



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Efectos del bloqueo de los receptores  
nicotínicos del núcleo supraquiasmático a lo  
largo del ciclo estral, sobre la regulación de  
las funciones del ovario

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ROBERTO CALDERÓN RAMOS

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ

ASESORAS:

Dra. LETICIA MORALES LEDESMA

Dra. JULIETA AZUCENA ESPINOZA MORENO

Investigación realizada gracias al proyecto:

UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN 216519

CDMX, 29 de noviembre de 2021





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

CARRERA DE BIOLOGÍA

Efectos del bloqueo de los receptores nicotínicos del núcleo supraquiasmático a lo largo del ciclo estral, sobre la regulación de las funciones del ovario

Tesis presentada por: Roberto Calderón Ramos

Directora de tesis: Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

Realizada en el Laboratorio de Fisiología Reproductiva y en el Laboratorio de Cronobiología de la Reproducción. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. UMIEZ. FES Zaragoza. UNAM.

Este estudio fue realizado con el apoyo de UNAM-DGAPA-PAPIIT No. IN 216519

FES Zaragoza, Ciudad de México, 29 de noviembre de 2021



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA  
FORMATO F-5



**OFICIO DE FECHA DE EXAMEN**

**QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ**  
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Presente

Le comunico que al alumno: **CALDERON RAMOS ROBERTO** con número de cuenta **313151822** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **29 de Noviembre de 2021** a las **11:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DRA. MORALES LEDESMA LETICIA	
VOCAL	DRA. VIEYRA VALDEZ ELIZABETH	
SECRETARIO	M. EN C. SILVA MENDEZ CARLOS CAMILO	
SUPLENTE	DRA. RAMIREZ HERNANDEZ DEYRA DE LOS ANGELES	
SUPLENTE	DRA. ESPINOZA MORENO JULIETA AZUCENA	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

**Efectos del bloqueo de los receptores nicotínicos del núcleo supraquiasmático a lo largo del ciclo estral, sobre la regulación de las funciones del ovario.**

En la modalidad de: **TESIS**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
CDMX, a 5 de Noviembre de 2021

**DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD**  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por ser la institución a la que le debo mi formación como profesionalista, científico y persona.

Agradezco a cada uno de los miembros del jurado:

**Dra. Leticia Morales Ledesma**

**Dra. Elizabeth Vieyra Valdez**

**M. en C. Carlos Camilo Silva Méndez**

**Dra. Deyra de los Ángeles Ramírez Hernández**

**Dra. Julieta Azucena Espinoza Moreno**

Por dedicar su tiempo en la revisión de esta tesis y brindarme los aprendizajes que enriquecieron el presente estudio.

Al apoyo financiero brindado por **UNAM-DGAPA-PAPIIT** convenio **IN216519**.

Al personal del Bioterio de la FES ZARAGOZA, **MZV. Adriana Altamirano, MVZ. Román Hernández** y **MZV. Dolores Elizabeth Guzmán**, por sus atenciones y por cuidar a las ratitas. A cada uno de los profesores, que durante toda la carrera me orientaron, apoyaron y compartieron sus experiencias y conocimientos.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Elizabeth:**

Es complejo expresar lo agradecido que estoy contigo, ya que, desde un principio, en tercer semestre me brindaste tu apoyo, conocimiento y confianza. Nunca hubiera imaginado que una serie de malas decisiones al inicio de la carrera, me llevarían a conocer a mi mentora y madre académica. Hoy por hoy, si no hubiera sido por tu apoyo y presión para ser un mejor estudiante, posiblemente no estaría escribiendo estos agradecimientos. No me queda mas que agradecerte no solo por ser mi mentora, si no mi amiga y confidente. Gracias.

A la **Dra. Leticia:**

Muchas gracias por la oportunidad de esa pequeña estancia que duraba un inter-semestre y ya se alargo a casi 4 años. En verdad le agradezco la confianza que me ha brindado, el apoyo y paciencia que ha tenido para revisar mis escritos y presentaciones. Gracias por estar ahí no solo en cuestiones académicas, si no que también en las personales. Finalmente quiero que sepa que me inspira a ser una mejor persona y algún día un gran investigador, como usted. Por eso y mas, gracias.

A las **Dras. Rosa Linares, Gabriela Rosas, Deyra Ramírez, Azucena Moreno y Andy Chaparro**, por compartir sus conocimientos, consejos y experiencias. Por las charlas que he tenido individualmente con cada una, que siempre me han inspirado a superarme. Y por la confianza que me brindan para seguir adelante en este camino de la investigación. Muchas gracias.

Al **Biol. casi M. en C. David Ramos**, No tengo palabras para expresar lo agradecido que estoy contigo, por que ya lo sabes. Me has abierto las puertas de tu casa, familia, trabajo... En fin, eres mi mejor amigo, el padre del nuevo amor de mi vida y te agradezco por ello.

A **Hugo Zarco, Fernanda Meza, Nallely Acuña y Mayahuel Morales**, por su amistad, por ayudarme en la parte experimental y personal, por sus consejos, y todas esas tardes amenas tanto dentro como fuera del laboratorio. Sin ustedes la experiencia en el laboratorio hubiera sido completamente diferente. Muchas gracias.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, en especial a **Alejandro, Kaleb, Michelle, Adriana, Alma, Karina, Hugo Colín, Paloma, Edgar, Miriam, Emmanuel, Jesy, Jose y Mildred**, con los que crecí y formé en el laboratorio. Gracias chicos por todos esos momentos que compartimos en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio 2, en especial a **Adri, Monse e Iliana**, por que sus consejos y sus perspectivas ayudaron a enriquecer este trabajo. Por ser unas grandes compañeras y amigas, gracias.

A los chicos de **the Biology Things, Natalia, Kevin, Lupita y Victor**, gracias por permitirme trabajar con ustedes, no solo en este proyecto de divulgación, si no en cada uno proyectos escolares que compartimos. Los quiero chicos.

A **Itzel, Lalo, Kai, Chayane, Oyuki, Helena, Natalia Salcedo, Danissa, Samuel, Enrique, Fabiola y Naomi Shimizu**, porque sin ustedes la carrera hubiera sido muy diferente. Aunque tuvimos altas y bajas, siempre estuvieron ahí. Gracias.

Al **M. en C. Pedro Cuapio**, por compartir su experiencia, y por la confianza que me brindo desde que lo conocí. En verdad le agradezco las oportunidades que me ha brindado.

A **Yulissa y Osmar**, porque ni el tiempo, ni la distancia ha logrado separar nuestra amistad. Los quiero y este trabajo también es gracias a ustedes.

## DEDICATORIAS

A mi papá, **Ignacio Calderón**, lo poco o mucho que he logrado en esta vida es por y para ti. Sin tu apoyo incondicional, tu sacrificio y tu esfuerzo para sacarnos adelante, no hubiera podido seguir este sueño que estoy cumpliendo. Por lo que este logro no es solo mío, si no tuyo. Te amo papá.

A mi mamá, **Veronica Ramos**, por que al igual que mi papá, te has sacrificado mucho y nada de esto seria posible si ti. Gracias a ti es que hoy soy quien soy, tu me educaste, me viste crecer y me enseñaste como afrontar los obstáculos de la vida. Los errores que he cometido en esta vida siempre me has ayudado a superarlos. Se que a pesar de que no soy perfecto, estas completamente orgullosa de mi y es tu confianza en mi por la que siempre he logrado lo que me he propuesto. Simplemente creo no pude tener una mejor mamá. Te amo y esto es tuyo.

A mi hermana, **Alejandra Calderón**, que sin importar que eres la menor de los dos, has mostrado mas maduras que yo en muchos aspectos de la vida. Tu me has enseñado a ser valiente, paciente, amable y mejor persona. A pesar de que la vida te ha puesto muchos obstáculos tu siempre los has superado sin importar que, por eso y mas no solo estoy orgulloso si no que te admiro como no tienes idea. Te amo hermana.

A mi futuro **sobrino/sobrino**, aun no naces y ya te amo. Espero algún día leas esta pequeña tesis de tu torpe tío, y quiero que sepas que siempre estaré para lo que necesites, eres un pequeño motor de mi vida. Te amo.

A mi abuela **Tere** y mi tía **Gaby**, ambas siempre estuvieron muy al pendiente de mí y de mi hermana, también apoyaron mucho a mi mamá en nuestra educación y se preocuparon por que nunca nos faltara nada. Hoy entiendo que todos esos regaños eran por nuestro bien, y aunque a veces creía que era algo molesto, siempre venían del amor para estar preparados en la vida. Las amo.

Al resto de **mi familia**, que siempre he presumido al mundo, por que es unida e incondicional. Por ustedes hoy soy quien soy y los amo a todos.

*In memoriam* de mi sobrino/sobrino no nacido/a, que, aunque no tuvo la oportunidad de nacer, fue querido/a y amado/a por toda su familia.

