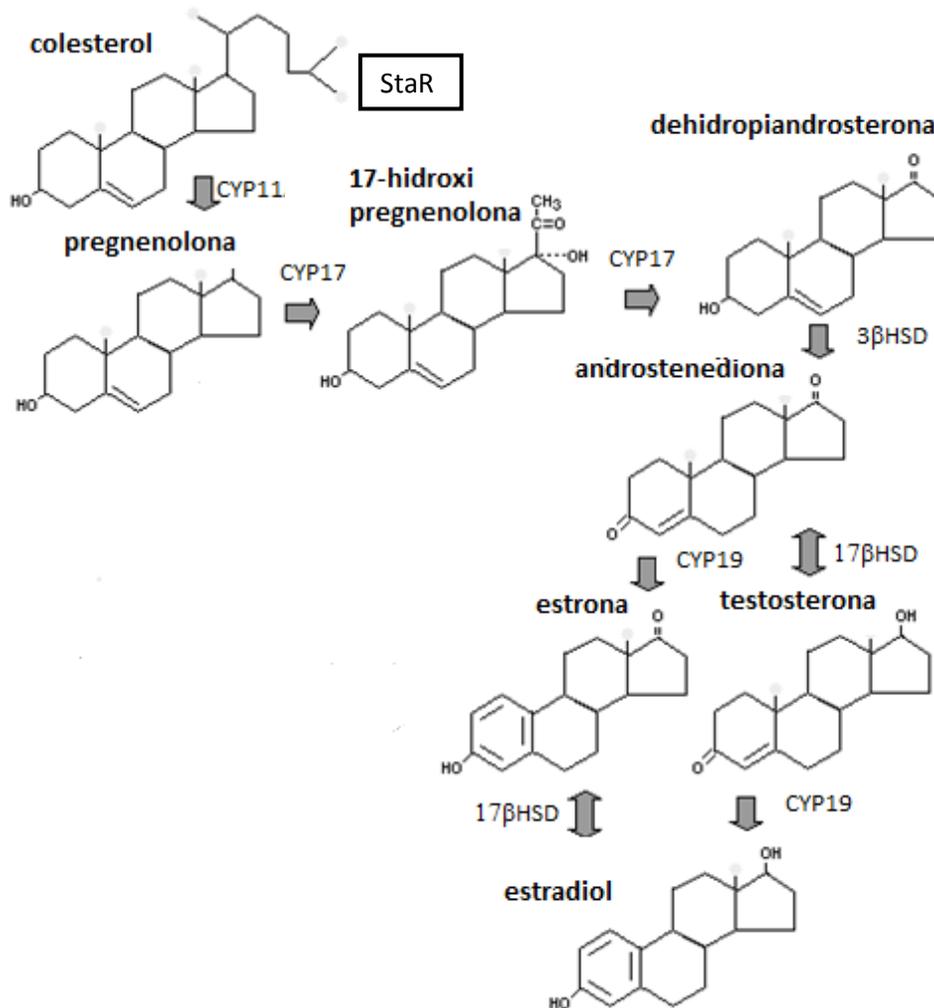


Figura 1. Biosíntesis del estradiol. Vía simplificada de la síntesis del estradiol, el cual tiene como precursor al colesterol que se transforma en pregnenolona por acción de la enzima CYP11A1. La pregnenolona forma andrógenos que mediante el efecto de la aromatasa (CYP19) forman al estradiol.

En las glándulas suprarrenales, los testículos y los ovarios, se expresa el citocromo p450c17 o CYP17, que rompe la unión entre los átomos C17 y C20. Cuando se rompe la cadena lateral se forma androstenediona y dehidroepiandrosterona, entonces la enzima 3 β -HSD mediante la reducción del grupo cetónico en el C17 promueve la formación a testosterona (Miller, 2005). El paso final se debe a la acción de la aromatasa CYP19, la cual cataliza la conversión de la testosterona a estradiol haciendo que el anillo A neutro de los andrógenos se vuelva un anillo fenólico (aromático).

A la fecha se han descrito tres tipos de estrógenos, el estradiol (E2 o 17 β -estradiol), la estrona (E1) y el estriol (E3). La estructura química de los estrógenos consta de 18 átomos de carbonos, el E2 contiene un anillo fenólico A con doble ligaduras y un grupo hidroxilo (OH) en el C3 y C17, en posición beta. La estrona posee una cetona de C17, mientras que el estriol tiene un OH adicional en C16. La peculiaridad química del E2 es lo que le confiere su alta afinidad por los ER α y ER β (Shiau *et al.*, 1998).

La principal producción de estrógenos ocurre en los ovarios, cuerpo lúteo y placenta; en menor cantidad, también pueden producirse en otros órganos como el corazón, el cerebro, el hígado y la piel (Cui *et al.*, 2013). Aunque la síntesis de estrógenos deriva del colesterol, hay diferencias en la ruta dependiendo del tejido y la célula. En el ovario, las células de la teca y las células de la granulosa responden diferencialmente a la estimulación de la FSH y la LH. El modelo de las “dos células-dos gonadotropinas” (Hillier *et al.*, 1994) explica que sólo las células de la granulosa poseen receptores a la FSH mientras que las de la teca sólo a la LH, por lo que la FSH estimula la actividad de la enzima aromatasa (codificada por el gen CYP19) (Havelock *et al.*, 2004), pero no la síntesis de andrógenos en las células de la granulosa; mientras que la LH promueve la síntesis de los andrógenos en las células de la teca. Durante la fase lútea del ciclo de ovulación, el área de las células de la granulosa se vasculariza y se da el aporte de colesterol, lo que ocasiona un incremento en la producción de progesterona y estrógenos que provienen de los andrógenos de la teca; de esta forma, la principal fuente de estrógenos se da en las células de la granulosa por la acción de la FSH (Gómez-Chang *et al.*, 2012). Los estrógenos pueden producirse endógenamente en el cerebro a partir del colesterol o testosterona circulante (Balthazart & Ball, 2006), pues son capaces de atravesar la barrera

hematoencefálica y existen áreas cerebrales que poseen a las enzimas necesarias para la biosíntesis del E2 (Cui *et al.*, 2013).

Los estrógenos ejercen su efecto mediante la unión a sus receptores, los cuales pertenecen a la superfamilia de NR y son factores transcripcionales. De acuerdo con el comité de la nomenclatura de los NR, los receptores a estrógenos (ER) conforman al subgrupo NR3A, por lo que también se nombran como NR3A1 y NR3A2 [HUGO Gene Nomenclature Committee (Povey *et al.*, 2001)]. Sin embargo, también se ha descrito el ER acoplado a proteínas G (GPR30) (Levin, 2001), aunque aún es controversial si se trata de un receptor genuino a estrógenos.

De manera general, la unión del estrógeno a sus ER se clasifica como genómica y no genómica (Björnström & Sjöberg, 2005), es decir, si la señalización genera una regulación transcripcional o no, lo cual también se relaciona con la localización del receptor a nivel celular, nuclear, citoplásmico o membranal. Por otra parte, los mecanismos de los ER no sólo dependen del contexto celular, sino también tisular. Los ER son receptores nucleares que funcionan principalmente como factores de transcripción para regular la expresión génica, por lo que el mecanismo clásico de estos receptores comprende la formación de un complejo que involucra la unión del receptor con su ligando ocasionando la dimerización del receptor ($ER\alpha/ER\alpha$, $ER\beta/ER\beta$ o $ER\alpha/ER\beta$), la interacción con ERE y el reclutamiento de correguladores transcripcionales (Deroo & Buensuceso, 2010). Algunas de las proteínas asociadas que participan como factores de transcripción son la SP-1, la AP-1, el NF- κ B y c-Jun (Cui *et al.*, 2013). Además, el receptor puede translocar al núcleo sin estar asociado a su ligando (Parker, 1995), sin embargo el ligando sirve para reclutar proteínas coactivadoras (y en el desplazamiento de correpresores), las cuales funcionan mediante el dominio AF-2 del receptor.

Cuando los receptores se localizan en el citoplasma, en la membrana o a través de otras proteínas de unión a estrógenos, la unión del E2 con los ER es no genómica o extranuclear y se activan mecanismos de cascadas de señalización de segundos mensajeros rápidamente (Levin, 2008). Generalmente en el sistema nervioso, el hígado y los huesos se da una vía de señalización rápida ante la exposición de los estrógenos, debido a que los ER están embebidos en la membrana (Cui *et al.*, 2013). Cuando se activa el receptor de membrana, se desencadenan las vías de señalización de cinasas, tales como MAPK/ERK, PI3K/AKT, cAMP,

PKA, PKC y la vía de las tirosinas cinasas (Hayashi & Yamaguchi, 2008). Algunas de estas cascadas de señalización pueden ocasionar la activación de CREB (Levin, 2001). Por otra parte, cuando la señalización se da a nivel membranal mediante GPR30, se activan las cascadas de señalización intracelulares de cAMP/PKA y PI3K/Akt (Maggiolini & Picard, 2010). La activación de los ER no requiere necesariamente de la unión al ligando, sino que se puede hacer mediante neurotransmisores como dopamina, factores de crecimiento como el EGF y el IGF-1; así como por la PKC, PKA y MAPK (Cui *et al.*, 2013).

1.1.1. Diferencias y distribución de los receptores a estrógenos

Los genes que codifican a los receptores esteroideos sexuales poseen una organización estructural conservada. El ER α fue clonado por primera vez en 1985 (Walter *et al.*, 1985), mientras que el ER β fue descubierto en rata en 1996 (Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996). El gen ESR1 es el encargado de codificar al ER α y el ESR2 al ER β .

Los ER se componen de un dominio A/B o NTD, el cual es el dominio regulador N-terminal. Un sitio de unión al DNA llamado dominio C, una región bisagra o dominio D y el dominio E de unión al ligando (LBD) y poseen un dominio F C-terminal del cual se desconoce su función (Espey & Richards, 2006). El dominio NTD tiene la función de activación 1 (AF-1), que puede interactuar con el AF-2, generando una fuerte expresión génica. Una de las principales diferencias estructurales entre los ER es debido a que el dominio A/B es 30 aminoácidos más corto en el ER β y presenta sólo el 20% de homología (Delaunay *et al.*, 2000). El dominio C es prácticamente idéntico en ambos receptores, pues presentan el 95% de homología. La función de este dominio es debida a la presencia de los motivos estructurales de interacción que son dos dedos de zinc. En la base C-terminal del primero de éstos se encuentra una secuencia denominada caja P (caja proximal), en donde se une el DNA; mientras que en la base N-terminal del segundo dedo de zinc se encuentra la caja D (caja distal) y forma un ángulo recto con la hélice de reconocimiento de los ERE y también proporciona una interfaz para la dimerización del receptor (Espey & Richards, 2006).

El dominio D, principalmente funciona como puente entre los dominios E y C de los receptores. El LBD además de permitir la unión de éste, también regula la actividad transcripcional del ligando mediante el AF-2, localizado en el motivo C-terminal. Otras funciones

que pueden estar a cargo del dominio D son la hetero y homodimerización, así como la interacción con proteínas de choque térmico (Espey & Richards, 2006). Los ER α y ER β comparten poco menos del 60% de homología en el dominio D, pero presentan similar afinidad por el E2 (Bhat *et al.*, 2004) (figura 2).

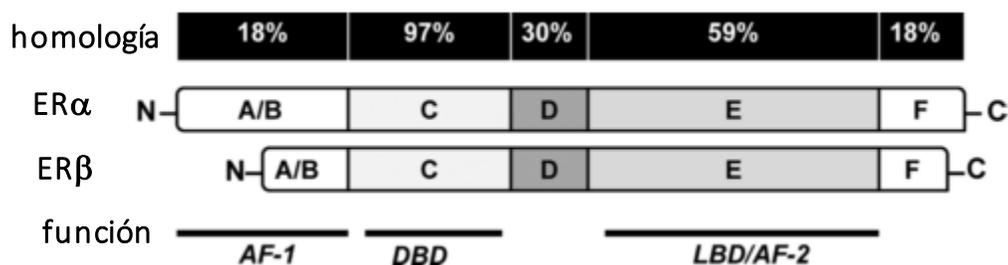


Figura 2. Homología entre los dominios que constituyen a los receptores nucleares a estrógenos. Son seis dominios funcionales que conforman a los receptores a estrógenos α y β . Existe una gran homología en los dominios de unión al DNA (región C) y poco más de la mitad de homología en el de unión al ligando (región E). La región A/B es la menos conservada entre los receptores y está a cargo de la activación de la transcripción genética (Activation Function 1 o AF-1), el dominio C es donde se lleva a cabo la unión con el DNA (DNA-binding domain o DBD), finalmente en el extremo carboxiterminal se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando (Ligand-binding domain o LBN), en donde se une la hormona pero también lleva a cabo funciones de activación de la transcripción (AF-2), dimerización, interacción con otras proteínas y fosforilación. Figura modificada de Cui *et al.*, 2013.

Debido a que la principal diferencia entre ambos receptores está en los dominios AF-1 y AF-2, se ha propuesto que tienen diferentes efectos celulares (Kian Tee *et al.*, 2004). Por otra parte, en ambos dominios se llevan a cabo funciones de activación transcripcional pero, en AF-1, la función es independiente de la unión con la hormona, mientras que en el AF-2 se requiere de dicha unión (Tora *et al.*, 1989). Dentro de la familia de los receptores nucleares es común que se presente variabilidad en la región amino terminal entre subtipos o isoformas de receptores a la misma hormona, lo cual resulta en diferencias funcionales (Delaunay *et al.*, 2000).

El ER α se expresa en gran cantidad de tejidos, como en la hipófisis, el tejido adiposo pardo y blanco, la piel, el músculo esquelético, el riñón, los huesos, el útero, el ovario, las glándulas mamarias, la próstata y la vesícula biliar; mientras que el ER β está presente en el colon, el riñón, el pulmón, el ovario y los órganos reproductivos masculinos (Yang *et al.*, 2006). La distribución del ER α en el cerebro anterior de rata, ratón y humano es similar y generalmente está presente en áreas involucradas con la función reproductiva, incluyendo el núcleo medial hipotalámico,

los núcleos del lecho de la estría terminal, el núcleo ventromedial y la parte posterodorsal de la amígdala medial; mientras que el ER β está ampliamente distribuido en el hipocampo, amígdala y en neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe (Mitra *et al.*, 2003).

Existe IR de ambos ER en el NSQ del hipotálamo de ratones, pues se ha descrito que el ER α es dominante en la región dorsolateral de la subdivisión de la corteza del NSQ mientras que el ER β se presenta en las regiones dorsomedial, dorsolateral y lateral de la corteza del NSQ, de tal forma que en las neuronas que constituyen al NSQ hay una mayor cantidad de células IR-ER β que al ER α ; además, las hembras tienen más ER en esta estructura en comparación con los machos (Vida *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios anteriores han descrito que solamente hay presencia de ER β pero no de ER α (Shughrue *et al.*, 1997; Mitra *et al.*, 2003), siendo además, muy difusa la presencia de ER β (Merchenthaler *et al.*, 2004). Por otra parte, se observó que la presencia de ER β aumenta cuando las ratas son OVX y disminuye muy poco ante el tratamiento de estradiol (Shima, *et al.*, 2003). Además, se ha descrito un ritmo diario diurno de expresión del mRNA de ER β en el NSQ, el cual se pierde en ratas viejas (Wilson *et al.*, 2002).

1.1.2. Participación de los estrógenos en el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovario

Los niveles de estrógenos cambian dramáticamente durante el desarrollo de la vida de las hembras. El ciclo estral en ratas y roedores se compone de cuatro etapas que en conjunto presentan cambios a nivel hormonal y ovárico, lo cual puede correlacionarse con la citología vaginal. Dichos cambios ocurren en un ciclo que consta de 4.5 días aproximadamente, conformado por el estro, metaestro, diestro y proestro. Los niveles de estrógenos incrementan durante la fase folicular presentando un pico sustancial al final de ésta, inmediatamente antes de la ovulación por efecto de los folículos preovulatorios; después de la ovulación, los niveles de estrógenos decaen por consecuencia de la ruptura folicular y luteinización, pese a que el cuerpo lúteo produce estrógeno, su mayor producción es de progesterona (López & Tena-Sempere, 2015).

Aunque la secreción dinámica de estrógeno es el reflejo de la actividad cíclica de la fase folicular y lútea del ovario, también tiene un control por parte de la hipófisis a consecuencia de

las secreciones de las gonadotropinas, la LH y la FSH que, a su vez son controladas a nivel del hipotálamo por la secreción de la GnRH. Las gonadotropinas actúan a nivel de las células de la teca y la granulosa para promover la síntesis y secreción de E2. Por otra parte, el estrógeno tiene un mecanismo de retroalimentación sobre las neuronas de GnRH ubicadas en el hipotálamo, a las cuales inhibe durante la mayor parte del ciclo, pero su efecto se vuelve estimulante durante la fase preovulatoria, en la cual se genera el pico preovulatorio de las gonadotropinas (figura 3). Esta secuencia de efectos es conocida como el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO).

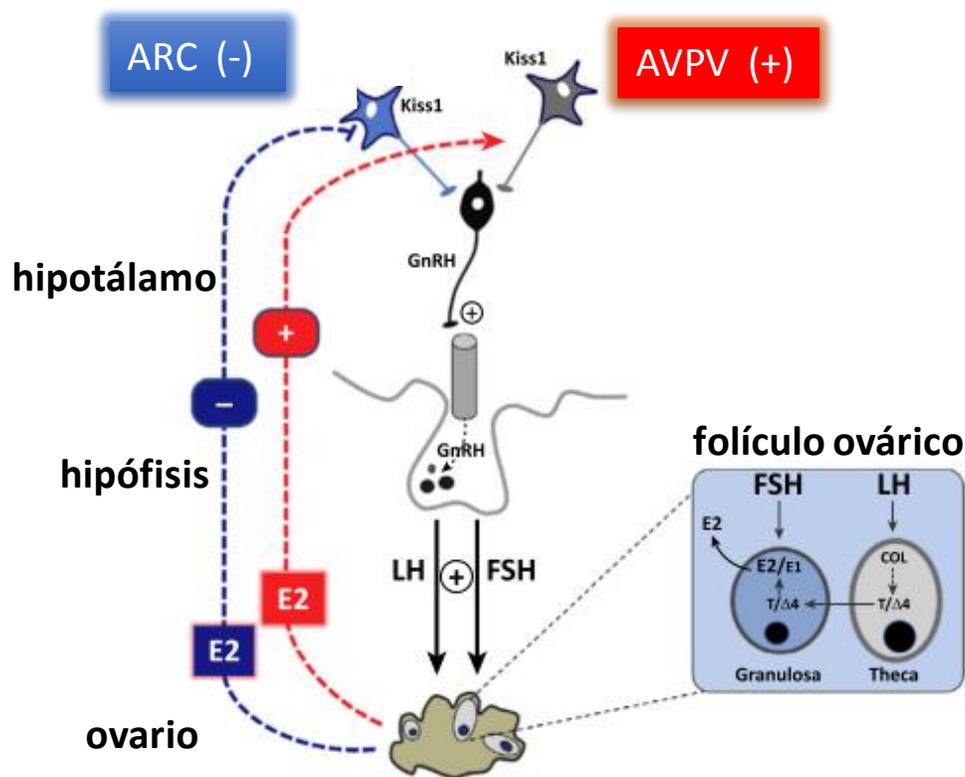


Figura 3. Retroalimentación positiva y negativa del estradiol sobre el eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovario. Las neuronas GnRH localizadas en el hipotálamo, ejercen su efecto sobre las gonadotropinas que produce la hipófisis, la LH y la FSH, que a su vez provocan la síntesis y secreción de los estrógenos por su efecto sobre las células de la teca y la granulosa de los folículos ováricos. Las neuronas de Kiss1 ubicadas en ARC y el AVPV median los efectos de la retroalimentación positiva (líneas azules) y negativa (líneas rojas) del efecto del E2. En el recuadro se esquematiza el “modelo de las dos células-dos hormonas”, donde la LH actúa sobre las células de la teca para estimular la síntesis de andrógenos, testosterona (T) y androstenediona ($\Delta 4$), los cuales difunden a las células de la granulosa para convertirse en estrógenos, principalmente E2 por la acción de la enzima aromatasa. Figura tomada y modificada de López y Tena-Sempere, 2015.

El pico preovulatorio de la LH se produce debido a un incremento de la liberación de la GnRH (Moenter *et al.*, 1992). A lo largo del ciclo ovárico, las hembras presentan una secreción episódica de GnRH que, en ovejas y primates es provocada por el incremento de E2, mientras que en roedores, además se requiere de una señal por parte del reloj circadiano para el aumento de GnRH (Karsch *et al.*, 1997).

Los niveles crecientes de estrógenos durante la fase folicular tardía del ciclo ocasionan una retroalimentación positiva en la liberación de GnRH, lo cual permite la liberación de gonadotropinas, sin embargo, en otras fases del ciclo estral, los estrógenos ejercen un efecto supresor sobre la secreción de éstas. El control positivo depende de la cantidad de estrógeno y el tiempo de exposición, mientras que el mecanismo de acción puede ser por la vía genómica clásica. De tal manera que, el aumento de LH se debe a la activación y posterior comunicación del AVPV con las neuronas de GnRH, por otra parte, las neuronas que contienen ER α en el AVPV reciben proyecciones directas desde el NSQ (Watson *et al.*, 1995), por lo que este núcleo también integra información tanto circadiana como estrogénica para regular la función de las neuronas de GnRH. Estudios con ratones *knockout* para ER α (α ERKO), sustentan la participación de los estrógenos dentro de una retroalimentación positiva, pues las hembras α ERKO son infértiles (Dupont *et al.*, 2000) y no presentan el aumento de la LH inducido por estrógenos, lo que además está correlacionado con una falta de activación en las neuronas del AVPV y GnRH (Herbison, 2006).

Los estrógenos generan el pico preovulatorio de GnRH durante el proestro, por medio de la regulación génica de las neuronas que expresan ER α en el AVPV y proyectan directamente sobre las de GnRH; lo que permite que se dé un aumento de su actividad pulsátil hasta lograr un patrón de liberación continua (Herbison, 2006). Además, la acción de los estrógenos también ejerce una retroalimentación negativa durante el resto de las otras etapas del ciclo estral, pues genera un efecto supresor sobre la secreción de GnRH, que implica una disminución en la amplitud y frecuencia del pulso de ésta (Evans *et al.*, 1997).

La retroalimentación negativa por parte de los estrógenos es menos comprendida actualmente; se cree que participan ambos ER. Sin embargo, se ha sugerido que el GABA tiene influencia en este control, pues las neuronas del POA expresan ER α y son muy sensibles a las fluctuaciones de los estrógenos; de tal forma que cuando aumentan se produce un

incremento de la liberación de GABA en las vías aferentes que proyectan sobre las neuronas de GnRH, provocando una disminución en el disparo de éstas y por consecuencia se suprime la pulsatilidad en la secreción de LH (Jarry *et al.*, 1991). Por lo tanto, el efecto de los estrógenos sobre las neuronas de GnRH refleja el equilibrio de los mecanismos de retroalimentación positiva y negativa ya que en la fase folicular tardía, el aumento de los niveles de estrógenos actúa en una retroalimentación positiva que domina sobre la influencia de la vía de retroalimentación negativa, esta última es relativamente constante durante el ciclo (Herbison, 2006).

Las neuronas de GnRH sólo expresan al ER β y sus acciones se ejercen tanto por la vía no genómica como por la genómica, sin embargo las neuronas que expresan ER α localizadas en el AVPV, el núcleo medial del área preóptica, el MBH y el tronco cerebral caudal proyectan directamente sobre las neuronas de GnRH (Herbison, 2006). Por otra parte, el AVPV contiene neuronas que expresan ER α y ER β (Roa *et al.*, 2008), mientras que el ARC también posee neuronas que expresan Kiss1 y se inhiben por el E2 (Smith *et al.*, 2005).

Las kiss1 son neuropéptidos clave para la regulación de la GnRH, pues actúan mediante su receptor GPR54 (o Kiss1R) el cual se expresa en las neuronas de GnRH (Messenger *et al.*, 2005) y parecen tener un papel en la generación del pico de la LH (Han *et al.*, 2005). Las neuronas de kiss1 en el AVPV presentan patrones de activación neuronal y expresión génica que coinciden con el ritmo circadiano de la LH (Robertson *et al.*, 2009).

1.2. Los ritmos circadianos y su papel en la fisiología reproductiva de la hembra

Diversos fenómenos biológicos son recurrentes y el periodo en algunos de ellos puede vincularse a ciclos geofísicos. En los organismos los sucesos cíclicos se reconocen como ritmos biológicos, los cuales se han clasificado tanto por su frecuencia como por su periodo, de acuerdo con el número de veces que ocurren en torno a un día. Por lo tanto, están los ritmos ultradianos, que se presentan varias veces al día; los ritmos circadianos, que son los que existen una vez al día; y los infradianos, que requieren de varios días para completar un ciclo. Bajo estos términos, la biología reproductiva en las hembras de diversos vertebrados, independientemente de la especie, es un conjunto tanto de ritmos ultradianos (pulsatilidad de GnRH), circadianos (secreción de LH y FSH) e infradianos (ciclos estrales, menstruales, en el

caso de varios mamíferos), que mantienen una coordinación temporal, ordenada y fina para el control de la ovulación.

El sistema circadiano está constituido por una vía de entrada al marcapasos circadiano que proporciona información del medio exterior, el marcapasos integra esta información y regula las vías de salida que generan respuestas rítmicas circadianas, las cuales a su vez pueden regularse por osciladores periféricos (figura 4). Bajo este modelo, se establecen las principales características de los ritmos circadianos: que se generan endógenamente y que son capaces de sincronizarse a factores físicos cíclicos en el ambiente (Sehgal, 2004). El sistema circadiano influye en distintos niveles del sistema reproductivo en las hembras, pues es capaz de proporcionarles un “sentido del tiempo” para garantizar que, eventos conductuales y fisiológicos coincidan, tal como ocurre al mantener la vigilia, la receptividad hacia el macho y la ovulación (Kennaway, 2005).

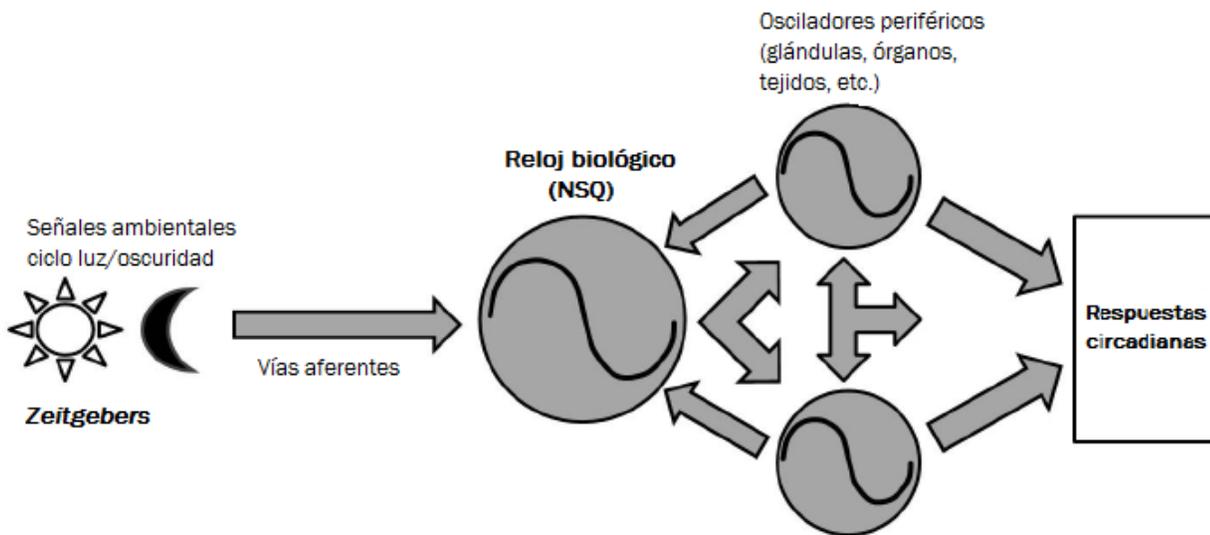


Figura 4. Organización del sistema circadiano en mamíferos. Las señales cíclicas (*Zeitgebers*) son captadas por vías aferentes que envían la información al marcapasos central, el NSQ en mamíferos, el cual impone fase y periodo a osciladores periféricos obteniendo como resultado de este proceso respuesta circadianas. Figura modificada de de Pontes *et al.*, 2010.

Las señales periódicas ambientales que son capaces de generar sincronización en el sistema circadiano son nombrados *Zeitgebers* (término alemán que significa “dador de tiempo”; Aschoff, 1960). Los ritmos circadianos son endógenos y persisten en ausencia de señales

ambientales, característica nombrada como *free running* (Aschoff, 1965) u oscilación espontánea en libre curso; que tiene la propiedad de compensar la temperatura, es decir, el periodo del ritmo se mantiene ante cambios de temperatura de incluso 10° C (Pittendrigh, 1960). Debido a que los ritmos circadianos son eventos que se repiten cada cierto intervalo de tiempo y dicha característica es producto de osciladores endógenos autosostenidos (endogenous self-sustained oscillators, ESSOs), mediante esta analogía el estudio matemático de los ritmos se apoya con la acción de los osciladores físicos (Daan, 2010), de tal forma que el periodo (τ) es el lapso de tiempo en el que se completa el fenómeno cíclico, mientras que las veces que se repite en un intervalo se refiere a la frecuencia, y la fase (Φ) hace referencia a un punto o momento del evento cíclico, de tal forma que la acrofase es el punto máximo en la oscilación y la batifase el mínimo, por lo que la distancia entre ambas constituye la amplitud, y el mesor la mitad de ésta (figura 5).

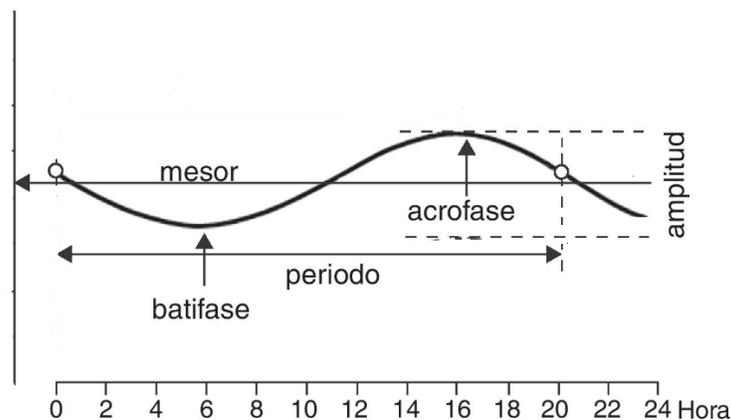


Figura 5. Parámetros empleados para el estudio de los ritmos circadianos. El eje de las abscisas representa la escala temporal y el de las coordenadas la variable estudiar; se señalan las principales características medibles de una oscilación.

Por otra parte, el principal sincronizador de los ritmos circadianos es el ciclo ambiental de luz-oscuridad, aunque también pueden serlo los ciclos de temperatura ambientales, los de humedad, la disponibilidad de alimento y las interacciones sociales, según la especie que se observe (Daan, 2010). El término de sincronización se refiere a la coincidencia que se establece entre el periodo externo (T) con el interno ($T=\tau$), estableciéndose una relación temporal constante de un evento particular del ritmo endógeno (φ) con uno del ciclo ambiental (Φ), a la

diferencia existente entre ambas fases se le nombra relación de fase (Ψ , $\Psi = \Phi - \phi$). Si $\tau < T$ se dice que la relación de fase es positiva, y si $\tau > T$, entonces es negativa (Daan & Aschoff, 2001).

Una década después de que Halberg acuñara el término circadiano para referirse a los ritmos cuyo periodo es cercano a 24 horas (Halberg, 1959), se propuso el término circaquadradiano (CQ) para el ciclo estral estudiado en hembras de hámster, el cual tiene un periodo de aproximadamente 96 horas (alrededor de 4 días) y persiste en condiciones constantes ambientales, de tal forma que surgió la idea de que parte de la regulación del ritmo del ciclo estral es debida a un reloj biológico (Alleva *et al.*, 1971). Dos años después, se conocería la localización del reloj biológico en mamíferos: el NSQ del hipotálamo (Moore & Eichler, 1972; Stephan & Zucker, 1972).

La relevancia de las señales circadianas en la reproducción de las hembras fue demostrada con los estudios de Everett y Sawyer, al observar que la ovulación se retrasa 24 h cuando las ratas son anestesiadas en la mañana del proestro (Sawyer *et al.*, 1949; Everett & Sawyer, 1950); otro estudio demostró que cuando las ratas son OVX y 15 días después se les inserta un implante subcutáneo de 50 μ g de BE, se presentó un pico de LH diariamente durante la tarde resultó y por 4 días consecutivos, lo cual indica la existencia de un control circadiano (Legan *et al.*, 1975); de tal forma que ésta dosis es suficiente para desplegar respuestas circadianas. Además, los cambios en el fotoperiodo alteran el inicio del surgimiento del pico de LH, que está relacionado con el inicio de actividad en roedores nocturnos (Albers, 1981; Albers *et al.*, 1981; Labyak & Lee, 1995). Así mismo, lesiones a nivel del NSQ y estudios en ratones *Knockout* para algún gen del reloj circadiano, suprimen el aumento de la LH y la ovulación (Alleva *et al.*, 1971; Moline & Albers, 1988).

El eje HHO no opera de manera independiente, es controlado por múltiples neurocircuitos entre los que destaca el del sistema circadiano, por lo que las características cíclicas de la reproducción son el resultado de la sincronía entre ambos sistemas (Putteeraj *et al.*, 2016). En las hembras de roedores, la ovulación sucede pocas horas antes o al mismo tiempo que ocurre la conducta sexual femenina, durante el proestro tardío y estro temprano, cuando los niveles de E2 son elevados. La coordinación temporal de estos eventos aumenta la probabilidad de fertilización después del apareamiento. Dicha regulación es debida al surgimiento preovulatorio de la GnRH que está controlado por dos tipos de vías de entrada y por sus vías aferentes: la

retroalimentación establecida por el estradiol secretado desde los folículos ováricos maduros y la vías de salida de la hora del día proveniente del NSQ (Van Der Beek *et al.*, 1997; Chappell, 2005).

Aún en presencia de los niveles óptimos de progesterona y estradiol, es necesaria una señal sincronizadora del NSQ para inducir la suficiente cantidad de GnRH que está asociada con el aumento de la LH. Dicha señal se presenta una vez al día, pues se ha observado que, aunque se administren los niveles adecuados de estradiol, la ablación del NSQ o la interrupción de las proyecciones neuronales desde el NSQ hasta el POA, incluidas las neuronas secretoras de kisspeptina, se presenta una pérdida de la regularidad del ciclo estral (Brown-Grant & Raisman, 1977; Wiegand *et al.*, 1980; Smarr *et al.*, 2012).

1.2.1. Sincronización fótica y sus efectos en la reproducción

El sistema circadiano regula tanto los eventos biológicos que ocurren con relación a características específicas de un ciclo ambiental de 24 horas, como a los fenómenos periódicos dentro del organismo; para llevar a cabo tal función, el sistema circadiano debe permanecer sincronizado con el fotoperiodo, lo cual se logra mediante un mecanismo de reinicio que “ajusta” las desviaciones del periodo endógeno ($T - \tau$). Este ajuste o sincronización requiere de una vía de entrada (aferencias de receptores y elementos de transducción) de las señales ambientales específicas o *Zeitgebers* y de elementos dentro del marcapasos circadiano que son capaces de transducir e integrar las señales en mecanismos que produzcan cambios adecuados de la fase del ritmo (figura 4).

El ritmo consecutivo del día y la noche (nictemeral) se puede simular artificialmente por ciclos de Luz y Oscuridad (LO), llamados fotofase y escotofase respectivamente. Cuando el *Zeitgeber* actúa sobre el ritmo endógeno, por convención el tiempo se expresa como *Zeitgeber Time* (ZT), de tal forma que en un esquema de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (LO 12:12), el ZT0 es definido cuando las luces se encienden y ZT12 corresponde al apagado de las luces. La proporción de horas de luz y oscuridad se le denomina fotoperiodo.

En diversos organismos se ha descrito que la sensibilidad del sistema circadiano a la luz muestra respuestas similares, incluso entre distintos taxa, lo que sugiere que el reloj circadiano

es fotosensible. Se han propuesto dos modelos sobre la sincronización fótica, debido a que el sistema circadiano puede modular continuamente la velocidad de su respuesta de acuerdo con la intensidad de la luz a lo largo del día, de tal forma que se desacelera o acelera para ajustar su frecuencia a la del entorno; este tipo de mecanismo se le conoce como **sincronización paramétrica** o continua (Daan, 1977).

El modelo de **sincronización no paramétrica** (discreta) fue propuesto por Pittendrigh (1960) y se presenta cuando el mecanismo ocurre por pulsos de luz discretos, de tal forma que la luz actúa rápidamente (minutos u horas) generando un cambio fásico en el nivel o actividad de la variable rítmica controlada por el reloj mismo (Crosthwaite *et al.*, 1995). Debido a esto, en condiciones de laboratorio es posible emplear fotoperiodos esqueleto, los cuales consisten en mantener al organismo en condiciones constantes de oscuridad y aplicar dos pulsos cortos de luz por ciclo: un pulso se da al comienzo y otro al final de la actividad, por ejemplo, un pulso de 15 minutos cada 12 horas, lo cual permite distinguir tres partes: amanecer, día y noche. Cuando los pulsos tienen la misma duración, se habla de un fotoperiodo esqueleto simétrico, y si la duración de los dos pulsos es distinta se le conoce como asimétrico (Jud *et al.*, 2005). Por otra parte, la respuesta de cualquier oscilador ante una perturbación depende de la fase, y tales efectos pueden ser visualizados mediante una representación gráfica que se le conoce como curva de respuesta de fase (CRF).

Para generar una CRF, el organismo debe estar en condiciones constantes de oscuridad, de tal forma que su ritmo este en libre curso y exprese τ . El ciclo completo se divide en 24 segmentos y cada uno corresponde a una hora de tiempo circadiano (CT, *Circadian Time*); usualmente, en organismos nocturnos, una unidad de CT es menor que una hora, porque $\tau < 24$ h. Por convención, CT0 se designa al comienzo del día subjetivo (la fase de descanso en roedores nocturnos) y CT12 es el comienzo de la noche subjetiva (la fase de actividad). En animales diurnos, CT0 corresponde al inicio de su fase de actividad y CT12 al de su fase de descanso (Jud *et al.*, 2005).

El método de CRF, representa los cambios de fase (ϕ) hacia adelante, hacia atrás o sin cambios de un estímulo sobre el oscilador en función del CT, por lo que un avance de fase desplaza el inicio de la actividad a una posición anterior en el ciclo circadiano, mientras que un retraso de fase lo mueve a un momento posterior (Jud *et al.*, 2005). Generalmente, en la CRF

de organismos nocturnos se puede apreciar la zona de retrasos (CT12 a CT18), la zona de avances (CT18 a CT2) y la zona de insensibilidad o “muerta” (CT2 a CT12), en donde el estímulo tiene poco o no tiene efecto y por lo general corresponde al día subjetivo (Daan & Pittendrigh, 1976).

La respuesta que presentan los organismos ante los cambios en la longitud de la fotofase se refiere como “fotoperiodismo”, y tiene particular impacto en uno o varios procesos fisiológicos relacionados con la reproducción. En los hámsters siberianos, por ejemplo, la exposición a días cortos induce inhibición reproductiva, la muda de invierno, inicio de hibernación y el aumento en la masa corporal, mientras que, en días largos, se revierte el efecto (Hoffmann, 1973). Las respuestas fotoperiódicas toman de 6 a 8 semanas en observarse, lo cual resulta consistente con los cambios graduales que se presentan naturalmente (Malpoux, 2006). Además, las respuestas también dependerán de la duración del día y la historia fotoperiódica del organismo, pues se ha observado que, en las ovejas, 13 h de luz al día causan estimulación de la secreción de la LH si previamente se expusieron a 16 h de luz; por el contrario, si previamente fueron expuestas a solo 10 h y después a 13 h de luz al día, se presenta una inhibición en la secreción de la LH (Robinson & Karsch, 1987).

Se han realizado diversas investigaciones sobre el papel de la melatonina pineal como el mensajero de los cambios en el fotoperiodo. La secreción de melatonina durante la escotofase está controlada por la información fótica que es transmitida al NSQ y que por medio de una vía mutisináptica hacia la glándula pineal llegan proyecciones del sistema nervioso simpático liberando noradrenalina (Reiter, 1980). Por lo tanto, la melatonina codifica la duración de la noche de la siguiente manera: el NSQ envía proyecciones al PVN, el cual hace un relevo en la IMC, desde donde se proyecta al SCG que dirige sus proyecciones sobre la glándula pineal, y su señal noradrenérgica actúa sobre los receptores β -adrenérgicos de los pinealocitos, lo que induce la formación de cAMP, que a su vez aumenta la producción de la expresión génica de AA-NAT, lo que genera un aumento en la concentración de melatonina; pues esta se sintetiza mediante una vía de dos pasos, desde serotonina a través de las enzimas AA-NAT y HIOMT (Carpentieri *et al.*, 2012).

Se sabe que la melatonina es importante para la reproducción estacional en algunos mamíferos, pues la ablación de la glándula pineal suprime las respuestas estacionales y la

administración de melatonina restaura dichas funciones (Hoffman & Reiter, 1965). En resumen, la melatonina refleja la señal de la duración de la escotofase y sus variaciones durante todo el año, por lo que modera tanto los ritmos circadianos, como los cambios fotoperiódicos sobre la fisiología y conducta de los organismos, en consecuencia, posee una función tanto de reloj como de calendario (Borniger & Nelson, 2017).

1.3. Características generales del núcleo supraquiasmático

En mamíferos, el NSQ está localizado en el hipotálamo anteroventral, a lado del tercer ventrículo y por encima del quiasma óptico; en ratas tiene un tamaño aproximado de 300-400 μ m de ancho y 400-500 μ m de alto (Morin & Allen, 2006). Cada NSQ consta de 10,000-12,000 neuronas con un tamaño aproximado de 12 μ m de diámetro (van den Pol, 1980). Dentro del NSQ se encuentran células elongadas localizadas en la parte dorsal y dentro del quiasma óptico, mientras que las células largas y bipolares se encuentran en la zona periventricular al núcleo (Moga & Moore, 1997). Por otra parte, el NSQ presenta más volumen y área en ratas machos que en hembras (Robinson *et al.*, 1986); además, los machos tienen más sinapsis axo-espinales, más densidad post-sináptica y sinapsis asimétricas que las hembras, aunque las hembras presentan más sinapsis simétricas (Güldner, 1982).

El NSQ es una estructura heterogénea que, a grandes rasgos se divide por la descripción y función de las neuronas localizadas en la parte dorsomedial (dm), también llamada *Shell* o corteza, las cuales son productoras de AVP, mientras que en la parte ventrolateral (vl, nombrada como *core* o médula), son neuronas productoras del VIP y del GRP (Moga & Moore, 1997). Las neuronas localizadas en la región dm poseen dendritas pequeñas, mientras que las de la región vl presentan dendritas largas que se extienden dorsoventralmente en el eje horizontal (Leak & Moore, 2001).

Todas las neuronas del NSQ sintetizan GABA, sin embargo, la constitución de esta estructura es altamente heterogénea y compleja, pues también existen otros neurotransmisores, hormonas y proteínas que han sido identificados en el NSQ. Las neuronas de la zona dm presentan células IR a CALB, AII y mENK y recibe información de fibras IR a GAL y al VIP. Las neuronas de la zona vl sintetizan GABA, CALB, VIP, CARL, GRP y NT, y recibe información de fibras que sintetizan NPY y 5HT (Abrahamson & Moore, 2001). Las fibras

de AVP, AII y mENK son densas en la región del *shell*, lo que sugiere la presencia de un circuito local intrínseco para esta región, en contraste, las fibras de VIP y GRP se extienden a través de la región dm y vl, indicando circuitos densos de y entre ambas regiones; finalmente, las fibras de somatostatina y sustancia P, sugieren que existen proyecciones desde la zona fronteriza a la región dm (Abrahamson & Moore, 2001). En cultivos celulares de NSQ, el VIP y la AVP muestran un patrón de liberación circadiano con periodos que van de 22 a 27 h, además, registros en células individuales del NSQ presentan un índice de disparo de aproximadamente 24 h, con un pico durante el día subjetivo (Moga & Moore, 1997).

A pesar de que la mayoría de los estudios sobre la estructura y morfología del NSQ han sido desarrollados en machos, existen algunos que muestran diferencias sexuales. El análisis microscópico electrónico indica que el NSQ de la rata macho presenta más sinapsis axoespinales, sinapsis asimétricas y neuronas con más nucléolos que el de las hembras; así como un volumen total mayor (Güldner, 1983). Por otra parte, también se ha demostrado dimorfismo sexual en la expresión del VIP (Krajnak *et al.*, 1998) y en la actividad eléctrica de las neuronas del NSQ, principalmente en el umbral para evocar potenciales de acción dependiendo de la región del NSQ. De tal manera que durante la escotofase, las neuronas del NSQ de machos, presentan umbrales de sus potenciales de acción más altos, índices de disparo más rápido y mayor amplitud, en comparación con las hembras (Kuljis *et al.*, 2013). Se sabe que uno de los papeles del VIP tiene que ver con el acoplamiento entre las neuronas del NSQ mediante diversos mecanismos (Welsh *et al.*, 2010) y que, las diferencias en la actividad eléctrica del NSQ entre machos y hembras podrían influir en las propiedades de los ritmos circadianos, tales como la sincronización y los cambios de fase (Bailey & Silver, 2014).

La gran diversidad de poblaciones de neuronas del NSQ y los efectos sobre otras regiones cerebrales, permite entender en general, el control de éste sobre distintos mecanismos fisiológicos cíclicos. Además, el NSQ recibe información del medio ambiente por vías aferentes y transmite dicha información a otros sistemas mediante vías eferentes, las cuales pueden ser humorales o neurales.

1.3.1. Aferencias y eferencias del núcleo supraquiasmático: énfasis en la comunicación relacionada con el eje neuroendocrino reproductivo de hembras.