*“La comprensión es el primer paso para la aceptación, y solo aceptando puede recuperarse”*

-Albus Dumbledore

# TABLA DE CONTENIDO

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>1</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>4</b>
<b>Marco Teórico .....</b>	<b>6</b>
<b>Ovario .....</b>	<b>6</b>
Desarrollo Folicular .....	7
Ovulación.....	10
Atresia Folicular .....	14
<b>Ciclo Estral.....</b>	<b>17</b>
<b>Núcleo Supraquiasmático .....</b>	<b>21</b>
Proyecciones Aferentes.....	23
Proyecciones Eferentes .....	24
<b>Relación entre el SCN y la secreción de la GnRH.....</b>	<b>26</b>
<b>Sistema Colinérgico .....</b>	<b>32</b>
<b>Sistema Colinérgico y SCN .....</b>	<b>39</b>
<b>Planteamiento del Problema.....</b>	<b>41</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>42</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>43</b>
<b>Objetivos Particulares.....</b>	<b>43</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>44</b>
<b>Selección de Animales .....</b>	<b>44</b>
<b>Grupos Experimentales.....</b>	<b>45</b>
<b>Autopsia.....</b>	<b>47</b>
<b>Procesamiento del Cerebro.....</b>	<b>47</b>
<b>Análisis Morfométrico del Ovario.....</b>	<b>48</b>
<b>Análisis Estadístico .....</b>	<b>48</b>

<b>Resultados.....</b>	<b>49</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>75</b>
<b>Modelos .....</b>	<b>86</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>89</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>90</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>91</b>

## Abreviaturas

<b>Acetil-CoA</b>	Acetil coenzima A
<b>ACh</b>	acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterasa
<b>AHA</b>	Área Hipotalámica Anterior
<b>ARC</b>	Núcleo Arqueado
<b>AVP</b>	Arginina Vasopresina
<b>ChAT</b>	Acetilcolintransferasa
<b>DBB</b>	Banda Diagonal de Broca
<b>DMH</b>	Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo
<b>DMV</b>	Núcleo Dorsal Motor del Vago
<b>FSH</b>	Hormona estimulante del folículo
<b>GABA</b>	Ácido gamma aminobutírico
<b>GHT</b>	Tracto Geniculado-Hipotalámico
<b>GnIH</b>	Hormona Inhibidora de Gonadotropinas
<b>GnRH</b>	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
<b>GnRH-AS</b>	Antisuero a GnRH
<b>GRP</b>	Péptido Liberador de Gastrina
<b>GTPasa</b>	Proteína G con acción enzimática
<b>hCG</b>	Hormona Coriónica Humana
<b>IGL</b>	Hojuela Intergeniculada
<b>IML</b>	Columna Intermediolateral
<b>LH</b>	Hormona Luteinizante
<b>LHCGRs</b>	Receptor a LH
<b>LSN</b>	Núcleo Lateral Septal
<b>mAChRs</b>	Receptores muscarínicos
<b>MBN</b>	Núcleo Basal Magnocelular
<b>MD</b>	Núcleo dorsomedial
<b>MEC</b>	Mecamilamina
<b>MPN</b>	Núcleo Preóptico Medial
<b>MRN</b>	Núcleo Medial del Rafe
<b>NA</b>	Noradrenalina

<b>nAChRs</b>	Receptores nicotínicos
<b>NPY</b>	Neuropéptido Y
<b>NTS</b>	Núcleo del Tracto Solitario
<b>OVLT</b>	Órgano Vasculor de la Lámina Terminal
<b>pFF</b>	Fluido folicular porcino
<b>PKA</b>	Kinasa dependiente de AMPc
<b>POA</b>	Área preóptica
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>PVN</b>	Núcleo Paraventricular del Hipotálamo
<b>PVT</b>	Núcleo Paraventricular del Tálamo
<b>RFRP-3</b>	Péptido relacionado con el RFamida
<b>RHT</b>	Tracto Retino-Hipotálamico
<b>RP3V</b>	Área Periventricular Rostral del Tercer Ventrículo
<b>SCN</b>	Núcleo Supraquiasmático
<b>SON</b>	Nervio Ovárico Superior
<b>SPZ</b>	Zona Subparaventricular
<b>TA</b>	Testigo Absoluto
<b>VACHT</b>	Transportador Vesicular de Acetilcolina
<b>VGN</b>	Núcleo Genuculado Ventrolateral
<b>VH</b>	Vehículo
<b>VIP</b>	Péptido Intestinal Vasoactivo
<b>VMH</b>	Núcleo Ventromedial del Hipotálamo

## Resumen

En los mamíferos, el desarrollo folicular es un proceso continuo y selectivo, mediante el cual, un número específico de ovocitos de la reserva ovárica maduran y posteriormente pueden ser ovulados. La ovulación es un proceso donde un ovocito maduro es expulsado desde un folículo preovulatorio hasta el oviducto, lugar donde se lleva a cabo la fecundación. En la rata, este evento es coordinado por señales diarias provenientes del núcleo supraquiasmático (SCN), que participan en la regulación de las funciones ováricas. El SCN es una estructura bilateral, localizada en la base del hipotálamo, y es considerado el principal oscilador circadiano. Uno de los sistemas de neurotransmisión que regula la actividad de las neuronas del SCN es el colinérgico. Por la estimulación o el bloqueo farmacológico de los receptores colinérgicos, se ha analizado la participación de la acetilcolina (ACh) del SCN en la regulación de las funciones ováricas. En el presente estudio se evaluó la participación de los receptores nicotínicos (nAChRs) del SCN sobre la ovulación y el desarrollo folicular, mediante el análisis de los efectos del bloqueo farmacológico de los nAChRs presentes en el SCN, por la microinyección de mecamilamina (MEC), un antagonista no selectivo de los nAChRs, a las 09:00 horas de cada día del ciclo estral. Los presentes resultados muestran que durante el estro, diestro-1 y diestro-2 el bloqueo de los nAChRs, resulta en la disminución del desarrollo folicular, de la respuesta ovulatoria y alteración del ciclo estral. Estos resultados nos permiten sugerir que, durante estos días, las señales colinérgicas del SCN, que son mediadas por los nAChRs, podrían participar en la regulación de la secreción de la GnRH/gonadotropinas. Sin embargo, la microinyección de MEC durante el proestro, resultó en la disminución del número de ovocitos liberados, sin modificar el desarrollo folicular y el ciclo estral, por lo que sugerimos que, durante este día, los nAChRs del SCN, podrían no participar en la regulación de la secreción de la GnRH/gonadotropinas, si no que podrían estimular/inhibir una vía neural simpática/parasimpática que regula la reactividad de los folículos a las gonadotropinas. En conjunto, los resultados nos permiten sugerir que, durante todos los días del ciclo estral, del SCN surge/arriba una señal colinérgica, mediada por los nAChRs, que participa en la regulación de las funciones ováricas y que durante el estro, diestro-1 y diestro-2, está involucrada en la regulación de los mecanismos neuroendocrinos que son esenciales en la regulación del desarrollo folicular, la ovulación y la progresión del ciclo estral.

## Introducción

Las funciones biológicas de los organismos son reguladas por la variación diaria de los ciclos de luz-oscuridad, ante esto, los seres vivos presentan una organización temporal en su conducta y en los procesos fisiológicos, bioquímicos y morfológicos, dando como resultado los ritmos biológicos (Aguilar-Roblero *et al.*, 2004).

En los mamíferos, los ritmos circadianos son regulados por un reloj central localizado en el hipotálamo, llamado núcleo supraquiasmático (SCN), es considerado el marcapasos central que regula los ciclos diarios de comportamiento y fisiología de las funciones orgánicas (Silver y Rainbow, 2013; Herzog *et al.*, 2017; Simonneaux *et al.*, 2017; Ono *et al.*, 2019). El SCN es sincronizado con los ciclos de luz-oscuridad por señales lumínicas provenientes de la retina, que viajan a través del tracto retino-hipotalámico (RHT) y sus conexiones eferentes, transmiten la hora del día estimada al organismo (Simonneaux *et al.*, 2017).

Uno de los principales neurotransmisores que regula a los ritmos circadianos en el SCN, es la acetilcolina (ACh) (Earnest y Turek, 1985; Rusak y Bina, 1990), la cual es una molécula pequeña y sencilla conformada por un éter del ácido acético y la colina. Existen diversos subtipos de receptores a la ACh, estos se pueden dividir según sus efectos farmacológicos como muscarínicos (mAChRs) o nicotínicos (nAChRs) (Raju, 1999; Flores-Soto y Segura-Torres, 2005), y ambos se encuentran presentes en el SCN (Miller *et al.*, 1987; O'Hara *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2010). Se ha descrito que la estimulación o el bloqueo de las señales colinérgicas que recibe el SCN modifica la expresión de neurotransmisores como la vasopresina (AVP) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Madeira *et al.*, 2004), la actividad locomotora (Myslivecek *et al.*, 2017) y la ovulación (Vieyra *et al.*, 2016).

La ovulación es regulada por una serie de señales neuroendocrinas que surgen desde el hipotálamo, donde se localizan neuronas especializadas en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), cuyos axones vierten este neuropéptido en un sistema de capilares sanguíneos que lo transportan hasta la adenohipófisis. La GnRH estimula la secreción de las gonadotropinas como son la hormona luteinizante

(LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH), las cuales son liberadas a la circulación general y ejercen sus efectos en su órgano blanco, que son los ovarios, donde regulan la secreción de hormonas esteroides y proteicas, el desarrollo folicular y la ovulación (Levine, 2015; Pawlina, 2015; Simonneaux *et al.*, 2017).

Se ha planteado que el sistema colinérgico del SCN podría estar regulando la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas a lo largo del ciclo reproductivo de la rata (Vieyra *et al.*, 2016; Vieyra *et al.*, 2019). Por lo que, en este estudio, se analizó la participación de los nAChRs del SCN sobre las funciones ováricas mediante la microinyección de mecamilamina (MEC), un antagonista no selectivo de los nAChRs, en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas de cada día del ciclo estral.

## Marco Teórico

### Ovario

El sistema reproductor femenino es regulado por señales neuroendocrinas que se originan en el hipotálamo y la hipófisis. Está constituido por los ovarios, las trompas de Falopio, el útero y la vagina. En su conjunto, este sistema regula los cambios hormonales responsables de la pubertad y de las funciones reproductivas (Levine, 2015). La producción de gametos (gametogénesis) así como la síntesis de hormonas esteroides (esteroidogénesis) representan las dos funciones de los ovarios (Pawlina, 2015).

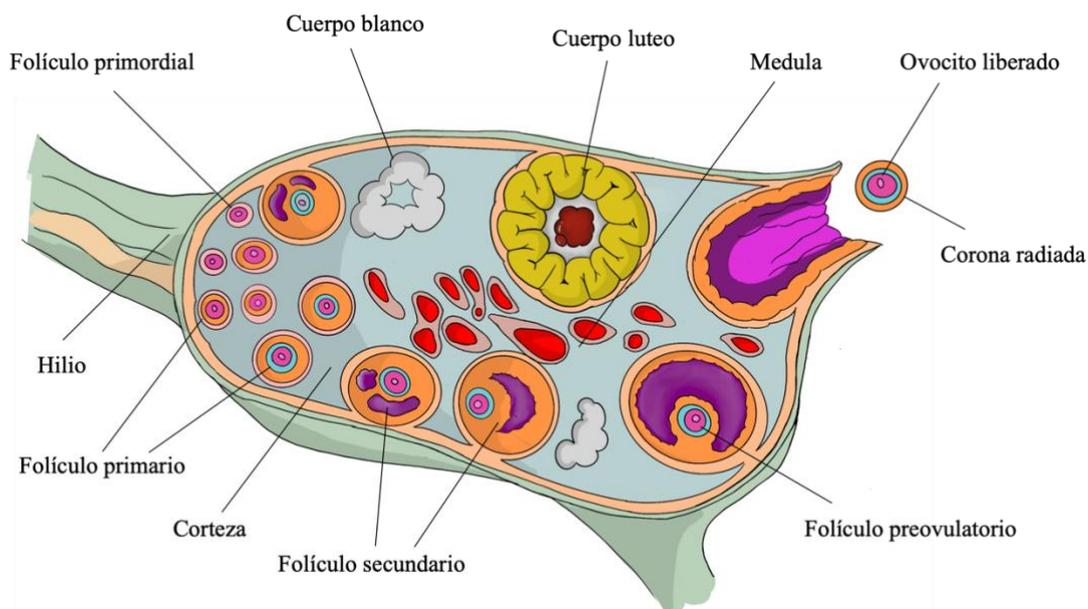
Los ovarios son estructuras nodulares pares, cada uno se encuentra fijado a la superficie posterior del ligamento ancho del útero a través del mesoovario, un pliegue del peritoneo que lleva vasos sanguíneos y los nervios a los ovarios. La superficie del ovario, está cubierta por una capa individual de células cubicas denominado epitelio germinal, por debajo de éste se encuentra la túnica albugínea, que es una cápsula de tejido conjuntivo denso, irregular y poco vascularizado, a su vez presenta fibras de colágeno, lo que le confiere un color blanquecino. En la rata adulta cada ovario tiene un peso aproximado de 30 mg y mide 4.35 mm de ancho, 5.5 mm de largo y 1.6 mm de grosor (Gartner y Hiatt, 2008; Pawlina, 2015).

Cada ovario consta de una corteza, una médula y el hilio (Gartner y Hiatt, 2008). La **médula** se ubica en la porción central del ovario, se encuentra formada por tejido conectivo que contiene una gran cantidad de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas (Pawlina, 2015). A su vez, se compone de fibroblastos que se encuentran incluidos de manera laxa en una malla rica en colágeno que contiene fibras elásticas. La médula del ovario posee un grupo de células intersticiales que conforman a la glándula intersticial (Tresguerres *et al.*, 2005) (Figura 1). La **corteza** se encuentra en la porción periférica del ovario rodeando a la médula, contiene a los folículos ováricos en diferentes estados de desarrollo, el estroma que rodea a los folículos presenta células musculares dispersas (Pawlina, 2015) (Figura 1). El **hilio** es la zona por donde ingresan al ovario los nervios, vasos sanguíneos y linfocitos, se localiza en uno de los bordes de la gónada (Tresguerres *et al.*, 2005; Costanzo, 2018) (Figura 1).

## Desarrollo Folicular

Los folículos ováricos son estructuras que se generan en los ovarios y que tienen dos funciones principales, la producción de hormonas y la maduración de los ovocitos. El folículo es la unidad anatómo-funcional del ovario, el cual está formado por un ovocito y dependiendo de la etapa de desarrollo, puede estar rodeado por células de la pre-granulosa o granulosa, la zona pelúcida, la membrana basal, la teca interna y/o externa (Duffy *et al.*, 2019). Los folículos ováricos pueden generar ovocitos capaces de ser fecundados o llevar un proceso degenerativo conocido como atresia folicular (Zhou *et al.*, 2019).

El desarrollo de los folículos ováricos inicia en el embrión, en donde diferentes eventos celulares se llevan a cabo como la generación, la migración, la mitosis y la apoptosis de las células germinales (Ginsburg *et al.*, 1990; Lei y Spradling, 2013). Posterior a la diferenciación de las células germinales primordiales, inicia el desarrollo de los ovocitos. Primero, las células germinales primordiales migran hacia las crestas gonadales, donde se diferencian en ovogonias y comienza la meiosis hasta la profase de la primera división, deteniéndose en el estadio de dictioteno, dando lugar a los ovocitos primarios, que permanecen en este estadio hasta que el folículo comienza a crecer y madurar (Ginsburg *et al.*, 1990; Mermillod *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2019).



**Figura 1. Esquema representativo de las estructuras del ovario.** Tomado y modificado de Gartner y Hiatt, 2008.

Tras la maduración de los ovocitos primarios, son rodeados por una capa homogénea de células planas conocidas como células de la pre-granulosa dando lugar a los *folículos primordiales* (Gartner y Hiatt, 2008). El ovocito de un folículo primordial mide alrededor de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y posee un núcleo excéntrico voluminoso con cromatina dispersa y con uno o más nucléolos granulares (Pawlina, 2015). Los organelos presentes en los folículos primordiales constan de múltiples mitocondrias, abundantes complejos de Golgi, retículo endoplásmico con pocos ribosomas y láminas anulares ocasionales (Gartner y Hiatt, 2008). Estos folículos se distribuyen en la periferia de la corteza y son los que se encuentran en mayor proporción, constituyendo la reserva ovárica (Van Voorhis, 1999) (Figura 2).

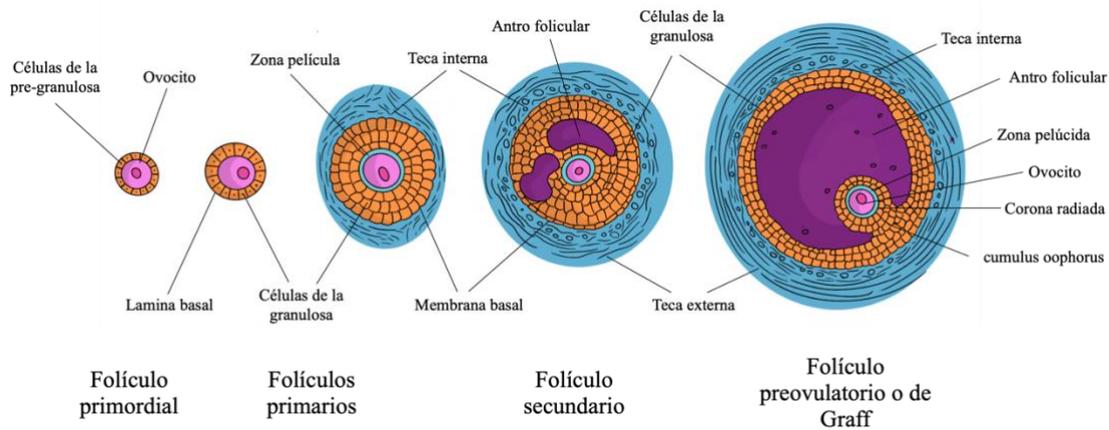
El desarrollo folicular inicia tras la activación de los folículos primordiales, que se convierten en *folículos primarios*. Este evento se ve asociado a la transformación de las células de la pre-granulosa a células de la granulosa, pasando de células aplanadas a cúbicas y cilíndricas (Pawlina, 2015). En el ovocito de este folículo, se encuentran varios complejos de Golgi y mitocondrias dispersas, el retículo endoplásmico rugoso presenta una mayor cantidad de ribosomas, que también se encuentran libres en el citoplasma (Gartner y Hiatt, 2008). A los folículos primarios con una sola capa de células de la granulosa, se les denomina folículos primarios unilaminares, sin embargo, conforme las células de la granulosa proliferan y se estratifican, forman varias capas alrededor del ovocito, el cual recibe el nombre de folículo primario multilaminar (Gartner y Hiatt, 2008; Brüel, 2015). Durante esta etapa del desarrollo folicular se forma la zona pelúcida, la cual separa al ovocito de las células de la granulosa circundantes. Esta zona pelúcida se compone de tres glucoproteínas distintas, ZP<sub>1</sub>, ZP<sub>2</sub>, ZP<sub>3</sub>, las cuales son secretadas por el ovocito (Gartner y Hiatt, 2008). Las células de la granulosa invaden con filopodios a la zona pelúcida, y entran en contacto con el plasmalema del ovocito y forman uniones comunicantes, donde el ovocito y las células de la granulosa intercambian información durante todo el desarrollo folicular (Gartner y Hiatt, 2008; Pawlina, 2015). Las células del estroma se comienzan a organizar alrededor del folículo primario multilaminar y forman una capa de células, denominadas células de la teca interna. A su vez las células de la granulosa comienzan a segregar líquido folicular (Constanzo, 2018) (Figura 2).