Actualmente se sabe que el NSQ presenta múltiples vías de entrada y de salida, y de acuerdo con la respuesta circadiana a estudiar, se conocen las relaciones directas e indirectas del reloj biológico con el órgano o sistema efector. En esta sección se describirán brevemente las principales vías aferentes y eferentes del NSQ con una profundización en aquellas que se relacionan con la regulación del eje neuroendocrino HHO.

Las tres principales vías de entrada del NSQ provienen de la retina (el RTH), el núcleo del Rafé y la IGL; de tal forma que la información proveniente de la retina proporciona información sobre el fotoperiodo, la entrada serotoninérgica proveniente del Rafé, modula la información fótica, y la que se origina desde IGL participa mediando la sincronización no fótica (Moga & Moore, 1997). Tanto el RTH como la IGL envían densas proyecciones sobre la región ventral del NSQ, con una ligera inervación sobre la subdivisión dorsal (Cassone *et al.*, 1988), mientras que el Rafé inerva por completo al NSQ (Moore *et al.*, 1978); tanto el núcleo medial como el dorsal del Rafé, son la principal vía serotoninérgica que inerva al NSQ. Una vía indirecta aferente que proviene del área retinorecipiente es la IGL, cuya inervación es inmunorreactiva al NPY (Card & Moore, 1984).

El RTH se origina desde un conjunto de células ganglionares de la retina conocidas como células tipo III y están distribuidas a lo largo de toda la retina; estas células ganglionares son pequeñas y presentan extensas dendritas arborícolas con pocas ramas. Los axones provenientes del RTH coinciden en la misma zona del NSQ donde se localizan neuronas del VIP y del GRP (Abrahamson & Moore, 2001). De acuerdo con los primeros estudios, se había mostrado que existía una vía desde el área geniculada ventrolateral (Swanson *et al.*, 1974) y posteriormente se reconoció que la IGL es una división morfológica y funcional distinta, pues a partir de ella se origina una segunda vía indirecta hacia el NSQ, el tracto genículo hipotalámico, cuyas proyecciones se entrecruzan con las del TRH y liberan al NPY y al GABA sobre el NSQ (Moore *et al.*, 2001).

El NSQ también recibe entradas neurales desde otras regiones, como el MPO, la SPZ, el PVT, el VMH, el ARC, el LS, el PPT, el PPN, el PB y ZI. En resumen, el NSQ recibe aferencias desde la retina, el sistema límbico, el hipotálamo, el núcleo del Rafé, el PVT y el sistema

extraretinal visual (por ejemplo, IGL); a su vez, éstas vías están organizadas topográficamente dentro del NSQ (Moga & Moore, 1997).

Al igual que con las vías aferentes, el NSQ proyecta hacia muchas regiones y generalmente existe una correspondencia de las estructuras que envían hacia el NSQ con las fibras que el núcleo proyecta. Mediante diversos estudios, se ha demostrado que algunas vías eferentes son esenciales para ciertas funciones circadianas tales como ciclicidad del estro, producción rítmica de corticosterona y melatonina.

La proyección más densa del NSQ es hacia la región perisupraquiasmática y la SPZ, la primera se localiza inmediatamente alrededor del NSQ, mientras que la SPZ se extiende desde la región caudal del NSQ hasta la división magnocelular posterior del núcleo hipotalámico paraventricular. Las vías aferentes del NSQ se continúan caudalmente por la SPZ y llegan al DMV y a la región medial del VMH, el área hipotalámica posterior y el área gris periacueductal (Moore *et al.*, 2001). A su vez, unas cuantas fibras se continúan dorsal y lateralmente a través de SPZ y se introducen a la IZ.

Existen otras cinco vías principales que surgen desde el NSQ, una de ellas es densa y viaja en dirección dorsal hacia la línea media del tálamo, desde donde inerva a los núcleos talámicos paraventriculares y parateniales. La segunda vía se extiende de manera anterior-ventral y a las regiones periventriculares del MPO, que incluyen al núcleo AVPV; ambas vías sintetizan AVP y VIP (Buijs & Kalsbeek, 2001). Existen fibras que se dirigen rostralmente al LSV y al BSTc, otras fibras se continúan caudalmente por el área retroquiasmática y la región entre el VMH y ARC; finalmente, hay una ligera proyección que atraviesa el LHA y llega a la IGL y al vLGN (Moore *et al.*, 2001).

Debido a que la región dm y la vl difieren en los péptidos y el patrón de vías aferentes, las subdivisiones del NSQ tienen funciones diferentes dentro del sistema circadiano y la organización de las vías aferentes depende de los circuitos locales en cada una de estas subdivisiones, lo cual contribuye a la capacidad de adaptación y la capacidad de procesar información ordenadamente para el control de los sistemas efectores (Leak & Moore, 2001).

El NSQ proyecta hacia áreas del cerebro que están involucradas en la reproducción, tal como el área medial preóptica y células positivas a GnRH (Van Der Beek *et al.*, 1997). Por

medio de seguimiento anterógrado, se ha demostrado que las neuronas del NSQ proyectan eferencias que sintetizan al VIP, directamente sobre las neuronas de GnRH (de la Iglesia *et al.*, 1995). El NSQ presenta conexiones con células estrogénicas del área media preóptica (Watson *et al.*, 1995) y con neuronas productoras de GnRH (de la Iglesia *et al.*, 1995; Van Der Beek *et al.*, 1997), de tal forma que existen por lo menos dos vías de comunicación desde el NSQ hacia las neuronas de GnRH.

La ruta directa es mediante las neuronas que sintetizan al VIP y proyectan sobre las de GnRH que expresan al receptor de VIP, el VPAC2R (Watson *et al.*, 1995; Van Der Beek *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000). Además, se ha visto una correlación de expresión de c-Fos en las neuronas de VIP con el aumento de la LH (Lee *et al.*, 1990; Van Der Beek *et al.*, 1994). Así mismo, la administración de VIP promueve la actividad eléctrica en las neuronas de GnRH cuando hay presencia de E2 y se presenta un pico de actividad eléctrica en el instante próximo al pico de la LH (Christian & Moenter, 2008). La vía indirecta es mediante las neuronas de la AVP que se localizan en la región vl del NSQ y proyectan hacia el AVPV, que a su vez proyecta sobre las neuronas de GnRH (de la Iglesia *et al.*, 1995; Leak & Moore, 2001; Kriegsfeld *et al.*, 2004). Las neuronas del AVPV expresan un subtipo de receptor para AVP, el V1a, el cual presenta un incremento en su expresión cuando hay presencia de E2 (Kalamatianos, *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha observado que las ratonas mutantes del gen *Clock* no presentan el pico preovulatorio de la LH pero, si se administra la AVP centralmente durante la tarde, es posible generarlo (Miller *et al.*, 2006).

El núcleo DMH es una región importante para la reproducción, pues además de su alto contenido de neuronas que expresan a la GnIH, recibe proyecciones de las dos principales regiones del NSQ, aunque principalmente de la zona ventrolateral (Gibson *et al.*, 2008). Cuando se administra el VIP se disminuye la actividad celular de las neuronas de GnIH, pese a que estas neuronas no expresan receptores para el VIP, lo que sugiere que son reguladas por el reloj circadiano mediante una vía alternativa, quizá por interneuronas (Russo *et al.*, 2015).

Por otro lado, las neuronas de kiss1 adoptan roles funcionales diferentes en los núcleos AVPV y ARC, en los cuales su respuesta es sensible a los estrógenos, manteniendo una regulación tanto de retroalimentación positiva y negativa, respectivamente (Tomikawa *et al.*, 2012). En resumen, las redes existentes de las proyecciones neuronales entre el NSQ y los

nucleos hipotámicos reproductores como el POA, el ARC, el AVPV y el DMH, estarían participando mediante interacciones con el marcapasos central para asegurar una óptima funcionalidad reproductiva (figura 6) (Putteeraj *et al.*, 2016).

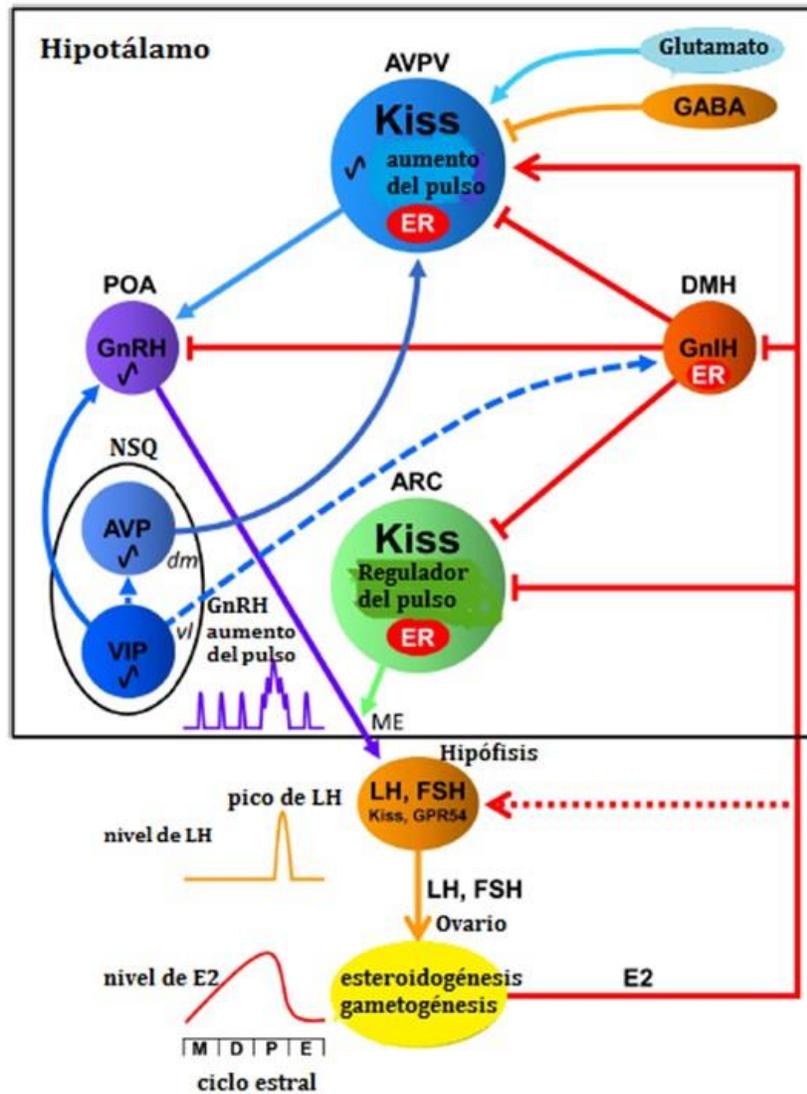


Figura 6. Interacciones entre el NSQ y los componentes del eje HHO. La parte VI del NSQ sintetiza al VIP y la región DM posee neuronas que sintetizan AVP, las neuronas VIP proyectan hacia el POA sobre las neuronas que producen GnRH, mientras que las de AVP proyectan sobre neuronas de Kiss1 en el AVPV. Las neuronas que producen GnIH en el DMH inhiben a las de GnRH y a las de Kiss en AVPV y el ARC, además, las neuronas en AVPV son estimuladas por el GLU e inhibidas por el GABA. La GnRH se libera sobre la ME para producir la secreción de la LH y la FSH desde la hipófisis, lo que inducirá la gametogénesis y esteroidogénesis en el ovario, el cual secreta E2 de manera cíclica, aumentando gradualmente durante las etapas del ciclo estral [metaestro (M), diestro (D), proestro (P) y estró (E)]. Tanto las neuronas del ARC como las del AVPV expresan los ER. Las líneas continuas indican regulación directa, mientras que las punteadas, indican una indirecta. Figura modificada de Putteeraj *et al.*, 2016.

1.3.2. Bases moleculares de la generación de los ritmos circadianos

Diversos experimentos realizados en *Drosophila* y ratones, permitieron identificar las características principales sobre el funcionamiento del reloj circadiano en animales y posteriormente conocer los componentes del reloj circadiano en mamíferos. Existen componentes moleculares principales que, en interacción entre un asa de activación y una de inhibición, generan oscilaciones rítmicas de aproximadamente 24 horas, los elementos positivos o activadores, son los genes *Clock* y *Bmal1*, mientras que los elementos del asa de inhibición (negativos) son los genes *Per* y *Cry*.

Tanto las proteínas CLOCK como BMAL1 son factores de transcripción que poseen dominios funcionales del tipo bHLH y PAS (Takahata *et al.*, 1999), que al formar heterodímeros se vuelven un complejo activo capaz de unirse a la secuencia promotora (CACGTG) conocida como caja E (*E-box*), la cual está presente en los genes *Per* (*Per1*, 2 y 3) y *Cry* (*Cry 1* y 2), así como en otros genes controlados por el reloj (CCG) (Gekakis *et al.*, 1998). La activación de *Per* y *Cry* por el heterodímero CLOCK:BMAL1 inicia la expresión de proteínas que están involucradas en las asas de retroalimentación positiva y negativa (Pando & Sassone-Corsi, 2001). La acumulación de PER en el citoplasma está regulada por la unión con CRY y por el estado de fosforilación, lo que permite su translocación al núcleo para interferir con la actividad de los dímeros de CLOCK:BMAL1, regulando negativamente el asa al inhibir su propia transcripción (Kume *et al.*, 1999).

El gen *Per1* y 2 que codifica a la proteína PER1 y 2 respectivamente, presenta un ciclo rítmico de síntesis, el cual se encuentra en antifase con la oscilación de *Bmal1* (Oishi *et al.*, 1998a). El pico máximo de la oscilación de PER1 ocurre durante el día y decae en la noche; mientras que la expresión de *Clock* es constante (Shearman *et al.*, 1999), por lo que BMAL1 es el factor limitante del heterodímero CLOCK:BMAL1 y su acumulación activa la transcripción de *Per* y *Cry*. Los dímeros formados por PER y CRY son fosforilados por las CKI ϵ/δ para su posterior translocación al núcleo (Akashi *et al.*, 2002).

Cuando los heterodímeros de CLOCK:BMAL1 activan la transcripción de *Per* y *Cry*, también activan la transcripción del gen del receptor huérfano nuclear *Rev-Erb α* , el cual reprime la transcripción de *Bmal1* mediante su acción sobre el elemento de respuesta Rev-erb/ROR

(Preitner *et al.*, 2002); de esta manera, cuando los niveles de *Bmal1* decaen, los niveles de *Per* y *Cry* están elevados.

De acuerdo con la dinámica de las asas de regulación del reloj molecular (figura 7A), es posible observar en un perfil diario en antifase de los elementos principales que la conforman, es decir, cuando PER y/o CRY están en su máxima expresión, entonces BMAL1 está en la mínima y viceversa (figura 7B). En un fotoperiodo LO 12:12, los perfiles diarios de las proteínas en el NSQ presentan fases máximas de expresión distintas a las de sus genes. Para PER1 se ha reportado que la proteína comienza a elevarse al final de la fotofase y alcanza su máximo nivel en la transición de la luz a la noche (apagado de las luces) y declina hacia el final de la escotofase, por lo que la mínima expresión de células IR ocurre durante la transición de la noche al día (encendido de las luces); además, el ritmo de PER1 tiene un desfase de retraso de 6-8 horas con respecto al mRNA de *Per1* (Yan *et al.*, 1999; Field *et al.*, 2000).

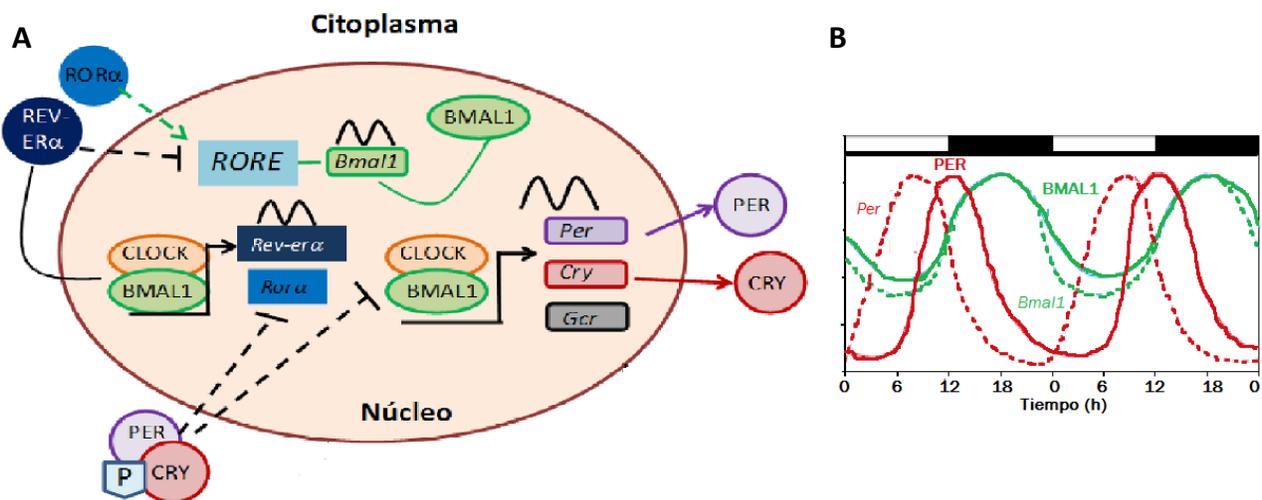


Figura 7. Asas de regulación del reloj molecular y expresión en antifase de PER1 y BMAL1. El heterodímero de CLOCK/BMAL1 se une a la región promotora de los genes *Per* y *Cry* y otros genes controlados por reloj (*Gcr*) responsables de las vías eferentes del reloj. Las proteínas PER y CRY se acumulan en el citoplasma donde se fosforilan (P) y translocan para inhibir su propia transcripción. Las líneas punteadas indican los mecanismos reguladores positivos (verdes) y negativos (negros), de tal forma que BMAL1 es regulado positivamente por ROR α y negativamente por REV-ER α (A), figura modificada de Juárez-Tapia & Miranda-Anaya, 2016. La dinámica del reloj molecular ocurre cada 24 h aproximadamente y debido a la inhibición/transcripción de los elementos positivos y negativos, se puede apreciar la expresión rítmica de PER1 (en verde y *mPer* en líneas punteadas) y de BMAL1 (en rojo y líneas *mBmal1* en punteadas) en antifase (B), figura modificada de Morse & Sassone-Corsi, 2002.

Por otra parte, bajo un fotoperiodo LO 12:12, se ha observado que en la rata, el perfil diario de BMAL1 en el NSQ alcanza su pico máximo a mitad de la noche (ZT18) (Tamaru *et al.*, 2000), y que el comportamiento rítmico en antifase entre PER1 y BMAL1 no es exclusivo del NSQ, sino que también se presenta en otros órganos como el corazón, riñón y pulmón (Oishi *et al.*, 1998a) e incluso, en diferentes regiones del cerebro (Chun *et al.*, 2015).

1.3.3. Fototransducción en el núcleo supraquiasmático

Una característica fundamental del sistema circadiano es la capacidad de ser sincronizado. En los mamíferos, la luz es el sincronizador más potente y la información fótica que llega a la retina viaja a través del RHT y llega directamente sobre el NSQ. Para que la luz sea recibida se requiere de la existencia de elementos especializados capaces de detectar dicha señal, los fotorreceptores retinianos clásicos son los conos y los bastones, que poseen pigmentos basados en la opsina y permiten la percepción de la luz; sin embargo, respuestas tales como cambios de fase inducidos por la luz y la inhibición de la producción nocturna de melatonina son mediados por otros fotopigmentos. En las células ganglionares de la retina se han hallado células IR y con expresión génica de melanopsina, lo cual sugiere que se trata de fotorreceptores circadianos, por lo que han recibido el nombre de células ganglionares retinianas intrínsecamente fotosensibles que contienen melanopsina (ipRGCs) (Hattar *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2011). Los criptocromos también han sido sugeridos como fotorreceptores dentro del sistema circadiano (Thresher *et al.*, 1998), pues se ha observado que contribuyen a la amplitud de la fototransducción retiniana, aunque no son estrictamente necesarios.

La transducción de la señal fótica dentro del NSQ comprende diversos procesos que permiten la generación de respuestas rítmicas. Cuando la señal lumínica llega a la retina, esta es detectada por células que transmiten la información a través del RHT hacia la región ventral del NSQ, donde libera al GLU y al PCAP (Chen *et al.*, 1999; Hamada *et al.*, 1999). El GLU actúa mediante sus receptores en el NSQ y sus respuestas dependen del tiempo circadiano al que se aplica el estímulo. Durante el inicio de la noche subjetiva, la exposición a la luz provoca un retraso de fase a través de la respuesta de los NMDA, los cuales inducen el flujo de calcio intracelular vía los receptores de rianodina (Ding *et al.*, 1998). Las acciones del Ca⁺ activan complejos como calmodulina/calcio, las cinasas MAP, así como la fosforilación de CREB lo que

conlleva a la expresión génica por la vía de Ca/CREs, en particular del gen *per1* (Gillette & Tischkau, 1999).

Cuando la exposición a la luz ocurre durante el final de la noche, provoca avances de fase, lo cual parece ser controlado por el GLU y su receptor NMDA mediante la producción de óxido nítrico (NO), el cual activa la forma soluble de la guanilato ciclasa (sGC) y por lo tanto, se da la activación de la cinasa dependiente de cGMP (PKG); de esta forma, se sugiere que la vía implicada durante el final de la noche para los avances de fase es sGC-cGMP-PKG (Golombek *et al.*, 2004). Así, el NSQ es sensible a los análogos del cGMP sólo durante la noche subjetiva, es decir, durante la ventana temporal en donde se pueden presentar avances de fase; tal activación se presenta en antifase con la activación del cAMP, la cual induce cambios de fase cuando el estímulo es aplicado durante el día subjetivo (Golombek & Rosenstein, 2010).

A nivel del NSQ, se ha identificado que *c-fos* es inducido 30 minutos después de un pulso de luz y su respuesta declina gradualmente (Kornhauser *et al.*, 1990). La vía por la cual se presenta la expresión de *c-fos* es mediante CREB, pues cuando se fosforila por respuesta ante el estímulo luminoso, la proteína se une al sitio CRE dentro del gen de *c-fos* activando su transcripción (Ripperger & Brown, 2010), por lo que, aunque este gen de expresión temprana ha sido empleado para el estudio de los efectos de las luz a nivel de la maquinaria molecular del reloj.

El gen *Per* también es inducido 1- 2 h después de un pulso de luz, *Per1* se induce al inicio y al final de la escotofase, mientras que la inducción de *Per2* se restringe al final de la fotofase (Yan & Okamura, 2002); sin embargo, existe discrepancia sobre la fotoinducción de *Per2*, ya que pueden deberse al método experimental usado. La inducción de los genes de *Per* tiene una relación directa con la generación de los cambios de fase, pues el *Per1* posee un sitio CRE funcional en su región reguladora, el cual es un sitio donde se une el factor de transcripción CREB (Travnickova-bendova *et al.*, 2002).

2. ANTECEDENTES

2.1. Efectos de los estrógenos sobre el sistema circadiano en hembras

Este tema será dividido en dos antecedentes principales: los efectos de los estrógenos sobre la actividad locomotriz en hembras y los estudios realizados a nivel de la maquinaria molecular del reloj circadiano. Una de las primeras investigaciones acerca del papel de los estrógenos en la fisiología circadiana fue hecha en hámster, registrando los movimientos mediante rueda de actividad (Morin *et al.*, 1977), en la que se demostró que la administración continua de estradiol exógeno tiene influencia sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz, de tal forma que reduce el valor τ en oscuridad constante y genera un avance en el ψ durante un fotoperiodo de LO 12:12, por lo que el inicio de su actividad se anticipa al sincronizador. Además, en condiciones constantes de LL, la administración de cápsulas de estradiol evita la desfragmentación o bipartición del ritmo de actividad locomotriz en dos componentes (fenómeno llamado como *splitting*) en hembras de hámster OVX, pero no en machos (Morin & Cummings, 1982); por lo que el estradiol, además de tener efecto sobre τ , también lo hace sobre la sincronización fótica. Sin embargo, otro estudio en ratones reportó que, la eliminación de las gónadas genera cambios diferentes entre sexos: en machos aumenta el valor de τ y disminuye la cantidad y la duración de la actividad locomotriz, mientras que en hembras sólo disminuye la actividad (Iwahana *et al.*, 2008).

En ratas, los registros con rueda de actividad a lo largo del ciclo estral, tanto en libre curso como en sincronización (LO 14:10), demuestran que durante el proestro y el estro hay mayor cantidad de actividad y el valor de τ es menor en comparación con el metaestro y el diestro (Albers, 1981). En hembras de hámster hay aumento en la actividad locomotriz durante el estro y el proestro (Moore & Eichler, 1972) y también en el roedor diurno *Octodon degus* (Labyak & Lee, 1995).

El uso de organismos genéticamente modificados ha sido otra línea de investigación que ha permitido explorar los efectos de los estrógenos sobre los ritmos circadianos. El primer estudio reveló que tanto machos como hembras WT aumentan su actividad locomotriz después de la administración de BE, lo cual también ocurrió en los β ERKO, pero no en los machos de α ERKO; por otra parte, en ambos organismos KO, sólo en hembras aumentó la actividad en

campo abierto. Con base en estos resultados se concluye que en ambos sexos la actividad en rueda es mediada principalmente por el ER α (Ogawa *et al.*, 2003).

En otro estudio, se caracterizó la interacción de los estrógenos y la ritmicidad circadiana usando ratones (machos y hembras) α ERKO y ratones NERKI, los cuales son incapaces de responder mediante “la vía clásica” de los RE, pero sí mediante la vía “no clásica”. Ambos modelos mantienen la funcionalidad de sus RE β . Tanto NERKI como α ERKO presentaron menor actividad en rueda de actividad durante la escotofase, tal fenómeno fue más significativo en las hembras. Por otra parte, después del apagado de las luces, los ratones macho NERKI iniciaron su actividad más tarde y en OO el ritmo circadiano de actividad incrementó su τ . En hembras α ERKO aumentó la duración de la actividad en OO, mientras que en machos α ERKO ocurrió en LL. Este estudio propone la participación de los estrógenos ante la respuesta a la luz a nivel del NSQ mediante una cascada de señalización intracelular (Blattner & Mahoney, 2012).

Los efectos de la luz sobre el NSQ ha sido uno de los mecanismos de entrada al reloj circadiano más estudiado. El efecto del estradiol sobre la foto inducción a nivel del NSQ aumenta la respuesta de células IR-C-FOS e IR-p-CREB (Abizaid *et al.*, 2004), así como en condiciones de LO (Peterfi *et al.*, 2004). El cambio conductual de la respuesta a la luz en diferentes horas del día permite la construcción de la CRF, la cual es un método que explora la sensibilidad a la luz (o a cualquier sincronizador) del sistema circadiano. Este método ha sido empleado para conocer los efectos de los estrógenos a nivel de la integración a la sensibilidad lumínica en ratones (machos y hembras) ArKO, los cuales tienen una deficiencia funcional en el gen *cyp49*, por lo que no pueden producir la enzima citocromo P450 y por lo tanto son deficientes en estrógenos. Los resultados obtenidos indican que en machos WT, el inicio de la actividad y la actividad total diaria disminuyen, mientras que τ aumenta cuando son GDX. En hembras también disminuye el total de actividad, pero el valor de τ no cambia y presentan un avance de fase más largo al comienzo del día subjetivo después de la OVX; así mismo, las hembras ArKO/OVX presentan retraso en el inicio de su actividad (Brockman *et al.*, 2011).

Un estudio reciente caracterizó la CRF en ratones machos y hembras α ERKO y NERKI y se obtuvo que las hembras silvestres WT tuvieron un mayor retraso de respuesta a la luz

y un adelanto de fase menor que las α ERKO; mientras que en machos, los ratones ERKI presentaron un mayor adelanto con respecto a los WT y los α ERKO, por lo que la señalización estrogénica tiene un papel sobre la respuesta a la luz en el sistema circadiano (Blattner & Mahoney, 2013). Posteriormente se observó que las hembras WT- OVX, aumentan su actividad más que las α ERKO después de una dosis alta de E2; además, las WT, α ERKO y NERKI OVX, inician antes su actividad con la administración de E2 y sólo en las WT hay una disminución de τ y una mayor respuesta en el adelanto de fase mediante el análisis de la CRF. Estos resultados sugieren que el RE β también tiene una participación en las respuestas del sistema circadiano (Blattner & Mahoney, 2014).

En un estudio que tuvo como objetivo determinar el efecto de la activación de los ER en los patrones diarios de actividad, mediante el registro de ésta por medio de la rueda de actividad, se demostró que la activación del ER β modificó la distribución del perfil diario de actividad y un adelanto en el inicio de ésta; mientras que la activación del ER α aumentó la amplitud de la actividad. Con base en estos resultados, la activación de ER α incrementa la magnitud de la actividad, mientras que la del ER β controla la fase y la distribución temporal de la actividad (Royston *et al.*, 2014).

Se ha descrito, a nivel del NSQ, que una inyección de 20 μ g E2 aumenta la expresión del mRNA de la conexina 32 (Shinohara *et al.*, 2000) y la conexina 36 (Shinohara *et al.*, 2001), proteínas implicadas en las uniones gap. Recientemente, usando registros electrofisiológicos *in vitro* de tejido del NSQ de rata, se observó que el E2 aumenta la excitabilidad neuronal mediante el aumento de la frecuencia de disparo y la despolarización neuronal (Fatehi & Fatehi-Hassanabad, 2008). Por otra parte, el aumento de E2 durante el desarrollo folicular promueve las formaciones sinápticas entre el NSQ y las neuronas liberadoras de GnRH (Morin & Allen, 2006). Estos estudios sugieren que los estrógenos participan en el acoplamiento de las neuronas que constituyen al NSQ.

Las investigaciones de Nakamura y cols., han demostrado que en el NSQ de ratas tratadas con E2, el mRNA de *Cry2* disminuye en dos puntos temporales (ZT6 y ZT18) (Nakamura *et al.*, 2001). Además, en el mRNA de *Per2* se presentó un adelanto de fase y una tendencia a disminuir los niveles durante la noche subjetiva (Nakamura *et al.*, 2005). Al siguiente año, reportaron que la expresión de PER2 tuvo un incremento en el núcleo medial de la amígdala

durante el proestro, el cual disminuyó gradualmente y presentó un retraso de fase entre el proestro y el diestro; sin embargo, no hay cambios en la expresión a nivel del NSQ (Perrin *et al.*, 2006). En otro estudio con ratones *knockin* en PER2 que poseen un promotor de luciferasa (PER:LUC), cuyas células del NSQ se analizaron por medio de cultivos celular, se demostró que la administración de E2 no alteró el valor de τ en la expresión de PER2 (Nakamura *et al.*, 2008). Por otra parte, en cultivos de NSQ de hembras de ratón, no se observan cambios en la bioluminiscencia de PER2 entre el proestro y el metaestro (Nakamura *et al.*, 2010), por lo que concluyen que no existe una retroalimentación directa entre el NSQ y los estrógenos ováricos. Contradictoriamente, Gery y cols. demostraron en una línea celular de cáncer de mama (MCF-7), que el E2 aumenta los niveles de mRNA de *Per2* vía el ER α (Gery *et al.*, 2007). En un estudio reciente, se observó que en el cultivo del tejido de NSQ de ratas, el pico de expresión de PER2 varía un poco con respecto a la etapa del ciclo estral (diestro ZT13, proestro ZT15, estro ZT14, metaestro ZT12) y este valor es distinto en ratas OVX (ZT9), el cual es además, similar al de machos intactos (Sellix *et al.*, 2013).

En otros tejidos, como en el útero, el E2 acortó el τ de *Per2* (Nakamura *et al.*, 2008); mientras que el ritmo de *Per2* en hígado y riñón se modificó en ratas OVX (Nakamura *et al.*, 2005). Las diferencias observadas a nivel del reloj molecular podrían deberse en parte a los diferentes ER, pues en el NSQ de hembras se expresa principalmente el ER β (Vida *et al.*, 2008), mientras que en hígado, riñón y útero, predomina el ER α (Nakamura *et al.*, 2005).

Hasta el momento, algunos efectos de los estrógenos resultan contradictorios, pues mientras ciertas investigaciones apuntan que no hay efectos en τ y en la actividad en modelos múridos de machos GDX (Hummer *et al.*, 2012), ni que tienen un papel fundamental en la función de los ritmos circadianos (Blattner & Mahoney, 2013), otras demuestran que sí (Blattner & Mahoney, 2012; Hummer *et al.*, 2012). Con respecto a las hembras, cuando son OVX aumenta el valor de su τ (Morin *et al.*, 1977); sin embargo, en hembras α ERKO y NERKI, las cuales son incapaces de responder al estradiol circulante mediante el ER α , no hay cambios en su τ (Blattner & Mahoney, 2012). Inclusive, se ha sugerido que los ER no tienen un papel importante en el NSQ (Butler, *at. al.*, 2012; Nakamura *et al.*, 2010, 2008). Vale la pena considerar que en los ratones machos hay una mayor cantidad de receptores a andrógenos que las hembras (Iwahana *et al.*, 2008); mientras que

en las hembras son más abundantes los ER β (Vida *et al.*, 2008), lo que permite pensar que el papel de los estrógenos es dependiente del sexo y por eso son comprensibles las diferencias obtenidas entre los estudios.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las hormonas ováricas influyen en las respuestas conductuales y fisiológicas que están bajo el control del sistema circadiano. Los mecanismos que subyacen esta relación recientemente comienzan a ser explorados. Se sabe que, en las hembras del ratón, una deficiencia en la señalización de esteroides induce cambios en el periodo y en el perfil diario de actividad locomotriz (Iwahana *et al.*, 2008); es de suponer que en las hembras de *Neotomodon* exista un efecto similar y que, en parte, las posibles diferencias pudieran estar relacionadas con la señalización de estrógenos a nivel del núcleo supraquiasmático. Así mismo, se sabe que en el ratón, la ovariectomía aumenta la expresión de ER (Vida *et al.*, 2008), mientras que el estradiol incrementa la expresión de C-FOS y del P-CREB (Abizaid *et al.*, 2004), ambas proteínas implicadas en la expresión génica de PER. Por otra parte, el uso de la rueda de actividad altera la medición de variables rítmicas (Novak *et al.*, 2012) y el registro de actividad en *Neotomodon alstoni* es muy claro sin necesidad de emplear la rueda para la obtención de actogramas (Fuentes-Granados *et al.*, 2010), gráficas indispensables para el análisis de los ritmos circadianos.

En el presente proyecto se plantearon las siguientes preguntas de investigación:

¿Existe influencia endocrina del ovario en la expresión del ritmo circadiano de actividad locomotriz y la sincronización fótica en *Neotomodon alstoni*?, de ser así ¿es posible observar esta influencia a nivel de la expresión de las proteínas de genes de reloj PER1 y BMAL1 en el NSQ?

Lo anterior representa una contribución original respecto al entendimiento de los efectos de los estrógenos sobre el sistema del reloj circadiano en esta especie, así como una referencia para comparar si la interacción pudiera ser común entre roedores múridos, en donde no existe influencia de la rueda de actividad.

HIPÓTESIS

Si en *Neotomodon alstoni*, los estrógenos ováricos influyen en la regulación circadiana de la actividad locomotriz, entonces la ausencia del ovario aumentará τ , así como la expresión de proteínas de reloj, PER1 y BMAL1 en el NSQ, en correlación con un aumento en la expresión de ER β .

OBJETIVOS

General: Determinar si en ratones de *Neotomodon alstoni* existe influencia del estrógeno ovárico hacia el NSQ mediada por receptores a estrógenos.

Particulares:

1. Caracterizar los cambios en el ritmo de actividad locomotriz con respecto a las etapas del ciclo estral en LO 12:12
2. Caracterizar los cambios producidos por la OVX en:
 - 2.1. el periodo del ritmo circadiano (τ) de la actividad locomotriz y en el perfil de actividad, en condiciones de oscuridad constante y durante la sincronización en LO12:12.
 - 2.2. la respuesta de cambio de fase del inicio de actividad ante pulsos de luz blanca de 1 h.
 - 2.3. determinar el perfil diario de la expresión de ER β , PER1 y BMAL1 en NSQ en animales sincronizados a fotoperiodo.
3. Determinar el efecto de la aplicación exógena de 50 μ g de BE sobre:
 - 3.1. la expresión de PER1 y BMAL en el NSQ alrededor de la fase en que exista mayor presencia de PER1.
4. Proponer una correlación entre: los cambios observados en la expresión de PER1 y BMAL1 en NSQ con respecto a los cambios observados en las propiedades del ritmo de actividad locomotriz.

3. METODOLOGÍA

Mantenimiento de animales: Se usaron hembras adultas *Neotomodon alstoni* (n=30) de 6-8 meses de edad, criadas en el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. Las ratonas se

colocaron individualmente en cajas de acrílico bajo un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 de oscuridad (LO 12:12) a una intensidad de 200-250 lx, con encendido de luces a las 06:00 h y apagado a las 18:00 h, a temperatura ambiente de 23-26°C. Las ratonas fueron alimentadas con nutricubos estándar para roedor (Rodent Laboratory Chow 5001, Purina) y agua *ad libitum*. La manipulación de las ratonas se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-1999 y la guía para cuidado y uso de animales de laboratorio NIH y bajo la supervisión profesional del MVZ, responsable del Bioterio de la Facultad de Ciencias.

Registro de actividad locomotriz y pulsos de luz: las hembras se colocaron individualmente en cajas de vidrio de 30cm x 18cm x 20cm con tapa de acrílico desmontable. Lateralmente sobre las cajas se montó el sistema de sensores infrarrojos. Cada interrupción generada por el desplazamiento del roedor fue almacenada a una frecuencia de muestreo de 10 minutos con el programa ACTIBIO (F. Psicol. URIDES-F. Ciencias, UNAM).

Citología vaginal y concentración de estradiol en plasma: con el fin de conocer la regularidad del ciclo estral en las hembras de *N. alstoni* (n=10) y su relación con la cantidad de E2 en plasma en las diferentes etapas del ciclo estral, se tomaron muestras de epitelio vaginal durante 20 días en el mismo intervalo horario (ZT12-16). La apertura vaginal se humedecía con solución salina (NaCl 0.9%) y mediante un asa bacteriológica esterilizada, se colectaron las muestras del epitelio vaginal y se colocaron en portaobjetos, fueron teñidos mediante hematoxilina-eosina y examinados bajo microscopio óptico con el objetivo de 10 X (Zeiss, AX10). La identificación de las etapas del ciclo estral de acuerdo con la presencia de leucocitos, células nucleadas y cornificadas (Felicio *et al.*, 1984). Una vez que la etapa fue determinada y bajo previa anestesia con isoflurano (Dorin, Halocarbon Labs, USA), se tomaron muestras sanguíneas mediante punción del seno orbital mediante tubos capilares heparinizados, los cuales se centrifugaron a 3,500 rpm durante 5 min para la obtención de un volumen aproximado de 250µl de plasma. Las concentraciones de estradiol fueron cuantificadas mediante radioinmunoanálisis (RIA) con el equipo Compugamma gamma counter modelo 1282 (LKB-Wallac) en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Ovariectomía bilateral: la cirugía se realizó en un ambiente aséptico y bajo la supervisión de un médico veterinario. Se eligieron hembras en la etapa del diestro; las ratonas fueron anestesiadas con ketamina/xilacina (0.05 mg/50 g) y se realizaron dos cortes laterales a la

columna vertebral para extraer ambos ovarios. Las incisiones fueron suturadas con hilo absorbible en el músculo e hilo estéril en la piel. A otro grupo de ratonas, se les realizó el mismo procedimiento quirúrgico, pero sin extirpar los ovarios, conformando al grupo de cirugía simulada (grupo *sham*). Después de la cirugía, las ratonas se mantuvieron en recuperación por lo menos durante 20 días, en los cuales se les observaba y limpiaba con frecuencia las suturas para su correcta cicatrización.

Inmunohistoquímica: las ratonas fueron sacrificadas mediante una dosis de 1ml/Kg de pentobarbital sódico a una concentración de 6.6g/100ml (Cheminova ®) para su posterior perfusión intracardiaca con PBS-Paraformaldehído al 4%. Después, se obtuvieron los cerebros y se fijaron durante 24h en paraformaldehído, 24h en solución de glucosa al 10%, 24h en solución de glucosa al 20% y 24h en solución de glucosa al 30%. Los cerebros fueron embebidos en un medio crioconservador (Tissue-Tek®) para la obtención de los cortes del NSQ (30 micras) con un criostato (Leica, CM1860). Las series de los cortes se colocaron en pozas de plástico (USA Sci) sumergidas en solución anticongelante a una temperatura de -20°C hasta su posterior uso.

Para el tratamiento de los cortes en inmunohistoquímica (IHQ) por flotación, se realizaron 3 lavados en PBS-tween20 (0.1%), una vez concluidos los lavados se colocaron durante 2h en BSA+PBS-tween20 y los cortes se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal de PER1 (Novus Biologicals NB300-564, dilución 1:200), BMAL1 (Abcam ab3350, dilución 1:200) o ER β (Santa Cruz Biotechnology SC8974, dilución 1:50). Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-tween20 (0.1%) y se colocaron durante 2h en anticuerpo secundario biotinilado (antirabbit IgG H+L vector®, BA1100,). Finalmente, las rebanadas se revelaron con el kit de diaminobencidina (vector® estándar ABC, SK-4100) y se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante 48 h, posteriormente se les colocó solución de montaje y cubre objetos para ser observados al microscopio óptico (Zeiss AX10) y fotografiados con una cámara digital (Axiocam ERc5S) y colectadas mediante el programa AxioVisio 4.8.3.

Estradiol exógeno: Dos grupos de hembras OVX (n=4 para cada grupo), fueron mantenidas en LO 12:12 durante al menos 30 días y se les inyectó de manera subcutánea 50 μ g de BE (sigma-Aldrich®, E8515) (Legan *et al.*, 1975) o vehículo (aceite vegetal de ajonjolí) durante el

ZT16. Las ratonas fueron sacrificadas por perfusión intracardiaca 11 horas después (ZT3), pues de acuerdo con un análisis previo se determinó que en *N. asltoni*, se alcanza la máxima concentración de E2 en plasma después de 4 horas (ver anexo 3) y se consideraron las 6 horas que transcurren en la expresión de gen a proteína. Una vez sacrificadas se obtuvieron y fijaron los cerebros para su posterior procesamiento mediante IMQ de las proteínas PER1, BMAL1 y ER α .

Diseño Experimental:

1. Un grupo de hembras adultas (n=10) fueron mantenidas en fotoperiodo LO 12:12, con encendido y apagado de las luces a las 6:00 y 18:00 h, respectivamente. Entre el ZT12-16 se tomaron las muestras del epitelio vaginal; así como las muestras de sangre para la cuantificación de E2 en las 4 etapas del ciclo estral: metaestro, diestro, proestro y estro.

2. Para conocer los efectos de la OVX sobre los parámetros de la actividad locomotriz circadiana y sobre la sincronización y sensibilidad fótica, se registraron a las hembras en fotoperiodo LO12:12 durante al menos 30 días, posteriormente se pasaron a OO con un foco de luz roja tenue (3 lux) durante 30 días. Bajo estas condiciones se les aplicó un pulso de luz (1h, 300 lx) en la zona de retrasos (CT14) y zona de adelantos (CT22) y se mantuvieron en libre curso nuevamente durante 15 días más. El protocolo anteriormente descrito se realizó en el grupo de hembras intactas, hembras con cirugía *sham* y OVX. Finalmente se sometieron de nuevo a una sincronización fótica de LO 12:12 (figura 8).

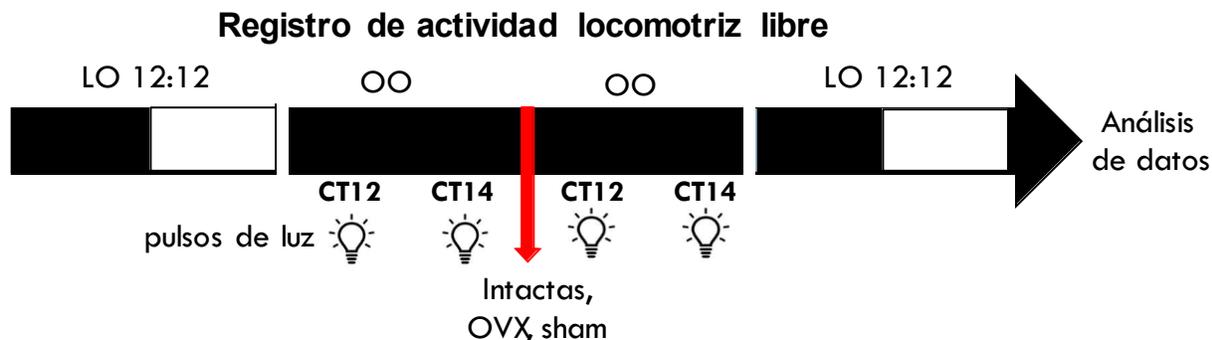


Figura 8. Línea temporal que esquematiza el protocolo y la progresión del registro del ritmo de actividad locomotriz libre en las hembras de *N. alstoni* en las diferentes condiciones de iluminación. La línea roja indica el momento en el cual se llevó a cabo la OVX, cirugía sham o ningún procedimiento. Los focos se refieren al pulso de luz.

Con el fin de evitar los posibles artefactos ocasionados por la manipulación de los animales para la toma del frotis vaginal, los registros de actividad fueron hechos en condiciones sin intervención para cada uno de los grupos de hembras (intactas, sham y OVX) y posteriormente, los frotis se hicieron fuera de registro.

3. Para conocer el efecto de los estrógenos sobre el perfil diario de las proteínas PER1, BMAL1 y ER β en el NSQ, se usaron los cerebros de las hembras sham (en diestro) y OVX, los cuales fueron obtenidos mediante perfusión intracardiaca en los ZT4, 9, 13, 18 y 23. Se cuantificó la expresión de las proteínas mediante el conteo de células con reactividad o en su defecto por la densidad óptica de la reacción inmunohistoquímica. Una vez obtenido este resultado se aplicó una inyección subcutánea de BE y/o vehículo a hembras OVX en el ZT16, elegido por los resultados obtenidos en el perfil diario. Luego y conforme a la elevación de la expresión de PER1, los animales se sacrificaron en el ZT3, permitiendo que el BE alcanzará su máxima concentración en el plasma (ver anexo 1) y de esta forma, asegurar la expresión de las proteínas para analizar de nuevo la localización y cuantificación de PER1 y BMAL1 en NSQ mediante inmunohistoquímica (figura 7).

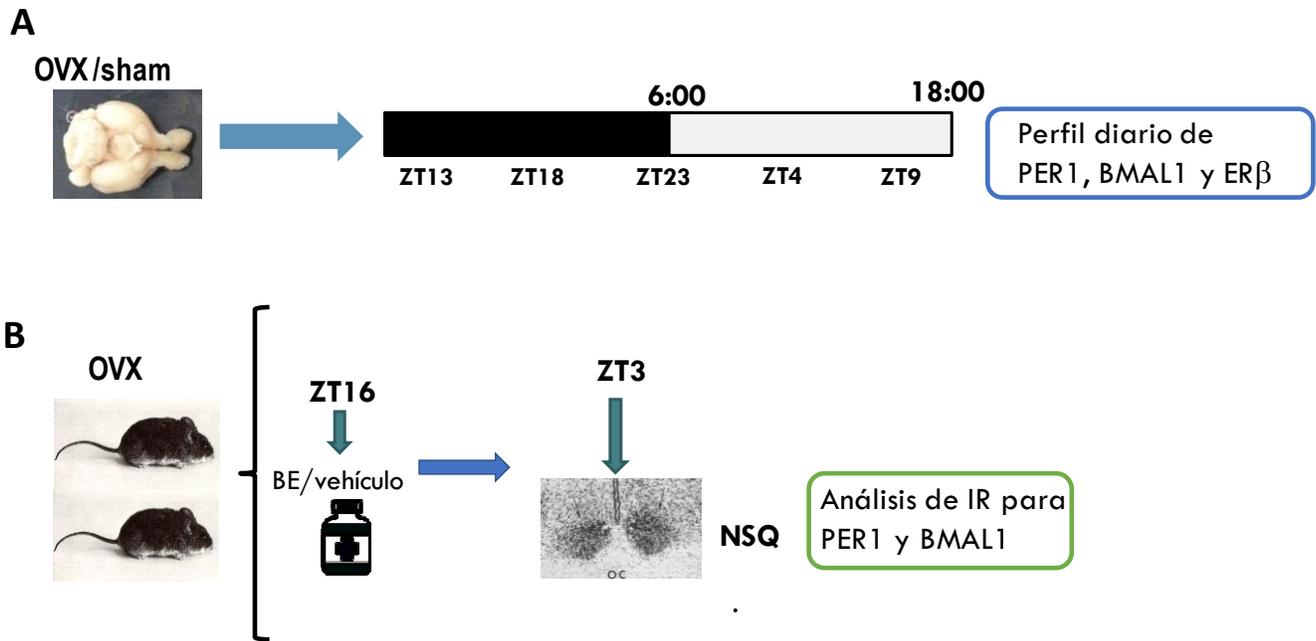


Figura 9. Protocolo para caracterizar los efectos del BE en el NSQ. Se indica la determinación del perfil diario de PER1, BMAL1 y ER β por iMQ en hembras OVX y sham (A). Se indica el momento en que se aplicó el BE para conocer los efectos sobre la expresión y localización de PER1 y BMAL1 (B).

Análisis de datos: Los resultados obtenidos de los frotis vaginales se graficaron de acuerdo a la progresión de la presencia de los diferentes tipos celulares (Takasu *et al.*, 2015). Para la obtención de τ , se analizaron durante 10 días consecutivos mediante el periodograma de Lomb-Scargle con el programa de Chronosfit® (Zuther y Lemmer, 2004), se consideraron los periodos circadianos e infradianos significativos ($P < 0.05$). Para reconocer algún cambio de acuerdo con el ciclo estral. La amplitud y acrofase en LO 12:12, así como el ψ entre el inicio de actividad y el apagado de las luces fueron determinados mediante el software ActiView®; se consideró un ψ positivo si la actividad iniciaba antes del apagado de las luces y negativo si lo hacía después del apagado (Daan y Aschoff, 2001). El inicio de actividad fue definido por 10 minutos consecutivos que tuvieron un valor igual o mayor al del promedio diario de interrupciones y ese bloque de actividad no debía estar seguido de algún intervalo de 10 minutos de inactividad (Blattner & Mahoney, 2014; Royston *et al.*, 2014). Las diferencias entre los parámetros analizados, dependiendo si se comparaban dos o tres grupos se analizaron mediante las pruebas estadísticas T de Student o ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post hoc* de Tukey.

Para conocer la acrofase diaria en hembras intactas durante LO 12:12, se obtuvieron datos de 25 días consecutivos y se trataron por medio del análisis circular de Rayleigh¹; se realizaron comparaciones entre el grupo de hembras intactas, OVX y sham con la prueba estadística de Mardia-Watson² mediante el software Oriana® y se representaron mediante histogramas circulares.

Los cambios ocasionados por los pulsos de luz en CT14 y CT22 se evaluaron proyectando una línea vertical sobre los inicios de actividad, la cual se consideró como la fase de referencia (ϕ_r). La línea incluyó al menos 5 días previos al pulso de luz y hasta 10 días después, de tal forma que la diferencia de la distancia en horas entre la ϕ_r previa a la luz y 10 días después del pulso determinaron el $\Delta\psi$ (Aschoff, 1965). La magnitud del cambio fue graficada en el eje de las ordenadas, mientras que en el de las abscisas se graficaron los CT elegidos. Las comparaciones entre tratamientos y grupos se hicieron con el software estadístico GraphPad®.

Los análisis de imágenes de IHQ se realizaron contando unilateralmente el NSQ mediante el programa ImageJ (NIH®), en el cual se definió un óvalo de 30.61 de área, con un ancho de 446 μ m y 650 μ m de alto, el cual incluía a todo el NSQ. El conteo se hizo manualmente considerando la IR como una marca franca y nítida. Se contaron 3 ratonas en cada punto temporal y de cada ratona se analizaron 3 rebanadas³ a lo largo de la extensión rostro-caudal del NSQ. Para las muestras de cada organismo y cada punto temporal se obtuvo el promedio de células IR, el cual se representó con su respectivo error estándar. Además, se realizó un segundo análisis de densidad óptica mediante número de pixeles invertidos en el mismo óvalo definido previamente. El análisis estadístico fue mediante ANOVA de 2 vías con GraphPad® y un análisis de COSINOR⁴ mediante el programa Cosana®.

Finalmente, con Excel (Microsoft® Office 365) se hizo un análisis de correlación de Pearson entre el promedio de las horas de la actividad correspondientes a los mismos horarios

¹ Prueba paramétrica de estadística circular, empleada para evaluar diversos grupos y comprobar si la población de un conjunto de datos difiere significativamente de la uniformidad.

² Análisis cuyo propósito es saber que tan significativamente diferentes son las muestras entre ellas, la cual puede estar tanto en el ángulo promedio o en la varianza angular.

³ En algunos casos sólo se contó con dos rebanadas debido al daño en la obtención del tejido. Sin embargo, el total de la muestra cuando fue el caso era de 6.

⁴ Análisis de ajuste de curva por medio de mínimos cuadrados con el fin de determinar una aproximación cosenoidal a los datos. La función matemática para tal fin considera tiempo, acrofase, amplitud, frecuencia angular y mesor.

muestreados para el procedimiento de la IHQ para PER1, BMAL1 y ER β , con el fin de observar algún tipo de relación entre el perfil diario de actividad y el de estas proteínas en el NSQ.

4. RESULTADOS

4.1. Cambios citológicos y en la concentración circulante de E2 en plasma a lo largo del ciclo estral en *N. alstoni* en LO 12:12

Las hembras de *N. alstoni*, presentan una progresión de recambio en las células del epitelio vaginal similar al de otras especies de roedores empleadas en laboratorio. Durante el metaestro se da la presencia de células cornificadas, leucocitos y algunas células nucleadas (Fig. 10A); en el diestro se presentan principalmente leucocitos (Fig. 10B), mientras que en el proestro abundan las células nucleadas (Fig. 10C) y finalmente durante el estro predominan células epiteliales cornificadas (Fig. 10D). Así mismo, de las muestras de sangre colectadas en cada una de las etapas del ciclo estral (Fig. 10E), se obtuvo que durante el proestro existe la mayor concentración de E2 en plasma (116 ± 8.19 pg/mL), la cual decae significativamente en el estro (80 ± 10.72 pg/mL) y progresivamente vuelve a aumentar en metaestro (99.79 ± 1.37 pg/mL) y diestro (96.85 ± 8.19 pg/mL).

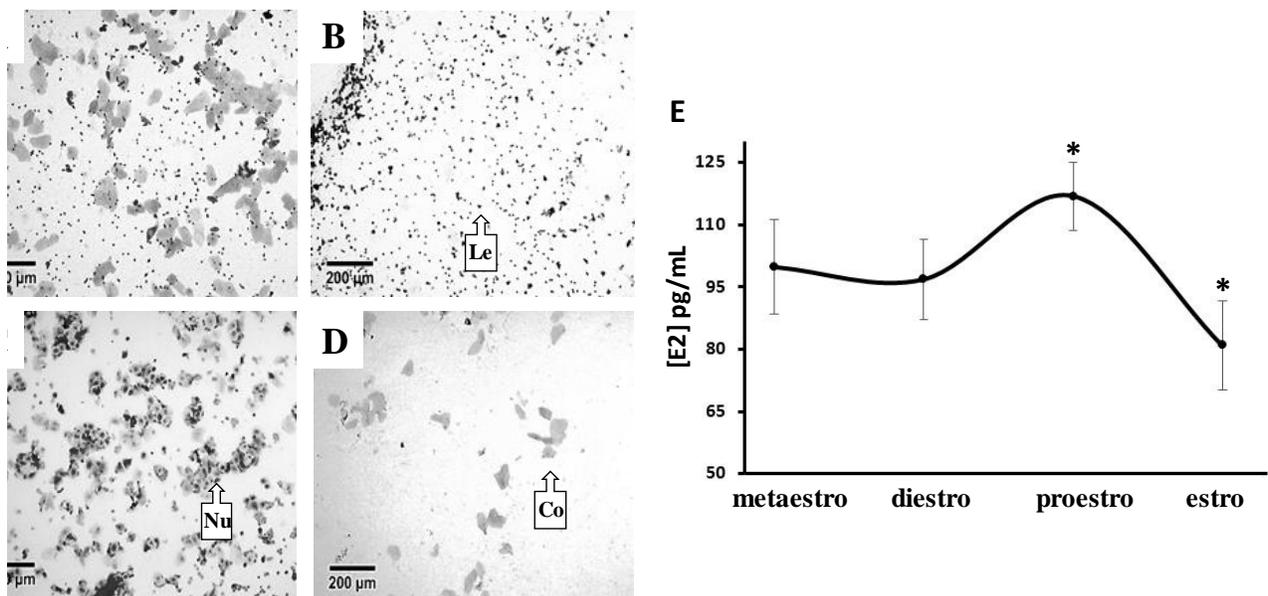


Figura 10. Citología Vaginal y progresión del ciclo estral en *N. alstoni*. Fotografías que muestran la citología vaginal durante las etapas del ciclo estral, las células cornificadas y leucocitos prevalecen durante el metaestro (A), gran prevalencia de leucocitos (Le) ocurre en el diestro (B), las células nucleadas (Nu) se observan sólo durante el proestro (C) y células cornificadas (Co) en el estro (D). En

el plasma se presentó un pico de concentración de E2 durante el proestro (E), la cual decae abruptamente en el estro (promedio \pm EE, * P < 0.05 ANOVA).

4.2. La actividad locomotriz presenta cambios en la amplitud relacionados con la progresión del ciclo estral.

Se analizó la regularidad de la progresión de las etapas del ciclo estral según el tipo celular obtenido mediante el frotis vaginal de 10 hembras intactas de *N. alstoni* y se comparó el valor del periodo durante 25 días seguidos, junto con el registro de actividad locomotriz sincronizado a ciclos LO 12:12. Es importante mencionar que ambos procedimientos se hicieron por separado para evitar las interferencias de la manipulación de las ratonas en el registro de actividad. En la gráfica 11A se observa que se completa un ciclo estral aproximadamente cada 4-5 días, así como un cambio en la amplitud de la actividad con la misma regularidad (figura 11B). En las hembras OVX la citología vaginal no presenta recambio y generalmente se observa la presencia de células cornificadas y leucocitos.

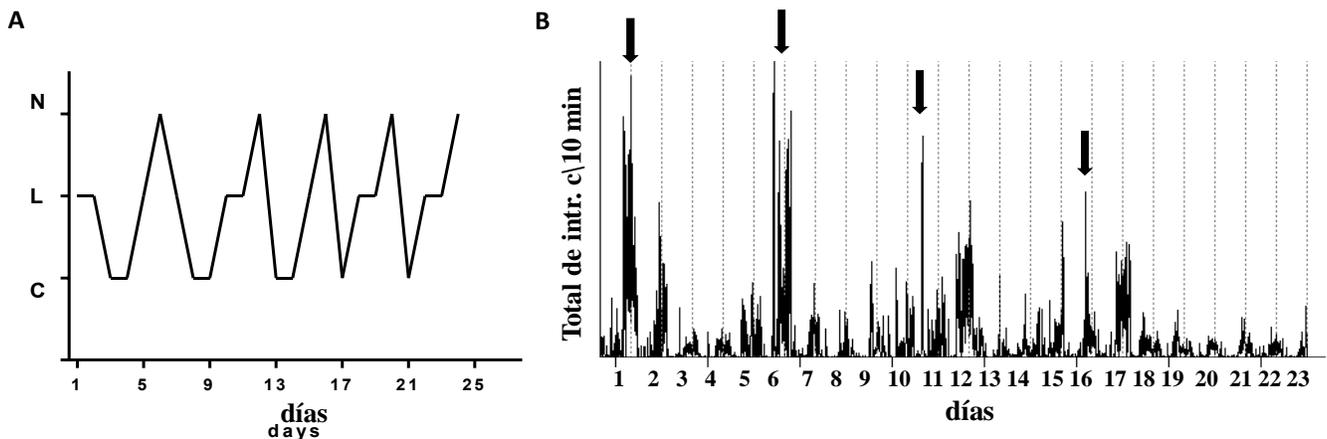


Figura 11. El ciclo estral se refleja en la citología vaginal y en la amplitud diaria de actividad locomotriz en *N. alstoni*. La progresión del ciclo estral se presenta cada 4-5 días aproximadamente (A), N=células nucleadas, L= leucocitos y C= células cornificadas; En el perfil diario de actividad, también puede observarse un patrón de mayor actividad que ocurre cada 4-5 días (B).

Debido a que se observó un patrón de actividad con una ocurrencia de 4-5 días en las hembras intactas, se analizaron los actogramas de hembras sham y OVX durante la fase de resincronización a LO 12:12 (fig. 12A) y se hizo un análisis de periodograma para detectar frecuencias infradianas semejantes al ciclo estral. El resultado se muestra en la Fig. 12B, en donde las hembras intactas presentan un ciclo infradiano con valor de 4.81 (\pm 0.18) días, las

hembras sham mantienen un valor similar de $4.9 (\pm 0.22)$ días; mientras que en las hembras OVX se pierde amplitud y el ciclo infradiano más cercano se reduce significativamente a $3.9 (\pm 0.51)$ días (fig. 12C).

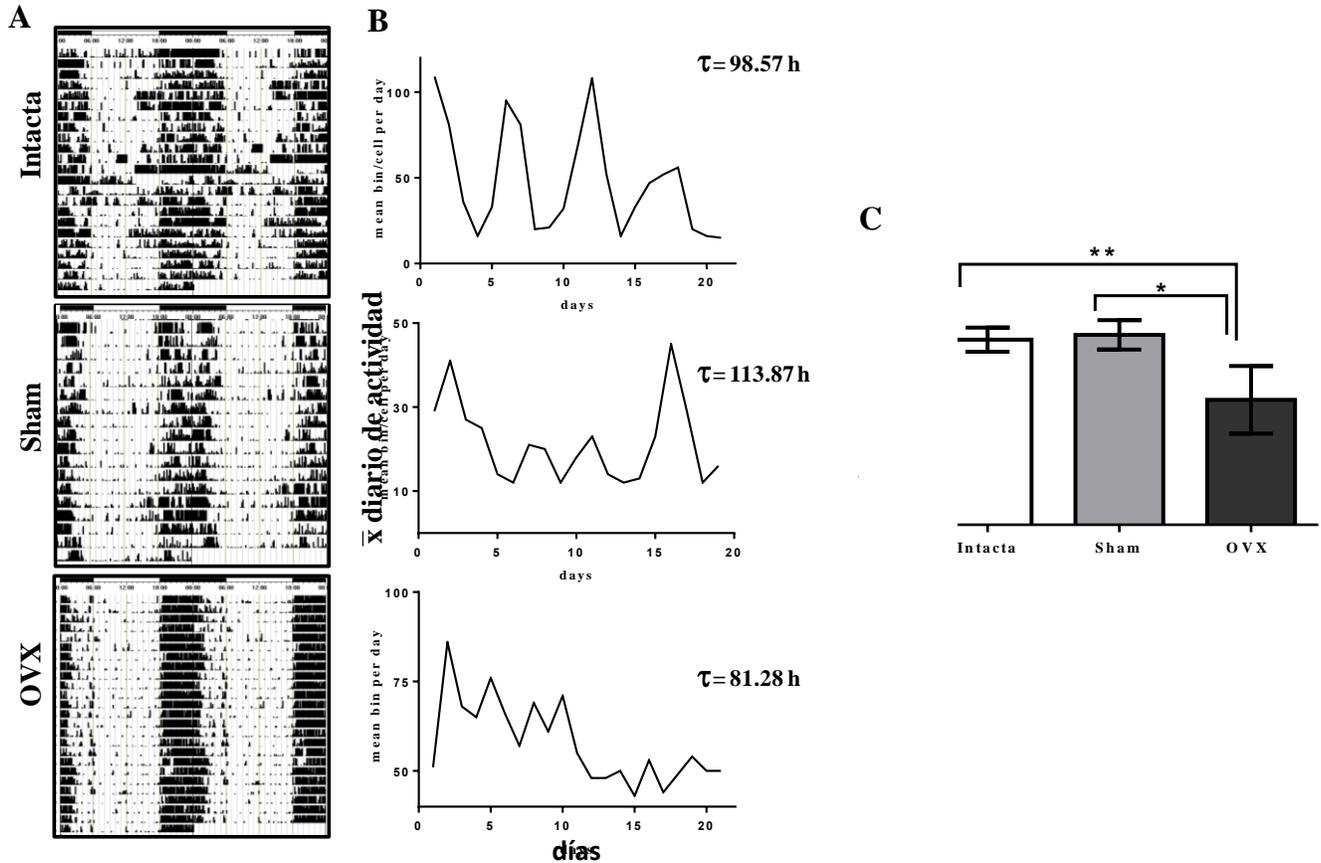


Figura 12. Relación entre actividad locomotriz en LO 12:12 y periodos infradianos. En (A), se muestran actogramas de doble gráfico representativos de cada uno de los grupos, tanto en el grupo de las intactas como las del sham notan cambios en intensidad de actividad y/o adelantos de inicio de actividad, pero no en las OVX. En B se muestran los correspondientes perfiles del promedio diario de actividad y en (C) valores del periodo infradiano similar entre los grupos sham e intacto, diferente al de las OVX (* $P < 0.02$, ** 0.005 prueba T de student).

4.3. La ovariectomía acorta τ e incrementa el perfil diario de actividad

Al inicio del protocolo de actividad todas las hembras fueron colocadas por al menos 15 días en LO 12:12, después se dejaron en condiciones constantes de OO y a un grupo de hembras se les quitaron ambos ovarios (OVX), mientras que al otro sólo se le practicó la cirugía simulada (sham). Se les dio un tiempo de recuperación de al menos 10 días y se continuó con el protocolo de pulso de luz y cambio de fase. En la figura 13 se muestran dos actogramas

representativos de cada uno de los grupos experimentales, así como de los efectos de la OVX sobre el ritmo circadiano de la actividad locomotriz en oscilación libre espontánea.

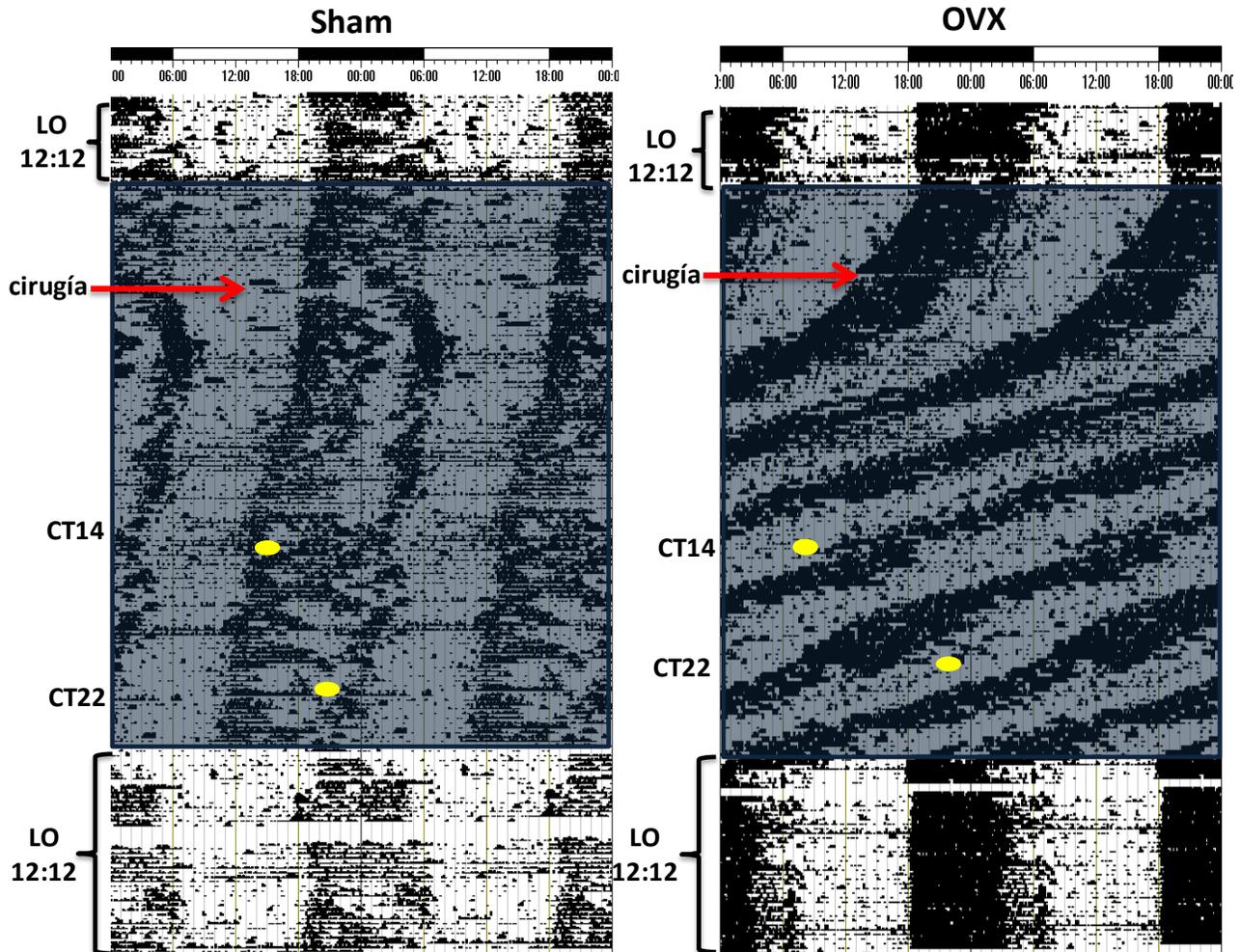


Figura 13. La ovariectomía cambia parámetros del ritmo circadiano de la actividad locomotriz en *N. alstoni*. Actogramas de hembras bajo condiciones de LO 12:12 y DD (zona sombreada); así como el efecto de la cirugía de OVX (a la derecha) y de sham (izquierda). Los puntos amarillos indican el momento en el cual se dieron los pulsos de luz en CT14 y CT22.

De acuerdo con los análisis hechos durante la sincronización fótica, todas las hembras son más activas durante la escotofase, sin embargo, de acuerdo con el tratamiento se presentaron cambios que enseguida se describen. El análisis de estadística circular realizado para analizar la acrofase entre grupos mostró diferencias entre el grupo de las OVX con respecto a las intactas y sham (fig. 14A). Las hembras intactas presentaron su acrofase en el ZT17:07 (\pm 16:50 - 17:25 h; $r = 0.86$) y las sham en ZT17:12 (\pm 16:58 - 17:27 h; $r = 0.82$), las OVX lo presentan antes, en el ZT16:48 (16:30 - 17:05 h; $r = 0.82$).

Después de la OVX, las hembras presentan un retraso significativo en ψ (fig. 14B) y comienzan su actividad 15.17 ± 7.1 min después del apagado de las luces con respecto a lo observado en las intactas del mismo grupo ($\psi = -7 \pm 5.3$ min). No se observaron diferencias en el grupo de las sham antes y después de la cirugía ($\psi = 1.85 \pm 4.95$ min vs. 12.27 ± 6.93 min).

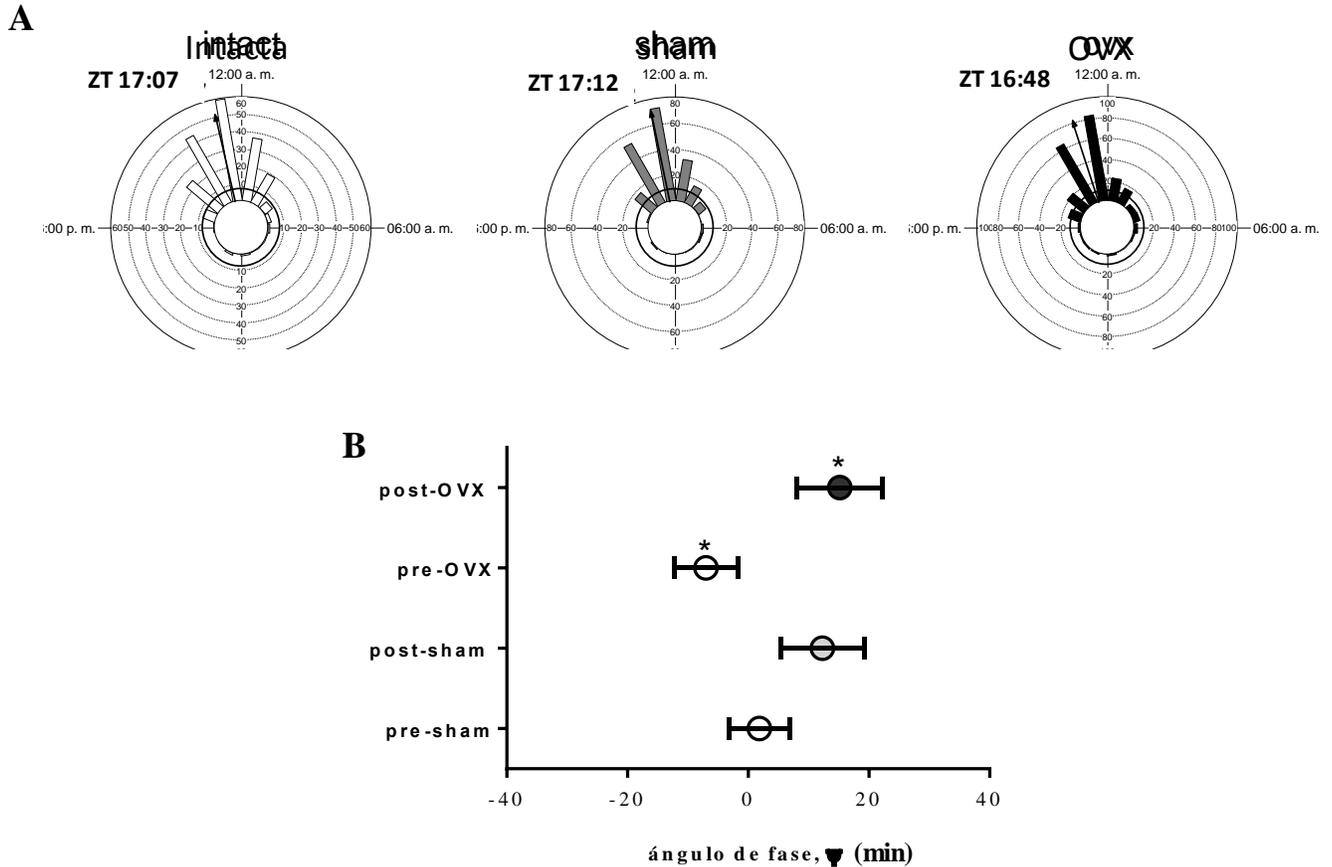


Figura 14. La ovariectomía tiene efectos en el inicio de actividad y la distribución de la acrofase. Las hembras OVX presentan antes su acrofase (A) de acuerdo con el análisis circular de Rayleigh (contrastada con Mardia- Watson, $*P < 0.05$). Después de la OVX (post-OVX) las ratonas inician su actividad 15 min después del apagado de las luces (B) ($*P < 0.05$).

Cuando las ratonas fueron expuestas de nuevo a la sincronización fótica en LO 12:12, el perfil diario de actividad en promedios de cada hora (Fig. 15A) presenta diferencias entre las 08:00 - 10:00 h (ZT14-16, indicado con el símbolo #) entre el grupo de las sham vs. Intactas, a las 16:00 h (ZT22) entre intactas y OVX y a las 21:00 h (ZT3) entre sham y OVX. Cuando la actividad se encuentra sincronizada, el cambio diario más evidente es un aumento de la

actividad en las ratonas OVX (76.7 ± 15.6 interrupciones /10 min) durante la escotofase (fig. 15C derecha, intactas = 27.6 ± 4.15 y sham = 23.1 ± 5.3 interrupciones/ 10 min); mientras que durante la fotofase los cambios no son significativos (fig. 15C izquierda, intactas = 5.15 ± 0.9 , sham = 8.7 ± 2.9 y OVX = 10.4 ± 2.2 interrupciones/10 min). Sin embargo, en el porcentaje total de actividad diaria analizada durante 10 días consecutivos, pudimos observar que las ratonas OVX incrementan su actividad significativamente en comparación con los otros grupos (fig. 15B, intactas = 100%, Sham = 99% y OVX = 130%).

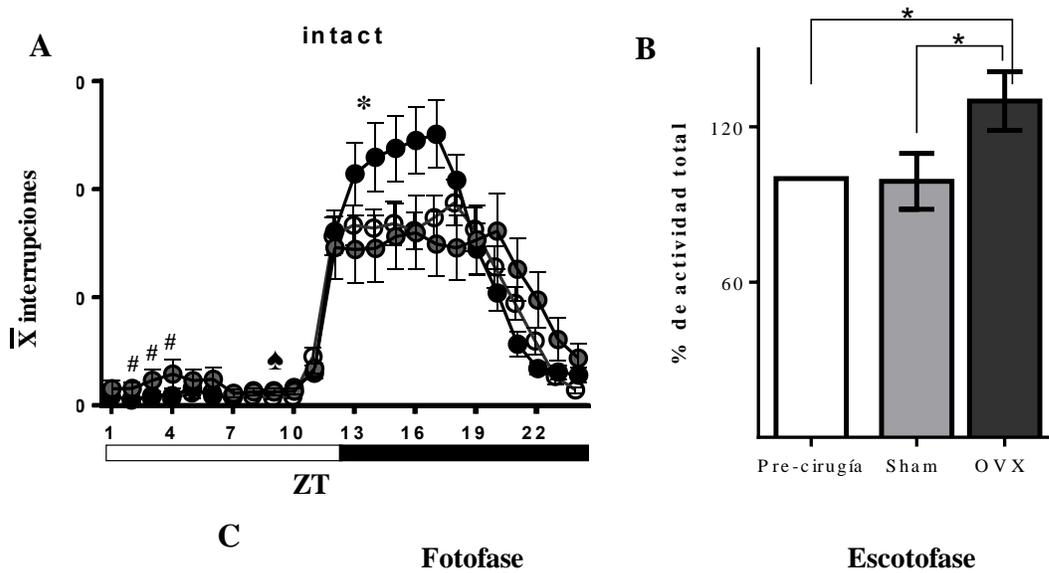


Figura 15. La ovariectomía aumenta la actividad locomotriz diaria en condiciones LO 12:12. En (A) se muestra el promedio cada hora de la amplitud diaria, durante 10 días consecutivos para cada grupo (n=10). Las ratonas sin ovarios (símbolos y barras oscuras) incrementan su actividad (# sham vs intacta, ♠ intacta vs OVX y * sham vs OVX). En (B) se muestra el porcentaje total diario de actividad es mayor en las hembras OVX con respecto a las intactas (símbolos y barras blancas) y las sham (símbolos y barras grises). En (C) se muestra el promedio de interrupciones tanto en fotofase como en escotofase. Las diferencias específicas ocurren durante la escotofase (C, derecha) (*P < 0.05, ANOVA).

Los efectos ocasionados por la OVX sobre el ritmo circadiano de actividad locomotriz durante condiciones constantes de OO se presentan en la fig. 16A, cuyos actogramas muestran 20 días del registro (16A) con su respectivo valor del periodo de τ en cada ejemplo. En la figura 16B se graficó el periodo, obtenido del promedio de 10 días antes de las cirugías y de 10 días después de un mes después de la recuperación. Las líneas unen a cada caso antes y después del tratamiento. Se puede apreciar la variabilidad entre los individuos y pese a ello en 9 de 10 animales, la OVX acorta el τ , mientras que sólo en 4 de 10 con cirugía sham se presentó un acortamiento. El promedio de τ en las hembras intactas es el mismo (pre-sham, $\tau = 23.6 \pm 0.12$ h y pre-ovx, $\tau = 23.59 \pm 0.1$ h) y sólo en el grupo de las OVX el acortamiento es significativo, OVX $\tau = 23.1 \pm 0.1$ h, y en las hembras sham no hay cambios $\tau = 23.5 \pm 0.16$ h (figuras 16C). Además, se observó una reducción del porcentaje total de actividad diaria en las hembras OVX, con respecto a las intactas y sham (16D), siendo la reducción significativa de un 28%.

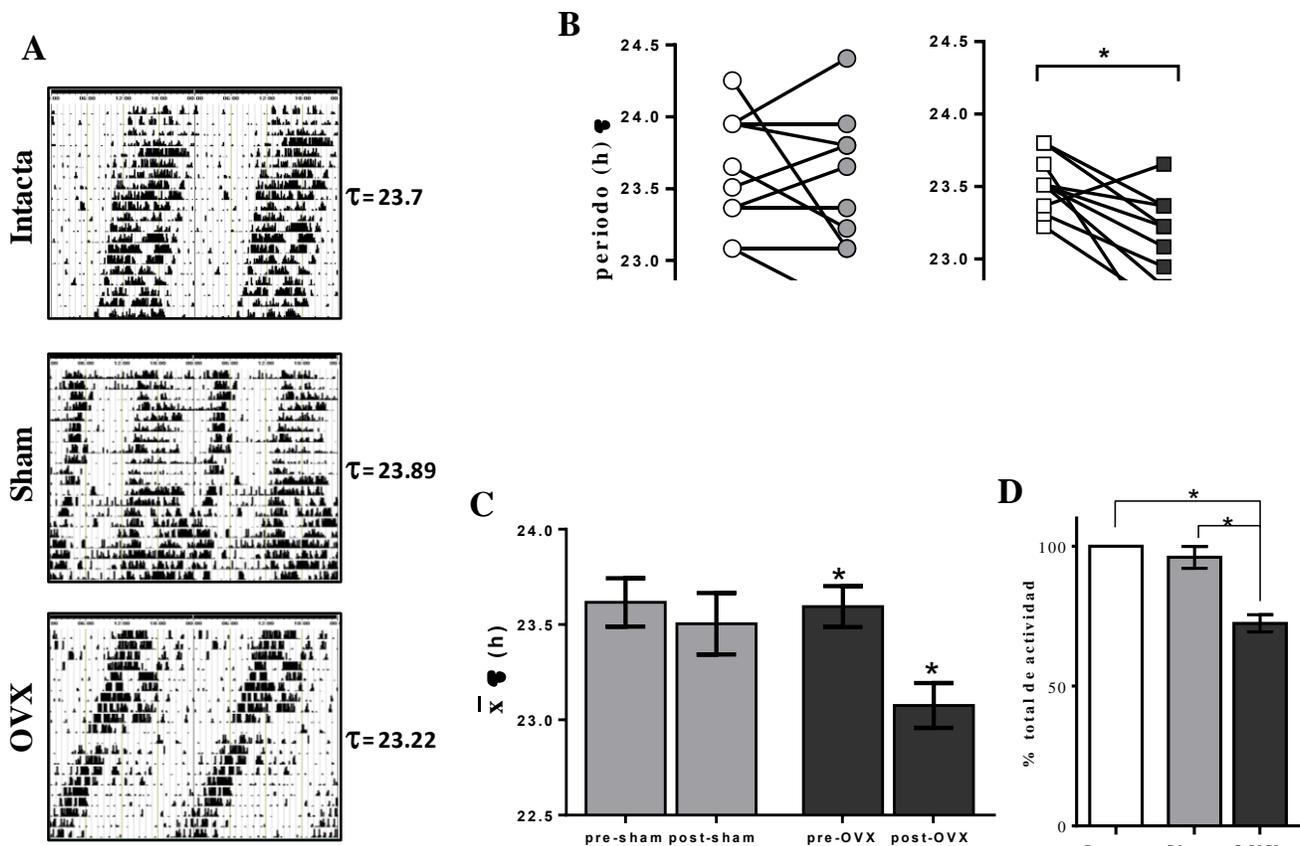


Figura 16. La ovariectomía acorta τ y reduce la amplitud del ritmo circadiano de la actividad locomotriz en OO. En A se muestran actogramas de doble gráfico representativos de cada grupo con el acortamiento después de la OVX. En el grupo de las hembras OVX la mayoría presento un acortamiento (B, derecha), mientras que el de las sham menos de la mitad (B, izquierda). La ovariectomía reduce el promedio de τ en libre curso (C, derecha) y reduce el total de la actividad (D), *P < 0.05.

4.4. La ovariectomía incrementa la magnitud del cambio de fase inducido por luz en el inicio de la noche subjetiva.

Los actogramas representativos de la Figura 17 muestran el efecto del pulso de luz (1 h) aplicado al CT14 (zona de retraso) y al CT22 (zona de avance) entre hembras intactas, OVX y sham. La línea roja indica la tendencia de la fase del inicio de actividad en los días previos y posteriores al pulso de luz. La diferencia de fase generada por el estímulo fótico está representada para cada caso en la gráfica (17B). Durante el comienzo de su noche subjetiva, las hembras intactas presentan un retraso de fase de -43 ± 6.3 min y las sham de -54 ± 15 min, mientras que las OVX mostraron un incremento del -115 ± 24 min. El pulso fótico que se dio

durante el día subjetivo, en el CT22 no generó cambios entre los grupos, pues las hembras intactas presentaron en promedio un avance de fase de 37.08 ± 1 min, las sham de 52 ± 20 min y las OVX de 36 ± 14.5 min.

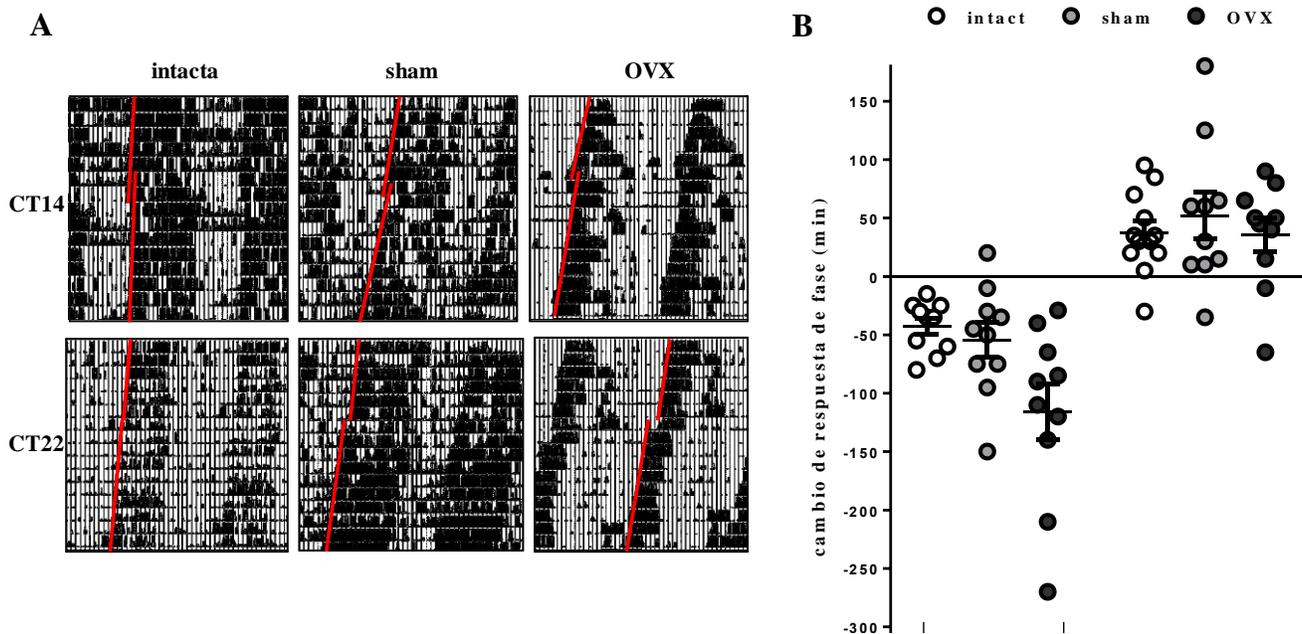


Figura 17. La ovariectomía incrementa la magnitud del cambio de fase en el inicio de la noche subjetiva. Actogramas que muestran el efecto de un pulso de luz de 1h en CT14 (arriba) y CT22 (abajo) en ratonas intactas, OVX y sham (A). Nótese la magnitud del cambio de fase en CT14 en las hembras que no presentan ovarios (B), las medias (\pm EE, *P < 0.05, ANOVA).

4.5. La ovariectomía cambia los perfiles diarios de expresión de las proteínas PER1, BMAL1 y ER β en el NSQ de *N. alstoni*.

Para evaluar los efectos de la OVX a nivel de cambios en la expresión de proteínas de reloj en el NSQ, se analizó el número de células inmunorreactivas (IR) para PER1 y BMAL1 en NSQ durante cinco puntos temporales a lo largo del día (n= 4 por punto). La figura 18A muestra el promedio de células IR para PER1 en el grupo sham, con mayor cantidad en ZT18 (468.22 ± 77.5), mientras que el promedio más bajo fue en el ZT23 (182 ± 39.42). Existen diferencias significativas (ANOVA) entre los ZT4 y ZT18 y entre ZT18 y ZT23. Además, mediante el análisis de ajuste cosinor se probaron distintos periodos, encontrando que el periodo de 24 horas

presentó mayor porcentaje de ritmicidad (75.96%, $P = 0.007$) con acrofase en ZT15. Por otra parte, en la fig. 18B se muestra el promedio de células IR para BMAL1, en donde se observa un patrón con fase opuesta al de PER1, con los mismos puntos temporales en cuanto a mayor y menor promedio de células IR, pues en ZT18 hay un promedio de 564.75 ± 82.88 células IR-BMAL1 y en ZT23 el promedio es de 366.22 ± 13.11 sin diferencias significativas entre ningún punto temporal. En esta proteína, con el análisis de cosinor se obtuvo el mayor porcentaje de ritmicidad (74.75%, $P = 0.009$) para un periodo de 24 h en ZT12.

En los mismos puntos temporales, en los NSQ de las hembras OVX se puede apreciar que el promedio de células IR-PER1 (fig. 18C) es mayor durante el ZT4 (352.14 ± 62.12) y menor durante el ZT18 (174.17 ± 35.21); pareciendo existir un adelanto en la acrofase de PER1 con respecto al grupo sham; sin embargo, con el ajuste de cosinor se obtuvo que el mayor porcentaje de ritmicidad (84.84%) fue para un periodo de 12h, con una acrofase en ZT2, lo que nos indica un ritmo bimodal, pues en ZT13 (328 ± 35.2) hubo un promedio elevado de células IR-PER1 similar al del ZT4. Mientras tanto, el promedio de células IR-BMAL1 del grupo de hembras OVX fue mayor en el ZT9 (957 ± 46.3) y menor en durante el ZT13 (669.9 ± 48.7); en este caso, también parece haber un adelanto en la acrofase de BMAL1 con respecto al grupo sham. En ambos grupos, se puede apreciar que después de la acrofase de tal proteína, en el próximo punto temporal se presenta la batifase. Además, de acuerdo con el análisis estadístico, hubo diferencias significativas entre los puntos temporales ZT9 y ZT18 y entre los ZT9 y ZT23 en el promedio de células IR-BMAL1 en hembras OVX. Con el ajuste de cosinor se obtuvo el mayor porcentaje (62.76%, $P = 0.0326$) para el ritmo de 24 h con una acrofase en ZT5.

En cuanto a la comparación entre grupos, se presentaron diferencias en PER1 en los puntos ZT9 y ZT18 (T de Student, $P = 0.01$); mientras que en BMAL1, las diferencias se presentaron en los ZT4, ZT9 (T de Student, $P = 0.006$) y ZT23 (T de Student, $P = 0.0001$).