El *folículo secundario* surge tras la acumulación del líquido folicular en pequeños espacios que se encuentran entre las células de la granulosa, estos espacios reciben el

nombre de cuerpos de *Call-Exner*. La unión de éstos cuerpos dan origen a una cavidad única llamada antro folicular. El líquido folicular contiene glucosaminoglucanos, proteoglucanos, proteínas de unión de los esteroides, hormonas como la progesterona, el estradiol, la inhibina, la activina y la foliculoestatina (Gartner y Hiatt, 2008). En estos folículos el ovocito posee un diámetro de 125  $\mu\text{m}$  (Pawlina, 2015). Al comenzar la formación del antro folicular el ovocito deja de crecer, pero el folículo sigue aumentando en tamaño (Brüel, 2015) al igual que el antro folicular, este es revestido por varias capas de células de la granulosa, las cuales presentan receptores a la FSH (Pawlina, 2015). A su vez, se forma una capa adicional de células somáticas llamada teca, la cual encapsula al folículo. Durante la maduración de los folículos, la teca se divide en teca interna y teca externa, estas capas tienen una función estructural en los folículos (Knighth *et al.*, 2012). Las células que conforman estas capas presentan receptores a la LH, la cual estimula la ovulación y la producción de los andrógenos. A diferencia de las células de la granulosa, la capa de las células de la teca interna se vascularizan conforme el folículo madura, mientras que las células de la granulosa no presentan una vascularización (Knighth *et al.*, 2012; Brüel, 2015) (Figura 2).

Finalmente, un folículo maduro, conocido como *folículo preovulatorio* o de Graff (para el caso de la mujer), surge por la continua proliferación de las células de la granulosa, así como el aumento del líquido folicular (Brüel, 2015). Estos folículos son los que darán lugar a la ovulación (Gartner y Hiatt, 2008; Krysko *et al.*, 2008). El estrato granuloso se torna más fino conforme el antro incrementa de tamaño, el antro folicular y las células del *cumulus oophorus* se separan de forma gradual del resto de las células de la granulosa preparándose para la ovulación (Pawlina, 2015). Las células que rodean inmediatamente al ovocito forman una capa de células simples conocida como corona radiada (Pawlina, 2015) (Figura 2).

Posterior a la ovulación, los elementos residuales del folículo que liberó al ovocito forman el *cuerpo lúteo*. Éste está formado por un 80% de células luteínicas de la granulosa y un 20% de células luteínicas de la teca (Brüel, 2015; Constanzo, 2018). La luteinización es el proceso por el cual, dichas células triplican su tamaño y se transforman en células poliédricas que contienen un pigmento amarillo llamado luteína (Brüel, 2015). Las células luteínicas de la granulosa poseen un diámetro alrededor de 30  $\mu\text{m}$  y sintetizan estrógenos, progesterona e inhibina, mientras que las células luteínicas de la teca son de



**Figura 2. Representación del desarrollo folicular en el ovario.** Tomado y modificado de Gartner y Hiatt, 2008.

un tamaño menor (alrededor de 15  $\mu\text{m}$ ) las cuales secretan andrógenos y progesterona (Pawlina, 2015).

El cuerpo lúteo sintetiza y segrega hormonas necesarias para la implantación y mantenimiento del cigoto. En el caso que ocurra la fecundación el cuerpo lúteo segrega estas hormonas hasta que la placenta tome este papel, sin embargo, si no existe fecundación el cuerpo lúteo involuciona (Constanzo, 2018). La secreción hormonal disminuye casi por completo y las células luteínicas se llenan de lípidos y mueren formando un cumulo de masas homogéneas eosinofílicas divididas por bandas delgadas de tejido conjuntivo conocido como cuerpo albicans (Brüel, 2015).

## Ovulación

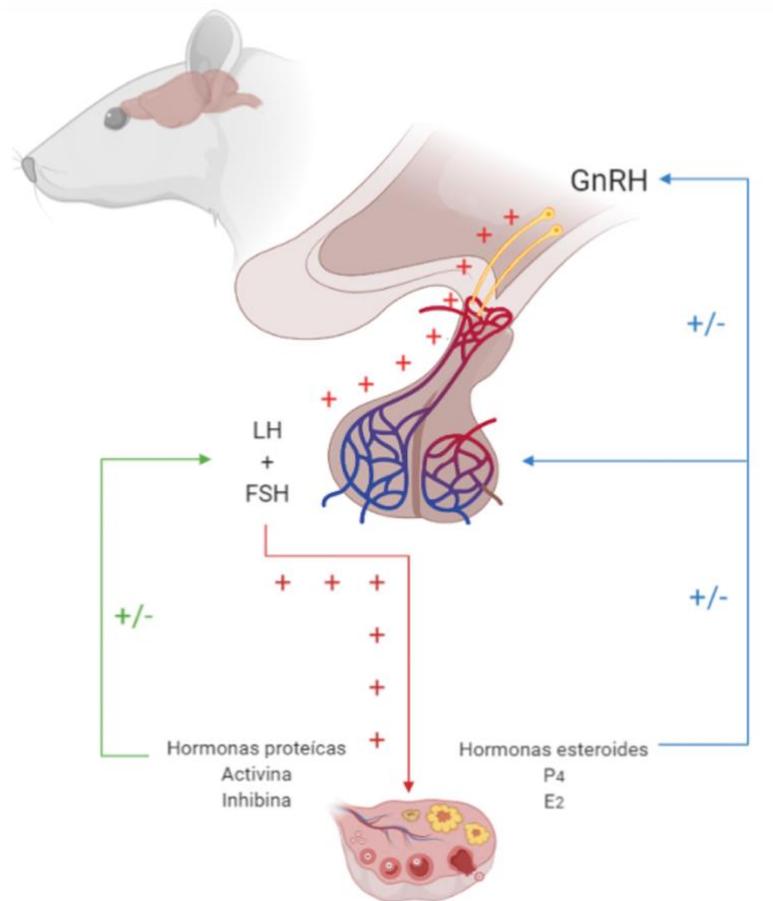
La ovulación se define como la liberación de un ovocito maduro desde un folículo preovulatorio hacia el oviducto, lugar donde se lleva a cabo la fecundación. Es un proceso esencial en la perpetuidad y supervivencia de los mamíferos y es regulado por una serie de señales neuroendocrinas entre los ovarios y el sistema nervioso central (Levine, 2015; Richards *et al.*, 2015; Robker *et al.*, 2018).

Al inicio de la pubertad, el hipotálamo y la hipófisis regulan la secreción de la LH y la FSH (Berga y Nafttolin, 2012). Las neuronas hipotalámicas liberan GnRH a un sistema de capilares sanguíneos conocido como sistema porta-hipotalámico-hipofisario, este sistema transporta a esta neurohormona hasta la adenohipófisis, y encuentra su blanco

celular en los gonadotrópos (Levine, 2015; Robker *et al.*, 2018). La unión de la GnRH con su receptor resulta en la liberación de las gonadotropinas (LH/FSH) al sistema circulatorio, donde viajan hasta los ovarios. En los ovarios, la LH se une a sus receptores localizados en las células de la teca, lo que desencadena la ovulación y estimula la secreción los andrógenos; la FSH, al unirse a sus receptores en las células de la granulosa estimula la proliferación, maduración y diferenciación de los folículos ováricos, y a su vez permite la transformación de andrógenos a estrógenos. Todo esto resulta en la maduración del ovocito y su posterior ovulación (Berga y Naftolin, 2012; Levine, 2015; Robker *et al.*, 2018).