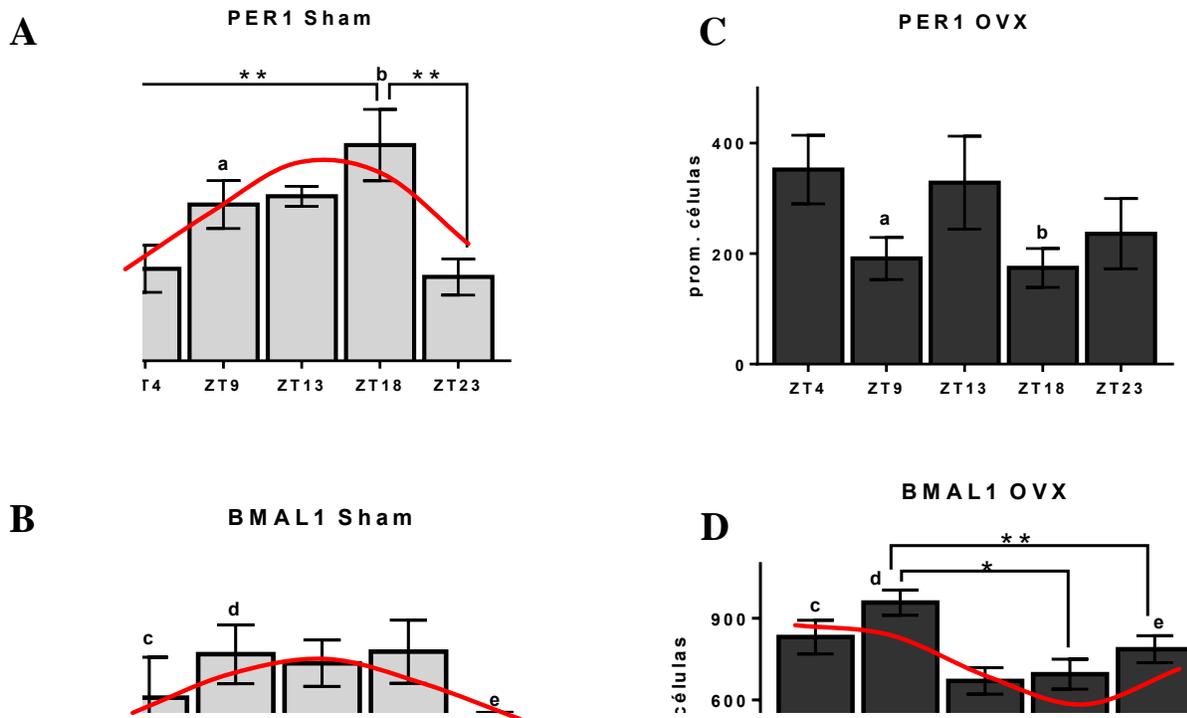


Figura 18. Perfil diario del promedio de número de células IR para PER1 y BMAL1 en hembras OVX y sham; así mismo, se muestra el ajuste por cosinor (línea roja) para identificar un ritmo de 24 horas, el cual no se ajustó para PER1 en OVX (C). De acuerdo con el ajuste, en las hembras sham hay un pico en ZT15 (A), mientras que en BMAL1 es en ZT12 (B). En las hembras OVX, el pico de células IR-PER1 ocurrió en dos ZT (C) y el de BMAL1 en ZT5, según el ajuste (D). Los promedios están representados con su error estándar y las diferencias fueron obtenidas mediante una ANOVA con *post hoc* de Tukey (* $P < 0.02$, ** $P < 0.001$). Las letras indican las diferencias en los mismos puntos temporales de las mismas proteínas entre grupos (T de Student, $P < 0.05$)

En la figura 19, se muestran una microfotografía representativa de cada uno de los puntos temporales de acuerdo con la proteína (PER1) y el grupo correspondiente. En ellas se puede ver que, la marca de IR fue más intensa en el grupo de las sham en comparación con las OVX. Además, es posible observar que, en algunos ZT, la marca IR se localiza en regiones específicas del NSQ.

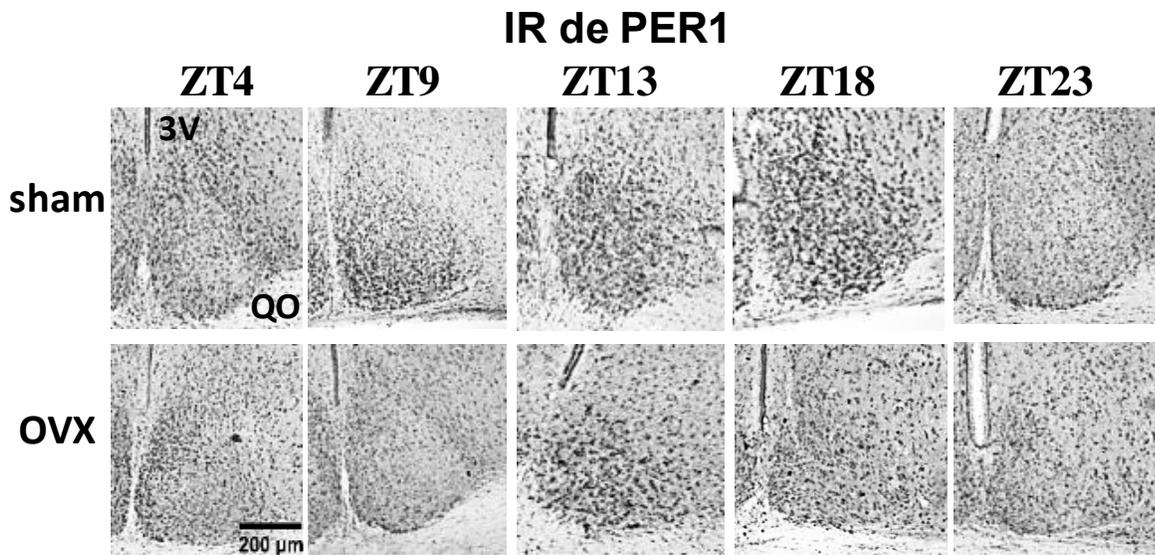


Figura 19. Patrón de inmunoreactividad para PER1 en el NSQ de hembras *N. alstoni*. Microfotografías (10X) que muestran las IR-PER1 (puntos negros) en los diferentes ZT en hembras sham y OVX. En hembras OVX la expresión de PER1 no parece tener un ritmo diario y es menor la marca IR (QO= Quiasma Óptico, 3V= tercer Ventriculo).

En la siguiente imagen (figura 20) se muestran las microfotografías capturadas de un NSQ durante los diferentes ZT para la IR de la proteína BMAL1 en las hembras sham y OVX, en las cuales se puede apreciar que en ZT9 existe mayor IR en las hembras sham, mientras que, de manera general, en las hembras sin ovarios hay mayor cantidad de células IR en comparación con los otros puntos temporales de las sham.

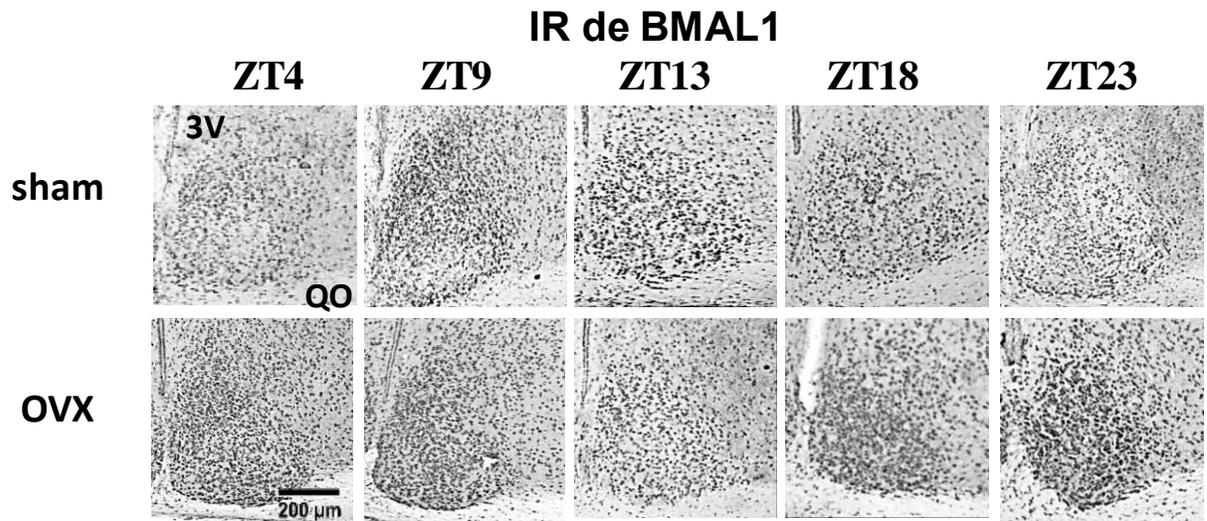


Figura 20. Patrón de Inmunoreactividad para BMAL1 en el NSQ de hembras *N. alstoni*. Microfotografías (10X) que muestran las IR-BMAL1 (puntos negros) en los diferentes ZT en hembras sham y OVX. En hembras OVX puede apreciarse que hay más IR de células para esta proteína (OQ= Quiasma Óptico, 3V= tercer Ventrículo).

Además, para poder comparar con la cuantificación de los ER β , se analizó la IR en NSQ de acuerdo con número de pixeles blancos (densidad óptica) para la misma área que en el conteo de células para PER1 y BMAL1. La figura 19, muestra el promedio en cada punto temporal, así como su error estándar. El comportamiento del trazo del perfil diario de PER1 (figura 21, izquierda) es parecido entre el grupo de las hembras sham y OVX, sin embargo, de acuerdo con el ajuste de cosinor, la acrofase en sham se presentó en el ZT19 (periodo de 24 h con 85%, $P = 0.001$) y en las OVX en ZT3, pero ajustado a un periodo bimodal (periodo de 12 h con 65.5%).

El perfil diario para BMAL1 en las hembras sham (figura 21, derecha) presentó un periodo de 24 h (97% de ritmicidad, $P = 0.000$) con acrofase en ZT6, mientras que en el grupo de las OVX fue en ZT8 según el ajuste por cosinor, el cual detectó un ritmo de 12h con porcentaje de 87%.

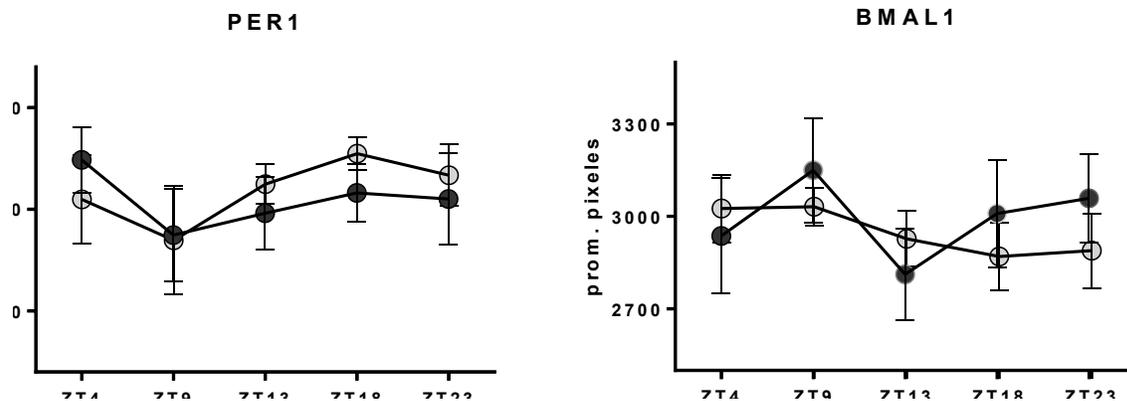


Figura 21. Perfiles diarios de PER1 y BMAL1 en hembras sham y OVX. En el perfil de PER1, las hembras sham (círculos grises), hay mayor cantidad de IR en promedio, mientras que en perfil de BMAL1 existen unos ZT donde hay más IR en el grupo de las OVX (círculos negros).

En cuanto al análisis de intensidad por medio de imágenes binarias (figura 22) para el $ER\beta$, existen diferencias entre el ZT9 (3057.62 ± 102.01) y ZT13 (2359.46 ± 117.96) en el grupo de las hembras sham; mientras que el grupo de las OVX no lo hay. Además, en las sham, según el análisis por cosinor, el ritmo es bimodal, ya que el 76.03% de ritmicidad se presenta con valor de 12 h con acrofase en ZT7. El mismo análisis para los datos de las hembras OVX, presentó un ritmo de 24 h (60%, $P = 0.040$) con acrofase en ZT4.

Por otra parte, en los ZT4 (sham = 2748.75 ± 182.32 vs OVX = 3291.47 ± 110.62) y ZT13 (sham = 2359.46 ± 102.01 vs OVX 3139.96 ± 135.32), hay diferencias entre las hembras sham y las OVX.

Figura 22. Perfiles diarios de ER β en hembras sham (círculos grises) y OVX (círculos negros) de acuerdo con el número de píxeles. Se presentaron diferencias entre sham y OVX en ZT4 y ZT13 (ANOVA, P = 0.05), mientras que en las hembras sham, además, hay diferencias entre los ZT9 y ZT13 (T de student, P < 0.01) siendo los puntos temporales de más y menor IR del NSQ.

La figura 23 muestra las fotografías representativas de cada ZT en un NSQ de la IR de células para el ER β , en las cuales puede apreciarse que la localización del receptor parece estar principalmente en el citoplasma, motivo por el cual se prefirió emplear el método de intensidad para poder evaluar la IR.

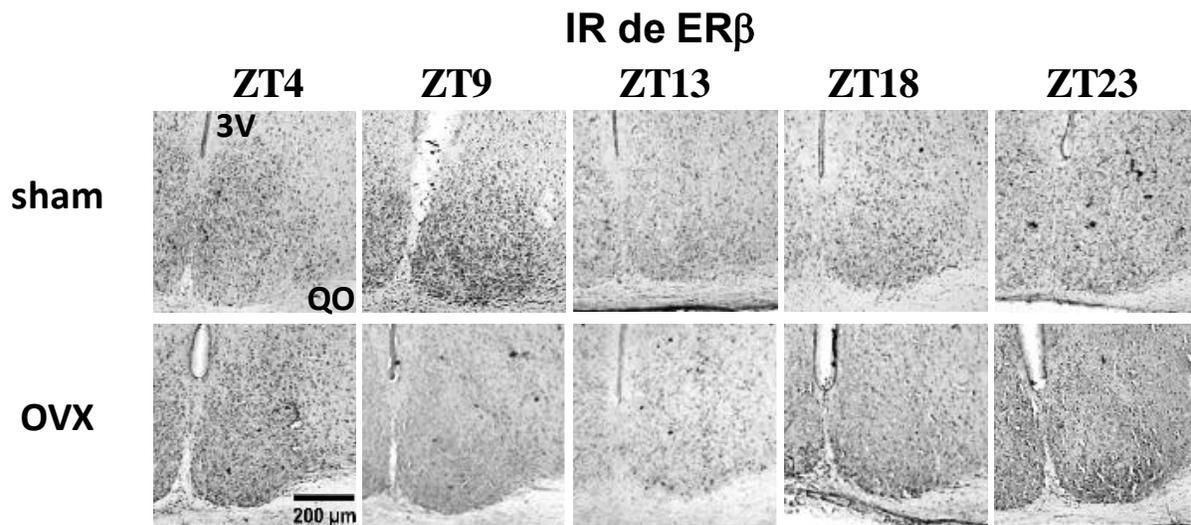


Figura 23. Patrón de Inmunoreactividad para ER β en el NSQ de hembras *N. alstoni*. Microfotografías (10X) que muestran las IR-ER β (puntos negros) en los diferentes ZT en hembras sham y OVX. En hembras sham puede apreciarse que hay más IR de para esta proteína (OQ= Quiasma Óptico, 3V= tercer Ventrículo).

En la tabla 1, se comparan los resultados obtenidos con los análisis empleados, tanto con ajuste de cosinor (derecha) como sin éste (izquierda). Cabe resaltar lo siguiente: en las hembras OVX, el máximo pico de PER1 ocurre alrededor del ZT4 con ambos métodos; mientras que, en las hembras sham, el ajuste por cosinor para el conteo manual muestra que el ZT de la acrofase es diferente, sin embargo, el mayor pico de PER1 se presentó durante la mitad de la escotofase, y en las OVX se ocurrió durante la fotofase y con un periodo bimodal (12 h). Para la proteína BMAL1, el conteo manual muestra una constancia entre métodos y ajuste en el grupo de las hembras OVX, presentándose alrededor del ZT9, lo cual no ocurre en el grupo de las sham, Finalmente, el ER β presentó un pico en ZT9 en las hembras sham, mientras que en las OVX fue en ZT4, además de que, fue la única proteína que presentó un ajuste de 12 h en este mismo grupo de hembras.

		máximo		mínimo				sham	Ajuste	OVX	Ajuste
		sham	OVX	sham	OVX						
PER1	manual	ZT18	ZT4	ZT23	ZT18	PER1	manual	ZT14	24 h	ZT2	12 h
	intensidad	ZT18	ZT4	ZT9	ZT9		intensidad	ZT19	24 h	ZT3	12h
BMAL1	manual	ZT18	ZT9	ZT23	ZT13	BMAL1	manual	ZT12	24 h	ZT5	24 h
	intensidad	ZT9	ZT9	ZT18	ZT13		intensidad	ZT 6	24 h	ZT8	12 h
ER β	intensidad	ZT9	ZT4	ZT13	ZT18	ER β	intensidad	ZT7	12 h	ZT4	24 h

Tabla 1. Comparación de máximo y mínimo promedio de células IR mediante conteo celular (manual) e intensidad (tabla izquierda) en hembras sham y OVX para las proteínas analizadas, y de acrofase ajustada por cosinor en PER1, BMAL1 y ER β entre ambos grupos (tabla derecha). Nótese que en las OVX PER y BMAL ajustaron a un periodo de 12 h, mientras que esto sólo se presentó en las sham para ER β .

Con base en las consistencias de los análisis, en la figura 24 pueden observarse las acrofases para todas las proteínas analizadas en hembras sham (círculos claros) y en las OVX (círculos oscuros). La máxima expresión de PER1 ocurrió durante el inicio de la mitad de la fotofase en las hembras sham, mientras que en las OVX se presentó tiempo después del encendido de las luces; tanto en las hembras sham como en las OVX, la acrofase de BMAL1 se presentó antes del apagado de las luces. Además, el ER β , presentó una acrofase en la segunda mitad de la fotofase en las hembras sham y en las OVX durante la primera mitad de la fotofase.

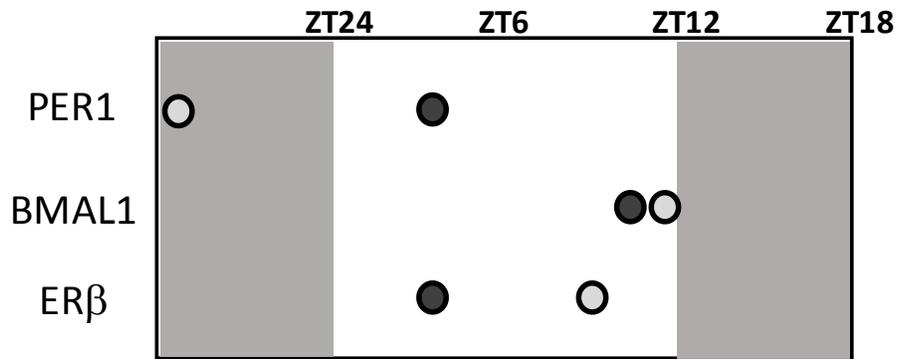


Figura 24. Acrofases de PER1, BMAL1 y ER β en *N. alstoni*. De acuerdo con los ZT evaluados para PER1, BMAL1 y ER β en hembras sham (círculos grises) y OVX (círculos negros), nótese que PER1 en sham ocurre durante la escotofase (zona con sombreado gris), mientras que el resto de las acrofases analizadas se presentaron durante la fotofase (zona blanca).

4.6 La ovariectomía cambia la dirección de la relación entre las proteínas del reloj con el perfil diario de actividad.

Se tomaron los promedios correspondientes a las mismas horas del perfil monitoreados para la técnica de IHQ de los perfiles en LO 12:12 del grupo sham (tabla 2, izquierda) y el grupo OVX (tabla 2, derecha) para calcular el coeficiente de correlación.

Sham				OVX			
	Actividad	PER1	BMAL1		Actividad	PER1	BMAL1
Actividad	1			Actividad	1		
PER1	0.787	1		PER1	-0.121	1	
BMAL1	-0.998	-0.745	1	BMAL1	-0.588	-0.368	1
ER β	-0.942	-0.948	0.919	ER β	-0.652	0.227	-0.165

Tabla 2. Valores del factor de correlación de Pearson en el grupo de hembras sham y OVX, entre el promedio de la actividad locomotriz y el promedio de la intensidad del marcaje IR en PER1, BMAL1 y el ER β .

En el grupo de las hembras sham, hay una correlación positiva con PER1 ($r = 0.787$), mientras que esta relación lineal, prácticamente se pierde en las hembras OVX ($r = -0.121$). Por otra parte, cuando hay un aumento de actividad, existe una disminución en la intensidad de IR para BMAL1 ($r = -0.942$), lo que a su vez muestra una fuerte relación negativa de BMAL1 con PER1 ($r = -0.948$); mientras que, en el grupo de las hembras OVX, hay una relación negativa moderada de la actividad locomotriz con BMAL1 ($r = -0.588$) y con PER1 casi se pierde ($r = -$

0.121). Finalmente, en el grupo de las hembras sham existe una fuerte relación positiva entre BMAL1 y ER β ($r = 0.919$), la cual prácticamente se pierde en el grupo de las hembras OVX ($r = -0.165$). Además, la relación del ER β con PER1 se torna positiva pero débil ($r = 0.227$) durante la OVX.

4.7 El BE incrementa la IR-BMAL1 en el NSQ de hembras OVX durante el ZT3.

Debido a que un objetivo fue conocer el efecto de la aplicación aguda de estradiol exógeno en hembras OVX, se decidió aplicar una sola dosis de 50 μ g de BE2 durante la escotofase, para ver si existía efecto sobre la expresión de proteínas de reloj durante la fotofase, puesto que es aquí donde hay mayor cantidad de PER1, BMAL1 y ER β , de acuerdo con los resultados del punto 4.5 de esta sección.

Después de la inyección de BE o vehículo en ZT16 y posterior perfusión 9 horas después (ZT3), se presentó un incremento en PER1. Por otra parte, en la expresión de BMAL1 hubo aumento significativo en las hembras OVX en comparación con las sham y el vehículo (figura 25). Las hembras del grupo sham en diestro tuvieron un promedio de 199.8 \pm 51.17 células IR-PER1 en el ZT4, después de administrarse vehículo en hembras OVX, el incremento fue de 697.08 \pm 42.75 y de 755.5 \pm 60.17 con BE. Por otra parte, el promedio de células IR-BMAL1 fue de 444.33 \pm 106.2 en hembras del grupo sham y con la administración de vehículo fue de 574.75 \pm 44.42, mientras que con la administración de BE incrementó el promedio de células IR a 867.18 \pm 57.35.

PER1

BMAL1



Figura 25. Efecto de la inyección de BE o vehículo sobre las IR-PER e IR-BMAL en el NSQ de hembras OVX. Promedio de células IR-PER1 (lado izquierdo) y BMAL1 (lado derecho) en hembras sham en fase de diestro (barras grises claro), inyección de vehículo en OVX (barras grises punteadas) y de BE (barras negras punteadas), perfundidas en ZT3 (ANOVA, $P = **0.001$, $***0.0001$). Para cada condición se muestran una microfotografía (10X) representativa (debajo de cada barra).

5. DISCUSIÓN

En mamíferos existe relación entre la regulación del sistema circadiano con la del sistema reproductivo de las hembras, por lo que un abordaje para comprender mejor este mecanismo es estudiar dicha relación entre diversas especies que, si bien comparten generalidades, también presentan algunas particularidades. Las hembras de *N. alstoni* presentaron una progresión del recambio en las células del epitelio vaginal que está asociado con los cambios en la concentración de E2 durante el ciclo estral (figura 10); tales cambios no se encontraron en el grupo de las ratonas OVX, inclusive en algunos organismos se llegó a dar un cierre parcial o total de la apertura vaginal, y en aquellas ratonas donde no ocurrió ese fenómeno no se observó una progresión en las células del epitelio vaginal, pues sólo se encontraron en una mayor proporción leucocitos y algunas células cornificadas sin presencia de células nucleadas, lo que es consistente con la pérdida de un ciclo estral endocrino por la ausencia de los ovarios y con que, en las ratonas OVX, los niveles de E2 no fueron detectables. Se sabe que la OVX en ratas recién nacidas retrasa el inicio de la apertura vaginal y el diámetro se reduce en

comparación con aquellas ratas intactas o con cirugía sham (Gitlin, 1974); este último fenómeno es similar al obtenido en las hembras adultas de *N. alstoni*. Además, nuestros resultado también son congruentes con otro estudio en el que, después de 60 días de realizar la OVX, los niveles de progesterona y estradiol disminuyen, mientras que los de testosterona aumentan y la citología vaginal permanece en diestro (Alagwu & Nneli, 2005).

Por otra parte, la concentración de E2 durante el ciclo estral es similar al de la rata (Wise & Ratner, 1980), pues *N. alstoni* también presentó la mayor concentración durante el proestro (Herbison, 2006), lo que comprueba que el papel del estrógeno es fundamental para la progresión del ciclo estral en esta especie. En un protocolo donde las ratas son OVX, se logró la liberación diaria de la LH, bajo tratamiento de E2 (Christian *et al.*, 2005), también se ha observado que la progesterona puede producirse, pero sólo si previamente hay tratamiento de E2 (Bronson & Vom Saal, 1979), con estas evidencias se demuestra la importancia del estradiol en la regulación del eje neuroendocrino HHO.

La prevalencia del ritmo en el ciclo estral se evaluó de acuerdo con la aparición de los tres diferentes tipos de células y su progresión, de tal forma que fue posible observar una regularidad (figura 10A). Se ha descrito que, la capacidad de acoplamiento del NSQ se pierde durante la vejez, y que esta condición también genera la pérdida del *scalloping* junto con la pérdida de ritmicidad en el ciclo estral (Takasu *et al.*, 2015), condición que pudo ocurrir en el presente estudio al extirpar los ovarios, pues se ha propuesto que el E2 podría participar en el acoplamiento celular del NSQ vía aumento de uniones gap (Shinohara *et al.*, 2000).

Existe una correlación en la progresión del recambio celular del epitelio vaginal con picos de actividad (figura 11), tales cambios se han asociado a la influencia del ciclo estral sobre la organización circadiana de hámsteres y ratas, en los cuales se presentaron alteraciones en la amplitud y Ψ de la actividad durante la sincronización (Albers, 1981; Anantharaman-Barr & Decombaz, 1989), dichas variaciones han sido definidas como *scalloping* (Morin *et al.*, 1977) y se caracterizan por presentar un adelanto en el inicio de actividad durante el proestro, así como un incremento (Wollnik & Turek, 1988; Kent *et al.*, 1991; Labyak & Lee, 1995). En las hembras de *N. alstoni* intactas fue posible observar un incremento de actividad que se presenta aproximadamente cada 4-5 días (figura 11B y 12).

Para evitar las perturbaciones durante los registros de actividad, éstos se realizaron en condiciones sin intervención para cada uno de los grupos de hembras (intactas, sham y OVX) y posteriormente, los frotis se hicieron fuera de registro, por lo que se asume que el ciclo estral tiene relación con el *scalloping* de los parámetros de la actividad analizada, tanto en hembras intactas como sham, pero no así en el grupo de las OVX (figura 12A). El *scalloping* o “ribeteo” de la actividad locomotriz consiste en un incremento de amplitud promedio cada 4-5 días (Figura 12B, 12C y 12D) y que se perdió en las hembras OVX. Diversos estudios han documentado que durante el día del ciclo estral en el que se presenta el pico de estradiol, también hay un aumento de actividad (Kent *et al.*, 1991; Labyak & Lee, 1995; Ogawa *et al.*, 2003), por lo que la pérdida del aumento cíclico en la actividad de las hembras OVX, puede deberse a la ausencia de E2; sin embargo, se ha propuesto que la progesterona podría mantener algún tipo de control rítmico sobre la actividad, ya que puede potenciar o disminuir los efectos del E2 (Rodier & Segal, 1977). La progesterona puede afectar en algún intervalo temporal de favorecimiento del estradiol, el cual es requerido para la inducción de cambios dependientes de estrógenos en la periodicidad circadiana (Albers *et al.*, 1981).

Otra característica del *scalloping* se refiere a un adelanto de fase del inicio de actividad, en el presente estudio, las hembras intactas y las sham presentaron un inicio de actividad variable, consistente con una menor estabilidad en su acrofase y una Ψ positiva, mientras que en el grupo de las OVX se presentó un retraso de Ψ , la acrofase se presentó antes y con mayor estabilidad (figura 14A y B). En ratones, se ha descrito que la variabilidad en el inicio de la actividad en las hembras está asociada con la etapa del ciclo estral (Kuljis *et al.*, 2013), así como en las hembras de hámster (Morin *et al.*, 1977) y en ratas (Albers *et al.*, 1981; Wollnik & Turek, 1988); sugiriéndose que este fenómeno es mediado por los cambios en la expresión del ER β (Blattner & Mahoney, 2014; Royston *et al.*, 2014). El inicio de actividad se adelanta cuando ocurre la ovulación, momento en el que la concentración de E2 es mayor; por lo anterior, es consistente que, en nuestros resultados, los bajos niveles de E2 en las ratonas OVX puedan relacionarse con un retraso en el inicio de actividad (figura 14B) y una coordinación absoluta.

Los cambios en la acrofase en el perfil diario de actividad en condiciones de LO 12:12 también presentaron diferencias significativas entre grupos (figura 15A), así como en la cantidad total de actividad (figura 15B) y en particular durante la escotofase (figura 15C), pues las hembras OVX se mueven más durante la noche. Esta respuesta es contraria a la descrita en

ratas, en las cuales la actividad se reduce después de la OVX (Ahdieh & Wade, 1982). Estudios con ratones KO de ER β presentan incremento de actividad en comparación con los WT, este resultado fue observado mediante la evaluación de la actividad en campo abierto, mientras que en rueda, la actividad presenta tendencia a aumentar sólo hasta el noveno día de registro; sin embargo, cuando los ratones (ambos sexos) son α REKO se elimina por completo el aumento de la actividad que era inducible por estrógenos (Ogawa *et al.*, 2003). No obstante, se ha observado que el tratamiento con estradiol consolida la actividad en rueda durante la escotofase (Ogawa *et al.*, 2003; Blattner & Mahoney, 2013). En las hembras *N. alstoni* OVX este efecto se notó sin tratamiento de E2, lo cual puede deberse posiblemente a que el efecto de la OVX fue evaluado entre 50-60 días después de la cirugía y que no se empleó rueda de actividad.

El consumo de alimento también fluctúa de acuerdo con el ciclo estral y presenta una disminución durante las fases donde hay mayor concentración de estrógeno (Czaja & Goy, 1975; Blaustein & Wade, 1976). Aunque no fue un objetivo de este trabajo, se notó que la OVX causa aumento de peso y mayor consumo de alimento, lo que concuerda con datos reportados por otros autores (Roy & Wade, 1977; Asarian & Geary, 2002). Una interpretación es que, el aumento nocturno de actividad en las hembras OVX se asocia con mayor respuesta de recompensa de búsqueda y consumo de alimento durante la noche (Richard *et al.*, 2017).

Los cambios en la concentración circulante de las hormonas ováricas a lo largo del ciclo estral están asociados con cambios en el periodo, amplitud e inicio de la actividad diaria (Albers, 1981; Anantharaman-Barr & Decombaz, 1989; Gentry & Wade, 1976), en este estudio se observó que en condiciones constantes de oscuridad la actividad disminuyó en el grupo de las hembras OVX (figura 16D) y se acortó significativamente τ (figura 16A, B y C), lo cual nos sugiere que el estradiol tiene un papel directo o indirecto, tanto en la modulación del asa molecular del reloj como en la sincronización fótica. En la mayoría de las especies estudiadas hasta el momento, se ha descrito que la OVX alarga τ y el tratamiento con estradiol exógeno lo acorta (Morin *et al.*, 1977; Mahoney *et al.*, 2011). El efecto observado en *N. alstoni* también puede deberse a que el estudio se realizó sin el uso de rueda de actividad, pues se sabe que este medio induce cambios conductuales que también se pueden reflejar a nivel molecular del sistema circadiano (Reebs & Mrosovsky,

1989; Ruiz De Elvira *et al.*, 1992; Eckel *et al.*, 2000), además de funcionar como un motivador en el sistema de recompensa (Novak *et al.*, 2012).

Para poder conocer el efecto sincronizador de un evento cíclico sobre un ritmo circadiano, se usó el análisis de respuesta de fase, el cual nos permiten medir el efecto que ejercen los pulsos de luz sobre la fase del ritmo en oscilación espontánea. En este estudio, sólo se emplearon la zona de retraso máxima (CT14) y de máximo avance (CT22) de la especie (Miranda-Anaya *et al.*, 2016) para averiguar sobre los efectos que la OVX tiene en la fotosensibilidad en *N. alstoni*. La diferencia se notó en la zona de retraso (CT14), con un aumento en la magnitud del cambio de fase; mientras que no se observó efecto al final de la noche subjetiva (figura 17). Se ha descrito que en ratonas α REKO y NERKI del mismo receptor (receptores que presentan una deficiencia que los hace incapaces de responder por la vía de señalización clásica), el incremento de la amplitud del cambio de fase lo presentaron en CT22 (Blattner & Mahoney, 2013). Nuestros resultados, apoyan la idea de que los estrógenos son requeridos para la integración de la respuesta de cambios de fase inducidos por luz.

Cuando un oscilador endógeno se sincroniza a un ciclo ambiental (T) el periodo endógeno del ritmo (τ) debe realizar ajustes diarios de fase para llevar a cabo una sincronización estable de tal forma que $T = \tau - \Delta\phi$, por lo que si $\tau < 24$ h el ritmo circadiano necesita realizar retrasos diarios para sincronizarse a $T = 24$ h, mientras que, si $\tau > 24$ h, el ritmo debe ejecutar avances diarios para ajustarse a 24 h (Floessner & Hut, 2017). Las hembras OVX coinciden con esta relación, pues al presentar $\tau < 24$ h (figura 15) son más sensibles a la respuesta del estímulo de luz en la zona de retrasos (figura 17).

Aunque está ampliamente documentada la expresión circadiana de genes de reloj en el NSQ (Bae *et al.*, 2001) en diversos roedores, la mayoría de estos estudios han sido realizados en machos; aún menos documentado es la expresión de las proteínas a nivel del NSQ en roedores hembras. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el promedio del conteo celular, en las hembras sham, pudimos apreciar el comportamiento en antifase de PER1 y BMAL1 (figura 18A y B), observando que, el mayor promedio de células IR-PER1 ocurrió en ZT18, mientras que en roedores machos ocurre en CT14 (Hamada *et al.*, 2001; Yan & Silver, 2004) y en ratas diurnas (*Arvicanthis niloticus*) en ZT14 con un rápido decaimiento en ZT18 (Ramanathan *et al.*, 2008). En otro estudio donde cuantificaron la IR-PER2 en NSQ durante las cuatro etapas del ciclo estral, éste alcanzó su máxima expresión en ZT13 (Perrin *et al.*, 2006); sin embargo,

estudios en ratones *Per1-Luc* mostraron cambios en la acrofase de acuerdo con la etapa del ciclo estral (Murphy *et al.*, 2013). Por otra parte, se ha comprobado que no existen diferencias en las fases del ritmo diario de mRNA de *Per1* y *Per2* a nivel del NSQ de machos y hembras, aunque en otras regiones cerebrales las hembras presentaron acrofases diferentes a las de los machos (Chun *et al.*, 2015).

El perfil diario de las proteínas en el NSQ de las hembras sham en diestro y OVX presentó diferencias importantes (figura 18 C), el perfil de PER1 en las OVX tuvo un ritmo bimodal y menor cantidad de células IR (figura 19). Se ha observado que en ratas, la OVX genera efectos en el ritmo diario de PER2 en el NSQ, prolongando el pico máximo desde ZT13 a ZT19 (Perrin *et al.*, 2006). En las hembras de *N. alstoni* OVX observamos un segundo pico en el número de células IR-PER1 en ZT13 (figura 18 C). Por su parte, BMAL1 cambió de acrofase y tuvo un aumento en el promedio del número de células IR (figura 18 D). Se sabe que la acrofase y amplitud de BMAL1 cambia en ratas no cíclicas en regiones cerebrales, aunque en el NSQ los cambios no son significativos (Chun *et al.*, 2015).

Los efectos de la OVX sobre el perfil de las proteínas PER1 y BMAL1 en el NSQ, pueden explicarse por la acción de los estrógenos. El posible mecanismo que interactúa con los efectos de las hormonas ováricas sobre las respuestas del sistema circadiano, se debe a la presencia de los ER en el NSQ, ya que hay evidencia de su expresión en esta área cerebral (Shughrue *et al.*, 1997; Mitra *et al.*, 2003; Vida *et al.*, 2008, y el presente estudio). Entonces, el mecanismo estaría llevando a cabo la coordinación temporal de dos fenómenos interconectados, el ciclo estral (ovárico), el cual genera fluctuaciones hormonales de manera infradiana y, el ritmo circadiano del NSQ que, a su vez interactuaría con los osciladores periféricos, entre los cuales se encuentra el ovario (Juárez-Tapia & Miranda-Anaya, 2016), en cuya glándula se ha descrito que existe ritmicidad de los genes del reloj (Fahrenkrug *et al.*, 2006; Karman & Tischkau, 2006; He *et al.*, 2007) y que requiere de la liberación de gonadotropinas para que sean expresados rítmicamente (Karman & Tischkau, 2006; Gräs *et al.*, 2012).

Se ha documentado que los ER cambian en el área preóptica de acuerdo con la etapa del ciclo estral, cuando se comienza a elevar el estradiol (en el metaestro), se presenta un incremento de los ER y progresivamente van disminuyendo hasta el estro (Zhou *et al.*, 1995). En el núcleo del tracto solitario, también se han observado variaciones en el ER α con niveles altos durante el estro y bajos en metaestro, así como niveles bajos en las ratas OVX (Spary

et al., 2010). En las hembras sham de *N. alstoni* observamos un ritmo bimodal del ER β en el NSQ, el cual presentó un ajuste a 24 horas en las hembras OVX (figura 22).

Por otra parte, no se tiene claridad si la expresión del ER β está regulada por el propio estrógeno a nivel del NSQ. Se sabe que en rata, la OVX incrementa su expresión y el tratamiento con E2 la disminuye ligeramente (Shima *et al.*, 2003). Nuestros resultados muestran que, las hembras OVX, presentaron un incremento de células IR-ER β en dos puntos temporales respecto a las hembras sham (figura 22). Así mismo, en el NSQ de ratas, se ha detectado que hay niveles bajos del mRNA de ER β , que se expresaron en un ritmo diario y con un pico máximo durante el encendido de las luces (Wilson *et al.*, 2002). En las ratonas de *N. alstoni*, el marcaje IR-ER β en el NSQ fue difuso (figura 23), lo cual es congruente con algunos reportes, en donde se ha visto que la señal en el NSQ es débil (Mitra *et al.*, 2003). Otra causa de nuestros resultados, puede deberse a las diferentes regiones celulares de localización del receptor pues éste podría estar presente a nivel de citoplasmático, nuclear o membranal (Nadal *et al.*, 2001); ya que el anticuerpo empleado (sc-8974) no especifica cuando el reconocimiento del epítipo (H-150) es exclusivo de si el ER se encuentra libre o unido. Por otra parte, la comparación de los patrones de expresión de los ER en rata, ratón, mono y humano, indican que los datos no deben ser extrapolados de una especie a otra (Mitra *et al.*, 2003).

En estudios hechos con ratones ERKO, se ha concluido que el ER α regula la magnitud de la actividad inducida por estradiol (Ogawa *et al.*, 2003; Royston *et al.*, 2014), mientras que el ER β controla la fase y la distribución temporal de la actividad (Royston *et al.*, 2014). Con base en nuestros resultados, podemos decir que en las hembras OVX se presentaron cambios de fase y de distribución en el perfil diario de actividad (figuras 14 y 15) que podrían ser consecuencia de la mayor expresión de ER β en NSQ; además, se sabe que la activación del ER β por el E2, atenúa la respuesta del cambio de fase en ZT16 (Royston *et al.*, 2014), idea que se comprueba en nuestros resultados, pues la OVX aumenta la expresión de ER β y eso podría estar contribuyendo a una mayor magnitud en la respuesta de fase en ZT14 en *N. alstoni*.

El análisis de correlación (tabla 2) demuestra que en las hembras sham existe una fuerte relación negativa entre PER1 y BMAL1, lo cual apoya la cualidad de la expresión en antifase generada por las asas de transcripción/inhibición en el reloj biológico (Oishi *et al.*, 1998b); además, existe una relación positiva de la expresión de PER1 con la actividad locomotriz, mientras que hay una fuerte relación positiva del y del ER β con BMAL1, por lo que ésta es

negativa con respecto a PER1, tal relación también ha sido observada en células cancerígenas de colon (Mostafaie, et al., 2009). En el grupo de las hembras OVX, prácticamente se pierde la relación entre BMAL1 y el ER β ($r = -0.165$), lo cual es congruente con el modelo de ratones KO en BMAL1, en donde se suprime la oscilación de ER β (Cai *et al.*, 2008)

Con respecto a las acrofases de las proteínas del reloj circadiano analizadas en el NSQ, podemos decir que presentaron una relación de fase con respecto a la del ER β , particularmente con BMAL1, y esta relación se modifica por la OVX (figura 24). Se sabe que el ER β , pero no el ER α , está controlado por las proteínas del reloj molecular, ya que presenta oscilaciones rítmicas en diversos tejidos periféricos; por ejemplo, en el pulmón de ratón se ha observado que la mayor expresión del mRNA de *Per1* y de ER β se presenta en el mismo punto temporal y se pierde cuando el ratón es KO de la proteína BMAL1 (Cai *et al.*, 2008), lo cual también es apoyado por el análisis de correlación (tabla 2, derecha) en donde la relación prácticamente se pierde en comparación con las hembras sham. Por otra parte, se ha descrito que en células cancerígenas de mama, el ER α incrementó la expresión de *Clock* (Xiao *et al.*, 2014)

Las proteínas CLOCK y BMAL1 son los factores transcripcionales que se unen a la región promotora *E-box* de los genes *Per* y *Cry* para activar su transcripción, cuando PER y CRY forman dímeros, estos translocan al interior del núcleo e inhiben la actividad de CLOCK/BMAL1 (Partch *et al.*, 2014). Cualquier cambio en la cantidad de alguno de los elementos positivos tendrá un impacto sobre los elementos negativos y viceversa. En las hembras OVX de *N. alstoni*, puede apreciarse una ligera disminución de PER1, lo que podría ser la explicación del porqué también observamos un aumento en BMAL1, pues al no existir suficiente cantidad de PER1, no se forman dímeros PER/CRY que inhiban la actividad de CLOCK/BMAL y por ello también podemos obtener un aumento en BMAL1, así como en ER β , pues éste también posee la región promotora *E box* (Cai *et al.*, 2008).

Con la hipótesis propuesta en el presente trabajo y de acuerdo con los efectos obtenidos de la OVX sobre la actividad locomotriz y de las proteínas analizadas en el NSQ, se resumen los resultados en el siguiente esquema (figura 26), en donde se propone que el efecto de la ausencia de ovarios sobre el NSQ es a nivel de acoplamiento (Shinohara *et al.*, 2001), de tal forma que el efecto se da por un aumento en los ER β (figura 22), lo que conlleva a un aumento en BMAL1 (figura 16D) que en consecuencia, afectará la regulación de PER1 (figura 18B). Estos cambios en BMAL1 pueden estar impactando en la conducta de actividad locomotriz

disminuyendo el τ (figura 16 C) y modificando la ψ (figura 14) y el perfil diario de actividad (figura 15A), pues el aumento en alguna de las proteínas de las asas principales del reloj molecular, pueden acelerar la dinámica de éstas. Por lo tanto, en esta tesis se propone que la relación entre la regulación del estrógeno con los elementos que constituyen al reloj molecular es bidireccional, pues los ER pueden ser tantos genes controlados por el reloj (CCG) como factores de transcripción y promover expresión de alguno de los genes principales que constituyen al reloj.

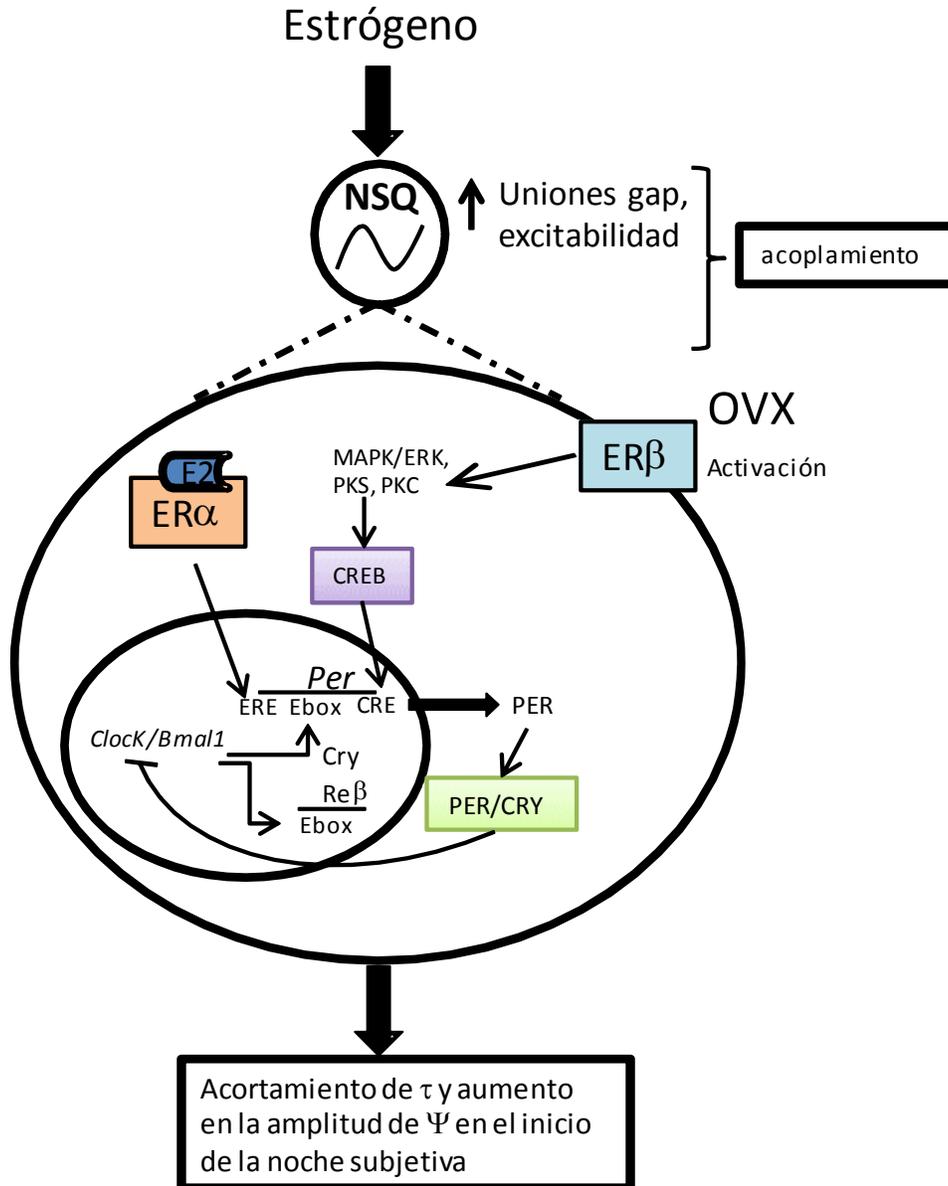


Figura 26. Modelo propuesto de acuerdo con los resultados obtenidos sobre los efectos de la OVX. La ausencia de estrógenos podría estar generando desacoplamiento entre las neuronas del NSQ, lo cual podría tener efecto a nivel de la sincronización. Dentro de la maquinaria del reloj molecular, el ER β puede

activarse tanto por la OVX; así como por los dímeros de CLOCK/BMAL1, al ser un CCG. Finalmente, este incremento en una parte del asa del reloj estaría teniendo efectos a nivel de la duración del periodo, así como en mecanismos de respuesta a la luz.