Este sistema neuroendocrino de regulación se conoce como eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Figura 3). Este eje presenta mecanismos de autorregulación, por ejemplo, el estradiol secretado por las células de la granulosa tiene un efecto de retroalimentación estimulante o inhibitorio en los centros superiores de este eje (Naftolin *et al.*, 2007; Pawlina, 2015; Robker *et al.*, 2018). En la retroalimentación inhibitoria, el estradiol sensibiliza a la adenohipófisis a la GnRH, sin embargo, suprime la secreción de la GnRH a nivel hipotalámico (Pau *et al.*, 1993; Naftolin *et al.*, 2007). No obstante, el incremento en la concentración de estradiol debido a la maduración folicular estimula la liberación de la GnRH y la LH (efecto de retroalimentación estimulante), lo que resulta en la maduración final de los ovocitos y desencadena el proceso de la ovulación (Zsarnovszky *et al.*, 2001). De forma similar, la progesterona, así como las hormonas de naturaleza peptídica secretadas por el ovario, tienen un efecto de retroalimentación estimulante/inhibitoria en los centros superiores del eje, este proceso permite la homeostasis del organismo y el desarrollo del ciclo reproductivo (Berga y Naftolin, 2012; Levine, 2015).

Como ya se ha mencionado, la LH tiene un papel fundamental en la ovulación, al unirse a su receptor (LHCGRs) en las células de la teca y de la granulosa, estimula la liberación de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas y otros factores autocrinos y paracrinos asociados a una respuesta inflamatoria (Liu *et al.*, 2013; Richards y Ascoli, 2018; Cui, 2021). Tras la aparición de estos factores se activan células inmunológicas residentes del ovario y se reclutan células inmunológicas adicionales importantes en el proceso de la ruptura del folículo. Proteasas producidas por el ovario, así como por las células inmunológicas debilitan la lámina basal, lo que permite que células endoteliales



**Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.** Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), Hormona luteinizante (LH), Hormona foliculo estimulante (FSH), Progesterona (P<sub>4</sub>) y Estradiol (E<sub>2</sub>). + (señal estimulante); +/- (retroalimentación estimulante / inhibitoria) (Smith, 2009).

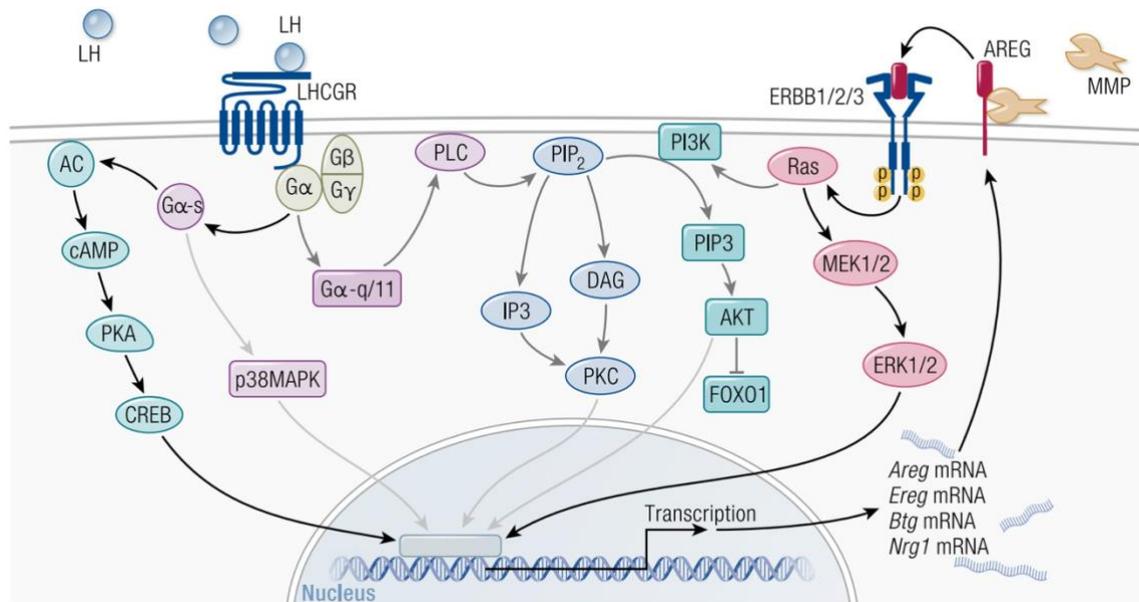
vasculares y células inmunológicas adicionales invadan el folículo. Los factores inflamatorios, así como la propia estimulación de los folículos reanudan la meiosis del ovocito y permiten el desprendimiento del *cumulus oophorus* de la capa de las células de la granulosa (Duffy *et al.*, 2019).

Para que se lleve a cabo la ovulación, el folículo atraviesa por a una serie de cambios estructurales que permiten su ruptura y la liberación del ovocito. Para ello, la matriz extracelular se rompe, colapsa la lámina basal que separa los compartimientos de las células de la teca y la granulosa para que la pared del folículo genere una apertura en el ápice del folículo, conocido como estigma.

Previo a la ruptura del folículo, se comienzan a separar las células de la superficie del epitelio ovárico en el ápice del folículo. El tejido conectivo comienza a fragmentarse y degradarse, y la pared del folículo se adelgaza. En la túnica albugínea y en la teca

externa, los fibroblastos comienzan a alagarse y aparentan ser células móviles inactivas. Existe un desprendimiento de las células de la granulosa que quedan en el antro folicular. Momentos antes de que ocurra la ovulación, se pierde la superficie del epitelio ovárico y se compactan los componentes celulares de la túnica albugínea, de las células de la teca y granulosa. Todos estos cambios aparentemente se limitan a la región apical del folículo preovulatorio. El epitelio de la superficie ovárica y la teca comienzan a degradarse, formando un orificio y conectando el fluido del antro folicular con la superficie externa del ovario, lo que permite la liberación del ovocito al oviducto (Espey, 1967; Auersperg *et al.*, 2001; Medzhitov, 2008; Duffy *et al.*, 2019).

Todos los procesos descritos anteriormente resultan de la unión de la LH a los LHCGRs, lo que activa una cascada de señalización intracelular, que directamente regula la transcripción de un conjunto de genes involucrados en la remodelación de tejido ovárico, la angiogénesis y las respuestas inflamatorias. Entre las vías de señalización se encuentran las relacionadas con las proteínas Kinasa A, ERK1/2, protein kinasa C y Ras, entre otras (Matsuda, 2012; Richards y Ascoli, 2018; Duffy *et al.*, 2019) (Figura 4).



**Figura 4. Vías de señalización activadas tras la unión de la LH a su receptor.** La vía de la proteína quinasa A (PKA), se activa cuando la LH se une a su receptor en los folículos preovulatorios, y la subunidad G $\alpha$ -s activa a la adenilato cicla (AC). La AC permite la formación de AMP cíclico (cAMP) y el incremento del cAMP, permite la activación de la PKA, que a su vez activa a la proteína de unión al elemento en respuesta a cAMP (CREB), el cual es un factor de transcripción que regula la expresión de los genes involucrados en la preparación del folículo preovulatorio que desencadena la ovulación. Otra vía que se activa tras la unión de la LH a su receptor, es la vía de la proteína quinasa C (PKC). La LH promueve la formación del inositol trifosfato (IP3) lo que activa a la PKC, que es un factor de transcripción. Se ha planteado que el incremento del IP3, es el resultado de la activación de la subunidad G $\alpha$ -q/11 del receptor a la LH, la cual activa la fosfolipasa C (PCL) que fosforila al inositol bi fosfato (IP2). Existe evidencia de que la LH activa la vía de señalización del fosfoinositol 3 quinasa (PI3K). En el ovario de ratón, la activación de los receptores a la LH, resulta en el incremento de la fosforilación de las AKT y FOXO, y esta bien establecido que estos factores regulan cascada abajo, la vía de señalización de la PI3K. Otra de las vías que activa la LH, es la p38MAPK. Se ha observado que la unión de la LH a su receptor incrementa la fosforilación de la p38MAPK, y dicha fosforilación no se inhibe por PKA H89, lo que indica que la activación de esta vía es independiente a la vía de la PKA (Duffy *et al.*, 2019).

## Atresia Folicular

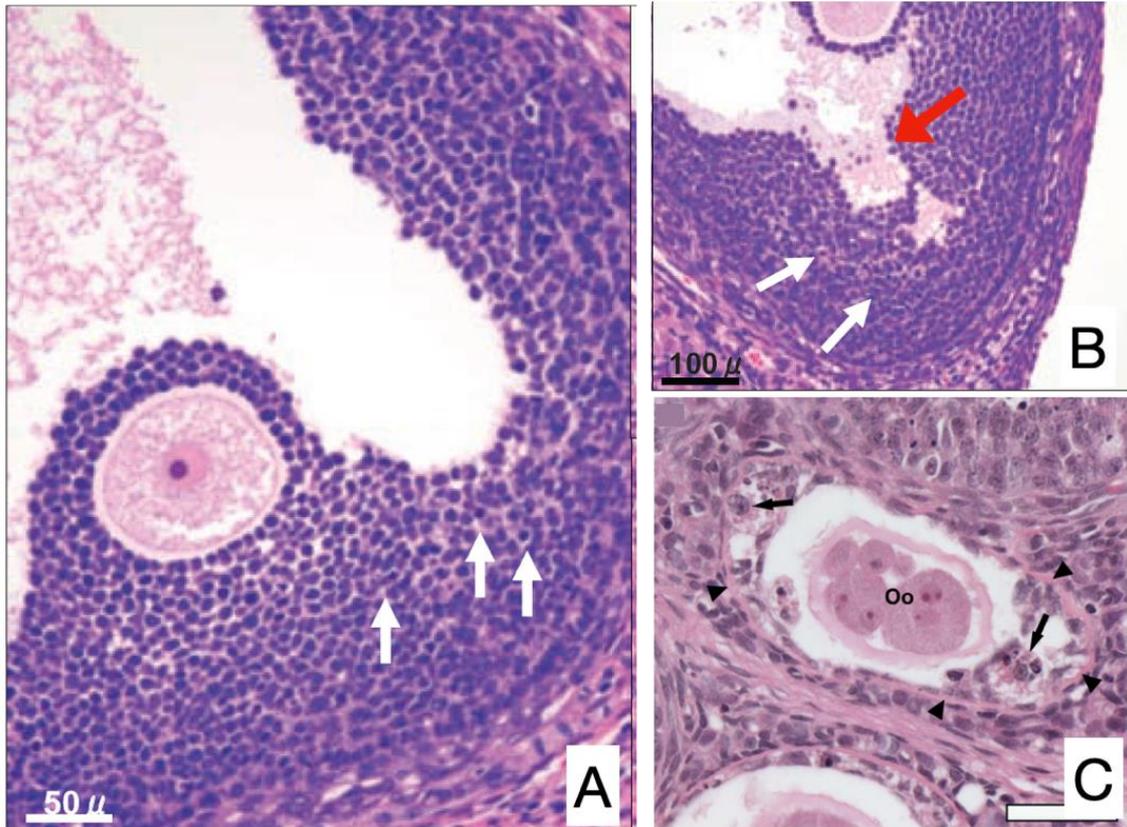
La actividad cíclica del ovario induce que algunos folículos de la reserva ovárica inicien su crecimiento para su posterior ovulación, sin embargo, muchos de éstos detienen su desarrollo y degeneran mediante un proceso conocido como atresia folicular (Mermillod *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013). La atresia folicular es un proceso apoptótico regulado por factores endocrinos, autocrinos y paracrinos (McGee y Hsueh, 2000), donde las señales de supervivencia promueven el desarrollo folicular e inhiben la atresia (Erickson y Danforth, 1995; Zhou *et al.*, 2019).

Las gonadotropinas juegan un papel importante en la regulación de la atresia folicular, se ha descrito el papel de la FSH como un factor de supervivencia, que propicia la expresión de los genes y la modificación transcripcional de proteínas que inhiben la apoptosis en células de la granulosa. También estimula la proliferación celular, activa la esteroidogénesis, y promueve la diferenciación celular, mientras que la LH previene la atresia en folículos preovulatorios y gatilla la ovulación (Erickson y Danforth, 1995; Ginther *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2019). De igual forma, las hormonas esteroides como el estradiol, funcionan como factores de supervivencia, que promueven la proliferación y la diferenciación de las células de la granulosa, y que a su vez promueven junto con la FSH la expresión de receptores a la LH en los folículos ováricos (Richards, 1980; Quirk *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2019).

Además de las gonadotropinas y las hormonas esteroides, otros reguladores intraováricos como el factor de linfoma de células B (Bcl-2), el factor de crecimiento insulínico y miembros de la súper familia TGF- $\beta$  (inhibinas y activinas), activan el desarrollo folicular y promueven la supervivencia folicular (Hu *et al.*, 2004; Hiller, 2009; Wang *et al.*, 2012).

Existen dos vías de señalización celular que inician la apoptosis en las células de la granulosa, la primera es una vía extrínseca que ocurre tras la unión de un ligando a receptores extracelulares, los cuales activan la caspasa 8. Mientras que la otra es una vía intrínseca, que promueve la liberación del citocromo c mitocondrial a través de la caspasa 9 (Hussein, 2005; Matsuda *et al.*, 2012). Estos fungen como activadores de caspasas que promueven la apoptosis, como la caspasa 3, la cual se ha descrito que activa la degradación de los componentes celulares, lo que produce los cambios morfológicos observados en la atresia folicular, como la pycnosis y descamación de las células de la granulosa, la aparición de macrófagos y la fragmentación del ovocito (Johnson y Bridgham, 2002; Yoshida *et al.*, 2009; da Silva-Bitecourt *et al.*, 2018) (Figura 5).

La atresia folicular permite la selección de los ovocitos maduros de mejor calidad, lo que incrementa la probabilidad de fecundación, implantación y desarrollo embrionario de los organismos (Yoshida *et al.*, 2009). A su vez, es un proceso necesario para mantener la homeostasis dentro del sistema reproductivo de los mamíferos (Zhou *et al.*, 2019).



**Figura 5. Diferentes tipos de folículos atrésicos.** A, Folículo en etapa temprana de atresia. Las flechas indican células de la granulosa picnóticas y apoptóticas. B, Flechas blancas indican células picnóticas y la flecha roja muestra células de la granulosa descamadas. C, Oo representa un ovocito con fragmentación. Las flechas negras indican la presencia de macrófagos y los triángulos negros señalan la membrana basal del folículo. Tomado y modificado de Yoshida *et al.*, 2009; da Silva-Bitecourt *et al.*, 2018.

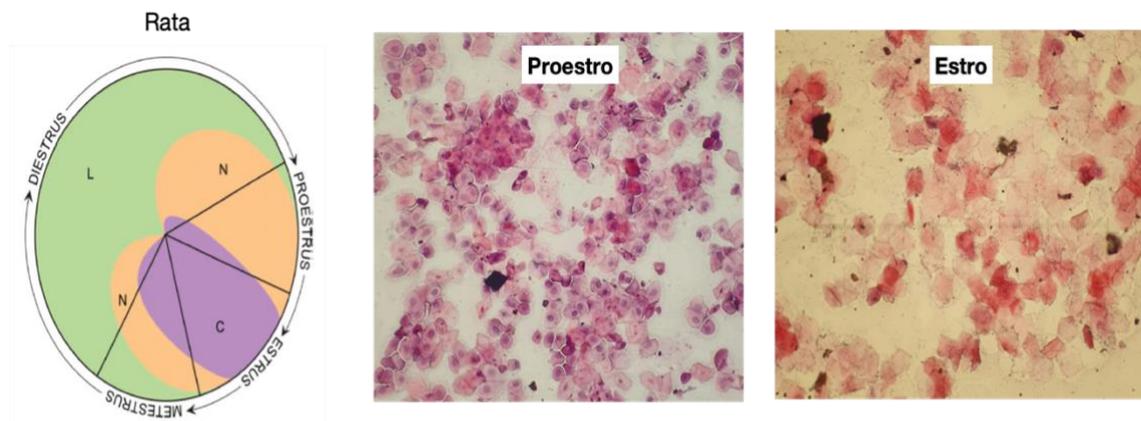
## Ciclo Estral

En los mamíferos el ciclo estral es un fenómeno periódico de las funciones ováricas, durante este, se produce una cascada de eventos hormonales y conductuales que son progresivos, altamente sincronizados y repetitivos (Smith, 2009). La rata presenta un ciclo estral con una duración de entre cuatro y cinco días, y ovulan de manera espontánea, se caracteriza por una fase preovulatoria y una postovulatoria, entre estas dos fases ocurre la ovulación. Para su estudio, el ciclo estral generalmente se divide en cuatro etapas: estro, diestro-1, diestro-2 y proestro (de la Cruz y Pásaro, 1998; Smith, 2009; Ajayi y Akhigbe, 2020). En ratas y ratones de laboratorio, la evaluación microscópica de los tipos celulares presentes en los frotis vaginales, se utiliza en la descripción de las etapas del ciclo estral y como índice del estado funcional del eje hipotalámico-hipofisis-ovario. En la figura 6 se pueden observar las características citológicas de la vagina en la rata adulta (Singh *et al.*, 2013; Ajayi y Akhigbe, 2020).

Durante el proestro, en la citología vaginal se pueden encontrar numerosas células nucleadas redondas distribuidas uniformemente, pueden aparecer agrupadas o separadas individualmente (Cora *et al.*, 2015). A su vez, es común encontrar células cornificadas en menor cantidad (Ajayi y Akhigbe, 2020), células en mitosis, poca o nula descamación, e inicia la formación de un estrato granuloso (indicando la salida del proestro), hay una capa superficial mucoide, la cual se cornificara con el paso del tiempo. Al final de esta fase del ciclo, aumenta la presencia de células cornificadas con una capa mucoide superficial, y con algunas células descamadas (Westwood, 2008). En el ovario se observa el crecimiento rápido de los folículos. Los folículos preovulatorios liberan una gran cantidad de estrógenos y progesterona, dicho incremento es mayor en la tarde del proestro. Entre las 17:00 – 18:00 horas ocurre la concentración máxima de la LH, lo que resulta en la ruptura del folículo preovulatorio y la ovulación (Figura 7) (Legan y Karsch, 1975; Mahoney *et al.*, 2004; Chappell *et al.*, 2009). En la histología ovárica, se pueden encontrar cuerpos lúteos degenerados, presencia de vacuolas citoplasmáticas y proliferación de tejido fibroso en la cavidad central (Westwood, 2008). El útero se encuentra distendido y con fluido (Smith, 2009). El epitelio del útero es cuboide o columnar, se puede observar la mitosis de las células epiteliales con poca o nula degeneración y poca infiltración de células inflamatorias (Westwood, 2008). Al final de esta etapa, las hembras comienzan a ser receptivas, por lo que permiten el acercamiento,

la monta y la cópula por parte del macho (de la Cruz y Pásaro, 1998). En la rata, el proestro es una etapa corta que dura en promedio 14 horas.