Respecto a los efectos del estradiol sobre la maquinaria del reloj molecular, los estudios realizados hasta el momento presentan diferencias de acuerdo con la estructura analizada, la técnica empleada, cómo se administró el estradiol y la dosis. En ratas OVX, se ha descrito que en el NSQ, una inyección de 20 μ g de 17 β -estradiol, aumentó la expresión de mRNA de *Cry2* 24 h después de la aplicación (Nakamura *et al.*, 2001); mientras que, cuando se utilizaron implantes subcutáneos de 17 β -estradiol se indujo un cambio de fase de *Per2* en el NSQ (Nakamura *et al.*, 2005). Por otra parte, dosis de 10nM y 10 μ M de 17 β -estradiol en un estudio *in vitro* con células del NSQ de ratonas *knockin* de PER2:LUC, no generaron efectos sobre la expresión de PER2 (Nakamura *et al.*, 2008); aunque en otro estudio con la misma técnica, pero con ratonas *knockin* de *per1-luc*, se describió que hay cambios de fase durante las diferentes etapas del ciclo estral a nivel del NSQ, por lo que se propuso que los cambios hormonales modifican el ritmo de *per1* (Murphy *et al.*, 2013). En el presente estudio, administramos una sola dosis suprafisiológica (50 μ g) de BE en ZT16 y observamos el efecto en ZT3, esta dosis se eligió debido a que se ha demostrado que en rata, es suficiente para inducir durante 4 días el pico diario de LH (Legan *et al.*, 1975) y es capaz de aumentar la concentración de E2 después de 2 horas de su aplicación en hembras OVX de *N. alstoni* (Anexo III).

Para que las alteraciones en la expresión génica tengan un significado funcional, deben traducirse en cambios en la proteína. Cuando analizamos la IR-PER1 en ZT3, obtuvimos que la diferencia fue significativa entre las hembras sham del protocolo de actividad en comparación con las OVX a las que se les administró tanto vehículo como BE. Esto pudo deberse a que, en las hembras OVX, en ZT4 es cuando se presentó un mayor promedio de número de células IR (figura 18C) para esta proteína; mientras que en las hembras sham en este mismo punto, presentó menor promedio de células IR-PER1 (figura 18A), debido a ello, suponemos que no hubo efecto del BE de estradiol en PER1, porque cuantificamos en un punto temporal en donde la propia condición de OVX ya generaba un aumento de esta proteína. Los niveles de RNA de *mPer1* y *mPer2* exhiben ritmos circadianos a nivel del NSQ e incrementan a consecuencia de la exposición de la luz durante la noche subjetiva pero no durante el día subjetivo (Albrecht *et al.*, 1997; Shearman *et al.*, 1997; Shigeyoshi *et al.*, 1997). Por otra parte, aunque *mPer3*

también presenta un ritmo circadiano, sus niveles de RNA no tienen ninguna respuesta ante pulsos de luz (Zylka *et al.*, 1998). A nivel del NSQ, la información fótica produce un incremento en los factores de transcripción *c-fos*, *egr-1* y pCREB (Aronin *et al.*, 1990; Guido *et al.*, 1999; Gau *et al.*, 2002), así mismo, el E2 incrementa el número de células IR para pCREB cuando el pulso fótico se administra en CT22 (Abizaid *et al.*, 2004) que a su vez, es un elemento requerido para la activación de PER1 cuando éste es inducido por la luz (Tischkau *et al.*, 2003). Sin embargo, en el presente estudio se administró el BE a la mitad de la noche (ZT16), y el efecto se observó durante la fotofase (ZT3), lo que apoya la idea de que el efecto del BE probablemente se sobrepuso con el de la fotoinducción de PER1.

La administración de BE sobre el número de IR-BMAL1 incrementó significativamente con respecto al vehículo y las hembras sham (figura 25), el mecanismo por el cual el BE alteró BMAL1 puede deberse a que se inyectó en un punto temporal previo a su incremento en las hembras OVX y que tiene un menor promedio de células IR-BMAL1 (figuras 18D), de tal forma que probablemente el BE, activa a los ER generando su unión en el sitio promotor ERE de *Per2* (Gery *et al.*, 2007), mientras que *Per2* puede modular a *Bmal1* cuando se complementa con receptores nucleares, como los ROR α o PPAR α (Schmutz *et al.*, 2009).

Se sabe que los cambios en las concentraciones hormonales producto del ciclo ovárico afectan la densidad sináptica en regiones cerebrales como el hipocampo (Woolley & McEwen, 1992). El estradiol no sólo tiene efectos sobre los elementos de la maquinaria del reloj molecular, se sabe que también incrementa la expresión de conexina 46 en el NSQ, por lo que podría estar actuando como un modulador del acoplamiento entre las células que constituyen al marcapasos maestro vía incremento de uniones estrechas (gap junctions), cuya función es mediar la comunicación eléctrica celular (Shinohara *et al.*, 2000, 2001). Cuando las uniones gap se bloquean se producen alteraciones ante las respuestas de cambio de fase inducidas por luz (Michel & Colwell, 2001); en los resultados obtenidos de las hembras OVX y con niveles de E2 indetectables, la ausencia de esta hormona podría ocasionar un desacoplamiento en la respuesta del NSQ ante los cambios fóticos ambientales. Sin embargo, las deficiencias en el acoplamiento eléctrico de las neuronas, parecen ser un mecanismo independiente de regulación a las oscilaciones de los genes reloj en el NSQ.

El conjunto de los resultados obtenidos en este estudio, sustentan la idea de que el estradiol en hembras es un elemento importante en la modulación del oscilador maestro, las cuales pueden ocurrir de manera directa o por vías indirectas, tanto humorales como neurales (Putteeraj *et al.*, 2016). Debido a que nuestros resultados en el periodo de la actividad locomotriz fueron diferentes a los descritos en otros roedores, apoyamos la hipótesis de que los efectos de las hormonas ováricas son especie-específicos y dependientes de la dosis que se administre, particularmente en estudios a nivel del NSQ.

Neotomodon asltoni es buen modelo para estudiar la actividad locomotriz sin emplear rueda de actividad, pues esta interfiere en los parámetros que se deben evaluar (Eckel *et al.*, 2000; Novak *et al.*, 2012), en el ciclo estral (Kent *et al.*, 1991), en respuestas circadianas (Yamada *et al.*, 1988), así como en la respuestas de la CRF (Reebs & Mrosovsky, 1989; Rosenwasser & Dwyer, 2001) e incluso en respuestas a nivel de expresión de genes de reloj (Yannielli *et al.*, 2002). Además, la rueda de actividad funciona como motivador (Novak *et al.*, 2012), lo cual produce efectos a través del mecanismo de recompensa y eso puede alterar la respuesta circadiana a evaluar.

6. CONCLUSIÓN

El presente estudio contribuye al conocimiento sobre la interconexión de la ritmicidad circadiana y los procesos reproductivos. La concentración de estradiol en plasma a lo largo del ciclo estral, la duración de éste y las características de la progresión en el epitelio vaginal a lo largo del ciclo estral, fueron muy similares a lo reportado en otras hembras de roedores de laboratorio.

En las hembras del ratón de los volcanes, el ciclo estral modula la amplitud del ritmo circadiano de actividad locomotriz, y en condiciones de sincronización, se presenta el fenómeno de *scalloping* relacionado con las diferentes etapas del ciclo estral. En condiciones constantes de oscuridad, la ovariectomía acorta el periodo de la actividad y en consecuencia incrementa la magnitud en el cambio de fase inducido por el pulso de luz durante el inicio de la noche subjetiva; así mismo, disminuye el total de actividad.

La ausencia de hormonas ováricas también impacta en la sincronización, pues se presenta un retraso del inicio de actividad, relacionado con el de la acrofase y con una mayor amplitud en el perfil diario, lo que se refleja en un aumento de la actividad que ocurre durante la primera mitad de la escotofase.

El perfil diario de las proteínas de reloj en el NSQ durante el diestro se presentó en PER1 y BMAL1 con un ajuste de 24 h, mientras que el del ER β fue bimodal. Cuando las hembras son OVX, solamente PER1 se vuelve bimodal y aunque BMAL1 y ER β mantuvieron un ajuste de 24 h, presentaron un cambio de su acrofase. Las hembras OVX tuvieron menor promedio de células IR-PER1, mientras que el de IR-BMAL1 aumentó. Además, existe una relación positiva entre la expresión IR-BMAL1 y ER β en hembras sham, la cual se pierde por la OVX; mientras que la relación negativa entre PER1 con BMAL1 disminuye en las OVX.

La inyección de BE en ZT16 y su evaluación en ZT3, ocasionó un aumento de IR-BMAL1 en comparación con la inyección de vehículo; mientras que en PER1 no tuvo efecto. Sin embargo, cuando se comparó el mismo punto temporal con las sham, en ambas proteínas el BE generó un aumento de células IR en el NSQ.

Nuestros resultados sugieren que los efectos producidos por la OVX en la respuesta circadiana de la actividad locomotriz pueden relacionarse con los cambios observados en el perfil diario de las proteínas PER1 y BMAL1 en el NSQ que, a su vez, podrían modularse principalmente por el estrógeno y su interacción con el ER β . Concluimos que, nuestros resultados aportan nueva información e importante sobre la interacción del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-ovario con el sistema circadiano en las hembras de *N. alstoni*.

7. LITERATURA CITADA

- Abizaid, A., Mezei, G., & Horvath, T.L. (2004) Estradiol enhances light-induced expression of transcription factors in the SCN. *Brain Res.*, **1010**, 35–44.
- Abrahamson, E.E. & Moore, R.Y. (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: Retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.*, **916**, 172–191.
- Ahdieh, H.B. & Wade, G.N. (1982) Effects of hysterectomy on sexual receptivity, food intake, running wheel activity, and hypothalamic estrogen and progesterin receptors in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **96**, 886–892.
- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., & Nishida, E. (2002) Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI in Cultured Cells. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1693–1703.
- Alagwu, E.A. & Nneli, R.O. (2005) Effect of Ovariectomy on the Levels of Plasma Sex Hormones in Albino Rats. *Niger. J. Physiol. Sci.*, **20**, 90–94.
- Albers, E.E., Gerall, A.A., & Axelsson, J.F. (1981) Effect of reproductive state on circadian periodicity in the rat. *Physiol. Behav.*, **26**, 21–25.
- Albers, H.E. (1981) Gonadal hormones organize and modulate the circadian system of the rat. *Am. J. Physiol.*, **241**, R62-6.
- Albrecht, U., Sun, Z.S., Eichele, G., & Lee, C.C. (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell*, **91**, 1055–1064.
- Alleva, J.J., Waleski, M. V, & Alleva, F.R. (1971) A Biological Clock Controlling the Estrous Cycle of the Hamster 1. *Endocrinology*, **88**, 1368–1379.
- Anantharaman-Barr, H.G. & Decombaz, J. (1989) The effect of wheel running and the estrous cycle on energy expenditure in female rats. *Physiol. Behav.*, **46**, 259–263.
- Aronin, N., Sagart, S.M., Sharpo, F.R., & Schwartzii, W.J. (1990) Light regulates expression of a Fos-related protein in rat suprachiasmatic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 5959–5962.
- Asarian, L. & Geary, N. (2002) Cyclic Estradiol Treatment Normalizes Body Weight and Restores Physiological Patterns of Spontaneous Feeding and Sexual Receptivity in Ovariectomized Rats. *Horm. Behav.*, **42**, 461–471.
- Aschoff, J. (1960) Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **25**, 11–28.
- Aschoff, J. (1965) Circadian Rhythms. *Science (80-)*, **148**, 1427–1432.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., & Weaver, D.R. (2001) Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*, **30**, 525–536.
- Bailey, M. & Silver, R. (2014) Sex differences in circadian timing systems: implications for disease. *Front. Neuroendocrinol.*, **35**, 111–139.

- Balthazart, J. & Ball, G.F. (2006) Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci.*, **29**, 241–249.
- Bhat, R.A., Stauffer, B., Unwalla, R.J., Xu, Z.B., Harris, H.A., & Komm, B.S. (2004) Molecular determinants of ERalpha and ERbeta involved in selectivity of 16alpha-iodo-17beta estradiol. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **88**, 17–26.
- Björnström, L. & Sjöberg, M. (2005) The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Mol. Endocrinol.*, **19**, 833–842.
- Blattner, M.S. & Mahoney, M.M. (2012) Circadian parameters are altered in two strains of mice with transgenic modifications of estrogen receptor subtype 1. *Genes, Brain Behav.*, **11**, 828–836.
- Blattner, M.S. & Mahoney, M.M. (2013) Photic phase-response curve in 2 strains of mice with impaired responsiveness to estrogens. *J. Biol. Rhythms*, **28**, 291–300.
- Blattner, M.S. & Mahoney, M.M. (2014) Estrogen receptor 1 modulates circadian rhythms in adult female mice. *Chronobiol. Int.*, **31**, 637–644.
- Blaustein, J.D. & Wade, G.N. (1976) Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol. Behav.*, **17**, 201–208.
- Borniger, J.C. & Nelson, R.J. (2017) Photoperiodic regulation of behavior: *Peromyscus* as a model system. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **61**, 82–91.
- Brockman, R., Bunick, D., & Mahoney, M.M. (2011) Estradiol deficiency during development modulates the expression of circadian and daily rhythms in male and female aromatase knockout mice. *Horm. Behav.*, **60**, 439–447.
- Bronson, F.H. & Vom Saal, F.S. (1979) Control of the preovulatory release of luteinizing hormone by steroids in the mouse. *Endocrinology*, **104**, 1247–1255.
- Brown-Grant, K. & Raisman, G. (1977) Abnormalities in Reproductive Function Associated with the Destruction of the Suprachiasmatic Nuclei in Female Rats. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, **198**, 279–296.
- Buijs, R.M. & Kalsbeek, A. (2001) Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 521–526.
- Butler, M.P., Karatsoreos, I.N., Sauter, J. Le, & Silver, R. (2012) Dose-dependent effects of androgens on the circadian timing system and its response to light. *Endocrinology*, **153**, 2344–2352.
- Cai, W., Rambaud, J., Masse, I., Benoit, G., Gustafsson, J.-åke, Delaunay, F., Laudet, V., & Pongratz, I. (2008) Expression Levels of Estrogen Receptor Beta Are Modulated by Components of the Molecular Clock. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 784–793.
- Card, J.P. & Moore, R.Y. (1984) The Suprachiasmatic Nucleus of the Golden-Hamster - Immunohistochemical Analysis of Cell and Fiber Distribution. *Neuroscience*, **13**, 415–431.
- Carpentieri, A., Barboza, G.D. De, Areco, V., López, M.P., & Talamoni, N.T. De (2012) New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol. Res.*, **65**, 437–444.

- Cassone, V.M., Speh, J.C., Card, J.P., & Moore, R.Y. (1988) Comparative anatomy of the mammalian hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *J. Biol. Rhythms*, **3**, 71–91.
- Chappell, P.E. (2005) Clocks and the black box: circadian influences on gonadotropin-releasing hormone secretion. *J. Neuroendocrinol.*, **17**, 119–130.
- Chen, D., Buchanan, G.F., Ding, J.M., Hannibal, J., & Gillette, M.U. (1999) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide : A pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 13468–13473.
- Christian, C.A., Mobley, J.L., & Moenter, S.M. (2005) Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 15682–15687.
- Christian, C.A. & Moenter, S.M. (2008) Vasoactive intestinal polypeptide can excite gonadotropin-releasing hormone neurons in a manner dependent on estradiol and gated by time of day. *Endocr. Rev.*, **149**, 3130–3136.
- Chun, L.E., Woodruff, E.R., Morton, S., Hinds, L.R., & Spencer, R.L. (2015) Variations in Phase and Amplitude of Rhythmic Clock Gene Expression across Prefrontal Cortex, Hippocampus, Amygdala, and Hypothalamic Paraventricular and Suprachiasmatic Nuclei of Male and Female Rats. *J. Biol. Rhythms*, **30**, 417–436.
- Crosthwaite, S.K., Loros, J.J., & Dunlap, J.C. (1995) Light-Induced Resetting of a Circadian Clock Is Mediated by a Rapid Increase in frequency Transcript. *Cell*, **81**, 1003–1012.
- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013) Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends Mol Med*, **19**, 197–209.
- Czaja, J.A. & Goy, R.W. (1975) Ovarian hormones and food intake in female guinea pigs and rhesus monkeys. *Horm. Behav.*, **6**, 329–349.
- Daan, S. (1977) Tonic and phasic effects of light in the entrainment of circadian rhythms. *Ann. New York Acad. Sci.*, **299**, 51–59.
- Daan, S. (2010) A History of Chronobiological Concepts. En Albrecht, U. (ed), *The Circadian Clock*, 1a edn. Springer, Verlag New York, pp. 1–35.
- Daan, S. & Aschoff, J. (2001) The Entrainment of Circadian Systems. En Takahashi, J.S., Turek, F.W., & Moore, R.Y. (eds), *Circadian Clocks. Handbook of Behavioral Neurobiology*, vol. 12. Springer, Boston, MA, pp. 7–43.
- Daan, S. & Pittendrigh, C.S. (1976) A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents. *J. Comp. Physiol.*, **106**, 253–266.
- de la Iglesia, H.O., Blaustein, J.D., & Bittman, E.L. (1995) The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH. *Neuroreport*, **6**, 1715–1722.
- de Pontes, A.L.B., Engelberth, R.C.G.J., da Silva Nascimento, E., Cavalcante, J.C., de Oliveira Costa, M.S.M., Pinato, L., de Toledo, C.A.B., & de Souza Cavalcante, J. (2010) Serotonin and circadian rhythms. *Psychol. Neurosci.*, **3**, 217–228.

- Delaunay, F., Pettersson, K., Tujague, M., & Gustafsson, J. a (2000) Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Mol. Pharmacol.*, **58**, 584–590.
- Deroo, B.J. & Buensuceso, A. V (2010) Minireview: Estrogen receptor-beta: mechanistic insights from recent studies. *Mol. Endocrinol.*, **24**, 1703–1714.
- Ding, J.M., Buchanan, G.F., Tischkau, S.A., Chen, D., Kuriashkina, L., Faiman, L.E., Alster, J.M., McPherson, P.S., Campbell, K.P., & Gillette, M.U. (1998) A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature*, **394**, 381–384.
- Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., & Mark, M. (2000) Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development*, **127**, 4277–4291.
- Eckel, L.A., Houpt, T.A., & Geary, N. (2000) Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiol. Behav.*, **70**, 397–405.
- Espey, L.L. & Richards, J.S. (2006) Ovulation. En Neill, J. (ed), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3a edn. Elsevier, pp. 425–474.
- Evans, N.P., Dahl, G.E., Padmanabhan, V., Thrun, L.A., & Karsch, F.J. (1997) Estradiol Requirements for Induction and Maintenance of the Gonadotropin-Releasing Hormone Surge : Implications for Neuroendocrine Processing of the Estradiol Signal *. *Endocrinology*, **138**, 5408–5414.
- Everett, J.W. & Sawyer, C.H. (1950) A 24-hour periodicity in the “LH-release apparatus” of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*, **47**, 198–218.
- Fahrenkrug, J., Georg, B., Hannibal, J., Hindersson, P., & Gr??s, S. (2006) Diurnal rhythmicity of the clock genes Per1 and Per2 in the rat ovary. *Endocrinology*, **147**, 3769–3776.
- Fatehi, M. & Fatehi-Hassanabad, Z. (2008) Effects of 17 β -estradiol on neuronal cell excitability and neurotransmission in the suprachiasmatic nucleus of rat. *Neuropsychopharmacology*, **33**, 1354–1364.
- Felicio, L.S., Nelson, J.F., & Finch, C.E. (1984) Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biol. Reprod.*, **31**, 446–453.
- Field, M.D., Maywood, E.S., O'Brien, J.A., Weaver, D.R., Reppert, S.M., & Hastings, M.H. (2000) Analysis of clock proteins in mouse SCN demonstrates phylogenetic divergence of the circadian clockwork and resetting mechanisms. *Neuron*, **25**, 437–447.
- Floessner, T. & Hut, R.A. (2017) Basic Principles Underlying Biological Oscillations and Their Entrainment. En Kumar, V. (ed), *Biological Timekeeping: Clocks, Rhythms and Behaviour*. Springe, New Delhi, pp. 47–58.
- Fuentes-Granados, C., Miranda-Anaya, M., Samario-Román, J., Moreno-Sáenz, E., Carmona-Castro, A., & Cárdenas-Vázquez, R.J. (2010) Circadian locomotor activity and response to different light conditions in the Volcano mouse, *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898). *Biol.*

Rhythm Res., **41**, 269–278.

- Gau, D., Lemberger, T., Gall, C. Von, Kretz, O., Minh, N. Le, Gass, P., Schmid, W., Schibler, U., Korf, H.W., & Schütz, G. (2002) Phosphorylation of CREB Ser142 Regulates Light-Induced Phase Shifts of the Circadian Clock. *Neuron*, **34**, 245–253.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., & Weitz, C.J. (1998) Role of the CLOCK Protein in Mammalian Circadian Mechanism. *Science (80-.)*, **280**, 1564–1569.
- Gentry, R.T. & Wade, G.N. (1976) Sex differences in sensitivity of food intake, body weight, and running-wheel activity to ovarian steroids in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **90**, 747–754.
- Gery, S., Virk, R.K., Chumakov, K., Yu, A., & Koeffler, H.P. (2007) The clock gene *Per2* links the circadian system to the estrogen receptor. *Oncogene*, **26**, 7916–7920.
- Gibson, E.M., Humber, S.A., Jain, S., Williams, W.P., Zhao, S., Bentley, G.E., Tsutsui, K., & Kriegsfeld, L.J. (2008) Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, **149**, 4958–4969.
- Gillette, M.U. & Tischkau, S.A. (1999) Suprachiasmatic nucleus : The brain's circadian clock. *Recent Prog. Horm. Res.*, **54**, 33–58.
- Gitlin, G. (1974) Vaginal opening and vaginal epithelium following ovariectomy in newborn rats. *Acta Anat.*, **90**, 117–132.
- Golombek, D. a & Rosenstein, R.E. (2010) Physiology of Circadian Entrainment. *Physiol. Rev*, **90**, 1063–1102.
- Golombek, D.A., Agostino, P. V, Plano, S.A., & Ferreyra, G.A. (2004) Signaling in the mammalian circadian clock: the NO/cGMP pathway. *Neurochem. Int.*, **45**, 929–936.
- Gómez-Chang, E., Larrea, F., & Martínez-Montes, F. (2012) Vías De Señalización Asociadas a La Esteroidogénesis. *Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas*, **15**, 24–36.
- Gräs, S., Georg, B., Jørgensen, H.L., & Fahrenkrug, J. (2012) Expression of the clock genes *Per1* and *Bmal1* during follicle development in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation and hypophysectomy. *Cell Tissue Res.*, **350**, 539–548.
- Guido, M.E., Goguen, D., De Guido, L., Robertson, H.A., & Rusak, B. (1999) Circadian and Photic Regulation of Immediate-early Gene Expression in the Hamster Suprachiasmatic Nucleus. *Neuroscience*, **90**, 555–571.
- Güldner, F.H. (1982) Sexual dimorphisms of axo-spine synapses and postsynaptic density material in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.*, **28**, 145–150.
- Güldner, F.H. (1983) Numbers of neurons and strogial cells in the suprachiasmatic nucleus of male and female rats. *Exp. brain Res.*, **50**, 373–376.
- Halberg, F. (1959) Physiologic 24 hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Int. Zeitschrift für Vitaminforsch.*, **10**, 255–296.
- Hamada, T., LeSauter, J., Venuti, J.M., & Silver, R. (2001) Expression of Period genes:

- rhythmic and nonrhythmic compartments of the suprachiasmatic nucleus pacemaker. *J. Neurosci.*, **21**, 7742–7750.
- Hamada, T., Yamanouchi, S., Watanabe, A., & Shibata, S. (1999) Involvement of glutamate release in substance P-induced phase delays of suprachiasmatic neuron activity rhythm in vitro. *Brain Res.*, **836**, 190–193.
- Han, S., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., & Herbison, A.E. (2005) Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty. *J. Neurosci.*, **25**, 11349–11356.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., & Yau, K.W. (2002) Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells : Architecture , Projections , and Intrinsic. *Science (80-)*, **295**, 1065–1070.
- Havelock, J.C., Rainey, W.E., & Carr, B.R. (2004) Ovarian granulosa cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **228**, 67–78.
- Hayashi, S.I. & Yamaguchi, Y. (2008) Estrogen signaling pathway and hormonal therapy. *Breast Cancer*, **15**, 256–261.
- He, P.J., Hirata, M., Yamauchi, N., Hashimoto, S., & Hattori, M.A. (2007) Gonadotropic regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **302**, 111–118.
- Herbison, A.E. (2006) Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network. En Neill, J. (ed), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*, 3a edn. Elsevier, p. 1415–1482,VII.
- Hillier, S.G., Whitelaw, P.F., & Smyth, D. (1994) Follicular oestrogen synthesis: the ‘ two-cell , two-gonadotrophin ’ model revisited. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **100**, 51–54.
- Hoffman, R.A. & Reiter, R.J. (1965) Pineal Gland : Influence on Gonads of Male Hamsters. *Science (80-)*, **148**, 1609–1611.
- Hoffmann, K. (1973) The Influence of Photoperiod and Melatonin on Testis Size, Body Weight, and Pelage Colour in the Djungarian Hamster (*Phodopus sungorus*). *J. Comp. Physiol.*, **85**, 267–282.
- Hummer, D.L., Peckham, E.M., & Lee, T.M. (2012) Estradiol acts during a post-pubertal sensitive period to shorten free-running circadian period in male *Octodon degus*. *Eur. J. Neurosci.*, **36**, 3051–3058.
- Iwahana, E., Karatsoreos, I., Shibata, S., & Silver, R. (2008) Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. *Horm. Behav.*, **53**, 422–430.
- Jarry, H., Leonhardt, S., & Wuttke, W. (1991) Gamma-Aminobutyric acid neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, **53**, 261–267.

- Juárez-Tapia, C.R. & Miranda-Anaya, M. (2016) El reloj circadiano ovárico : un segundero en la fisiología de la reproducción The ovarian circadian clock : a secondhand of the clock on the reproductive physiology Introducción Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y ciclo estral **4**, 147–163.
- Jud, C., Schmutz, I., Hampp, G., Oster, H., & Albrecht, U. (2005) A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biol. Proced. Online*, **7**, 101–116.
- Kalamatianos, T., Kalló, I., Goubillon, M., & Coen, C.W. (2004) Cellular Expression of V1a Vasopressin Receptor mRNA in the Female Rat Preoptic Area: Effects of Oestrogen. *J. Neuroendocrinol.*, **16**, 525–533.
- Karman, B.N. & Tischkau, S.A. (2006) Circadian Clock Gene Expression in the Ovary: Effects of Luteinizing Hormone1. *Biol. Reprod.*, **75**, 624–632.
- Karsch, F.J., Caraty, A., Evans, N.P., & Moenter, S.M. (1997) Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.*, **56**, 303–309.
- Kennaway, D.J. (2005) The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum. Reprod. Update*, **11**, 91–101.
- Kent, S., Hurd, M., & Satinoff, E. (1991) Interactions between body temperature and wheel running over the estrous cycle in rats. *Physiol. Behav.*, **49**, 1079–1084.
- Kian Tee, M., Rogatsky, I., Tzagarakis-Foster, C., Cvoró, A., An, J., Christy, R.J., Yamamoto, K.R., & Leitman, D.C. (2004) Estradiol and Selective Estrogen Receptor Modulators Differentially Regulate Target Genes with Estrogen Receptors alpha and betha. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 1262–1272.
- Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayo, K.E., & Takahashi, J.S. (1990) Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron*, **5**, 127–134.
- Krajnak, K., Kashon, M.L., Rosewell, K.L., & Wise, P.M. (1998) Sex Differences in the Daily Rhythm of Vasoactive Intestinal Polypeptide But Not Arginine Vasopressin Messenger Ribonucleic Acid in the Suprachiasmatic Nuclei *. *Endocrinology*, **139**, 4189–4196.
- Kriegsfeld, L.J., Leak, R.K., Yackulic, C.B., LeSauter, J., & Silver, R. (2004) Organization of Suprachiasmatic Nucleus Projections in Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*): An Anterograde and Retrograde Analysis LANCE. *J Comp Neurol*, **468**, 361–379.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltó-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 5925–5930.
- Kuljis, D.A., Loh, D.H., Truong, D., Vosko, A.M., Ong, M.L., McClusky, R., Arnold, A.P., & Colwell, C.S. (2013) Gonadal- and sex-chromosome-dependent sex differences in the circadian system. *Endocrinology*, **154**, 1501–1512.
- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., & Reppert, S.M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of

- the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, **98**, 193–205.
- Labyak, S.E. & Lee, T.M. (1995) Estrus- and steroid-induced changes in circadian rhythms in a diurnal rodent, *Octodon degus*. *Physiol. Behav.*, **58**, 573–585.
- Leak, R.K. & Moore, R.Y. (2001) Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *J. Comp. Neurol.*, **433**, 312–334.
- Lee, W., Smith, M.S., & Hoffman, G.E. (1990) Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 5163–5167.
- Legan, S.J., Coon, G.A., & Karsch, F.J. (1975) Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinology*, **96**, 50–56.
- Levin, E.R. (2001) Genome and Hormones: Gender Differences in Physiology: Invited Review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J. Appl. Physiol.*, **91**, 1860–1867.
- Levin, E.R. (2008) Rapid signaling by steroid receptors. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **295**, R1425–R1430.
- López, M. & Tena-Sempere, M. (2015) Estrogens and the control of energy homeostasis: A brain perspective. *Trends Endocrinol. Metab.*, **26**, 411–421.
- Maggiolini, M. & Picard, D. (2010) The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *J. Endocrinol.*, **204**, 105–114.
- Mahoney, M.M., Rossi, B.V., Hagenauer, M.H., & Lee, T.M. (2011) Characterization of the estrous cycle in *Octodon degus*. *Biol. Reprod.*, **84**, 664–671.
- Malpaux, B. (2006) Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. En Neill, J. (ed), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 3a edn. Elsevier, pp. 2231–2281.
- Merchenthaler, I., Lane, M. V., Numan, S., & Dellovade, T.L. (2004) Distribution of Estrogen Receptor Alpha and Beta in the Mouse Central Nervous System: In Vivo Autoradiographic and Immunocytochemical Analyses. *J. Comp. Neurol.*, **473**, 270–291.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., Caraty, A., & Aparicio, S.A.J.R. (2005) Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 1761–1766.
- Michel, S. & Colwell, C.S. (2001) Cellular Communication and Coupling within the Suprachiasmatic Nucleus. *Chronobiol Int.*, **18**, 579–600.
- Miller, B.H., Olson, S.L., Levine, J.E., Turek, F.W., Horton, T.H., Takahashi, J.S., Hughes, H., & Chase, C. (2006) Vasopressin Regulation of the Proestrous Luteinizing Hormone Surge in Wild-Type and Clock Mutant Mice 1. *Biol. Reprod.*, **75**, 778–784.
- Miller, W. (2005) Minireview: Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology*, **146**, 2544–2550.
- Miranda-Anaya, M., Carmona-Alcocer, V., & Carmona-Castro, A. (2016) Effects of obesity on

- circadian photic entrainment of locomotor activity in wild mice *Neotomodon alstoni*. *Biol. Rhythm Res.*, **47**, 529–537.
- Mitra, S.W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H.A., Hayashi, S., Pfaff, D.W., Ogawa, S., Rohrer, S.P., Schaeffer, J.M., McEwen, B.S., & Alves, S.E. (2003) Immunolocalization of estrogen receptor betha in the mouse brain: Comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, **144**, 2055–2067.
- Moenter, S.M., Brand, R.C., & Karsch, F.J. (1992) Dynamics of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) secretion during the GnRH surge: Insights into the mechanism of GnRH surge induction. *Endocrinology*, **130**, 2978–2984.
- Moga, M.M. & Moore, R.Y. (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **389**, 508–534.
- Moline, M.L. & Albers, H.E. (1988) Response of circadian locomotor activity and the proestrus luteinizing hormone surge to phase shifts of the light-dark cycle in the hamster. *Physiol.Behav.*, **43**, 435–440.
- Moore, R.Y. & Eichler, V.B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.*, **42**, 201–206.
- Moore, R.Y., Halaris, A.E., & Jones, B.E. (1978) Serotonin neurons of the midbrain raphe: Ascending projections. *J. Comp. Neurol.*, **180**, 417–438.
- Moore, R.Y., Neil J Smelser, & Paul B Baltes (2001) Suprachiasmatic Nucleus. *Int. Encycl. Soc. Behav. Sci.*, **12**, 15290–15294.
- Morin, L.P. & Allen, C.N. (2006) The circadian visual system, 2005. *Brain Res. Rev.*, **51**, 1–60.
- Morin, L.P. & Cummings, L.A. (1982) Splitting of wheelrunning rhythms by castrated or steroid treated male and female hamsters. *Physiol. Behav.*, **29**, 665–675.
- Morin, L.P., Fitzgerald, K.M., & Zucker, I. (1977) Estradiol shortens the period of hamster circadian rhythms. *Science*, **196**, 305–307.
- Morse, D. & Sassone-Corsi, P. (2002) Time after time: Inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends Neurosci.*, **25**, 632–637.
- Mosselman, S., Polman, J., & Dijkema, R. (1996) ER betha: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, **392**, 49–53.
- Murphy, Z.C., Pezuk, P., Menaker, M., & Sellix, M.T. (2013) Effects of ovarian hormones on internal circadian organization in rats. *Biol. Reprod.*, **89**, 1–9.
- Nadal, A., Diaz, M., & Valverde, M. a. (2001) The Estrogen Trinity: Membrane, Cytosolic, and Nuclear Effects. *News Physiol Sci*, **16**, 251–255.
- Nakamura, T.J., Moriya, T., Inoue, S., Shimazoe, T., Watanabe, S., Ebihara, S., & Shinohara, K. (2005) Estrogen differentially regulates expression of Per1 and Per2 genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. *J. Neurosci. Res.*, **82**, 622–630.
- Nakamura, T.J., Sellix, M.T., Kudo, T., Nakao, N., Yoshimura, T., Ebihara, S., Colwell, C.S., &

- Block, G.D. (2010) Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: Effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. *Steroids*, **75**, 203–212.
- Nakamura, T.J., Sellix, M.T., Menaker, M., & Block, G.D. (2008) Estrogen directly modulates circadian rhythms of PER2 expression in the uterus. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**, E1025–E1031.
- Nakamura, T.J., Shinohara, K., Funabashi, T., & Kimura, F. (2001) Effect of estrogen on the expression of Cry1 and Cry2 mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats. *Neurosci. Res.*, **41**, 251–255.
- Novak, C.M., Burghardt, P.R., & Levine, J.A. (2012) The use of a running wheel to measure activity in rodents: Relationship to energy balance, general activity, and reward. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **36**, 1001–1014.
- Ogawa, S., Chan, J., Gustafsson, J.Å., Korach, K.S., & Pfaff, D.W. (2003) Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: Specificity for the type of activity. *Endocrinology*, **144**, 230–239.
- Oishi, K., Sakamoto, K., Okada, T., Nagase, T., & Ishida, N. (1998a) Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 199–203.
- Oishi, K., Sakamoto, K., Okada, T., Nagase, T., & Ishida, N. (1998b) Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 199–203.
- Pando, M.P. & Sassone-Corsi, P. (2001) Signaling to the mammalian circadian clocks: in pursuit of the primary mammalian circadian photoreceptor. *Sci. STKE*, re16.
- Parker, M.G. (1995) Structure and Function of Estrogen Receptors. *Vitam. Horm.*, **51**, 267–287.
- Partch, C., Green, C., & Takahashi, J. (2014) Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.*, **24**, 90–99.
- Perrin, J.S., Segall, L.A., Harbour, V.L., Woodside, B., & Amir, S. (2006) The expression of the clock protein PER2 in the limbic forebrain is modulated by the estrous cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 5591–5596.
- Peterfi, Z., Churchill, L., Hajdu, I., Obal, F., Krueger, J.M., & Parducz, A. (2004) Fos-immunoreactivity in the hypothalamus: Dependency on the diurnal rhythm, sleep, gender, and estrogen. *Neuroscience*, **124**, 695–707.
- Pittendrigh, C.S. (1960) Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **25**, 159–184.
- Povey, S., Lovering, R., Bruford, E., Wright, M., Lush, M., & Wain, H. (2001) The HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). *Hum. Genet.*, **109**, 678–680.
- Preitner, N., Damiola, F., Luis-Lopez-Molina, Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, **110**, 251–260.

- Putteeraj, M., Soga, T., Ubuka, T., & Parhar, I.S. (2016) A “timed” kiss is essential for reproduction: Lessons from mammalian studies. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **7**, 1–10.
- Ramanathan, C., Nunez, A.A., & Smale, L. (2008) Daily rhythms in PER1 within and beyond the suprachiasmatic nucleus of female grass rats (*Arvicanthis niloticus*). *Neuroscience*, **156**, 48–58.
- Reebs, S.G. & Mrosovsky, N. (1989) Effects of Induced Wheel Running on the Circadian Activity Rhythms of Syrian Hamsters: Entrainment and Phase Response Curve. *J. Biol. Rhythms*, **4**, 39–48.
- Reiter, R.J. (1980) The Pineal and Its Hormones in the Control of Reproduction in Mammals*. *Endocr. Rev.*, **1**, 109–131.
- Richard, J.E., López-Ferreras, L., Anderberg, R.H., Olandersson, K., & Skibicka, K.P. (2017) Estradiol is a critical regulator of food-reward behavior. *Psychoneuroendocrinology*, **78**, 193–202.
- Ripperger, J. & Brown, S. (2010) The Circadian Clock. En Albrecht, U. (ed), *The Circadian Clock*. Springer, New York, pp. 37–78.
- Roa, J., Vigo, E., Castellano, J.M., Gaytan, F., Navarro, V.M., Aguilar, E., & Dijcks, F.A. (2008) Opposite Roles of Estrogen Receptor (ER)- alpha and ER betha in the Modulation of Luteinizing Hormone Responses to Kisspeptin in the Female Rat : Implications for the Generation of the Preovulatory Surge. *Endocrinology*, **149**, 1627–1637.
- Robertson, J.L., Clifton, D.K., de la Iglesia, H.O., Steiner, R.A., & Kauffman, A.S. (2009) Circadian Regulation of Kiss1 Neurons : Implications for Timing the Preovulatory Gonadotropin-Releasing Hormone/Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology*, **150**, 3664–3671.
- Robinson, J.E. & Karsch, F.J. (1987) Photoperiodic history and a changing melatonin pattern daylength. *J. Reprod. Fertil. Ltd*, **80**, 159–165.
- Robinson, S.M., Fox, T.O., Dikkes, P., & Pearlstein, R.A. (1986) Sex differences in the shape of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and suprachiasmatic nucleus of the rat: 3-D computer reconstructions and morphometrics. *Brain Res.*, **371**, 380–384.
- Rodier, w. I. & Segal, S. (1977) The effect of progesterone on the activity-wheel running of ovariectomized rats. *Horm. Behav.*, 214–221.
- Rosenwasser, A.M. & Dwyer, S.M. (2001) Circadian phase shifting: Relationships between photic and nonphotic phase-response curves. *Physiol. Behav.*, **73**, 175–183.
- Roy, E.J. & Wade, G.N. (1977) Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats. *Horm. Behav.*, **8**, 265–274.
- Royston, S.E., Yasui, N., Kondilis, A.G., Lord, S. V., Katzenellenbogen, J.A., & Mahoney, M.M. (2014) ESR1 and ESR2 differentially regulate daily and circadian activity rhythms in female mice. *Endocrinology*, **155**, 2613–2623.
- Ruiz De Elvira, M.C., Persaud, R., & Coen, C.W. (1992) Use of running wheels regulates the effects of the ovaries on circadian rhythms. *Physiol. Behav.*, **52**, 277–284.

- Russo, K.A., La, J.L., Stephens, S.B.Z., Poling, M.C., Padgaonkar, N.A., Jennings, K.J., Piekarski, D.J., Kauffman, A.S., & Kriegsfeld, L.J. (2015) Circadian control of the female reproductive axis through gated responsiveness of the RFRP-3 system to VIP signaling. *Endocrinology*, **156**, 2608–2618.
- Sawyer, C.H., Everett, J.W., & Markee, J.E. (1949) A neural factor in the mechanism by which estrogen induces the release of luteinizing hormone in the rat. *Endocrinology*, **44**, 218–233.
- Schmidt, T.M., Do, M.T., Dacey, D., Lucas, R., Hattar, S., & Matynia, A. (2011) Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function. *J Neurosci*, **31**, 16094–16101.
- Schmutz, I., Ripperger, J.A., Baeriswyl-Aebischer, S., & Albrecht, U. (2009) The mammalian clock component PERIOD2 coordinates circadian output by interaction with nuclear receptors. *Genes Dev.*, **24**, 345–357.
- Sehgal, A. (2004) Part I. Introduction to Circadian Rhythms. In Sehgal, A. (ed), *Molecular Biology of Circadian Rhythms*. Wiley-LISS, New Jersey, pp. 3–16.
- Sellix, M.T., Murphy, Z.C., & Menaker, M. (2013) Excess androgen during puberty disrupts circadian organization in female rats. *Endocrinology*, **154**, 1636–1647.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Reppert, S.M., & Weaver, D.R. (1999) Expression of basic helix-loop-helix/PAS genes in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, **89**, 387–397.
- Shearman, L.P., Zylka, M.J., Weaver, D.R., Kolakowski, L.F., & Reppert, S.M. (1997) Two period homologs: Circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, **19**, 1261–1269.
- Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Hughes, H., & Francisco, S. (1998) The Structural Basis of Estrogen Receptor / Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen **95**, 927–937.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C., & Okamura, H. (1997) Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell*, **91**, 1043–1053.
- Shima, N., Yamaguchi, Y., & Yuri, K. (2003) Distribution of estrogen receptor beta mRNA-containing cells in ovariectomized and estrogen-treated female rat brain. *Anat. Sci. Int.*, **78**, 85–97.
- Shinohara, K., Funabashi, T., Mitushima, D., & Kimura, F. (2000) Effects of estrogen on the expression of connexin32 and connexin43 mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats. *Neurosci. Lett.*, **286**, 107–110.
- Shinohara, K., Funabashi, T., Nakamura, T.J., & Kimura, F. (2001) Effects of estrogen and progesterone on the expression of connexin-36 mRNA in the suprachiasmatic nucleus of female rats. *Neurosci. Lett.*, **309**, 37–40.

- Shughrue, P.J., Lane, M. V., & Merchenthaler, I. (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp.*, **388**, 507–525.
- Smarr, B.L., Morris, E., & De La Iglesia, H.O. (2012) The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of Kiss1 and the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, **153**, 2839–2850.
- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., & Steiner, R.A. (2005) Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, **146**, 3686–3692.
- Smith, M.J., Jennes, L., & Wise, P.M. (2000) Localization of VIP2 Receptor Protein on GnRH in the Female Rat. *Endocrinology*, **141**, 4317–4820.
- Spary, E.J., Maqbool, A., & Batten, T.F.C. (2010) Changes in Oestrogen Receptor a Expression in the Nucleus of the Solitary Tract of the Rat Over the Oestrous Cycle and Following Ovariectomy *Neuroendocrinology* 492–502.
- Stephan, F.K. & Zucker, I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 1583–1586.
- Stocco, D.M. & Clark, J. (1996) Regulation of the Acute Production of Steroids in Steroidogenic cells. *Endocr. Rev.*, **17**, 221–244.
- Swanson, L.W., Cowan, W.M., & Jones, E.G. (1974) An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the albino rat and the cat. *J. Comp. Neurol.*, **156**, 143–163.
- Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N., Fujii-kuriyama, Y., Jin, X., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Zylka, M.J., De Vries, G.J., Reppert, S.M., Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K., Uhler, M.D., Dunlap, J.C., Shinohara, K., Funabashi, T., Mitushima, D., & Kimura, F. (1999) Histamine Actions in the Central Nervous System. *Cell*, **96**, 107–110.
- Takasu, N.N., Nakamura, T.J., Tokuda, I.T., Todo, T., Block, G.D., & Nakamura, W. (2015) Recovery from Age-Related Infertility under Environmental Light-Dark Cycles Adjusted to the Intrinsic Circadian Period. *Cell Rep.*, **12**, 1407–1413.
- Tamaru, T., Isojima, Y., Yamada, T., Okada, M., Nagai, K., & Takamatsu, K. (2000) Light and Glutamate-Induced Degradation of the Circadian Oscillating Protein BMAL1 during the Mammalian Clock Resetting. *J. Neurosci.*, **20**, 7525–7530.
- Thresher, R.J., Miyamoto, M.H.V.Y., Kazantsev, A., Hsu, D.S., Petit, C., Selby, C.P., Dawut, L., Smithies, O., Takahashi, J.S., & Sancar, A. (1998) Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science (80-)*, **282**, 1490–1494.
- Tischkau, S.A., Mitchell, J.W., Tyan, S., Buchanan, G.F., & Gillette, M.U. (2003) Ca²⁺/cAMP Response Element-binding Protein (CREB)-dependent Activation of Per1 Is Required for Light-induced Signaling in the Suprachiasmatic Nucleus Circadian Clock *. *J. Biol. Chem.*, **278**, 718–723.

- Tomikawa, J., Uenoyama, Y., Ozawa, M., Fukanuma, T., Takase, K., Goto, T., Abe, H., Ieda, N., Minabe, S., Deura, C., Inoue, N., Sanbo, M., Tomita, K., Hirabayashi, M., Tanaka, S., Imamura, T., Okamura, H., Maeda, K., & Tsukamura, H. (2012) Epigenetic regulation of Kiss1 gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, E1294–E1301.
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., & Chambon, P. (1989) The Human Estrogen Receptor Has Two Independent Nonacid Transcriptional Activation Functions. *Cell*, **59**, 477–487.
- Travnickova-bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M., & Sassone-corsi, P. (2002) Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 7728–7733.
- Urlep, Z. & Rozman, D. (2013) The interplay between circadian system, cholesterol synthesis, and steroidogenesis affects various aspects of female reproduction. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **4**, 1–10.
- van den Pol, A.N. (1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *J. Comp. Neurol.*, **191**, 661–702.
- Van Der Beek, E.M., Van Oudheusden, H.J.C., Buijs, R.M., Van Der Donk, H.A., Van Den Hurk, R., & Wiegant, V.M. (1994) Preferential Induction of c-fos Immunoreactivity in Vasoactive Intestinal Polypeptide-Innervated Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons during a Steroid-Induced Luteinizing Hormone Surge in the Female Rat. *Endocrinology*, **134**, 2636–2644.
- Van Der Beek, E.M., Wiegant, V.M., Van Oudheusden, H.J.C., Van Der Donk, H.A., Van Den Hurk, R., & Buijs, R.M. (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 Res.*, **755**, 101–111.
- Vida, B., Hrabovszky, E., Kalamatianos, T., Coen, C.W., Liposits, Z., & Kalló, I. (2008) Oestrogen receptor α and β immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: Distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones. *J. Neuroendocrinol.*, **20**, 1270–1277.
- Walter, P., Green, S., Greenet, G., Krust, A., Bornert, J.-M., Jeltsch, J.-M., Staub, A., Jensent, E., Scrace, G., Waterfield, M., & Chambon, P. (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA (AgtlI expression screening/oligonucleotide screening/in vitro translation/hybrid-selection/monoclonal antibody). *Biochemistry*, **82**, 7889–7893.
- Watson, R.E., Langub, M.C., Engle, M.G., & Maley, B.E. (1995) Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Res.*, **689**, 254–264.
- Welsh, D.K., Takahashi, J.S., & Kay, S.A. (2010) Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu. Rev. Physiol.*, **72**, 551–577.
- Wiegand, S.J., Terasawa, E., Bridson, W.E., & Goy, R.W. (1980) Effects of Discrete Lesions of Preoptic and Suprachiasmatic Structures in the Female Rat. *Neuroendocrinology*, **31**,

147–157.

- Wilson, M.E., Rosewell, K.L., Kashon, M.L., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., & Wise, P.M. (2002) Age differentially influences estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) gene expression in specific regions of the rat brain. *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 593–601.
- Wise, P.M. & Ratner, A. (1980) Effect of ovariectomy on plasma LH, FSH, estradiol and progesterone and medial basal hypothalamic LHRH concentrations in old and young rats. *Neuroendocrinology*, **30**, 15–19.
- Wollnik, F. & Turek, F.W. (1988) Estrous correlated modulations of circadian and ultradian wheel-running activity rhythms in LEW/Ztm rats. *Physiol. Behav.*, **43**, 389–396.
- Xiao, L., Chang, A.K., Zang, M.X., Bi, H., Li, S., Wang, M., Xing, X., & Wu, H. (2014) Induction of the CLOCK gene by E2-ER α signaling promotes the proliferation of breast cancer cells. *PLoS One*, **9**, 1–13.
- Yamada, N., Shimoda, K., & Ohi, K.E.N. (1988) Free-Access to a Running Wheel Shortens the Period of Free-Running Rhythm in Blinded Rats **42**, 87–91.
- Yan, L. & Okamura, H. (2002) Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 1153–1162.
- Yan, L. & Silver, R. (2004) Resetting the brain clock: Time course and localization of mPER1 and mPER2 protein expression in suprachiasmatic nuclei during phase shifts. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 1105–1109.
- Yan, L., Takekida, S., Shigeyoshi, Y., & Okamura, H. (1999) Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: Circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience*, **94**, 141–150.
- Yang, X., Downes, M., Yu, R.T., Bookout, A.L., He, W., Straume, M., Mangelsdorf, D.J., & Evans, R.M. (2006) Nuclear Receptor Expression Links the Circadian Clock to Metabolism. *Cell*, **126**, 801–810.
- Yannielli, P.C., Mckinley Brewer, J., & Harrington, M.E. (2002) Is novel wheel inhibition of per1 and per2 expression linked to phase shift occurrence? *Neuroscience*, **112**, 677–685.
- Zhou, Y., Shughrue, P.J., & Dorsa, D.M. (1995) Estrogen receptor protein is differentially regulated in the preoptic area of the brain and in the uterus during the rat estrous cycle. *Neuroendocrinology*, **61**, 276–283.
- Zylka, M.J., Shearman, L.P., Weaver, D.R., & Reppert, S.M. (1998) Three period homologs in mammals: Differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, **20**, 1103–1110.

El reloj circadiano ovárico: un segundero en la fisiología de la reproducción

The ovarian circadian clock: a secondhand of the clock on the reproductive physiology

Recibido: 10 de marzo de 2016; aceptado: 25 de mayo de 2016

Cynthia Rocío Juárez Tapia ¹, Manuel Miranda Anaya ²

Facultad de Ciencias, UNAM

Resumen

Para garantizar el éxito reproductivo, los mamíferos requieren de la organización de muchos procesos fisiológicos y conductuales, así como la participación de señales del medio ambiente. Durante la reproducción, las hembras secretan diversas hormonas que inducen de manera óptima la ovulación para la posible fertilización. Dichos eventos, se presentan rítmicamente y están vinculados a un proceso circadiano de regulación.

El núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo es considerado el reloj maestro de los ritmos circadianos en mamíferos e influye diariamente, vía neural y endocrina en diversos sistemas fisiológicos. La fisiología reproductiva es coordinada por las conexiones del NSQ con otros núcleos hipotalámicos encargados de la liberación de las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG).

En esta revisión se abordará la comunicación entre los sistemas circadiano y el eje HHG para la regulación del ciclo estral, con particular énfasis en el reciente descubrimiento del ovario como oscilador circadiano periférico en roedores.

Palabras clave: ovario, sistema circadiano, oscilador periférico, fisiología reproductiva.

Abstract

To secure reproductive success, mammals require the establishment of several physiological and behavioral processes, as well as the involvement of environmental signals. During reproduction, females secrete a number of different hormones to induce an optimal ovulation for a potential fertilization. These events are presented rhythmically and are linked to the circadian regulation.

The suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus is considered the master clock of circadian rhythms in mammals, it affects neural and endocrine manner on several physiological systems daily. Reproductive physiology is coordinated by SCN connections with other hypothalamic areas, which are responsible for the release of the hormones involved in the hypothalamic-pituitary-gonads axis (HPG).

This review will address the communication between the circadian system and the HPG axis in the regulation of the estrous cycle, with a particular emphasis on the recent discovery of the role of the ovary as a peripheral circadian oscillator in rodents.

Keywords: ovary, circadian system, peripheral oscillator, reproductive physiology

INTRODUCCIÓN

Los organismos llevan a cabo dos funciones básicas para su supervivencia: alimentarse y reproducirse. La primera es requerida para obtener energía y poder llevar a cabo procesos implicados durante el desarrollo; la segunda

es la manera de perpetuar la especie al transmitir y recombinar su información genética de generación en generación y es el sustrato de los procesos evolutivos ante el ambiente. La reproducción sexual requiere de la

¹Maestra en Ciencias. Unidad de adscripción: Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. Facultad de Ciencias. Estudiante candidata a doctora del posgrado en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Sus líneas de investigación son: Neurobiología de ritmos circadianos y su relación con el fotoperíodo y la fisiología reproductiva. Correo electrónico: cinth@ciencias.unam.mx

²Doctor en Ciencias. Profesor Titular C de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, Campus Juriquilla, Querétaro, UNAM. Sus líneas de investigación son: Neurobiología de ritmos circadianos y su relación con problemas ecológicos y de la salud. Correo electrónico: miranmanuel@ciencias.unam.mx.



fecundación para la combinación genética de dos células germinales, lo que implica una coincidencia en espacio y en tiempo para el encuentro de los gametos femeninos y masculinos.

En hembras de mamíferos, previo a la fecundación del óvulo, son necesarios una serie de procesos coordinados, tanto conductuales como fisiológicos con la pareja. La observación de los cambios de la diversidad de conductas y rasgos fenotípicos permitió a Darwin en 1859, postular una teoría de “la selección sexual”. Junto a los procesos conductuales, los procesos fisiológicos involucrados en la reproducción reciben una fuerte influencia del ambiente, lo que requiere de la coordinación óptima en el tiempo para que aumente la probabilidad del éxito reproductivo, tal función se logra, al parecer, a través de la participación del sistema circadiano.

El presente trabajo provee una revisión sobre el conjunto de evidencias relacionadas con el control circadiano en la reproducción de las hembras, específicamente en roedores; y hace énfasis en aquellos descubrimientos que analizan al ovario como tejido con funciones rítmicas circadianas. El artículo se estructura desarrollando a grandes rasgos los dos temas principales: fisiología del ciclo estral y ritmos circadianos; posteriormente se desarrolló un tema sobre la interacción de estos procesos. Estos tres temas fueron sustentados tanto con literatura clásica en el tema con enfoque de ritmos biológicos y/o circadianos, así como con literatura reciente.

Una vez establecidos los antecedentes generales, se abordó de lleno el análisis sobre el tema del ovario como oscilador periférico con base en la literatura especializada. Se plantearon las siguientes preguntas: ¿cómo se genera la coordinación entre un ritmo circadiano y uno infradiano?, ¿cuál es la importancia del ovario como oscilador periférico? Para coleccionar las referencias específicas en el tema, se realizó una búsqueda en las bases de datos *Pubmed* y *Scopus* con las siguientes palabras clave: *circadian clock in ovary*, *circadian rhythm*, *ovary* y *clock genes* utilizando el operador booleano *AND*. De los resultados de la búsqueda se seleccionaron aquellos artículos con los siguientes criterios: *a)* que analizaran componentes del reloj molecular circadiano en el ovario, *b)* que el estudio fuera en mamíferos y *c)* que el modelo biológico empleado para el estudio fuera en roedores. Tras la búsqueda se descartaron aquellos artículos irrelevantes con base en su título y resumen y se revisaron

los relevantes para el tema.

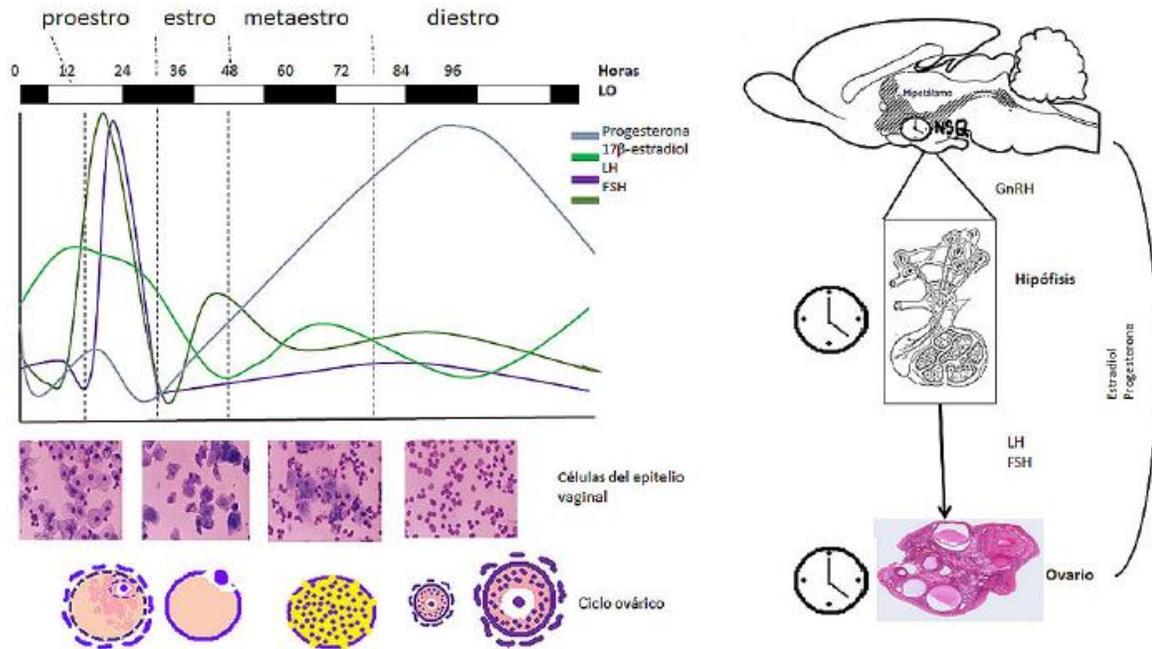
EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS Y CICLO ESTRAL

La reproducción en la hembra es un tema de estudio sumamente amplio, pues abarca desde la conducta sexual y su control hormonal hasta la crianza y cuidado de las crías. La conducta sexual está conformada por tres procesos: atracción, proceptividad y receptividad, todos ellos con particularidades hormonales y fisiológicas muy específicas para cada especie. Para más detalles ver Beyer, Hoffman y González (2007). Para los fines de la presente revisión, se abordará directamente y de manera general, la fisiología del ciclo estral, la cual está inmersa en la conducta de receptividad, ya que existe un momento específico de éste ciclo donde la hembra es receptiva al macho.

A grandes rasgos, los ciclos reproductivos en las hembras de roedores son llamados ciclos estrales y tienen una duración aproximada de 4-5 días; cada ciclo consta de 4 etapas: proestro (*P*), estro (*E*), metaestro (*M*) y diestro (*D*), (Freeman, 1994). En cada una de ellas existen cambios hormonales bien definidos, ejemplo de ello son las altas concentraciones en plasma de la prolactina, la hormona luteinizante (*HL*) y la hormona foliculo estimulante (*FSH*) en la tarde del proestro, específicamente a las 18:00 horas (Fink y Ayer, 1974); mientras que en *M* los niveles de estradiol se elevan hasta alcanzar su mayor concentración durante el *P* y regresan a niveles basales al final del *E*. Por su parte, la progesterona presenta dos picos de secreción, uno durante el *M* y el *D*, y el segundo pico de mayor amplitud durante el *P*, el cual decae al llegar la fase de *E*. La ovulación comienza al inicio del *P* y concluye al final del *E* (Marcondes, Biachi y Tanno, 2002) y puede ser rastreada mediante los cambios en las células del epitelio vaginal, las cuales caracterizan a cada etapa. Los eventos de liberación hormonal y de los ovocitos, implicados en el ciclo, demandan una coordinación temporal que está estrechamente relacionada e influenciada por un control circadiano (figura 1).

El ciclo estral no es el único proceso durante la reproducción femenina en donde se presenta un control circadiano. En conejos, el amamantamiento ocurre aproximadamente cada 24 horas y en las crías se presenta

Figura 1. Cambios hormonales, ováricos y del epitelio vaginal durante el ciclo estral, y su control circadiano en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario



Diagramas que representan y resumen los eventos de liberaciones hormonales durante los días (representados con las barras blancas y negras en horas) que constituyen el ciclo estral en roedores (izquierda), así como los cambios celulares observados en las células del epitelio vaginal y el ciclo ovárico (diagrama de la izquierda, abajo). Además, también se puede observar la influencia del sistema circadiano en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y el papel de tales estructuras como osciladores (diagrama de la derecha). GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona foliculo estimulante; NSQ, núcleo supraquiasmático.

Fuente: McLean, Valenzuela y Bennett, 2012.

una conducta anticipatoria, lo cual también puede reflejarse en la secreción de oxitocina, hormona que se libera con el estímulo de succión en las glándulas mamarias durante la lactancia (González-Mariscal, 2006).

Previo a la ovulación, la hormona liberadora de gonadotropinas (*GnRH*) es liberada desde el hipotálamo en su modalidad pulsátil; estos pulsos son de baja amplitud y presentan una duración de aproximadamente 30 min. (Chappell, 2005). El *M* se caracteriza por presentar un patrón de secreción basal de *GnRH* suficiente para estimular la secreción basal de hormona luteinizante (*LH*) y hormona foliculo estimulante (*FSH*) desde la hipófisis; ambas hormonas promueven la maduración de folículos en los ovarios. Durante el *D*, algunos folículos se diferencian y comienza la secreción de estrógenos (17-β estradiol) aumentando gradualmente su concen-

tración en la sangre. En el *P*, la secreción de estrógenos por parte de los folículos maduros presenta su máxima concentración durante la noche del proestro y estimula la cornificación de las células en el epitelio vaginal; mientras que durante el *E*, los ovarios liberan simultáneamente varios ovocitos, en respuesta al aumento de las concentraciones preovulatorias de *LH* y *FSH* en la rata (Domínguez, Chávez y Cruz, 1991).

El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (*HHG*) es controlado principalmente por la *GnRH*, la cual es un decapeptido secretado por neuronas hipotalámicas localizadas desde el área preóptica (*POA*) hasta el núcleo arcuato (*ARC*). Una vez liberada la *GnRH* a la eminencia media (*ME*) viaja hacia la hipófisis a través de una red de capilares localizada en el infundíbulo. La *GnRH* en hipófisis se une a las células gonadotropas que presentan receptores



acoplados a proteína *G*; evento que estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas *LH* y *FSH*. Una vez en circulación, estas hormonas llegan al ovario y se unen a sus receptores en las células de la teca o granulosa de los folículos, desencadenando procesos de crecimiento, maduración y diferenciación folicular; así como la síntesis y secreción de hormonas esteroides (estrógeno y progesterona), y la liberación de los ovocitos (Sikes, 2009).

En resumen, la secreción de *GnRH* se presenta de dos formas: una pulsátil caracterizada por pulsos de alta frecuencia y baja amplitud (Chappell, 2005) que ocurre cuando hay bajas concentraciones de estradiol, lo que ocasiona la inhibición de la secreción de *GnRH* y *LH*; y una cíclica caracterizada por presentar un pico conspicuo durante la fase preovulatoria, cuando las altas concentraciones de estradiol retroalimentan positivamente la secreción de *GnRH* y *LH*. Este aumento en la liberación masiva de *GnRH* es requerido para inducir un pico en los niveles de concentración de *LH* indispensable para desencadenar la ovulación (Schneider, 2004).

EL SISTEMA CIRCADIANO EN MAMÍFEROS

Las señales ambientales cíclicas con periodo estable permiten que los organismos se adapten a ellas y se anticipen a cambios periódicos en la iluminación y en la temperatura. Los ciclos geofísicos regulares parecen haber ejercido una presión selectiva en los seres vivos, esta influencia se observa en la persistencia de los ritmos en condiciones constantes y su correspondencia de duración aproximada (*circa*) con la ritmicidad de algún ciclo ambiental, la cual se caracteriza por durar aproximadamente 24 horas. Los ritmos circadianos son generados por un reloj biológico determinado genéticamente, el cual es capaz de sincronizarse diariamente a los ciclos de luz-oscuridad (Pittendrigh, 1993). La sincronización de un reloj circadiano resulta de la interacción entre un oscilador endógeno y una variable cíclica ambiental, conocida con el nombre de *Zeitgeber* (término alemán que significa dador de tiempo) o sincronizador (Aschoff, 1960).

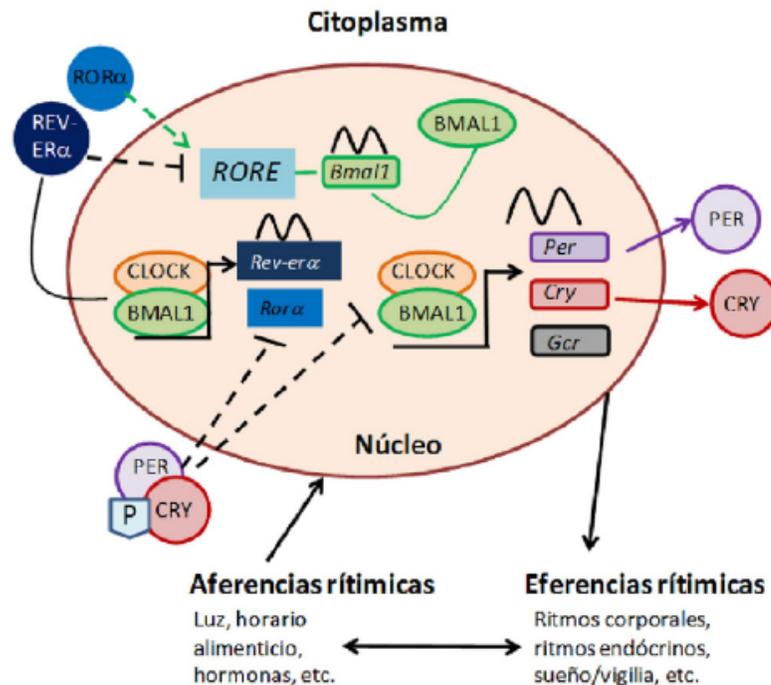
La sincronización es el proceso que ocurre cuando el periodo de un oscilador endógeno (τ) es ajustado y acoplado al periodo de un *Zeitgeber* (T), por lo que se dice que $\tau=T$; lo que establece una relación de fase (Ψ) entre el oscilador circadiano y el *Zeitgeber* (Daan y Aschoff,

2001). Cuando se habla de tiempo del *Zeitgeber* (*Zeitgeber Time [ZT]* por sus siglas en inglés) se refiere al horario en condiciones artificiales en función al momento en que inicia la presencia de la luz. Cuando se habla de tiempo circadiano (*Circadian Time [CT]* por sus siglas en inglés), se refiere a 24 unidades horarias que se completan en el tiempo que constituye el periodo endógeno del oscilador biológico, usualmente son referidos a una conducta como el inicio de la actividad (Pittendrigh y Minis, 1964).

Aquellas señales capaces de sincronizar a un oscilador biológico, tienen que ser previamente percibidas por alguna estructura del organismo. El sistema circadiano consiste en todos los elementos biológicos que interactúan para mantener un orden temporal interno; de tal forma que es conformado por las vías aferentes (usualmente son sistemas sensoriales) a un marcapasos central u oscilador endógeno, y las vías de salida (tejidos u órganos) para el ritmo manifiesto. Las aferencias o vías de entrada transmiten información de las señales ambientales hacia el oscilador o marcapasos central, éste, realiza la integración de la información recibida sobre las señales externas y lleva a cabo un ajuste sobre diversas funciones fisiológicas temporales, cuyas eferencias son los ritmos neuronales, hormonales y conductuales (Schibler y Sassone-Corsi, 2002).

El origen endógeno de la oscilación circadiana en un organismo, requiere un mecanismo a nivel celular y molecular que es controlado por asas de retroalimentación de transcripción-traducción (Moore y Eichler, 1972). La primera asa de retroalimentación es integrada por el factor de transcripción *BMAL1* (*Brain and muscle Arnt-like protein-1*) que forma dímeros con la proteína *CLOCK* (*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*) mediante el dominio PAS, y activa la transcripción de los genes *Period* (*Per1* y *Per2*) y *Cryptochrome* (*Cry1* y *Cry2*). Una vez activados *PER* y *CRY*, forman heterodímeros que ingresan al núcleo celular, donde inhiben su propia activación. Por otra parte, los heterodímeros de *CLOCK-BMAL1* inducen la expresión de un receptor nuclear huérfano llamado *Rev-erb α* y *ROR* (*retinoid-related orphan receptor*). La segunda asa de la maquinaria se establece por las modificaciones post-traduccionales del dímero *PER-CRY*, que implica la fosforilación por las caseína cinasas (*CK1 ϵ* , δ), lo cual asegura un retraso adecuado (figura 2), de manera que la duración del ciclo completo es de aproximadamente 24 horas (Takahashi *et al.*, 2008; Mohawk, Green

Figura 2. Representación de las principales aspas de transcripción-traducción de los genes reloj en las células del NSQ de mamíferos



El heterodímero conformado por *CLOCK*/*BMAL 1* se une a la región promotora de los genes *Per* y *Cry* y otros genes controlados por reloj (*Gcr*) responsables de las vías eferentes del reloj. Las proteínas *PER* y *CRY* se acumulan en el citoplasma donde se fosforilan (*P*) y translocan para inhibir su propia transcripción. Las eferencias rítmicas son responsables de sincronizar los ritmos en los relojes periféricos e influir en procesos fisiológicos. Por otra parte, las aferencias rítmicas participan en la diafonía con el centro del reloj molecular mediante mecanismos de retroalimentación. Las líneas punteadas indican los mecanismos reguladores positivos (verdes) y negativos (negros).

Fuente: Stubblefield, Terrien y Green, (2012)

y Takahashi, 2012).

La maquinaria molecular del reloj circadiano está presente en todas las células, sin embargo, fuera del NSQ la autonomía en la oscilación es débil, por lo que se reconoce como oscilador circadiano periférico a los tejidos que manifiestan oscilación de maquinaria de reloj *in vitro*, pero que rápidamente se amortigua. El NSQ sincroniza la fisiología del organismo a los cambios diarios mediante la coordinación de los osciladores periféricos a través de vías neuronales y humorales (Schibler y Sassone-Corsi, 2002). Estudios previos han demostrado que una variedad de factores son capaces de reajustar a los osciladores periféricos, como los glucocorticoides (Balsalobre, Mar-

cacci y Schibler, 2000), los estrógenos (Nakamura *et al.*, 2005) y las prostaglandinas (Tsuchiya *et al.*, 2005) entre otros. Cuando los organismos están sincronizados a un ciclo de luz-oscuridad, se establece una relación de fase particular entre los osciladores periféricos con el NSQ en una relación temporal tejido-específica (Abe *et al.*, 2002).

En resumen, los ritmos circadianos: son endógenos, ubicuos y capaces de sincronizarse a señales ambientales. Aquellos ritmos biológicos que se presentan varias veces en 24 horas (alta frecuencia) se les llama ultradianos; mientras que aquellos que requieren varios días para completarse (baja frecuencia) se les conocen como infradianos; las bases de estas oscilaciones no son cla-

ras pero al parecer reciben una fuerte influencia de los mecanismos circadianos.

REGULACIÓN DEL CICLO ESTRAL POR EL SISTEMA CIRCADIANO

Entre la regulación del eje neuroendocrino que controla el ciclo estral y la regulación circadiana dada por el núcleo supraquiasmático, se plantea la siguiente pregunta: ¿existe influencia del reloj circadiano sobre un ritmo biológico infradiano como el ciclo estral? Las primeras evidencias de esta relación se mostraron a principios de la década de los 70 en hembras de hámster y de rata, cuya ablación del NSQ generó una condición anovulatoria, caracterizada por un estro persistente (Stetson y Watson, 1976; Brown-Grant y Raisman, 1977). Por otra parte, cuando hembras de hámster son expuestas a condiciones constantes de luz durante un periodo prolongado, presentan una ovulación asincrónica y ciclos estrales irregulares (Alleva *et al.*, 1968) así como un deterioro en el ritmo circadiano de actividad locomotriz (Stetson, Watson-Whitmyre y Matt, 1977). Además, en roedores con lesión del NSQ se presenta arritmia en la actividad locomotriz, y al recibir trasplantes de NSQ fetal, se recupera en cierta medida la ritmicidad circadiana en la conducta (Ralph *et al.*, 1990) pero no en los ritmos endócrinos de estos animales (Meyer-Bernstein *et al.*, 1999).

También se observó que el NSQ regula el pico preovulatorio de LH durante el ciclo estral a través de sus aferencias hacia neuronas hipotalámicas encargadas de secretar GnRH (de la Iglesia y Schwartz, 2006). Se propone que la liberación pulsátil de las gonadotropinas desde la hipófisis es posiblemente regulada por la sincronización de múltiples osciladores celulares que ajustan su secreción en respuesta a los cambios de los secretagogos hipotalámicos (Bonnefont, 2010) pues se ha demostrado en cultivo de células de la hipófisis, oscilaciones de *mPer1* durante varios días (Yoshikawa *et al.*, 2005). La coordinación cíclica de estas oscilaciones puede favorecer la expresión de genes controlados por reloj, entre los cuales se encuentran los que median la síntesis y liberación de LH y FSH, cuyo tejido diana es el ovario.

El ovario es un órgano formado principalmente de folículos en diferentes estados de desarrollo, así como

de cuerpos lúteos. El crecimiento y desarrollo de los folículos encaminados a la liberación de ovocitos fertilizables, depende en parte, del patrón de secreción de las gonadotropinas; ejemplo de ello es la FSH, encargada del desarrollo folicular, pues promueve la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa; mientras que el pico de LH es esencial para la ovulación y el consecuente proceso de luteinización (McGee y Hsueh, 2000).

La regulación circadiana de la ovulación ha sido observada desde hace más de medio siglo. En las hembras de rata, el pico de LH se da aproximadamente 2-4 horas después de haber apagado las luces (Everett y Sawyer, 1950) durante el atardecer del proestro, cuando una señal precisa circadiana se coordina con un ambiente esteroideo apropiado (Legan y Karsch, 1975). Si se lesiona el NSQ se genera una ovulación irregular (Wiegand y Terasawa, 1982). Se han demostrado proyecciones neuronales desde el NSQ hacia las neuronas secretoras de GnRH en la rata (Kalsbeek y Buijs, 2002) y los cambios en la duración de los periodos de luz-oscuridad que se integran en el NSQ alteran el momento del pico de secreción de gonadotropinas durante el ciclo estral (Goldman *et al.*, 2004).

De acuerdo a las evidencias generadas sobre la relación entre el sistema circadiano y el eje HHG, Sellix y Menaker (2010) proponen el siguiente paradigma: en lugar de responder a un sistema jerárquico lineal, eventos como la ovulación controlados por el HHG son organizados temporalmente por un sistema multi-oscilador que depende de la sincronización entre el acoplamiento de sus componentes (ver figura 4A).

Los eventos reproductivos, a su vez, tienen efectos directos e indirectos sobre la organización circadiana de la conducta y la fisiología. Ejemplo de ello son los estudios sobre los cambios en los ritmos de actividad durante el ciclo estral; en los cuales se ha observado un adelanto de fase del inicio de la actividad locomotriz y un aumento de la amplitud de ésta durante el proestro; a lo que se le ha interpretado como una ganancia en el tiempo de interacción de la hembra con el macho para aumentar la probabilidad de la cópula (Morin, Fitzgerald y Zucker, 1977; Albers, Gerall y Axelson, 1981). El ritmo de actividad locomotriz no es el único en el que ocurren cambios según la etapa estral, se ha reportado que el ritmo de temperatura corporal presenta un retraso de fase durante el proestro y un aumento en la amplitud durante el estro (Kent, Hurd y Satinoff, 1991).

El ciclo estral también cumple con la característica de ser un ritmo endógeno al igual que los ritmos circadianos, pero con origen y propiedades distintas (Stetson y Anderson, 1980). Desde el punto de vista de la cronobiología, la reproducción es un conjunto de ritmos agrupados dentro de otros ritmos de mayor periodicidad (de la Iglesia, 2006).

EL OVARIO COMO OSCILADOR CIRCADIANO PERIFÉRICO

El ovario es un órgano encargado de la secreción de hormonas y de la liberación de los ovocitos para su posible fertilización. Las evidencias existentes sobre el ovario de roedores como oscilador circadiano periférico se sustentan en la expresión rítmica de genes de reloj en éste órgano. En extractos de ovario de ratas mantenidas en ciclos de LO 12:12, en las fases de P y E del ciclo estral, los mRNA de los genes *Per* (*Per1* y *Per2*) presentan un ciclo de expresión cada 24 horas aproximadamente, analizados con la técnica de la *RT-PCR*. En contraste, en oscuridad continua y sin definir la etapa del ciclo estral, la máxima amplitud del ciclo (acrofase) de *Per1* se presentó a las dos horas después de apagar la luz (ZT 14), mientras que *Per2* se presentó seis horas después (ZT18). Los cambios cíclicos en la expresión mRNA de *Per* se correlacionaron con un retraso de varias horas respecto al ciclo de las proteínas *PER*. Además, la localización *Per1* y *Per2* mediante el estudio de radio inmunohistoquímica indicó su presencia en células esteroideogénicas de folículos preantrales, antrales, preovulatorios y en el cuerpo lúteo; así como en tejido intersticial (Fahrenkrug *et al.*, 2006).

Estos estudios establecieron la primera evidencia concreta de que en el ovario de la rata existe un mecanismo molecular circadiano y permitieron reconsiderar la pregunta sobre si existe comunicación del núcleo supraquiasmático con el ovario ¿cómo sucede? La idea principal es que el ovario es un oscilador periférico, y como tal debe estar siendo regulado por señales neurohumorales reguladas desde el NSQ y por lo tanto, conformando parte del sistema circadiano. Bajo esta hipótesis general, Karman y Tischkau (2006), analizaron la expresión de *Per2* y *Bmal1* en el ovario y en el núcleo supraquiasmático de ratas hipofisectomizadas tratadas con gonadotropina coriónica humana (hCG). Sus resultados confirmaron

que la hormona luteinizante es un regulador del ritmo circadiano de algunos genes reloj presentes en el ovario. Como primera parte del desarrollo de la investigación corroboraron mediante *western blot* la presencia de las proteínas *BMAL1* (79kDa), *CLOCK* (91kDa), *Per1* (112kDa), *Per2* (90kDa) y *CRY1* (74kDa). Posteriormente se observó que el ovario tiene un ritmo diario del mRNA de *Per2* con una relación de fase con el NSQ de 8 horas; mientras que para *Bmal1*, la relación de fase es de 4 horas. El análisis de *PER* es congruente con otro estudio (Fahrenkrug *et al.*, 2006) en el cual se reportó a la acrofase en el ZT16, mientras que *BMAL1* está en antifase con respecto a *Per2*. La conclusión de este trabajo fue que la *LH* es la señal humoral que inicia la ritmicidad de los genes de reloj en el ovario de ratas (Karman y Tischkau, 2006). Las diferencias entre ambas investigaciones sobre la bati-fase (punto más bajo de la oscilación) de *PER* se deben posiblemente al momento del ciclo estral en el que se colectó el tejido, pues éste es capaz de cambiar las fases en diferentes tejidos (Nakamura *et al.*, 2010).

Una vez que se evidenció la participación de la *LH* para la generación del ritmo de *Per2* y *Bmal1* en el ovario de la rata (Karman y Tischkau, 2006), al año siguiente se reportó la expresión cíclica de *Per1* en células de la granulosa y células del cuerpo lúteo *in vivo*; así como el efecto de la *FSH* para promover durante un ciclo la oscilación de *Per2* y de la *LH* para mantenerlo; además de revelar que en ovarios inmaduros no existe un ciclo de *Per1*, mientras que en ovarios de ratas puberales sí se presenta un ciclo muy marcado en las células lúteas (He *et al.*, 2007); tal conclusión contrasta con el reporte anterior, ya que Karman y Tischkau (2006) reportan un ritmo expresado en células de la granulosa y de la teca para *Per2* y *Bmal1*. Si bien la *LH* tiene un efecto modulador sobre la maquinaria molecular en el ovario, también las señales de la *FSH* actúan como sincronizadores de genes de reloj en este tejido (He *et al.*, 2007). Con base en lo anterior, se continúa con el modelo en el cual las señales de las hormonas sexuales hipofisarias son requeridas para el establecimiento de las oscilaciones circadianas en el ovario y que, aunque el ovario presenta los elementos principales del reloj molecular, ésta expresión no es rítmica antes de la pubertad.

Los genes de reloj y sus transcritos se expresan rítmicamente en el ovario de la rata y ésta expresión está presente en las células de la granulosa y de la teca que



conforman a los folículos, así como en el cuerpo lúteo (Karman y Tischkau, 2006; He *et al.*, 2007). El siguiente paso fue investigar si existía un control neural en la ritmicidad del ovario. Para ello Yoshikawa, *et al.* (2009) hicieron un experimento que consistió en quitar el nervio superior ovárico y el plexo ovárico en ratas transgénicas de la luciferasa en la región de regulación del gen *Per1* (*Per1-Luc*). Luego, las ratas fueron expuestas a cambios de horarios de iluminación por 6 horas, al final analizaron la bioluminiscencia de *Per1 in vitro* en un ovario denervado vs uno intacto de la misma rata. Tanto en el denervado como en el control no se observaron diferencias significativas en la fase de *Per1*; mientras que en cultivos de células de la granulosa los efectos de la *FSH* y la *LH* ocasionaron un cambio de fase de *Per1* dependiente de la dosis y del momento en que se aplicó, por lo que los grandes candidatos para ser las señales sincronizadoras en los genes de reloj en el ovario son las vías humorales y no las neurales; sin embargo, no se excluye del todo la posibilidad de que otro tipo de denervación influya sobre los procesos de ovulación.

Se ha reportado que la inervación del nervio vago juega un papel en la ovulación de ratas y que el efecto depende de la bilateralidad, pues al diseccionar el nervio vago izquierdo disminuye la tasa de ovulación; mientras que al diseccionar el del lado derecho, no hay efectos (Cruz, Chávez y Domínguez, 1986). Además, la inervación vagal modula la regulación estimuladora del inicio de la pubertad, pues al seccionar el nervio uni o bilateralmente los niveles séricos de estradiol disminuyen y se presenta un retraso de la apertura vaginal en ratas (Morales-Ledezma, Betanzos-García, Domínguez-Casalá, 2004). Por lo anterior, es importante no ignorar las conexiones del sistema nervioso autónomo que van desde el NSQ al ovario como probables vías de comunicación de señales circadianas.

Hasta este punto, se ha conformado un modelo en donde el NSQ influye mediante mecanismos neuro-humorales sobre la fisiológica del ovario; sin embargo, también puede existir una comunicación que sea desde el ovario hacia el NSQ. Nakamura *et al.* (2010), reportaron los efectos de las hormonas esteroideas del ovario durante las cuatro fases del ciclo estral sobre la expresión cíclica de genes de reloj en el útero, hígado y el propio ovario. Los resultados indican que el ritmo de los genes de reloj del ovario sigue siendo congruente

entre los estudios anteriores (ver tabla 1). Sin embargo, es de resaltar que *Per1* cambia de fase y disminuye su amplitud durante el estro.

Debido a las variaciones encontradas en el útero, los investigadores decidieron analizar los efectos del estrógeno y la progesterona sobre la ritmicidad de *Per* mediante el uso de ratones *knock-in Per2-Luc* y observaron que la relación de fase existente entre la expresión de *Per2* en el ovario y el NSQ es de aproximadamente 4 horas, similar a lo reportado por Karman y Tischkau en 2006. La principal conclusión y aportación de éste trabajo es que las variaciones de las hormonas esteroideas de los ovarios controlan los cambios en la sincronización de los genes de reloj en ovario y útero; mientras que en hígado modulan la sincronización de la expresión de los genes de reloj (Nakamura *et al.*, 2010). Los resultados de ésta investigación aportan una contribución diferente, ya que, si bien el ovario es un oscilador periférico, las hormonas estrogénicas son capaces de ejercer efectos sobre otros osciladores periféricos, añadiendo más complejidad al mecanismo de comunicación entre el sistema circadiano y reproductivo.

En el 2011, Tischkau, Jaeger y Krager, analizaron mediante *RT-PCR* los ritmos de *Per2* y *Bmal1* en el ovario de ratón, pero esta vez bajo los efectos de la administración de una dioxina (*TCDD*), la cual es un compuesto que genera alteraciones a nivel de desarrollo folicular y la inhibición de la ovulación. Además de reportar un ritmo para *Per2* y *Bmal1* igual al del ovario de la rata, la aplicación de la dioxina interrumpe la expresión del ritmo de dichos genes interactuando a través del receptor aril hidrocarburo (*AhR*); indicando que un efecto tóxico capaz de inhibir la ovulación, también afecta el mecanismo oscilador circadiano del tejido.

Hasta el momento aún no es clara la forma en que se expresan los genes de reloj en los diferentes compartimentos y líneas celulares del ovario. Un estudio reportado por He *et al.* (2007) demostró por las técnicas de inmunohistoquímica y *RT-PCR*, que existe oscilación circadiana de *Per2* en células de la granulosa tanto maduras, como inmaduras; posteriormente Chu *et al.*, (2011) mediante *RT-PCR* y monitoreo en tiempo real en cultivos celulares, observaron ritmicidad de *Bmal1* en células lúteas pero no en células de la granulosa; así como la inducción de la expresión rítmica de *Per2* a consecuencia de la *FSH* durante el desarrollo, crecimiento y

Tabla 1. Resumen de las investigaciones realizadas sobre la expresión rítmica en las proteínas y genes del reloj circadiano en el ovario de roedores.

Año	Autor	Técnica	gen	proteína	Acrofase	Batifase	Ciclo estral	Fotoperiodo	Modelo
2006	Fahrenkrug et al.	RT-PCR en tiempo real	<i>Per1</i>		ZT14	ZT0-2	P- E	LO 12:12 OO	Rata Wistar
		RT-PCR en tiempo real	<i>Per2</i>		ZT18	ZT6	P- E	LO 12:12 OO	
		RIHQ		PER1	ZT12	ZT6	Sin definir	LO 12:12 OO	
		RIHQ		PER2	ZT16	ZT12	Sin definir	LO 12:12 OO	
2006	Karman y Tischkau	RT-PCR en tiempo real	<i>Bmal1</i>		ZT0/24	ZT12	Sin definir	LO12:12	Rata Sprague-Dawley
		RT-PCR en tiempo real	<i>Per2</i>		ZT16	ZT4	Sin definir	LO12:12	
		Hibridación <i>in situ</i>	<i>Bmal1</i>		ZT0	ZT15	Sin definir	LO12:12	
		Hibridación <i>in situ</i>	<i>Per2</i>		ZT15		Sin definir	LO12:12	
		Inmunotransferencia		BMAL1	ZT0/24	ZT12-16	sin definir	LO12:12	
		inmunotransferencia		PER2	ZT12-16	ZT24/0	Sin definir	LO12:12	
2007	He et al.	inmunofluorescencia		PER1	ZT12	ZT4	inmaduras	LO12:12	Rata Wistar
2010	Nakamura et al.	RT-PCR	<i>Per1</i>		ZT12 y ZT8	cambia	P, D,M, (E)	LO12:12	Rata Wistar
		RT-PCR	<i>Per2</i>		ZT12-16	ZT4	P,E, D,M	LO12:12	
		RT-PCR	<i>Bmal1</i>		ZT24/0	ZT12	P,E, D,M	LO12:12	
2011	TishkauJaeger y Krager.	inmunotrasferencia		PER2	CT12	CT0	Sin definir	LO 12:12	Ratón c57bl6J
				BMAL1	CT0	CT12	Sin definir	LO12:12	
2012	Gräs et al.	RT-PCR	<i>Per1</i>		ZT12	ZT24		LO12:12	Rata Wistar sin hipófisis
		RT-PCR	<i>Bmal1</i>		ZT24	ZT12		LO12:12	

En la tabla se muestra cronológicamente, las investigaciones sobre la ritmicidad de genes de reloj en el ovario; así como los puntos horarios máximos (acrofase) y mínimos (batifase) según la técnica molecular empleada. Se especifica si la investigación consideró o no la etapa del ciclo estral en el modelo biológico usado. RT-PCR= reacción en cadena de la polimerasa con inversa transcriptasa. RIHQ= radio inmunohistoquímica. LO 12:12 (condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). OO= oscuridad continua. En un ciclo de LO12:12, ZT0 se refiere al encendido de las luces y ZT12 al apagado. La escala subjetiva de tiempo dependiente de la actividad del animal CT12 señala el comienzo de la actividad del animal en una especie nocturna.

Fuente: elaboración propia.

maduración de folículos ováricos inmaduros. Además, se observó que durante el proceso apoptótico *Bmal1* y *Clock* son inhibidos, mientras que los niveles de *Per2* perduran hasta por 4 días. Con base en estas demostraciones, el modelo del ovario como oscilador periférico ha comenzado a comprenderse como un mecanismo que presenta una regulación muy fina, pues la ritmicidad de cada elemento del reloj molecular es específica y dependiente de las hormonas *LH* y *FSH*, lo que involucra a los diferentes tipos de receptores a éstas hormonas según el compartimento ovárico.

Gräs *et al.*, (2012) reportaron que las gonadotropinas tienen influencia sobre la expresión de *Per1*; pues evi-

denciaron mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, la localización celular del ritmo de *Per1* en los diferentes compartimentos del ovario de rata, sugiriendo una correlación durante el desarrollo entre la adquisición de receptores de *LH* y el comienzo de los ritmos de los genes de reloj en células de la teca interna durante la foliculogénesis, bajo el supuesto de que los receptores funcionales de *LH* son expresados gradualmente en las células de la granulosa de folículos antrales en crecimiento y su expresión máxima se da durante el estado preovulatorio, justo antes del pico de *LH* (expresión rítmica de *Per1* en folículos preovulatorios). Así pues, el mecanismo oscilador del ovario esta compartimentado:

mientras que *LH* genera expresión rítmica de *Per1* en las células de la teca, *FSH* genera la de *Per2* en células de la granulosa; por lo que los elementos negativos del reloj molecular están presentes en los folículos, mientras que el elemento positivo, *BMAL1*, está presente en los cuerpos lúteos.

Sin embargo, recientemente se reportó que *Bmal1*, también está presente rítmicamente en células de la granulosa; pues al emplearse un agonista de Rev-erba, el glucocógeno sintasa quinasa *GSK4112*, se suprimió la expresión de *Bmal1* en células maduras de la granulosa; lo que a su vez conlleva a un efecto en la regulación de la proteína reguladora aguda esteroideogénica (*StAR*), ya que Rev-erba puede inducir significativamente la expresión de *StAR* como un activador en dichas células. También se observó que *GSK* ejerce un cambio de fase en la oscilación de expresión de *Per2*, las técnicas empleadas fueron *RT-PCR*, monitoreo en tiempo real de cultivos celulares y *qPCR* (Chen *et al.*, 2012). Un siguiente estudio con las mismas técnicas y con *western blot*, Chen *et al.*, (2013) reportaron que la estimulación de *FSH* en células

de la granulosa en el ovario induce un avance de fase en la maquinaria del reloj y aumenta la amplitud de las oscilaciones de *Per2*; tal cambio probablemente sea mediado por uniones tipo gap, pues al ser bloqueada la amplitud de las oscilaciones de *Per2*, éstas disminuyen. Por lo que hasta el momento, se agrega al modelo, la participación de las uniones intercelulares en el mantenimiento de la ritmicidad circadiana en el ovario.