En el día del estro, la citología vaginal se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de células epiteliales cornificadas, el citoplasma es granular y la células tienen una forma irregular. También se pueden encontrar un gran número de bacterias y ocasionalmente células epiteliales redondas con núcleo (Cora *et al.*, 2015). La histología vaginal se caracteriza por el desprendimiento gradual de las capas mucoides superficiales y cornificadas, con una reducción del epitelio. Aparece detrito celular con ausencia de actividad mitótica e inicia la infiltración gradual de leucocitos (Westwood, 2008). En el ovario, se pueden encontrar nuevamente cuerpos lúteos en regresión, sin embargo, también se pueden encontrar cuerpos lúteos frescos (indicativos de una ovulación reciente), con células basófilas, fluido en la cavidad central del folículo y ausencia de tejido fibroso (Westwood, 2008). El útero se encuentra en su máxima distensión, al inicio del estro la histología uterina se caracteriza por la degeneración de células epiteliales. Hay nula actividad mitótica e incrementa la infiltración de leucocitos (Westwood, 2008). Durante esta etapa termina la conducta de celo, y se observa un segundo pico de la concentración de la FSH el cual estimula el crecimiento de los folículos que van a ovular



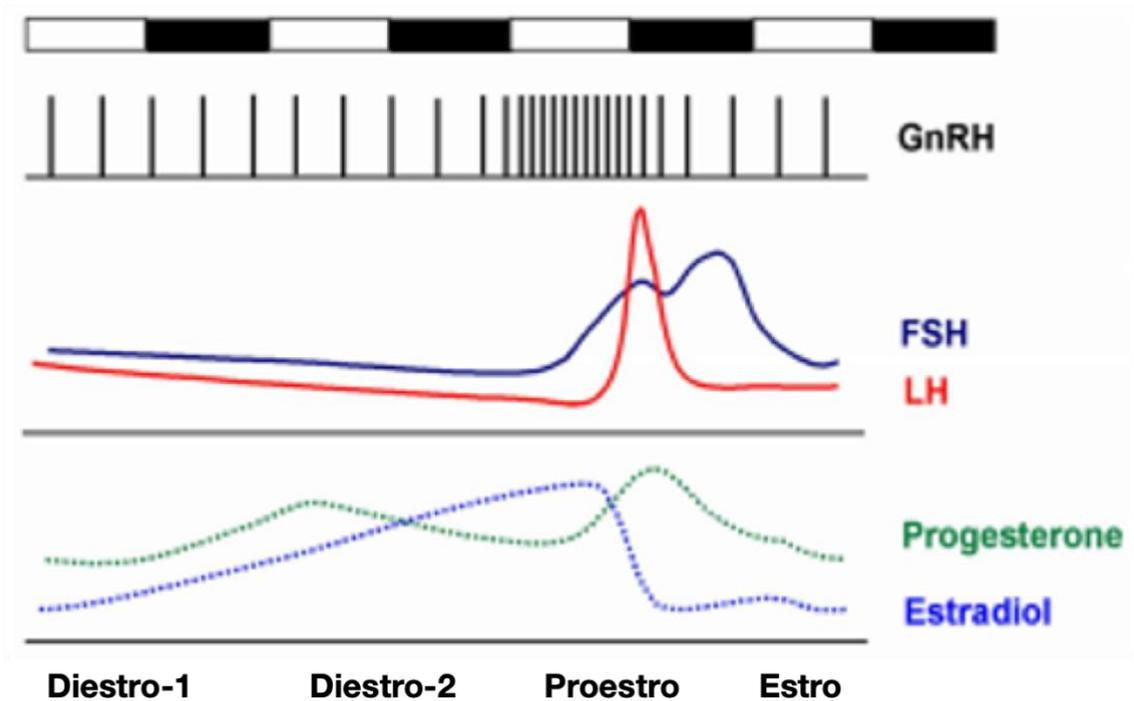
**Figura 6. Citología vaginal de ratas adultas.** En la esquina superior izquierda se localiza una gráfica que representa la proporción de células del epitelio vaginal en cada día del ciclo estral. N, células nucleadas; C, células cornificadas y L, Leucocitos (Ajayi y Akhigbe, 2020). Del lado derecho se muestran frotis vaginal de ratas en cada día del ciclo estral, teñidos con la técnica de hematoxilina/eosina

en los siguientes ciclos (de la Cruz y Pásaro, 1998; Mahoney *et al.*, 2004; Smith, 2009) (Figura 7). En la rata, el estro tiene una duración de 24 a 48 horas.

Durante el diestro-1, el frotis vaginal se caracteriza por un gran número de leucocitos, así como por células residuales del estro y, en algunas ocasiones, se pueden encontrar células epiteliales redondas con núcleo (Cora *et al.*, 2015). Histológicamente, en la vagina existe un desprendimiento completo de la capa cornificada, hay una gran infiltración de leucocitos y persiste la descamación del estrato cornificado, además de la degeneración del estrato granuloso y germinativo superior (Westwood, 2008). En el ovario los folículos comienzan a secretar estradiol y los cuerpos lúteos progesterona (de la Cruz y Pásaro, 1998; Smith, 2009) (Figura 7), los cuerpos lúteos pueden aun contener líquido en su cavidad. Hay un menor número de células basófilas y casi no se encuentra tejido fibroso (Westwood, 2008). En el útero continúa la degeneración de las células endometriales epiteliales. Se empieza a observar actividad mitótica en conjunto con la degeneración celular (Westwood, 2008). Las hembras en esta etapa no presentan recepción a la copula (de la Cruz y Pásaro, 1998). En la rata, el diestro-1 es una etapa corta que varía de 6 a 8 horas.

Finalmente, durante el diestro-2, en el frotis vaginal aun se puede observar una predominancia de leucocitos, con pocas células cornificadas y células epiteliales redondas (Cora *et al.*, 2015). Histológicamente, la vagina se caracteriza por la presencia de un epitelio cornificado, con infiltración variable de leucocitos y una posterior proliferación y engrosamiento del epitelio. Al final del día hay nula infiltración de leucocitos (Westwood, 2008). En el ovario incrementa el tamaño de los cuerpos lúteos por lo que es mayor la concentración de la progesterona, e incrementa la formación de tejido fibroso en la cavidad del cuerpo lúteo (Westwood, 2008). Durante esta etapa los folículos secretan estradiol de forma creciente, y se regeneran los epitelios vaginales y uterinos (de la Cruz y Pásaro, 1998; Smith, 2009) (Figura 7). En la histología del útero se puede observar un epitelio columnar con poca actividad mitótica, la cual incrementa con el paso del tiempo. Al final de esta fase se observa un incremento en la capa estromal (Westwood, 2008). En

la rata, el diestro-2 es la etapa más larga del ciclo estral con una duración aproximada de 48 a 72 horas.



**Figura 7. Representación del patrón de secreción hormonal durante el ciclo estral.** La barra superior representa los ciclos de luz oscuridad (12:12). Debajo se representan los pulsos de secreción de la GnRH en cada día del ciclo estral. Además, se muestra el patrón de secreción de las gonadotropinas (LH/FSH) y las hormonas esteroides en cada día del ciclo estral. Tomado y modificado de Miller y Takahashi, 2014.

Se ha mostrado que el SCN participa en la regulación del ciclo estral y de las funciones ováricas, evidencia de ello, es que la lesión de este núcleo altera las vías neuroendocrinas que regulan las funciones ováricas, lo que resulta en la pérdida del ciclo estral y la ovulación (Brown Grant *et al.*, 1977; Wiegand *et al.*, 1980; Van Der Horst *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 2017).