De esta forma, desde el 2006 hasta la fecha, se han fortalecido las investigaciones sobre el ovario como oscilador circadiano periférico y actualmente se cuentan con herramientas que permiten comprender mejor el papel de un control circadiano central en la fisiología de la reproducción (ver figura 3). Sin embargo, el detalle del mecanismo oscilatorio en el ovario aún está en vías de ser dilucidado por completo.

En 2013, Murphy *et al.*, reportaron la influencia del ciclo estral y la reducción de esteroides sobre la organización circadiana de ratas *Per1-Luc* cicladadas y ovariectomizadas (*OVX*). Los autores midieron la expresión relativa de *Per1-Luc* en *NSQ* y osciladores periféricos tales como

Figura 3. Línea de tiempo sobre investigaciones que confirman al ovario como oscilador circadiano periférico.



Línea de tiempo que muestra las investigaciones realizadas sobre oscilaciones de los elementos que constituyen la maquinaria del reloj molecular en el ovario de roedores; así como el papel de éstos en la fisiología del ciclo ovárico.

Fuente: elaboración propia.

hígado, pulmón, córnea, ovario y riñón, por medio de cultivos celulares. Sus resultados demostraron que la etapa del ciclo estral afecta la fase de expresión de *Per1* en forma de tejido-específica, pero el efecto más significativo fue en el hígado; tejido en el cual se lleva a cabo la degradación de hormonas esteroideas. Además, vieron el efecto de diferentes dosis (100 μ M, 500 μ M o 1 μ M) de estradiol (E2) y progesterona (P4) y la combinación de ambos sobre el ritmo de bioluminiscencia de *Per1* en cultivos de neuronas de NSQ. Los resultados son sorprendentes, pues aunque se ha comprobado mediante inmunohistoquímica que existen receptores alfa y beta a estrógenos en el NSQ de ratón (Vida *et al.*, 2008), los estrógenos por sí solos no tienen efectos sobre el periodo y/o la fase de la expresión de *Per1*; mientras que P4 ocasiona alargamiento del periodo en una dosis de 10 μ M; y desde 100 μ M al combinarse (E2+P4) presentando así, un efecto sinérgico. Pese a que los hallazgos de este experimento no demuestran que el estradiol por sí sólo tenga efectos directos sobre las neuronas del NSQ en la ritmicidad de *Per1*, no se debe dejar de lado a los otros genes participantes en las asas de traducción-transcripción del reloj molecular, pues existen interacciones de algunos genes reloj con el proceso de la esteroidogénesis (Li *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013).

Existen muchas dudas sobre el significado funcional de los genes de reloj dentro del ovario. Cada uno de los elementos de la maquinaria molecular circadiana representa un reto por analizar. Sin embargo, se sabe que las mutaciones en los genes *Clock* y *Bmal1* ocasionan deficiencias graves en el ciclo estral, en la fertilidad y durante el embarazo (Miller *et al.*, 2004; Dolatshad *et al.*, 2006); por lo que las alteraciones a nivel de la maquinaria molecular del reloj pueden tener un efecto negativo sobre los diversos aspectos de la fertilidad, como ejemplo, la ausencia de *BMAL1* en células esteroidogénicas del ovario impide la implantación, posiblemente debido a los bajos niveles de progesterona y prolactina asociados (Liu *et al.*, 2014).

¿CÓMO Y PARA QUÉ TENER UN RELOJ OVÁRICO?

El NSQ influye en la sincronización de la secreción de *LH* y *FSH* en la hipófisis a través de vías nerviosas. Una

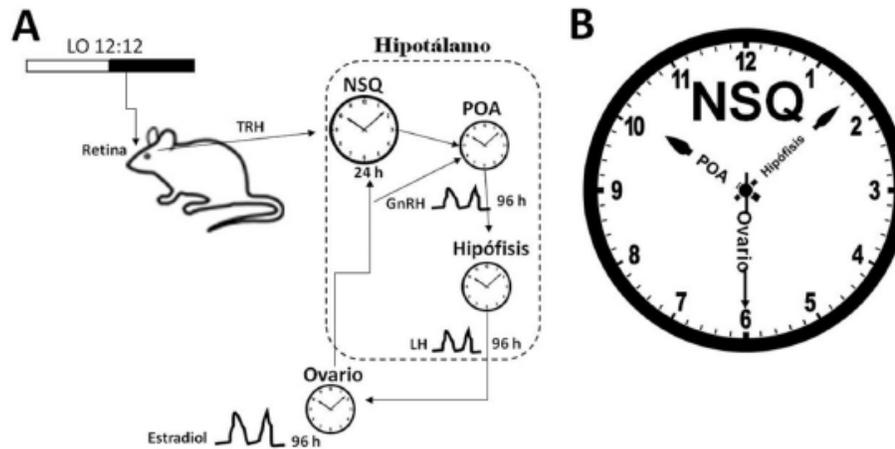
vez liberadas, las hormonas sincronizan a los osciladores circadianos en el ovario. Las neuronas del NSQ se sincronizan diariamente a los cambios de luz y otras señales no fóticas, sin embargo, durante el ciclo estral de los roedores, el pico de *LH* y *FSH* ocurre cada 4 días ¿Cómo es que ambos ciclos se coordinan? Es posible considerar la existencia de señales ambientales con periodos que son múltiplos de 24 horas capaces de sincronizar a los relojes circadianos (Goldman *et al.*, 2004). Es así como además de existir una “ventana temporal” desde el hipotálamo a la hipófisis para la secreción de *LH*, es probable que también exista una “ventana temporal” de sensibilidad en el ovario hacia el efecto de la *LH*. Estas *ventanas temporales* presentes en las estructuras del eje neuroendocrino sugieren que son controladas por una maquinaria molecular circadiana, las cuales a su vez, al conformarse por factores reguladores de transcripción, podrían estar teniendo un papel importante en la regulación de receptores; pues éstos son importantes para el efecto de las hormonas sobre sus tejidos diana.

El ciclo ovárico en roedores (según la especie) tiene una duración de entre 96 y 120 h. Es un ritmo infradiano, pero es posible comprenderlo a la luz de un control circadiano (figura 4). Existen tres hipótesis sobre la generación de ritmos endógenos con duración mayor a la de un día: *a*) por una secuencia de etapas enlazadas, *b*) por un oscilador autosostenido e independiente y *c*) por un mecanismo capaz de contar un número específico de ciclos de luz oscuridad, al cual se le llama la hipótesis de desmultiplicación de frecuencias (Mrosovsky, 1978). La relación del NSQ con HHG podría incluir a las tres hipótesis, la parte crucial es explicar esta interacción, pues el NSQ es sabido que es un oscilador autosostenido e independiente, mientras que tanto la hipófisis como el ovario podrían estar cronometrando cada 4, 5 ó 28 días la liberación de las hormonas, según la especie.

Por otra parte, no debe olvidarse el estudio de la influencia que tienen las hormonas ováricas sobre el NSQ, pues los resultados de algunos experimentos con roedores ovariectomizados afectan respuestas circadianas (Morin, Fitzgerald y Zucker, 1977; Morin y Cumming, 1982; Labyak y Lee, 1995; Iwahana *et al.*, 2008; Blattner y Mahoney, 2012; Royston *et al.*, 2014).

Se propone que el ovario funciona como un seguidero dentro de la cronometría del HHG. El NSQ controla la sensibilidad para la liberación de las *GnRH*, lo que a su

Figura 4. Diagrama que representa el modelo de los componentes y de la temporalidad en los eventos hormonales en el ciclo estral



Modelo donde se enfatiza la existencia de osciladores circadianos en cada componente del eje neuroendocrino. Los cambios de las señales fóticas (barra negra y blanca) que son detectados por la retina, mandan esta información mediante el tracto retino-hipotalámico (TRH) hacia el NSQ. La sincronización entre las neuronas del NSQ, neuronas secretoras de *GnRH*, células de la hipófisis y del ovario es requerida para la organización temporal de los eventos controlados por el HHG. La desincronización entre los componentes podría generar efectos negativos en la fisiología reproductiva (basado en Sellix y Menaker, 2010). Se puede observar la influencia y retroalimentación del sistema circadiano dentro del eje neuroendocrino. Nótese cómo los estrógenos no sólo influyen sobre las neuronas secretoras de *GnRH* en el área media preóptica del hipotálamo (POA), sino que también ejercen un efecto (poco conocido) sobre el núcleo supraquiasmático (NSQ). B. Modelo propuesto en el que se representa un control circadiano en la temporalidad de la fisiología del ciclo estral, en donde las neuronas del POA podrían estar funcionando como la manecilla de las horas, la hipófisis como la del minutero y los eventos fisiológicos-temporales del ovario como la manecilla del segundero, al momento en el que coinciden las tres manecillas, se produce la ovulación.

Fuente: elaboración propia.

vez debe coincidir con el momento de mayor sensibilidad de la hipófisis para la liberación de *LH*, que a su vez tendrá su efecto sobre el ovario para la producción de hormonas y liberación de los ovocitos. De esta forma, el NSQ corresponde a la manecilla encargada de marcar la hora, la hipófisis estaría marcando los minutos bajo el efecto de las secreciones pulsátiles de *GnRH*, y el ovario los segundos. Cuando las tres manecillas se han alineado, como por ejemplo, cuando un reloj analógico marca las 7:00 horas en punto, se genera un evento importante. Para los fines del tema, pensemos que la ovulación es el evento para lo cual la hembra está preparada fisiológicamente para la fecundación (ver figura 4B), pues coinciden las ventanas temporales de sensibilidad; es decir, NSQ genera aumento en la frecuencia de liberación de *GnRH*, que coincide probablemente con un mayor número de receptores a ésta hormona en hipófisis, lo que ocasiona la secreción masiva de *LH*, siendo el momento

más oportuno en el cual el ovario es capaz de responder, llevando a cabo la liberación de ovocitos y aumento de estrógenos.

Cuando la alineación en las manecillas no se cumple, se altera la función reproductiva en la hembra, tal como se cree que ocurre en mujeres cuando se presentan cambios de horario generados por vuelos y rotación de turnos en el trabajo (Lawson *et al.*, 2011; Gamble, Resuehr y Johnson, 2013); los cuales también alteran los horarios de ingesta de alimento y los ciclos de sueño-vigilia, lo que puede ocasionar obesidad y esto a su vez, impactar también sobre la reproducción femenina (Klenov y Jungheim, 2014). Volviendo al ejemplo del reloj analógico, lo que estaría ocurriendo es que la manecilla del reloj que marca las horas (NSQ) podría ser movida (producto de las señales fóticas alteradas) hacia delante, hacia atrás o incluso estancada, suscitando pérdida en la correcta cronometría e incluso la ausencia de la coincidencia en

un momento específico entre las manecillas del reloj, o sea, las 7:00 horas en punto podrían no marcarse y en consecuencia se tendría una pérdida en la ovulación, según el ejemplo supuesto.

Es importante tener en cuenta que el control homeostático de la fisiología reproductiva puede variar según la disponibilidad de machos y/o las presiones de las condiciones ambientales. Cabe destacar, que si bien gran parte de la información detallada sobre la cronobiología de la reproducción es y ha sido generada en modelos clásicos de roedores de laboratorio, la fisiología de la reproducción es muy variada entre las formas de vida que han evolucionado en el planeta y, que la selección natural moldea a la evolución, operando sobre los resultados y no sobre los mecanismos, por lo que es importante llevar estudios en modelos no clásicos.

Existen estudios en ratones silvestres que revelan diferencias inter-género en conductas circadianas (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012); así como conductas implicadas en el establecimiento de la pareja para la reproducción. Tal es el caso de estudios realizados en laboratorio y en campo sobre el jerbo de Mongolia, el cual presenta monogamia en cautiverio, mientras que en campo no (Agreen, 1984). Otro ejemplo, es su conducta agresiva, proceso que está bajo un control hormonal, observado en laboratorio (Vázquez-Gaytán, 2007). En resumen, el valor de los estudios generados en modelos de mamíferos no tradicionales puede ayudarnos a comprender mecanismo neuroendocrinos que dan lugar a las diferencias individuales que ocurren naturalmente (Smale, Heideman y French, 2005).

CONCLUSIONES

Con las investigaciones mencionadas en esta revisión, podemos concluir que el ovario en roedores es un oscilador circadiano desde la pubertad en mamíferos. Sin embargo, el desarrollo del NSQ en los roedores ocurre en el día 10 postnatal (Langraf, Koch y Oster, 2014), por lo que la sensibilidad del NSQ a las hormonas ováricas debe darse también a partir de la pubertad. La forma en que cambia el control circadiano sobre los procesos reproductivos a lo largo de la vida en las hembras también es de suma importancia, es por ello que resulta fundamental comprender mejor la relación funcional entre

estos dos ritmos biológicos, ¿cómo es la comunicación entre NSQ y ovario y qué implicaciones tiene en la regulación del eje HHG y con otros núcleos hipotalámicos involucrados en la reproducción?

Las funciones de los osciladores circadianos, tanto las del central como las de los periféricos, son ajustadas con los diferentes cambios ambientales, tales como, la información fótica y la alimentación (Kennaway, 2005); por lo que alteraciones metabólicas también contribuyen a una desincronización interna e impactan en la fisiología reproductiva. La pérdida del balance entre las hormonas metabólicas con las sexuales puede generar alteraciones a nivel de la maquinaria molecular del reloj en el ovario.

La coordinación precisa del tiempo dentro del eje HHG es esencial para la fertilidad en la hembra. La regulación de la reproducción por parte de un mecanismo circadiano lleva a pensar en las consecuencias de la desincronización circadiana sobre la reproducción. A nivel de salud humana, puede permitir comprender desde otra perspectiva algunos problemas de fertilidad asociados a la vida laboral de aquellas mujeres, cuyo trabajo implica rotación de horarios y/o viajes que producen descompensación horaria entre el reloj biológico y un nuevo horario (*jet lag*). Hay estudios que asocian éste tipo de actividad con el incremento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer de mama, infartos y desordenes reproductivos y de fertilidad (Mahoney, 2010).

En esta revisión nos limitamos a las investigaciones hechas en mamíferos, pero también existen estudios en donde se ha comprobado la existencia de genes de reloj en el ovario de aves e insectos (Nakao *et al.*, 2007; Bradshaw y Holzapfel, 2010). La regulación entre el sistema circadiano y el ciclo reproductivo son rasgos naturalmente seleccionados que representan algún beneficio adaptativo que actualmente tratamos de entender y no hay duda en que el correcto funcionamiento de la integración de las señales recibidas por el NSQ y la coordinación entre éste y los relojes periféricos es necesario para el mantenimiento homeostático en los vertebrados.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



(CONACyT). Apoyado por PAPIIT UNAM IN212715

REFERENCIAS

- Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, ... y Block, G. D. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22 (1), 350-356.
- Agreen, G. (1984). Pair formation in the Mongolian gerbil. *Animal behavior*, 32 (2), 528-535.
- Albers, H. E., Gerall, A. A. y Axelson, J. F. (1981). Effect of reproductive state on circadian periodicity in the rat. *Physiology & behavior*, 26 (1), 21-25.
- Alleva, J. J., Waleski, M. V., Alleva, F. R. y Umberger, F. R. (1968). Synchronizing effects of photoperiodicity on ovulation in hamsters. *Endocrinology*, 82 (6), 1227-1235.
- Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology*, 25, 11-28.
- Balsalobre, A., Marcacci, L. y Schibler, U. (2000). Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Current Biology*, 10 (20), 1291-1294.
- Beyer, C., Hoffman, K. L. y Gonzalez-Flores O. (2007). Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: Similarities and differences with the rat. *Hormones and Behavior*, 52 (1), 2-11.
- Blattner, M. S. y Mahoney, M. M. (2012). Circadian parameters are altered in two strains of mice with transgenic modification of estrogen receptor subtype 1. *Genes, brain and behavior*, 11 (7), 828-836.
- Bonnefont, X. (2010). Circadian timekeeping and multiple timescale neuroendocrine rhythms. *Journal of neuroendocrinology*, 22 (3), 209-216.
- Bradshaw, W. E. y Holzapfel, C. M. (2010). Circadian clock genes, ovarian development and diapause. *BMC Biology*, 8, 115-118.
- Brown-Grant, K. y Raisman, G. (1977). Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proceeding of the Royal Society of London - Biological Science*, 198 (1132), 279-296.
- Carmona-Alcocer, V., Fuentes-Granados, C., Carmona-Castro, A., Aguilar-González I., Cárdenas-Vázquez R. y Miranda-Anaya, M. (2012). Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon talstoni*. *Physiology & behavior*, 105 (3), 727-733.
- Chappell, P. E. (2005). Clocks and the black box: circadian influences on gonadotropin-releasing hormone secretion. *Journal of neuroendocrinology*, 17 (2), 119-30.
- Chen, H., Chu, G., Zhao, L., Yamauchi, N., Shigeyoshi, Y., Hashimoto, S. y Hattori, M. (2012). Rev-erb α regulates circadian rhythms and StAR expression in rat granulosa cells as identified by the agonist GSK4112. *Biochemical and biophysical research communications*, 420 (2), 374-379.
- Chen, H., Zhao, L., Chu, G., Kito, G., Yamauchi, N., Shigeyoshi, Y...y Hattori, M. A. (2013). FSH Induces the development of circadian clockwork in rat granulosa cells via gap junction protein Cx43-dependent pathway. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 304 (6), 566-575.
- Chu, G., Kaoru, Y., Narahara, S., Uchikawa, M., Kawamura, M., Yamauchi N...y Hattori, M. A. (2011). Alteration of circadian clockwork during differentiation and apoptosis of rat ovarian cells. *Chronobiology international*, 28 (6), 477-487.
- Cruz, M. E., Chávez, R. y Domínguez, R. (1986). Ovulation follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vaginerves. *Revista de investigación clínica; órgano del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 38 (2), 167-71.
- Daan, S. y Aschoff, J. (2001). The entrainment of circadian systems. En J. S, Takahashi, F. W, Turck y R. Y., Moore, *Handbook of behavioral neurobiology circadian clocks*, Vol.12 (pp. 7-35). Nueva York: Kluwer Academic, Plenum Publishers.
- Darwin, C. (1859). *El origen de las especies por medio de la selección natural*. España: Alianza Editores.
- De la Iglesia, H. O. y Schwartz, W. J. (2006). Timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology*, 147 (3), 1148-1153.
- Dolatshad, H., Campbell, E. A., O'Hara, L., Maywood, E. S, Hastings, M. H, y Johnson, M. H. (2006). Developmental and reproductive performance in

- circadian mutant mice. *Human reproduction*, 21 (1), 68-79.
- Domínguez, R., Chávez, R. y Cruz, M. E. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En R. Domínguez, *Tópicos selectos de Biología de la Reproducción* (pp. 161-192). México: Miguel Ángel Porrúa.
- Everett, J. W. y Sawyer, C. H. (1950). A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*, 47 (3), 198-218.
- Fahrenkrug, J., Georg, B., Hannibal, J., Hindersson, P. y Gräs S. (2006). Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology*, 147 (8), 3769-3776.
- Fink G. y Ayer M. S. (1974). Gonadotrophin secretion after electrical stimulation of the preoptic area during the oestrous cycle of the rat. *The Journal of Endocrinology*, 62 (3), 589-604.
- Freeman, M. E. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En E. Knobil y J. Neil. *The Physiology of reproduction* (pp. 2327-2388). Nueva York: Raven Press.
- Gamble, K. L., Resuehr, D. y Johnson, C. H. (2013). Shift work and circadian dysregulation of reproduction. *Frontiers in endocrinology*, 4, 92.
- Goldman, B., Gwinner, E., Karsch, F. J., Saunders, D., Zucker, I. y Ball, G. F. (2004). Circannual rhythms and photoperiodism. En J. C., Dunlap, J. J., Loros J. J. y P. J., DeCoursey. *Chronobiology biological timekeeping* (pp. 107-142). Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- González-Mariscal, G. (2006). Mother rabbits and their offspring: Timing is everything. *Developmental psychobiology*, 49 (1), 71-76.
- Gräs, S., Georg, B., Jorgensen, H. L. y Fahrenkrug, J. (2012). Expression of the clock genes *Per* and *BMAL1* during follicle development in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation and hypophysectomy. *Cell and tissue research*, 350 (3), 539-548.
- He, P. J., Hirata, M., Yamauchi, N., Hashimoto, S. y Hattori, M. (2007). Gonadotropin regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 302 (1-2), 111-118.
- Iwahana, E., Karatsoreos, I., Shibata, S. y Silver, R. (2008). Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. *Hormones and behavior*, 53 (3), 433-430.
- Kalsbeek, A. y Buijs, R. M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell and tissue research*, 309 (1), 109-118.
- Karman, B. N. y Tischkau, S. A. (2006). Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*, 75 (4), 624-632.
- Kennaway, D. J. (2005). The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum reproduction update*, 11 (1), 91-101.
- Kent, S., Hurd, M. y Satinoff, E. (1991). Interactions between body temperature and wheel running over estrous cycle in rats. *Physiology & behavior*, 49 (6), 1079-1084.
- Klenov, V. E. y Jungheim, E. S. (2014). Obesity and reproductive function: a review of the evidence. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 26 (6), 455-460.
- Labyak, S. E. y Lee, T. M. (1995). Estrus \square and steroid \square induced changes in circadian rhythms in a diurnal rodent, *Octodon degus*. *Physiology & behavior*, 58 (3), 573-585.
- Landgraf, D., Koch, C. E. y Oster, H. (2014). Embryonic development of circadian clocks in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 143.
- Lawson, C. C., Whelan, E. A., Lividoti Hibert, E. N., Spiegelman, D., Schernhammer, E. S. y Rich-Edwards, J. W. (2011). Rotating shift work and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology*, 22 (3), 305-312.
- Legan, S. J. y Karsch, F. J. (1975). A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology*, 96 (1), 57-62.
- Li, S., Wang, M., Chang, A. K., Yang, C., Zhao, F., Bi, H., Liu Y...y Wu, H. (2013). CLOCK is a substrate of SUMO and sumoylation of CLOCK upregulates the transcriptional activity of estrogen receptor- α . *Oncogene*, 32 (41), 4883-4891.
- Liu, Y., Johnson, B. P., Shen, A. L., Wallisser, J. A., Krentz, K. J., Moran, S. M...y Bradfield, C. A. (2014). Loss of *BMAL1* in ovarian steroidogenic cells results in implantation failure in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (39), 14295-14300.



- Mahoney, M. M. (2010). Shift work, jet lag, and female reproduction. *International journal of endocrinology*, 813764.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. y Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phase of the rat: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology*, 62 (4a), 609-614.
- McGee, E. A. y Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21 (2), 200-214.
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S. y Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments*, (67), 4389.
- Meyer-Bernstein, E. L., Jetton, A. E., Matsumoto, S. I., Marjuns, J. F., Lehman, M. N. y Bittman, E. L. (1999). Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology*, 140 (1), 207-218.
- Miller, B. H., Olson, S. L., Turek, F. W., Levine, J. E., Horton, T. H. y Takahashi, J. S. (2004). Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Current biology*, 14 (15), 1367-1373.
- Mohawk, J. A., Green, C. B. y Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neurosciences*, 35, 445-462.
- Moore, R. Y. y Eichler, V. B. (1972). Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain research*, 42 (1), 201-206.
- Morales-Ledezma, L., Betanzos-García, R. y Domínguez-Casalá, R. (2004). Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepuberal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Archives of medical research*, 35 (4), 279-283.
- Morin, L. P. y Cumming, L. A. (1982). Splitting of wheel running rhythms by castrated or steroid treated male and female hamsters. *Physiology & behavior*, 29 (4), 665-675.
- Morin, L. P., Fitzgerald, K. M. y Zucker, I. (1977). Estradiol shortens the period of hamster circadian rhythms. *Science*, 196 (4287), 741-749.
- Mrosovsky, N. (1978). Circannual cycles in hibernators. En L. C. H. Wang y J. W. Hudson. *Strategies in cold* (pp. 21-65). Nueva York: Academic Press.
- Murphy, Z. C., Pezuk, P., Menaker, M. y Sellix, M. T. (2013). Effects of ovarian hormones on internal circadian organization in rats. *Biology of reproduction*, 89 (2), 35-47.
- Nakamura, T. J., Moriya, T., Inoue, S., Shimazoe, T., Watanabe, S., Ebihara, S. y Shinohara, K. (2005). Estrogen differentially regulates expression of *Per1* and *Per2* genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. *Journal of neuroscience research*, 82 (5), 622-630.
- Nakamura, T. J., Sellix, M. T., Kudo, T., Nakao, N., Yoshimura, T., Ebihara, S.,...y Block, G. D. (2010). Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: Effects of fluctuating ovarian steroid hormones levels. *Steroids*, 75 (3), 203-12.
- Nakao, N., Yasuo, S., Nishimura, A., Yamamura, A., Watanabe, T., Anraku, T.,...y Yoshimura, T. (2007). Circadian clock gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles. *Endocrinology*, 148 (7), 3031-3038.
- Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual review of physiology*, 55 (1), 16-54.
- Pittendrigh, C. S. y Minis, D. H. (1964). The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *The American Naturalist*, 48, 261-294.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. y Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247 (4945), 975-8.
- Royston, S. E., Yasui, N., Kondilis, A. G., Lord, S.V., Katzenellenbogen, J.A. y Mahoney M.M. (2014). ESR1 and ESR2 differentially regulate daily and circadian activity rhythms in female mice. *Endocrinology*, 155 (7), 2613-2623.
- Schneider, J. E. (2004). Energy balance and reproduction. *Physiology & behavior*, 81 (2), 289-317.
- Schibler, U. y Sassone-Corsi, P. (2002). *A web of circadian pacemakers: Cell*, 111 (7), 919-922.
- Sellix, M. T. y Menaker, M. (2010). Circadian clocks in the ovary. *Trends in endocrinology and metabolism*, 21 (10), 628-636.

- Sikes, H. E. (2009). *Circadian clock gene involvement in the regulation of the reproductive neuroendocrine axis. Tesis para obtener el grado de doctor en filosofía*. EE.UU.:UMI dissertation Publishing.
- Smale, L., Heideman, P. D. y French J. A. (2005). Behavioral neuroendocrinology in nontraditional species of mammals: things the "knockout" mouse CAN'T tell us. *Hormones and behavior*, 48 (4), 474-483.
- Stetson, M. H. y Anderson P.J. (1980). Circadian pacemaker times gonadotropin release in free-running female hamsters. *The american journal of physiology*, 238 (1), R23-27.
- Stetson, M. H. y Watson-Whitmyre, M. (1976). Nucleus suprachiasmaticus: the biological clock in the hamster? *Science*, 191 (4223), 197-99.
- Stetson, M. H., Watson-Whitmyre, M. y Matt, K. S. (1977). Circadian organization in the regulation of reproduction: Timing of the 4-day estrous cycle of the hamster. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 8 (3-4), 350-352.
- Stubblefield, J. J., Terrien, J. y Green, C. B. (2012). Nocturnin: at the crossroads of clocks and metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism*, 23 (7), 326-333.
- Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H y McDearmon, E. L. (2008). The genetics mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature reviews. Genetics*, 9 (10), 764-75.
- Tischkau, S. A., Jaeger, C. D. y Krager, S. L. (2011). Circadian clock disruption in the mouse ovary in response to 2, 3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-Dioxin. *Toxicology letters*, 201 (2), 116-22.
- Tsuchiya, Y., Minami, I., Kadotani, H. y Nishida, E. (2005). Resetting of peripheral circadian clock by prostaglandin E2. *EMBO reports*, 6 (3), 256-261.
- Vázquez-Gaytán, B. (2007). *Conducta paterna, agresión y niveles de testosterona en el gerbo de Mongolia Meriones unguiculatus* (tesis de licenciatura). Recuperado de: <http://132.248.9.195/pd2008/0624112/Index.html>
- Vida, B., Hrabovszky, E., Kalamatianos, T., Coen, C. W., Liposits, Z. y Kallo, I. (2008). Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones. *Journal of neuroendocrinology*, 20 (11), 1270-1277.
- Wiegand, S. J. y Terasawa, E. (1982). Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology*, 34 (6), 395-404.
- Yoshikawa, T., Sellix, M., Pezuk, P. y Menaker, M. (2009). Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology*, 150 (9), 4338-4347.
- Yoshikawa, T., Yamazaki, S. y Menaker, M. (2005). Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *Journal of biological rhythms*, 20 (6), 500-512.

ANEXO II

Physiology & Behavior 182 (2017) 77–85



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/physbeh



Ovariectomy influences the circadian rhythm of locomotor activity and the photic phase shifts in the volcano mouse



Cynthia Juárez-Tapia^{a,b}, Manuel Miranda-Anaya^{a,*}

^a Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias-Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Neotomodon alstoni
Circadian locomotor activity
Ovary
Photic phase shifting

ABSTRACT

Recently, the relationship between the circadian system and female reproduction has been of great interest; ovarian hormones can modify the amount and distribution of daily activity differently in rodent species. The volcano mouse *Neotomodon alstoni* is a species in which it is possible to study the circadian rhythm of locomotion, and it offers comparative information about the influence of ovaries on the circadian system. In this study, we used infrared crossings to compare free movement in intact and sham-operated or ovariectomized mice. We analyzed behavioral and endocrine changes related to the estrous cycle and locomotor circadian rhythm in free-running mice and photic phase shifting. Evidence shows that intact mice present a scalloped pattern of daily activity during the estrous cycle. In constant darkness, the ovariectomy reduces the total amount of activity, shortens the free-running circadian period of locomotion and increases photic phase shifts during the early subjective night. During entrainment, the ovariectomized mice increased the amplitude of total activity during the scotophase, and delay the time of activity onset. These results suggest that ovarian hormones in *N. alstoni* modulate the circadian rhythm of locomotor activity in a species-specific manner.

1. Introduction

In females, estrogens influence several behavioral and physiological processes, including the circadian regulation of locomotion. Classical studies in mice have used running wheels as a tool to study locomotor activity. However, running wheels may have a reward effect in addition to affecting energy and reproductive balance. The use of a biological model that does not require an activity wheel to observe the circadian rhythm of locomotion contributes to a better understanding of the relationship between circadian clock regulation, the suprachiasmatic nucleus (SCN) and the estrous cycles in mice.

The endocrine system that regulates ovulation during the estrous cycle is known as the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis (HPG). The Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in the hypothalamus induces the release of the luteinizing hormone (LH) and the follicle-stimulating hormone (FSH) in the pituitary gland. Subsequently, both the LH and the FSH induce the production of steroids in the ovary and ovulation [1]. The increasing activation of GnRH secretory-neurons during the pre-ovulatory phase requires high concentrations of ovarian estradiol (E2) during the follicular phase. This boosts the release of GnRH during late afternoon in proestrus [2]. Progesterone, another gonadal steroid,

is also produced in the ovary in small quantities during the follicular growth phases. These increasing levels of estrogens and progestogens provide negative feedback to the pituitary, resulting in decreased secretion of LH and FSH across the luteal phase. The coordination of all these mechanisms requires external synchronization with environmental cues and internal synchronization with functions influenced by the neuroendocrine system [3]. The endocrine signaling of the HPG axis feeds back the circadian pacemaker and affects multiple physiological systems and behaviors [4]. The SCN in mammals controls the circadian rhythms of behavior and physiology [5]; it projects axons to the medial hypothalamus [6] and to the medial preoptic area (MPOA), where neurosecretion of GnRH occurs [7]. Circulating levels of gonadotropins show daily changes that persist in constant conditions [8,9]. In rats, the gonadotropic activation at a particular time of the day is controlled by a circadian mechanism [2,10–12].

Comparative studies in rodents on the effect of ovarian hormones on circadian locomotor output show variable effects among species and protocols. In hamsters, estrogens positively influence the amplitude of locomotion [13–16]. The circadian period shortens during the estrus or proestrus phase [17–19]. In ovariectomized hamsters, an implant that chronically releases of estradiol shortens the free running period, but

* Corresponding author at: Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias-Campus Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Juriquilla 3001, Querétaro CP 76230, México.

E-mail address: miranmanuel@ciencias.unam.mx (M. Miranda-Anaya).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.10.002>

Received 14 July 2017; Received in revised form 3 October 2017; Accepted 3 October 2017

Available online 04 October 2017

0031-9384/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

this effect is blocked by the administration of progesterone [13]. In rats, ovariectomy (OVX) increases food intake, body weight, and decreases activity and sexual behavior [20,21]; it also lengthens the period of free-running rhythms of locomotion [17]. In mice C57BL/6 J, OVX reduces the activity [22] and in degu *Octodon degus*, no effect on activity was noted [19].

The effect of estrogen in female rats and hamsters also has a scalloping pattern, in the form of a slight advance in the onset of locomotion, associated at the time of ovulation [15]. Studies focused on the estrous cycle, OVX and its influence on locomotor activity were performed using running wheels. However, access to running wheels may have an effect on the intensity of activity, rewards, food intake and the estrous cycle [23–25]. Running wheels may also influence the responses controlled by the circadian system [26,27] including the clock gene expression in SCN [28]. In order to eliminate the motivational influence of the wheel, therefore, studies are needed in an environment without wheels in the estrous cycle [25,29].

Comparative endocrine studies on non-traditional mammals can improve understanding of the adaptive advantages of differences occurring naturally in diverse murine species, and diversity is the raw material on which natural selection acts [30]. The volcano mouse *Neotomodon alstoni* (Order Rodentia, Muridae, subfamily Sigmodontinae) is endemic to the Neovolcanic transversal ridge in Mexico. It displays a robust circadian freely moving locomotion that allows for the evaluation of activity onset, reducing the effect that a running wheel may have on the estrous cycle. In *N. alstoni* females, sexual maturity occurs 40–49 days after birth [31]; the average estrous cycle is 4.5 days, and gestation is nearly 25 to 35 days, resulting in an average of three offspring [32]. *N. alstoni* has been used as a model for parental behavior [33] and for circadian physiology in different studies of locomotor activity [34–36]. This species has also been used in studies of sexual differences in neural and metabolic disorders related to circadian regulation [37–39].

The relationship between the endocrine influence of sex hormones and SCN has not yet been established in this species. The present work aims to determine whether there is a relationship between the estrous cycle and the circadian system in *Neotomodon alstoni* and if it is consistent with the observed in other murid species. This first approach is evaluated by using ovariectomy to study its effects on the core characteristics of the circadian rhythm of locomotor activity (free running and entrainment in photoperiod and photic phase shifting). This may contribute to understanding if ovarian hormones influence in the same way on the circadian regulation in different rodents.

2. Methods

2.1. Animals and housing

All procedures described in this article were carried out according to the international ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 8023) [40]; and the Institutional guidelines, and the General Law of Health for Research Studies in Mexico (NOM-062-Z00-1999). *N. alstoni* is considered a species of least concern by the IUCN. Mice used in this study were born and raised in laboratory conditions (light-dark cycle; LD: 12:12, 0600–1800 h photophase, 200–250 lx) and individually housed in cages containing wood chips. Standard food chow (Rodent Lab 5001, Purina Inc.) and tap water were provided ad libitum. Thirty female adults of *N. alstoni* (6–8 months old) weighing 54 ± 2 g were studied. The temperature of the room was kept between 18 and 23 °C. Zeitgeber time (ZT) was used as a reference in LD; lights-on = ZT0 and lights off = ZT12. In constant darkness, the onset of activity was used as a reference for Circadian Time 12 (CT12).

2.2. Vaginal cytology

Vaginal cytology changes were monitored in 10 mice maintained in LD 12:12 for 20 days. A vaginal swab was collected between ZT12–16 using a sanitized swab. The vaginal opening was wet with a plastic pipette containing a physiological saline solution (NaCl 0.9%) at ambient temperature, and a swab was gently rubbed over the vaginal opening. The samples obtained from the swab were rolled across a dry glass slide, air-dried, and stained with hematoxylin-eosin and overlaid with a coverslip. The slides were examined under a light microscope (Zeiss, AX10) with a 10 × magnification using bright field illumination. The stages corresponding to the Estrous cycle were determined based on the absence or presence of leukocytes (Le), nucleated (Nu) and cornified (Co) epithelial cells as in Felicio, et al. [41].

2.3. Plasma estradiol (E2) level

The estradiol (E2) level was measured by radioimmunoassay (RIA) in plasma from 6 mice at different times of the estrous cycle. Blood samples (250 µl) were obtained from mice under isoflurane anesthesia (Dorin, Halocarbon Labs, USA) by retro-orbital sinus into heparinized capillary tubes. The samples were centrifuged for 5 min. at 3500 rpm. to separate the plasma, and it was subsequently stored at –40 °C. Radioactivity was measured with a CompuGamma gamma counter, model 1282 (LKB-Wallac, Turku, Finland).

2.4. Locomotor activity recording

Freely moving locomotor activity in each mouse was recorded inside acrylic cages equipped with infrared light crossings as indicated elsewhere [35,36]. The cages were enclosed in a light-tight wooden box in a LD 12:12 cycle (photophase 6:00–18:00; 200–250 lx) or in constant darkness with a dim red light (DD). Individual locomotion profiles were calculated using the number of infrared light crossings monitored by a computer. Each beam interruption was considered as a single event; the data were collected by a PC every 10 min (bin-cell) and analyzed using the software ACTIVIEW® (Minimitter, Sunriver, OR). The ventilation inside the chamber was kept constant, and the room temperature was maintained between 20 and 25 °C. The circadian locomotor activity was represented by double-plotted actograms.

2.5. Surgery procedures

All surgery procedures were performed in an aseptic environment. During the diestrus, the mice were anesthetized with ketamine/xylazine (0.05 mg/50 g) and bilaterally OVX with a dorsal approach (through the back muscle, lateral to the spinal column). The ovaries were removed, but the uterine horns were left intact. The incisions were closed with an absorbable suture through the muscle wall and with sterile sutures through the skin. A separate group of mice underwent the same procedure, but their ovaries were not removed (sham-operated); a specialized veterinarian supervised all the surgical procedures. Mice recuperated for at least 20 days before being subjected to recordings of activity.

2.6. Experimental protocols

A group of intact mice ($n = 30$) were set in LD for 20 days and then in DD with a dim red light (3 lx) until a stable free running rhythm was observed. Subsequently, they were exposed to a 1-h pulse of bright white light (300 lx) at CT14 or CT22 (delays and advances zones, respectively [35]). Then, mice were kept in DD for at least 15 days until they displayed stable free running rhythms. Photic phase-shift was evaluated according to the onset of activity. Then, mice were transferred to a photic environment and OVX ($n = 10$) or sham operated ($n = 10$). After a recovery period of ten days, mice were set again in DD

and the photic phase shift protocol was repeated. Finally, 40 days after OVX, mice were used for locomotor activity recordings in LD 12:12 for at least three more weeks. This protocol allowed for a comparison of the photic phase shifts and free running period in a given individual before and after surgery.

2.7. Data analysis

The free-running circadian period of the 10-day sequence of activity data was analyzed according to the Lomb-Scargle periodogram with Chronosfit * software [42]. Circadian or infradian periods (3–7 days) above the significance criteria ($P < 0.05$) were also considered. The amplitude of locomotion acrophase in LD, as well as the phase angle (ψ) between the onset of activity and lights off, was determined using Actview* software. Differences before and after surgeries in period or photic phase shifts were compared using a Student's *t*-test. Daily acrophase data were followed for 25 days and analyzed using a circular Rayleigh test; comparisons were tested with Mardia-Watson test using Oriana* software. The onset of activity was defined as the first 10-min activity interval that equaled or exceeded the average daily activity and was not followed by more than two consecutive 10-min inactivity intervals [43,44]. In the standard notation of the phase angle difference a positive sign is given when the light off is preceded, and a negative sign when it occurs afterwards [45]. The photic phase shift protocols were performed exposing the animals in CT14 or CT22 to a 1-h light pulse (300 lx) as indicated before [35]. An eye-fitted line through activity onset of at least ten days before the light pulse and other periods of ten days after the pulse were used as a phase reference; the difference projected between them at the pulse-day was used to quantify the phase shift [45]. Blind analyzers were used to evaluate the phase shift magnitudes. The statistical comparisons between photic phase shifts were made using one-way-ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

3. Results

3.1. Regularity in the estrous cycle in *N. alstoni*

The female *N. alstoni* mice had the same vaginal cytology as other laboratory rodents [46]. Characteristic cells in each stage of the estrous

cycle were observed: metestrus (Fig. 1A) revealed both nucleated and cornified cells and few leukocytes. Diestrus (Fig. 1B) was characterized by a greater proportion of leukocytes; proestrus (Fig. 1C) showed many nucleated cells while estrus (Fig. 1D) had cornified cells. Circulating estradiol (Fig. 1E) shows a peak during proestrus (116 ± 8.19 pg/ml); it decayed during estrus (80 ± 10.72 pg/ml) and progressively rose during metestrus (99.79 ± 1.37 pg/ml) and diestrus (96.85 ± 8.19 pg/ml). The daily vaginal smear tests for 25 days showed that intact female mice exhibited regular estrous cycles, during which cornified cells (Co) were present for 2 consecutive days, corresponding to metestrus and estrus stages. There was five times the presence of nucleated (Nu) cells, which is characteristic of proestrus. After 40–50 days of ovariectomy, mice did not show a detectable circulating amount of E2; the vagina was closed with no tissue swelling or, when slightly open, cytology showed few leukocytic and cornified (but not nucleated) cells. Also, in OVX sacrificed mice, the uterus was dissected, and its aspect in size and vascularization was notably reduced.

Estrous regularity is associated with changes in daily mean activity clearly affected by the ovariectomy. Fig. 2 shows three actograms (amplitude scale, 0–50 crossings/ 10 min) in intact (above), sham (center) and OVX (down) mice. Next to these figures, the daily activity average is shown (Fig. 2B), plotted for 21 days. Changes in amplitude were found approximately every 4.8 ± 0.2 days in 100% of the intact group; 4.9 ± 0.2 days in 89% of the sham group, and only 50% of OVX mice showed periods with an average of 3.8 ± 0.51 days, different from the other groups ($P < 0.05$, Student's *t*-test).

3.2. Locomotor activity profile in LD

All mice were more active during darkness in the LD cycle. Differences in terms of acrophase were also found. Fig. 3A shows circular statistics of acrophase data (~200 values each); differences in vector direction between OVX and the other groups were found (Mardia-Watson test; $p < 0.05$). Circular histograms show similar acrophase (arrow) in intact ($ZT = 17:07 \pm 16:50-17:25$ h; $r = 0.86$) and sham ($ZT = 17.12 \pm 16:58$ h – $17:27$ h, $r = 0.89$) compared to OVX ($ZT = 16.48$ h \pm $16:30-17:05$ h, $r = 0.82$). When the phase angle difference between the onset of activity and the zeitgeber was analyzed (Fig. 3B), OVX presented a significant delay

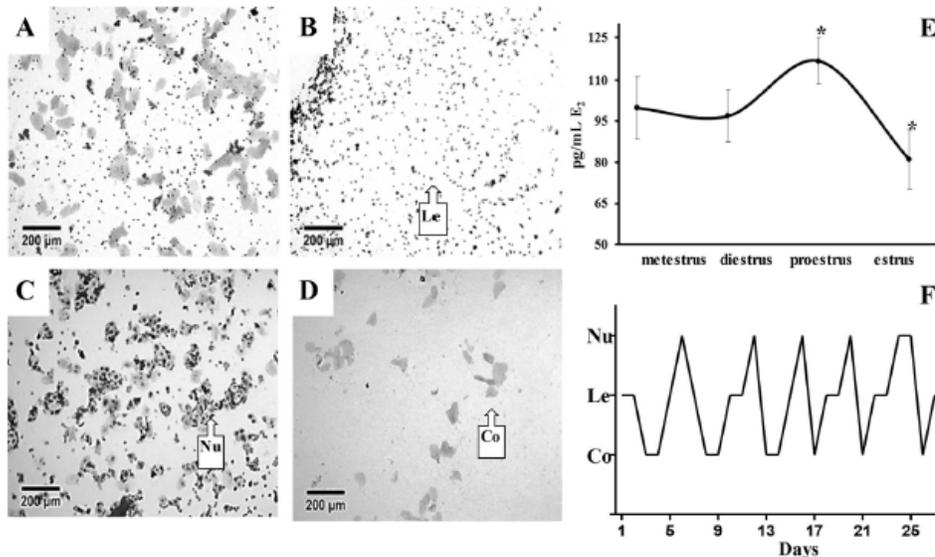


Fig. 1. Vaginal cytology and circulating estradiol during the estrous cycle in *Neotomodon alstoni*. Representative photographs of each stage with three characteristic cells: In metestrus (A), diestrus (B), proestrus (C) and estrus (D). The SEM \pm concentration of circulating estradiol (E) is elevated during proestrus (* $P < 0.05$ ANOVA). In (F), representative progression of estrous cycle followed by vaginal cytology for 25 days, where Nu = nucleated; Le = leukocytic and Co = cornified cells.

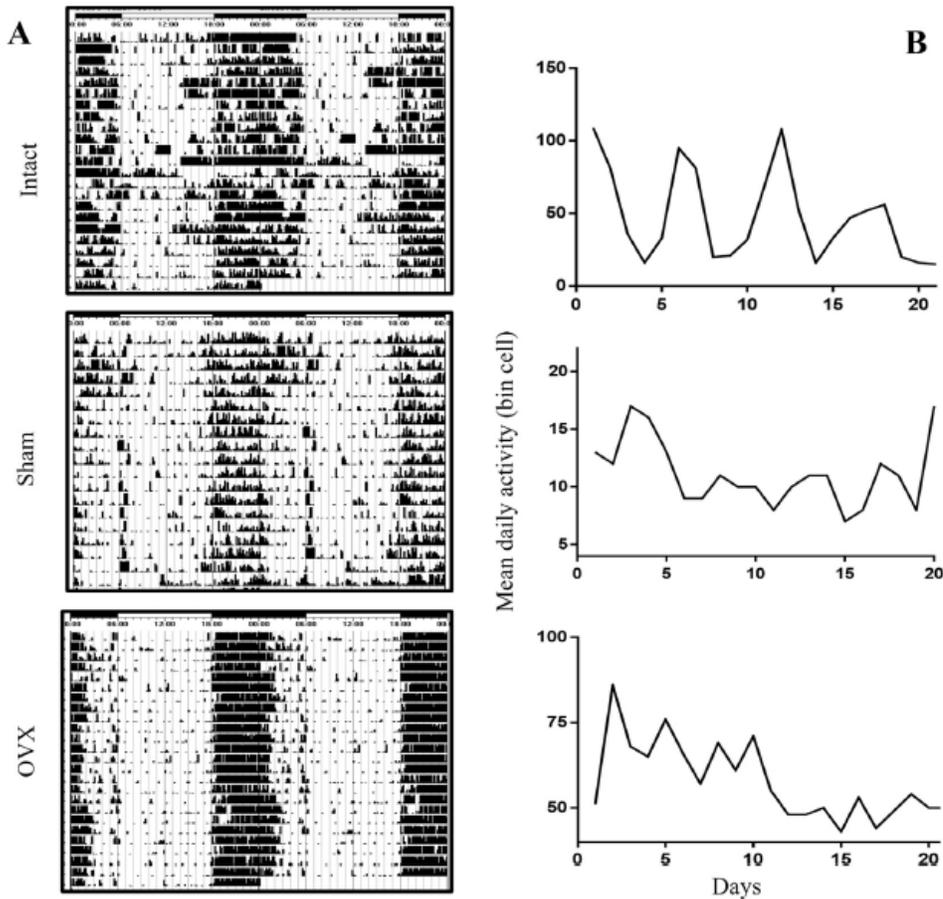


Fig. 2. Relationship between locomotor activity in LD 12:12 and scalloping. In (A), representative double-plotted actograms of intact, sham and OVX mice. Profiles of day to day mean activity for 21 days is shown in (B) corresponding to the representative actogram indicate that the scalloping is lost in OVX.

($\psi = 15.17 \pm 7.11$ min.) compared to the pre-OVX group ($\psi = -7 \pm 5.28$ min.; Student's *t*-test, $P < 0.01$). There were also differences in amplitude of locomotor activity. Fig. 3C presents a profile of locomotor activity (mean activity/h) along the LD cycle. Differences were noted at 8:00 h–10:00 h between intact and sham-operated mice during the day, and between OVX and intact mice at 16:00 h and at 23:00 h during the night. Total activity with respect to the previous intact condition is shown in Fig. 3D, and an increase is noted in OVX (Student's *t*-test, $P < 0.05$). Such difference in activity occurs mainly during the scotophase (Fig. 3E). In OVX, it was statistically higher (76.77 ± 15.66) than in intact mice (27.6 ± 4.15) or sham group (23.1 ± 5.31 ; $p < 0.05$, ANOVA) but non-significant increment in photophase was observed in OVX (10.4 ± 2.18) compared to the intact group (5.15 ± 0.1) and the sham group (8.73 ± 2.87).

3.3. Changes in circadian locomotor activity during constant darkness

Representative actograms in Fig. 4A and average plots show the effects of ovariectomy or sham on the free-running circadian period compared to intact mice. The changes in free-running circadian rhythms were noted after recovery from surgery. Fig. 4B shows a plotting of the circadian rhythm period (τ) value individually for each group before and after surgery; OVX induces a general shortening in τ in 9 out of 10 mice tested; in the sham group, changes in τ either increasing or decreasing were observed in 4 out of 9 cases. Fig. 4C shows the mean of τ from intact mice before (pre-sham) and sham-operated

(left panel), which have no significant differences ($\tau = 23.6 \pm 0.12$ h vs. $\tau = 23.5 \pm 0.16$ h); nevertheless, in the condition before (pre-OVX) and after OVX (Fig. 4C, right panel), the period was shortened nearly by 0.5 h ($\tau = 23.6 \pm 0.1$ h vs. 23.1 ± 0.1 h $p < 0.05$). Total percentage of average daily activity (Fig. 4D), followed during 10 days before and after ovariectomy, shows a significant decrement in OVX mice held in constant darkness (Student's *t*-test, $P < 0.01$).

3.4. Circadian photic phase shifting

Fig. 5A shows representative actograms of intact (left), sham (middle) and OVX (right panels) that received a 1 h light pulse either at CT 14 or CT 22. Straight black lines at the left side of each actogram indicate the onset of activity. The phase difference induced by the light pulse in all the animals tested are shown in Fig. 5B, including the average (\pm SEM). Intact mice exhibited an average phase delay in response to light pulse early in subjective night at CT 14, of -43 ± 6.28 min., in sham -54 ± 14.99 min. And, in OVX there is an increase in amplitude delays of photic phase shifting (115 ± 23.75 min; $P < 0.01$, vs. intact). A pulse delivered in late subjective night at CT22 did not show differences between groups. Intact mice exhibit an average advance of 37.08 ± 10 min, sham 52.00 ± 19.7 min and OVX mice 36 ± 14.5 min.

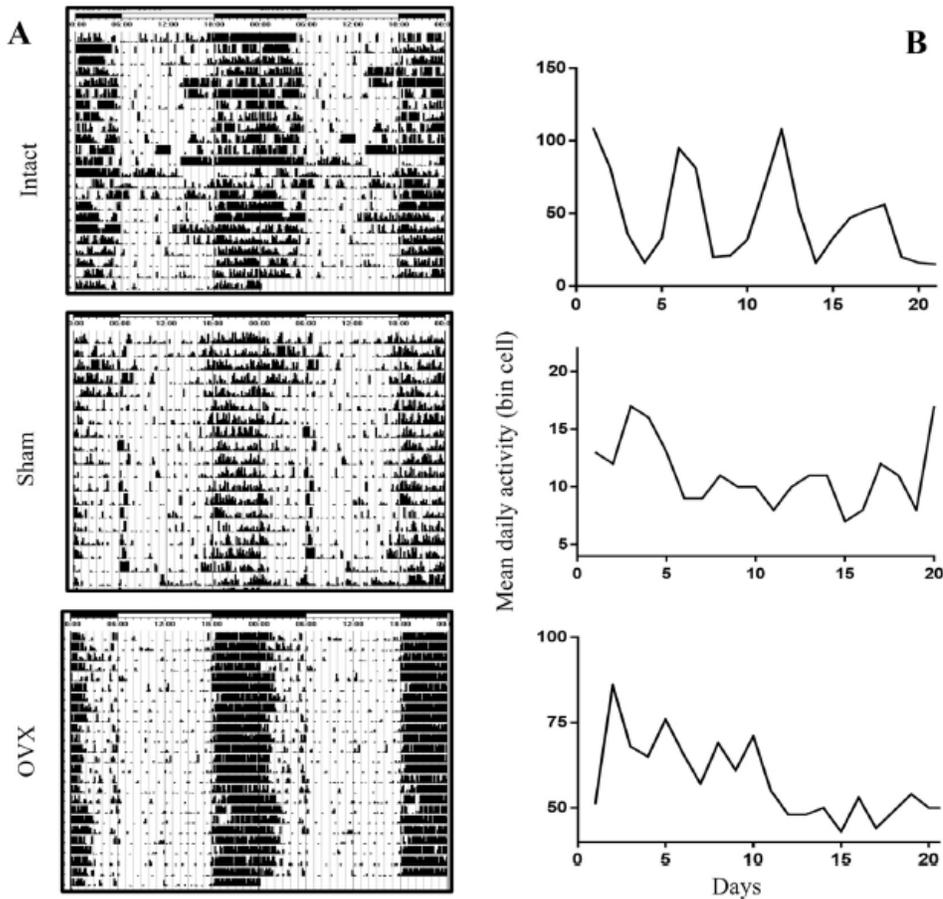


Fig. 2. Relationship between locomotor activity in LD 12:12 and scalloping. In (A), representative double-plotted actograms of intact, sham and OVX mice. Profiles of day to day mean activity for 21 days is shown in (B) corresponding to the representative actogram indicate that the scalloping is lost in OVX.

($\psi = 15.17 \pm 7.11$ min.) compared to the pre-OVX group ($\psi = -7 \pm 5.28$ min.; Student's *t*-test, $P < 0.01$). There were also differences in amplitude of locomotor activity. Fig. 3C presents a profile of locomotor activity (mean activity/h) along the LD cycle. Differences were noted at 8:00 h–10:00 h between intact and sham-operated mice during the day, and between OVX and intact mice at 16:00 h and at 23:00 h during the night. Total activity with respect to the previous intact condition is shown in Fig. 3D, and an increase is noted in OVX (Student's *t*-test, $P < 0.05$). Such difference in activity occurs mainly during the scotophase (Fig. 3E). In OVX, it was statistically higher (76.77 ± 15.66) than in intact mice (27.6 ± 4.15) or sham group (23.1 ± 5.31 ; $p < 0.05$, ANOVA) but non-significant increment in photophase was observed in OVX (10.4 ± 2.18) compared to the intact group (5.15 ± 0.1) and the sham group (8.73 ± 2.87).

3.3. Changes in circadian locomotor activity during constant darkness

Representative actograms in Fig. 4A and average plots show the effects of ovariectomy or sham on the free-running circadian period compared to intact mice. The changes in free-running circadian rhythms were noted after recovery from surgery. Fig. 4B shows a plotting of the circadian rhythm period (τ) value individually for each group before and after surgery; OVX induces a general shortening in τ in 9 out of 10 mice tested; in the sham group, changes in τ either increasing or decreasing were observed in 4 out of 9 cases. Fig. 4C shows the mean of τ from intact mice before (pre-sham) and sham-operated

(left panel), which have no significant differences ($\tau = 23.6 \pm 0.12$ h vs. $\tau = 23.5 \pm 0.16$ h); nevertheless, in the condition before (pre-OVX) and after OVX (Fig. 4C, right panel), the period was shortened nearly by 0.5 h ($\tau = 23.6 \pm 0.1$ h vs. 23.1 ± 0.1 h $p < 0.05$). Total percentage of average daily activity (Fig. 4D), followed during 10 days before and after ovariectomy, shows a significant decrement in OVX mice held in constant darkness (Student's *t*-test, $P < 0.01$).

3.4. Circadian photic phase shifting

Fig. 5A shows representative actograms of intact (left), sham (middle) and OVX (right panels) that received a 1 h light pulse either at CT 14 or CT 22. Straight black lines at the left side of each actogram indicate the onset of activity. The phase difference induced by the light pulse in all the animals tested are shown in Fig. 5B, including the average (\pm SEM). Intact mice exhibited an average phase delay in response to light pulse early in subjective night at CT 14, of -43 ± 6.28 min., in sham -54 ± 14.99 min. And, in OVX there is an increase in amplitude delays of photic phase shifting (115 ± 23.75 min; $P < 0.01$, vs. intact). A pulse delivered in late subjective night at CT22 did not show differences between groups. Intact mice exhibit an average advance of 37.08 ± 10 min, sham 52.00 ± 19.7 min and OVX mice 36 ± 14.5 min.

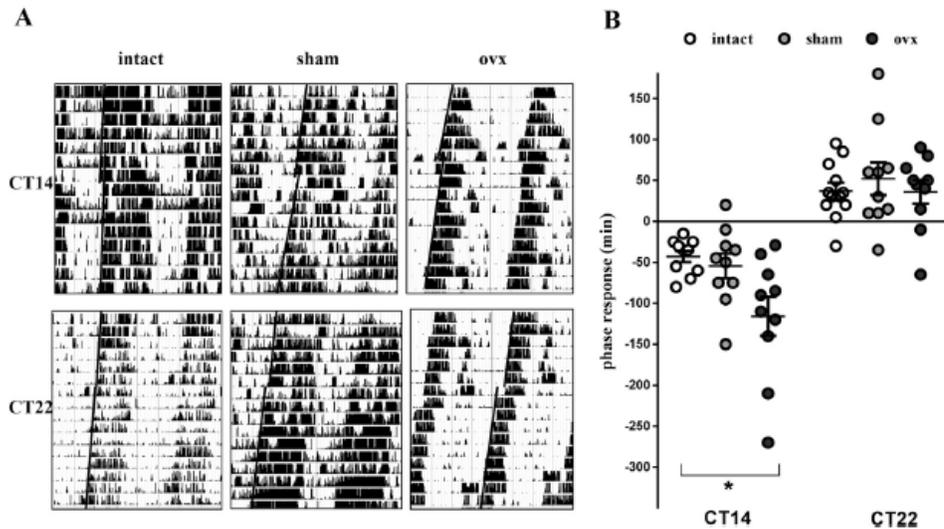


Fig. 5. The ovariectomy increases amplitude in photic phase shifting at CT 14. Double-plotted actograms from intact, sham surgery and OVX females at CT14 and CT22 are shown in (A). The individual photic phase shifts are more evident in OVX females at CT14 (B) (ANOVA, * $p < 0.05$), while in CT22 there are no differences between groups.

4. Discussion

This study has contributed first evidence in a species that was not studied before about the relationship between circadian and reproductive systems. The volcano mouse is a social rodent whose lifespan may reach 5 years [47]. We studied 6–8 months old mice, therefore, they could be considered as young adults. In *Neotomodon alstoni*, ovariectomy shortens the free-running circadian period, increases the amplitude in delays photic phase shifting, reduces the amount of total activity in total darkness, but increases it in scotophase during an LD cycle. In order to understand the mechanisms involved, a posterior study needs to include the progesterone profile in OVX mice and whether chronic administration of estrogens E2 and progesterone may affect the parameters found as different due to ovariectomy, as well as if this change is persistent at different ages of the reproductive lifespan.

The female mice *N. alstoni* maintained regular estrous in which the presence of cornified cells are associated with the changes in estradiol (Fig. 1). In OVX mice, the vaginal opening was closed with no tissue swelling, or when slightly open, few leukocytic and cornified cells were observed. The estrous cycle is influenced by the SCN regulating the LH surge [1]. The estrous cycle involves the release of ovarian hormones that may influence circadian organization in both hamsters and rats associated with changes in τ , amplitude and ψ [13,17,48]; such variation has been defined as “scaloping” [15]. Changes in τ and ψ have also been described during proestrus when the highest concentration of estradiol was present [16,19,29,49]. In the present study, a scaloping was noted in the daily average amplitude of locomotor activity of intact *N. alstoni* along the estrous cycle every 4.5–6.5 days, associated with less stability in its acrophase (Fig. 3A) and a positive ψ . After ovariectomy, scaloping in amplitude was lost, and it was possibly the cause of ψ delayed, the acrophase was present earlier and more stable (~30 min) in 80% of OVX. The advance in acrophase was consistent with the shortening in the free running period [50], but opposite with ψ observed. The OVX mice show a shorter infradian period in half of the mice tested. This result may be a consequence of influences different of the ovarian hormones that require further research.

The reduced amplitude observed after ovariectomy in constant darkness (Fig. 4D), consistent with other rodent models, could be due to the acute reduction in circulating estrogens after ovariectomy, possibly the lack of estradiol, which in other rodents consolidates the activity during the night [44,49,51,52]. In our study, the activity increases

during scotophase in total amount, as well as in amplitude, this effect was observed 40–50 days after ovariectomy (Fig. 3C, D, and E). The results of locomotor activity during LD in other OVX rodents have mainly used the activity wheel; this may be partially responsible for the difference observed in the present work. In addition, the lack of ovarian hormones in *Neotomodon* could influence not only the coupling between SCN neurons but also their inputs and outputs that regulate the activity under LD conditions; one possibility would be the increase in the reward of food seeking behavior at the beginning of the night [53], or mechanisms mediated by changes in the serotonergic system affecting multiple autonomic and behavioral functions [54] observed in OVX rodents, also suggesting further research in this issue.

Preliminary studies in OVX *N. alstoni* have shown that acute doses of estradiol benzoate (5 μg) do not produce significant changes in the amplitude of locomotor activity observed along 48 h after the injection. Also, we noted that an increase in activity was noted between intact and sham operated at some hours during photo phase. The activity scattered during light is frequent in logs without wheel. What it is observed in mice with sham surgery may be part of the behavioral variability.

The SCN plays a fundamental role during the estrous cycle: it regulates the LH surge and the subsequent ovulation in female reproduction [1]. It also regulates the ovarian hormones influencing many features of circadian organization in both the Syrian hamster and the rat [13,15,17]. The LH surge presents a phase shift, which is activity dependent [55]; although LH concentration was not measured in this study, the assumption was that, since estradiol is low in OVX, there is no LH surge [56]. These changes in ovarian hormones are associated with changes in τ , amplitude, and onset of activity [17,48]. The present study demonstrates that the estrous cycle regularity of *N. alstoni* is related to changes in the locomotor activity amplitude in LD, possibly because of changes in circulating estradiol. Such changes occur approximately every 4.5–6.5 days both in intact and in sham females, while in OVX, this regularity was lost. These results are consistent with Tasaku et al. [57] where a lack of estrous rhythm in aged female mice is due to decay in ovarian hormones.

The relationship between ovarian estrogens and the SCN have been tested in different murine species. In rats, estradiol receptors have been seen in the periphery (RE α) and within (RE β) the SCN [58,59]. In the SCN of female mice, RE β is more abundant than RE α [59,60] suggesting a direct effect of estrogens in the SCN neurons. The effects of estradiol and progesterone have been tested on the circadian molecular

clock, which consists of a set of transcriptional modulators and their protein products. The CLOCK and BMAL1 proteins are the positive transcriptional factors that bind to an E-box in the promoter region of clock genes *Per* and *Cry* to activate their transcription. The proteins PER and CRY form a dimer that translocate into the nucleus inhibiting the activity of CLOCK/BMAL1 [61]. The effect of E2 or progesterone upon the circadian regulation of clock genes has been controversial. A negative effect of 17 β -estradiol on circadian expressions of *Per2* mRNA in the SCN of OVX rats have been reported [62], however, in PER1: LUC rats, the administration of E2 to SCN explants does not change the free running period of *Per1* expression, but progesterone does it in a dose-dependent manner [63]. In SCN explants from PER2: LUC OVX mice, E2 does not influence the period of *Per2* rhythm [64]. Progesterone receptors (PR) can function as a part of the binding of the steroid-activating complex to regulate the expression of the clock genes [65], but PRs are rare in SCN [66]. Also, it has been shown that progesterone inhibits the effect of estrogen on the expression of connexin-36 mRNA in rat SCN [67]. Progesterone seems to have opposite effects on the circadian system to those observed by estradiol; together these hormones can modulate electrical coupling particularly in the communication of the junctions involved in the intercellular coupling of neurons of the SCN and consequently in the resulting circadian rhythm, as suggested by previous studies in hamsters [68]. However, this deficiency of the electrical coupling of neurons seems to be independent of the regulation of oscillations of the circadian clock genes in the SCN [63,69,70]. Therefore, subtle differences in mechanisms underlying the effect of ovarian hormones may exist between species. As an example, OVX mice does not change the period of circadian locomotor activity in free running [22,71]; however, high doses of chronic 17 β -estradiol shorten it [43], indicating that the influence of ovarian hormones, particularly upon the SCN, may be species-specific in a dose-dependent manner.

Both estradiol and progesterone decrease after OVX [72,73] and this lack of estrogens may reorganize circadian organization in central and peripheral oscillators. The circadian system regulates events and determines the time of maximal and minimal expression of diverse physiological and behavioral responses [74]. Ovariectomy has a profound effect on the acrophase of clock genes in peripheral circadian oscillators. In rats, ovariectomy changes the acrophase of *Per1* expression in explants of white adipose tissue and liver [63] while in mice, it seems to have a strong effect in the uterus of PER2: LUC mice [64]. The diverse results of the influence observed on the circadian locomotor activity in all the species or murine tested might also be the result of the effect of the estrogens influence overall the circadian system, as well as the neural tissues that may relay information on the suprachiasmatic nucleus [75]. The effect of ovariectomy on *Neotomodon alstoni* opens a new possibility to test hypotheses on the effect of steroids on the circadian system and clock genes in central and peripheral oscillators.

The results obtained in the present work on the amplitude of photic phase shifting (Fig. 5), indicate that, in *N. alstoni*, a relationship exists between the entraining mechanisms in the SCN and the endocrine influence of the ovary. This result is consistent with other findings where estradiol reduces the amplitude of phase-shift delays but not in the advance zone of the phase response curve [44]. In mice, ER α -knock-out and nonclassic estrogen receptor knock-in mice (NERKI) also show an increased amplitude in phase shifting at CT22 [76], indicating that estrogen signaling is required for the integration of circadian photic phase shifting. Photic information in the SCN involves an increment on transcription factors *c-fos*, *egr-1* and pCREB [77–79]. E2 also increases the immunoreactive cells to pCREB in the SCN at CT22 [80] linked to the expression of clock genes involved in photic entraining [81]. Exogenous E2 increases the number of cells expressing c-Fos during photophase, mainly in the ventrolateral SCN [82]. It is known that in the SCN *Per1* is photo-inducible at subjective night [83], while *Per2* is only inducible during the early subjective night [84]. The photo-induction of these genes is involved in the mechanisms that produce a phase-shifting

of the molecular circadian oscillator, and the signaling may be sensitive to the estrogens. It is possible that, in *Neotomodon*, estrogens modulate the photic sensitivity to light in the early subjective that indirectly impacts the photic induction of PER1 and PER2. The influence of estrogens upon the circadian clockwork involves receptors ER α and ER β , both present in the SCN of rodents [57,85–87], and in structures considered as inputs and outputs of the SCN [72,88]. Therefore, estrogens may act directly or indirectly on the circadian behavior. ER α is involved in the magnitude and intensity of the activity, while ER β participates in the photic phase shifting as well as in the distribution of locomotor activity [44].

It may be that, in OVX *Neotomodon*, the absence of estrogen may impact through both kinds of receptors, reducing activity in DD, shortening τ and modifying the photic sensitivity in the early subjective night. However, further research considering specific immunolabeling on the kind of receptor is required.

The present study contributes to additional knowledge in the biology of the volcano mouse *Neotomodon alstoni*, especially, in the relationship between the circadian regulation of the SCN and the mechanisms involving the ovary that integrate the entraining and the free-running of the circadian rhythm in locomotion. This study also contributes to the results obtained without the possible influence of wheel running, which can produce both behavioral and molecular changes in the circadian system [23,27,88] as well as in the reward system by functioning as a motivator [25]. It is known that the exposure to wheel running on proestrus blocks the expected LH surge in most hamsters and delays it until the next day [87]. The use of *N. alstoni* enables the study of locomotor activity without wheel running, thereby reducing the factors that could mask the obtained results. The variations observed with respect to other animal models are fundamental to understanding whether the influence of the ovary physiology upon circadian mechanisms in the pacemaker is similar among murids or if they are species specific.

5. Conclusion

In the volcano mouse *Neotomodon alstoni*, the estrous cycle modulates the amplitude of the circadian rhythm of locomotor activity. Ovariectomy shortens τ and increases the photic phase shifting in the early subjective night, indicating that also a modulatory influence exists between the ovaries and the suprachiasmatic nucleus of this species. In order to understand such influence, further experimental protocols are required to test separately or combined, in a dose-dependent manner; chronic releasing of 17 β -estradiol and progesterone, as well as in immunolabeling ER neurons in SCN, and possible differences in clock proteins in SCN between OVX and intact animals.

Acknowledgements

CRJT was supported by CONACyT and it is part of her Ph.D. thesis in the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM with student grant CONACyT [261883/220328]. This work was supported by PAPIIT-UNAMIN212715 to MMA. The authors thank Teresa Bosques-Tistler and Susanna Barbatun for Academic English editing. We also thank the support from personal of the Academic group of Biol. Animal Experimental, Agustín Carmona-Castro, Guadalupe Martínez Morales and Hugo Molina Obregón for his support in the animal care. Mario Cárdenas (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán) for technical assistance in RIA, and Martín Fuentes Cano for technical maintenance of the locomotor activity recording system.

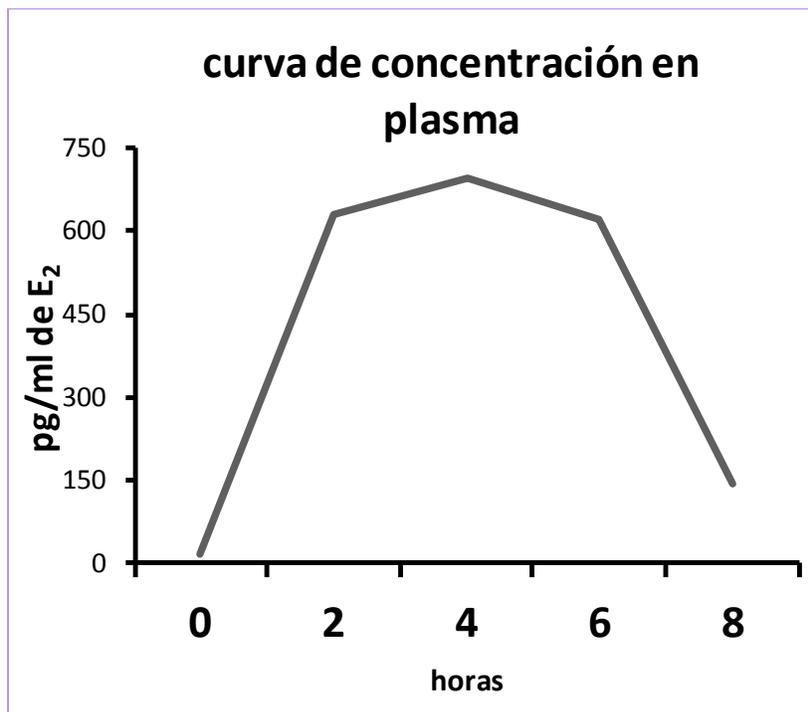
References

- [1] R.H. Miller, J.S. Takahashi, Central circadian control of female reproductive function, *Front. Endocrinol.* 4 (2014) 195.
- [2] H.O. De la Iglesia, W.J. Schwartz, Minireview: timely ovulation: circadian

- regulation of the female hypothalamic-pituitary-gonadal axis, *Endocrinology* 147 (3) (2006) 1148–1153.
- [3] W.J. Schwartz, H.O. de la Iglesia, P. Zlomanczuk, H. Tilnerova, Encoding the Quaternary Stagnation within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus, *J. Biol. Rhythm.* 16 (4) (2001) 302–311.
- [4] M.R. Gorman, T.M. Lee, Hormones and Biological Rhythms, in: J.B. Becker, S.M. Breedlove, D. Crews, M.M. McCarthy (Eds.), *Behavioral Endocrinology*, 2nd edition, MIT Press, Cambridge, 2002, pp. 451–489.
- [5] R.Y. Moore, The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system, *Proc. Mol. Biol. Transl. Sci.* 119 (2013) 1–28.
- [6] E. Morgado, C. Juárez-Portilla, A.J. Silverman, R. Silver, Relevance of network organization in SCN clock function, in: R. Aguilar-Roblero, M. Díaz-Muñoz, M. Fanjul-Moles (Eds.), *Mechanisms of Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance*, Springer, Switzerland, 2015, pp. 149–175.
- [7] W.H. Colledge, Kisspeptin and GnRH neuronal signaling, *Trends Endocrinol. Metab.* 20 (3) (2009) 115–121.
- [8] F.H. Bronson, F.S. Vom Saal, Control of the preovulatory release of luteinizing hormone by steroids in mouse, *Endocrinology* 104 (5) (1979) 1247–1255.
- [9] M.H. Stetson, P.J. Anderson, Circadian pacemaker times gonadotropin release in free-running female hamsters, *Am. J. Phys.* 238 (1) (1980) R23–7.
- [10] J.W. Everett, C.H. Sawyer, A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation, *Endocrinology* 47 (3) (1950) 198–218.
- [11] J.J. Allera, M.V. Walecki, F.R. Allera, A biological clock controlling the estrous cycle of the hamster, *Endocrinology* 88 (6) (1971) 1368–1379.
- [12] M.H. Stetson, M. Watson-Whitmyre, The neural clock regulating estrous cyclicity in hamsters: gonadotropin release following barbiturate blockade, *Biol. Reprod.* 16 (4) (1977) 536–542.
- [13] J.S. Takahashi, M. Menaker, Interaction of estradiol and progesterone: effects on circadian locomotor rhythm of female golden hamsters, *Am. J. Phys.* 239 (5) (1980) 497–504.
- [14] M.M. Mahoney, B.V. Rossi, M.H. Hagenauer, T.M. Lee, Characterization of the estrous cycle in Octodon degus, *Biol. Reprod.* 84 (4) (2011) 664–671.
- [15] L.P. Morin, K.M. Fitzgerald, I. Zucaker, Estradiol shortens the period of hamster circadian rhythms, *Science* 196 (4287) (1977) 305–307.
- [16] F. Wollnik, F.W. Turek, Estrous correlated modulations of circadian and ultradian wheel-running activity rhythms in LEW/Ztm rats, *Physiol. Behav.* 43 (3) (1988) 389–396.
- [17] H.E. Albers, Gonadal hormones organize and modulate the circadian system of the rat, *Am. J. Phys.* 241 (1) (1981) R62–6.
- [18] K. Fitzgerald, I. Zucaker, Circadian organization of the estrous cycle of the golden hamster, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73 (8) (1976) 2923–2927.
- [19] S.E. Labyak, T.M. Lee, Estrus- and steroid-induced changes in circadian rhythms in a diurnal rodent, *Octodon degus*, *Physiol. Behav.* 58 (3) (1995) 573–585.
- [20] R.T. Gentry, G.M. Wade, Sex differences in sensitivity of food intake, body weight, and running-wheel activity in ovarian steroid in rats, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 90 (8) (1976) 747–754.
- [21] H.B. Andlief, G.N. Wade, Effects of hysterectomy on sexual receptivity, food intake, running wheel activity, and hypothalamic estrogen and progesterin receptors in rats, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96 (6) (1982) 886–9218.
- [22] E. Iwahana, I. Karasoreos, S. Shibata, R. Silver, Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice, *Horm. Behav.* 53 (3) (2008) 422–430.
- [23] L.A. Eckel, T.A. Houpt, N. Geary, Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels, *Physiol. Behav.* 70 (3–4) (2000) 397–405 (Houpt).
- [24] D.P. Dixon, A.M. Ackert, L.A. Eckel, Development of, and recovery from, activity-based anorexia in female rats, *Physiol. Behav.* 80 (2–3) (2003) 273–279.
- [25] G.M. Novak, P.R. Burchardt, J.A. Levine, The use of a running wheel to measure activity in rodents: relationship to energy balance, general activity, and reward, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36 (6) (2012) 1002–1014.
- [26] N. Yamada, K. Shimoda, S. Ohi, S. Takahashi, K. Takahashi, Free-access to a running wheel shortens the period of free-running rhythm in blinded rats, *Physiol. Behav.* 42 (19) (1988) 87–91.
- [27] S.G. Roebis, N. Osovsky, Effects of induced wheel running on circadian activity rhythms in Syrian hamsters: entrainment and phase response curve, *J. Biol. Rhythm.* 4 (1) (1989) 39–48.
- [28] P.C. Yannelli, J. McKinley Brewer, M.E. Harrington, Is novel wheel inhibition of *per1* and *per2* expression linked to phase shift occurrence? *Neuroscience* 112 (3) (2002) 677–685.
- [29] S. Kent, M. Hurd, E. Saitoff, Interactions between body temperature and wheel running over the estrous cycle in rats, *Physiol. Behav.* 49 (6) (1991) 1079–1084.
- [30] I. Simale, P.D. Heideman, J.A. French, Behavioral neuroendocrinology in non-traditional species of mammals: things the "knockout" mouse CANT tell us, *Horm. Behav.* 48 (4) (2005) 474–483.
- [31] R. Ortiz, M. Aguilar, H. Granados, Estudio sobre la biología del estón de los volcanos (*Neotomodon alstoni alstoni*) XIII. Histología de la madurez gonadal en la hembra. XXX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas en Jalapa, Reunión, Veracruz, 1987, p. C17.
- [32] J. Luis-Díaz, R. Cárdenas-Vázquez, I. Villalpando-Fierro, M. Martínez-Torres, H. Merchant, Follicular development in the volcano mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*, Rodentia: Muridae) from birth to maturity: a morphological approach, *Acta Zool.* 89 (3) (2008) 185–192.
- [33] J. Luis, L. Ramírez, A. Camona, G. Ortiz, J. Delgado, R. Cárdenas, Paternal behavior and testosterone plasma levels in the Volcano Mouse *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Muridae), *Rev. Biol. Trop.* 57 (1–2) (2009) 433–439.
- [34] C. Fuentes-Granados, M. Miranda-Anaya, J. Samario-Román, E. Momno-Sáenz, A. Carmona-Gastro, R.I. Cárdenas-Vázquez, Circadian locomotor activity and response to different light conditions in the volcano mouse, *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898), *Biol. Rhythm. Res.* 41 (4) (2010) 269–278.
- [35] M. Miranda-Anaya, V. Carmona-Alcocer, A. Camona-Gastro, Effects of obesity on circadian photic entrainment of locomotor activity in wild mice *Neotomodon alstoni*, *Biol. Rhythm. Res.* 47 (4) (2016) 529–537.
- [36] M. Miranda-Anaya, D. Luna-Moreno, A. Carmona-Gastro, M. Díaz-Muñoz, Differences in photic entrainment of circadian locomotor activity between lean and obese volcano mice (*Neotomodon alstoni*), *J. Circadian Rhythm.* 15 (1) (2017) 1–10, <http://dx.doi.org/10.5334/jcr.145>.
- [37] V. Carmona-Alcocer, C. Fuentes-Granados, A. Camona-Gastro, I. Aguilar-González, R. Cárdenas-Vázquez, M. Miranda-Anaya, Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex-dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni*, *Physiol. Behav.* 105 (3) (2012) 727–733.
- [38] A. Báez-Ruiz, D. Luna-Moreno, A. Carmona-Gastro, R. Cárdenas-Vázquez, M. Díaz-Muñoz, V. Carmona-Alcocer, C. Fuentes-Granados, M. Miranda-Anaya, Hypothalamic expression of anorexigenic and orexigenic hormone receptors in obese females *Neotomodon alstoni*: effects of fasting, *Nutr. Neurosci.* 17 (1) (2014) 31–36.
- [39] M. Pérez-Mendoza, D. Luna-Moreno, A. Carmona-Gastro, H.A. Rodríguez-Guadarrama, I.M. Montoya-Gómez, M. Díaz-Muñoz, M. Miranda-Anaya, *Neotomodon alstoni* mice present sex differences between lean and obese in daily hypothalamic leptin signaling, *Chronobiol. Int.* (2017) 1–11.
- [40] F. Pontaluppi, M.H. Smolensky, Y. Toulton, Ethics and methods for biological rhythm research on animals and human beings, *Chronobiol. Int.* 27 (9–10) (2010) 1911–1929.
- [41] L.S. Felicio, J.F. Nelson, C.E. Finch, Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification, *Biol. Reprod.* 31 (3) (1984) 446–453.
- [42] P. Zuther, B. Lemmer, **Chronos-Ht Version 1.0.4, Available at:** <http://www.ma.uni-helbing.de/inst/phar/forschung/Lemmer.html>.
- [43] M.S. Blatner, M.M. Mahoney, Estrogen receptor 1 modulates circadian rhythms in adult female mice, *Chronobiol. Int.* 31 (5) (2014) 637–644.
- [44] S.E. Reynolds, N. Yasui, A.G. Kondilis, S.V. Lord, J.A. Katzenellenbogen, M.M. Mahoney, ESR1 and ESR2 differentially regulate daily and circadian activity rhythms in female mice, *Endocrinology* 155 (7) (2014) 2613–2623.
- [45] S. Daan, J. Aschoff, The entrainment of Circadian Rhythm, in: J.S. Takahashi, F.W. Turek, R.Y. Moore (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology, Circadian Clocks*, Vol 12 Kluwer Academic/Plenum, New York, 2000, pp. 509–528.
- [46] S.L. Byers, M.V. Wiles, S.L. Dunn, R.A. Taft, Mouse estrous cycle identification tool and images, *PLoS One* 7 (2012) e355538.
- [47] F. Ayala-Guerrero, L. Vargas-Reyna, J.I. Ramos, G. Mexicanos, Sleep patterns of the volcano mouse (*neotomodon alstoni alstoni*), *Physiol. Behav.* 64 (4) (1998) 577–580.
- [48] H.G. Anantharaman-Barr, J. Decombaz, The effect of wheel running and the estrous cycle on energy expenditure in female rats, *Physiol. Behav.* 46 (2) (1989) 259–263.
- [49] S. Ogawa, J. Chan, J.A. Gustafson, F.S. Korach, D.W. Pfaff, Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor α specificity for the type of activity, *Endocrinology* 144 (1) (2003) 230–239.
- [50] S. Daan, J. Aschoff, The entrainment of circadian system, in: J.S. Takahashi, F.W. Turek, R.Y. Moore (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology, Circadian Clocks*, New York, Kluwer Academic/Plenum, 2001, pp. 7–43.
- [51] R. Beckman, D. Bunick, M.M. Mahoney, Estradiol deficiency during development modulates the expression of circadian and daily rhythms in male and female aromatase knockout mice, *Horm. Behav.* 60 (4) (2011) 439–447.
- [52] M.S. Blatner, M.M. Mahoney, Circadian parameters are altered in two strains of mice with transgenic modification of estrogen receptor subtype 1, *Genes Brain Behav.* 11 (7) (2012) 828–836.
- [53] J.E. Richard, L. López-Ferreras, R.H. Anderberg, K. Olanderom, K.P. Skibicka, Estradiol is a critical regulator of food-reward behavior, *Psychoneuroendocrinology* 78 (2017) 193–202.
- [54] C.L. Betha, M. Pedraza-Thompson, W.E. Schurter, C. Gundlach, Z.N. Lu, Ovarian steroids and serotonin neural function, *Mol. Neurobiol.* 18 (2) (1998) 87–123.
- [55] M.L. Molina, H.E. Albers, Response of circadian locomotor activity and the proestrus luteinizing hormone surge to phase shifts of the light-dark cycle in the hamster, *Physiol. Behav.* 43 (3) (1988) 435–440.
- [56] P. Mcevoy, K. Sinchak, R.H. Mills, L. Tao, P. LaPointe, J.K. Lu, The luteinizing hormone surge is preceded by an estrogen-induced increase of hypothalamic progesterone in ovariectomized and adrenalectomized rats, *Neuroendocrinology* 78 (1) (2003) 29–35.
- [57] N.N. Takasu, T.J. Nakamura, I.T. Tokuda, T. Todo, G.D. Block, W. Nakamura, Recovery from age-related infertility under environmental light-dark cycles adjusted to the intrinsic circadian period, *Cell Rep.* 12 (9) (2015) 1407–1413.
- [58] P.J. Shughrae, M.V. Lane, I. Merchenthaler, Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system, *Comp. Neurol.* 388 (4) (1997) 507–525.
- [59] R. Vida, E. Hrabovszky, T. Kalamazian, C.W. Coen, Z. Liposits, I. Kalló, Oestrogen receptor α and β immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones, *J. Neuroendocrinol.* 20 (11) (2008) 1270–1277.
- [60] M.E. Wilson, K.L. Rosewell, M.L. Kathon, P.J. Shughrae, I. Merchenthaler, P.M. Wise, Age differentially influences estrogen receptor-alpha (ER α) and estrogen receptor-beta (ER β) gene expression in specific regions of the rat brain, *Mech. Ageing Dev.* 123 (6) (2002) 593–601.
- [61] C.L. Parich, C.R. Green, J.S. Takahashi, Molecular architecture of the mammalian

- circadian clock, *Trends Cell Biol.* 24 (2) (2014) 90–99.
- [62] T.J. Nakamura, T. Moriya, S. Inoue, T. Shimazoe, S. Watanabe, S. Ebihara, K. Shinohara, Estrogen differentially regulates expression of *Per1* and *Per2* genes between central and peripheral clocks and between reproductive and non-reproductive tissues in female rats, *J. Neurosci. Res.* 82 (5) (2005) 622–630.
- [63] Z.C. Murphy, P. Pezuk, M. Menaker, M.T. Sellix, Effects of ovarian hormones on internal circadian organization in rats, *Biol. Reprod.* 89 (2) (2013) 1–9.
- [64] T.J. Nakamura, M.T. Sellix, M. Menaker, G.D. Block, Estrogen directly modulates circadian rhythms of *PER2* expression in the uterus, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295 (5) (2008) 1025–1031.
- [65] C.A. Rubel, R.B. Lanz, R. Kommagani, H.L. Franco, J.P. Lydon, F.J. Demayo, Research resource: genome-wide profiling of progesterone receptor binding in the mouse uterus, *Mol. Endocrinol.* 26 (8) (2012) 1428–1442.
- [66] J.D. Blaustein, G.N. Wade, Progesterin binding by brain and pituitary cell nuclei and female rat sexual behavior, *Brain Res.* 140 (2) (1978) 360–367.
- [67] K. Shinohara, T. Funabashi, T.J. Nakamura, F. Kimura, Effects of estrogen and progesterone on the expression of connexin-36 mRNA in the suprachiasmatic nucleus of female rats, *Neurosci. Lett.* 309 (1) (2001) 37–40.
- [68] L.P. Morin, Effect of ovarian hormones on synchrony of hamster circadian rhythms, *Physiol. Behav.* 24 (4) (1980) 741–749.
- [69] T. Dismar, D. Landgraf, H. Pan, J.L. Moreno, D.K. Welsh, Cellular circadian oscillators in the suprachiasmatic nucleus remain coupled in the absence of connexin-36, *Neuroscience* 357 (2017) 1–11.
- [70] K. Shinohara, T. Funabashi, D. Minushima, F. Kimura, Effects of estrogen on the expression of connexin32 and connexin43 mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats, *Neurosci. Lett.* 286 (2) (2000) 107–110.
- [71] B.T. Palmisano, J.M. Stafford, J.S. Pendergast, High-fat feeding does not disrupt daily rhythms in female mice because of protection by ovarian hormones, *Front. Endocrinol.* 14 (8) (2017) 44.
- [72] P.M. Wise, A. Ratner, Effect of ovariectomy on plasma LH, FSH, estradiol, and progesterone and medial basal hypothalamic IHRH concentrations old and young rats, *Neuroendocrinology* 30 (1) (1980) 15–19.
- [73] E.A. Alagwu, R.O. Nsoji, Effect of ovariectomy on level of plasma sex hormones in albino rats, *Niger J. Physiol. Sci.* 20 (1–2) (2005) 90–94.
- [74] L. Yan, R. Silver, Neuroendocrine underpinnings of sex differences in circadian timing systems, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 160 (2016) 118–126.
- [75] M.T. Sellix, M. Egli, R.P. Henderson, M.E. Freeman, Ovarian steroid hormones modulate circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity, *Brain Res.* 1005 (1–2) (2004) 164–181.
- [76] M.S. Blarner, M.M. Mahoney, Photoc phase-response curve in 2 strains of mice with impaired responsiveness to estrogens, *J. Biol. Rhythm.* 28 (24) (2013) 291–300.
- [77] N. Aonán, S.M. Sagar, F.R. Sharp, W.J. Schwartz, Light regulates expression of a Fos-related protein in the rat suprachiasmatic nuclei, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (15) (1990) 5959–5962.
- [78] D. Gau, T. Lemberg, C. von Gall, O. Kretz, N. Je Minh, P. Gas, W. Schmid, U. Schibler, H.W. Korf, G. Schütz, Phosphorylation of CREB Ser42 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock, *Neuron* 34 (2) (2002) 245–253.
- [79] M.E. Guido, D. Goguen, L. De Guido, H.A. Robertson, B. Rusak, Circadian and photic regulation of immediate-early gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus, *Neuroscience* 90 (2) (1999) 555–571.
- [80] A. Abizaid, G. Mezel, T.L. Horvath, Estradiol enhances light-induced expression of transcription factors in the SCN, *Brain Res.* 1010 (1–2) (2004) 35–44.
- [81] S.A. Tischkau, J.W. Mitchell, S.H. Tyan, G.F. Buchanan, M.U. Gullerite, Ca²⁺ / cAMP response element-binding (CREB)-dependent activation of *Per1* is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock, *J. Biol. Chem.* 278 (2) (2003) 718–723.
- [82] A. Takamata, K. Torii, K. Miyake, K. Morimoto, Chronic estrogen replacement in ovariectomized rat attenuates food intake and augments c-Fos expression in the suprachiasmatic nucleus specifically during the light phase, *Br. J. Nutr.* 106 (8) (2011) 1283–1289.
- [83] L.P. Sherman, M.J. Zylka, D.R. Weaver, L.F. Kozakowski Jr., S.M. Reppert, Two-period genes: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei, *Neuron* 19 (6) (1997) 1261–1269.
- [84] S. Miyake, Y. Sumi, L. Yan, S. Takasaki, T. Fukuyama, Y. Ishida, S. Yamaguchi, K. Yagita, H. Okamura, Phase-dependent responses of *Per1* and *Per2* genes to a light-stimulus in the suprachiasmatic nucleus of the rat, *Neurosci. Lett.* 294 (1) (2000) 41–44.
- [85] I. Merchenthaler, M.V. Lane, S. Numan, T.L. Dellovade, Distribution of estrogen receptor α and β in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses, *J. Comp. Neurol.* 473 (2) (2004) 270–291.
- [86] N. Yamaguchi, K. Yuri, Estrogen-dependent changes in estrogen receptor- β mRNA expression in middle-aged female rat brain, *Brain Res.* 1543 (2014) 49–57.
- [87] Z. Urlep, D. Rozman, The interplay between circadian system, cholesterol, and steroidogenesis affects various aspects of female reproduction, *Front. Endocrinol.* 4 (2013) 111.
- [88] M.C. Ruiz de Elvira, R. Persaud, C.W. Coen, Use of running wheels regulates the effects of the ovaries on circadian rhythms, *Physiol. Behav.* 52 (2) (1992) 277–284.

ANEXO III



Curva de concentración de E2 en plasma de una hembra de *N. alstoni*. La gráfica muestra el en tiempo cero la concentración de E2 previo a la administración de 50mg de BE (16pg/ml). Después de 2 h de la inyección subcutánea se da un aumento de 630pg/ml y la máxima concentración de E2 (697pg/ml) fue después de 4 h de la inyección. Nótese que el aumento tiene una duración de 6 h y que a las 8 h posteriores de la administración (142 g/ml) se presentó una disminución de la concentración.