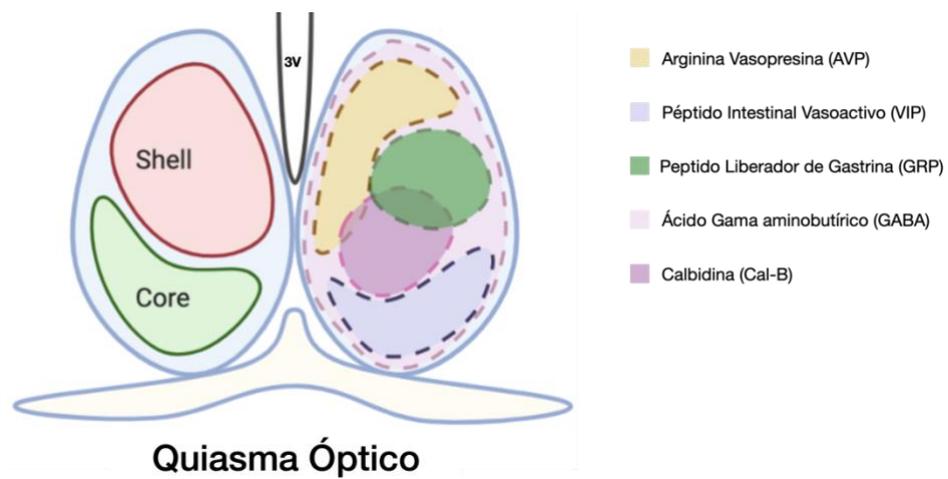
## Núcleo Supraquiasmático

Todos los organismos vivos, desde las cianobacterias hasta los humanos, presentan relojes biológicos endógenos que permiten la anticipación de respuestas fisiológicas y posibilitan una mejor adaptación ante las variaciones diarias de factores ambientales como la luz y la temperatura (Kuhlman *et al.*, 2018). En los mamíferos, el SCN es considerado como el marcapasos central circadiano, ya que es capaz de definir ciclos temporales con un periodo cercano a 24 horas, los cuales son necesarios para la expresión de ritmos circadianos en los procesos fisiológicos de un organismo, así como en su comportamiento y metabolismo (Aguilar-Roblero *et al.*, 2004; Herzog *et al.*, 2017).

El SCN es una estructura bilateral, localizada en la porción ventral del hipotálamo anterior, ventrolateral al tercer ventrículo y dorsal al quiasma óptico (Yan y Okamura, 2002; Aguilar-Roblero *et al.*, 2004; Ma y Morrison, 2019) (Figura 8). En roedores, este núcleo está conformado aproximadamente por 10,000 neuronas y 3,500 astrocitos (Hastings *et al.*, 2020) y mide menos de 1 mm de largo y 10  $\mu\text{m}$  de ancho (Schwartz, 2002). De acuerdo con sus características inmunohistoquímicas y estructurales, el SCN ha sido dividido en dos subregiones, la ventrolateral (*Core*) que recibe las señales lumínicas desde la retina y la subregión dorsomedial (*Shell*) la cual mantiene comunicación con la región ventrolateral (Abrahamson y Moore, 2001; Aguilar-Roblero *et al.*, 2004; Mieda, 2019). Las neuronas de este núcleo sintetizan diferentes neurotransmisores, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el péptido liberador de gastrina (GRP) se expresan principalmente en la región ventrolateral del SCN, mientras que la región dorsomedial se caracteriza por la presencia de la arginina vasopresina (AVP) (Leak *et al.*, 1999; Mohawk y Takahashi, 2011; Hastings *et al.*, 2018) (Figura 8).

Otros neurotransmisores como la neurotensina, la somatostatina, la procinéctina (Prok2), la colecitoquinina (CCK) se expresan a lo largo del SCN (Moore *et al.*, 2002; Welsh *et al.*, 2010; Hannibal *et al.*, 2010; Ma y Morrison, 2019), a su vez, el ácido gamma aminobutírico (GABA) se expresa en la mayoría de las neuronas (Fan *et al.*, 2015; Hasting *et al.*, 2019) (Figura 8).

Existen evidencias experimentales que permiten considerar al SCN como el principal oscilador circadiano en mamíferos. La primera evidencia de ello es que las neuronas que conforman al reloj maestro presentan patrones circadianos en la actividad metabólica y eléctrica. Si se realizan explantes del SCN de un individuo y se colocan en condiciones *in vitro* se conservan estos patrones de actividad circadiana (Shibata *et al.*, 1983). La segunda es que la lesión del SCN, en roedores, resulta en la pérdida de los ritmos de la actividad locomotora, ingesta de agua y secreción de la corticosterona (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). Además, cuando se trasplanta el SCN de un animal a otro de la misma especie, el ritmo circadiano que predomina es del tejido que se trasplantó (Lehman *et al.*, 1987). Ralph y colaboradores (1990) observaron que cuando se trasplanta el SCN de hámsteres con la mutación  $\tau$ , caracterizada por un período circadiano endógeno de libre curso de 20 horas, a hámsteres con lesión del SCN cuyo ritmo intrínseco es de 24 horas, el ritmo circadiano que se conserva es el del SCN trasplantado, lo que implica que los ritmos biológicos yacen en el SCN.



**Figura 8. Esquema de la citoarquitectura del SCN de la rata.** El SCN es una estructura bilateral, del lado izquierdo se observa la división dorsomedial (*Shell*) y la ventrolateral (*Core*). Del lado derecho se observa la distribución de algunos neurotransmisores presentes en el SCN. Tomado y modificado de Antle y Silver, 2005.

## Proyecciones Aferentes

Se han descrito varias aferencias al SCN, entre ellas, las del RHT y el tracto geniculohipotalámico (GHT), que envían información fótica al SCN (Welsh *et al.*, 2010; Ma y Morrison 2019). También recibe fibras serotoninérgicas provenientes de los núcleos mesencefálicos del rafe, y las proyecciones neurales colinérgicas de los núcleos magnocelulares del prosencéfalo basal y del tronco del encéfalo (Bina *et al.*, 1993; Meyer-Bernstein y Morin, 1996; Dibner *et al.*, 2010) (Figura 9).

La cantidad de luz ambiental es detectada en la retina por fotorreceptores circadianos diferentes a los que intervienen en la visión. Los fotorreceptores circadianos son un tipo especial de célula ganglionares que poseen el fotorreceptor melanosina (Provencio *et al.*, 1998) y se caracterizan por tener un campo receptivo visual muy amplio y codificar la cantidad de luz. Los axones de estas células ganglionares forman el RHT que llega a la porción ventrolateral del SCN (Moore *et al.*, 1972). El SCN recibe la información lumínica a través de los axones del RHT. Ésta es convertida a química mediante la acción de células ganglionares fotosensibles llamadas M-1, las cuales sintetizan la melanosina (Hughes *et al.*, 2015; Herzog *et al.*, 2017; Ma y Morrison, 2019). Estas células liberan glutamato en la región ventrolateral del SCN, lo que altera la expresión génica de las neuronas que lo conforman (Morse y Sassone-Corsi, 2002; Dibner *et al.*, 2010).

La segunda vía de señales lumínicas que recibe el SCN, proviene del GHT, ésta es una vía indirecta donde dichas señales viajan desde la retina a la hojuela intergeniculada (IGL), en donde hacen un relevo y posteriormente continúan hacia el SCN (Hughes *et al.*, 2015). En esta región, convergen las señales lumínicas con estímulos no fóticos (ruido, temperatura y movimiento) (Aguilar-Roblero *et al.*, 2004; Ma y Morrison, 2019). El principal neurotransmisor de las fibras nerviosas del GHT, es el neuropéptido Y (NPY), seguido del GABA y la encefalina, estos neurotransmisores se liberan a la región ventrolateral del SCN, principalmente, y modulan la actividad neural (Biello *et al.*, 1994; Morin y Blanchard, 2001; Ma y Morrison, 2019).

Existe un subgrupo de neuronas en el SCN que sintetizan CCK, éstas tienen la peculiaridad de no ser inervadas por células ganglionares de la retina, por lo que se sugiere

que podrían estar relacionadas en la regulación no-fótica del reloj circadiano (Buhr *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito que reciben señales de 29 núcleos cerebrales, entre los cuales se encuentran el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), el núcleo paraventricular del tálamo (PVT), el núcleo supraóptico, el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH), entre otros (Yuan *et al.*, 2018).

El SCN presenta receptores a serotonina (5-HT), el cual es un neurotransmisor que proviene del núcleo medial del rafe (MRN), estos receptores se localizan principalmente en la región ventrolateral del SCN, específicamente en neuronas VIPérgicas (Ma y Morrison, 2019). El MRN modula la información lumínica en el SCN, potencializando las aferencias de glutamato que recibe (Ma y Morrison, 2019). En las ratas que no expresan el receptor a 5-HT se interrumpen los ciclos de sueño-vigilia, así como los patrones de actividad locomotora (Nakamaru-Ogiso *et al.*, 2012), en tanto que la lesión del MRN en hámsteres resulta en cambios de fase en la actividad locomotora (Meyer-Bernstein y Morin, 1996).

El SCN recibe ACh desde el prosencéfalo basal, donde existe una gran cantidad de neuronas colinérgicas que se originan en el núcleo basal magnocelular (MBN) y proyectan al SCN (Figura 9). Además, recibe información colinérgica del tronco encefálico y se han descrito tres núcleos colinérgicos con eferencias al SCN, estos núcleos incluyen al núcleo tegmental pedúnculo pontino, al núcleo tegmental latero-dorsal y el núcleo parabigeminal (Bina *et al.*, 1993; Madeira *et al.*, 2004). Las aferencias colinérgicas, modulan las señales lumínicas del SCN, la expresión de neurotransmisores y la actividad locomotora (Zatz y Herkenham, 1981; Madeira *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2010).

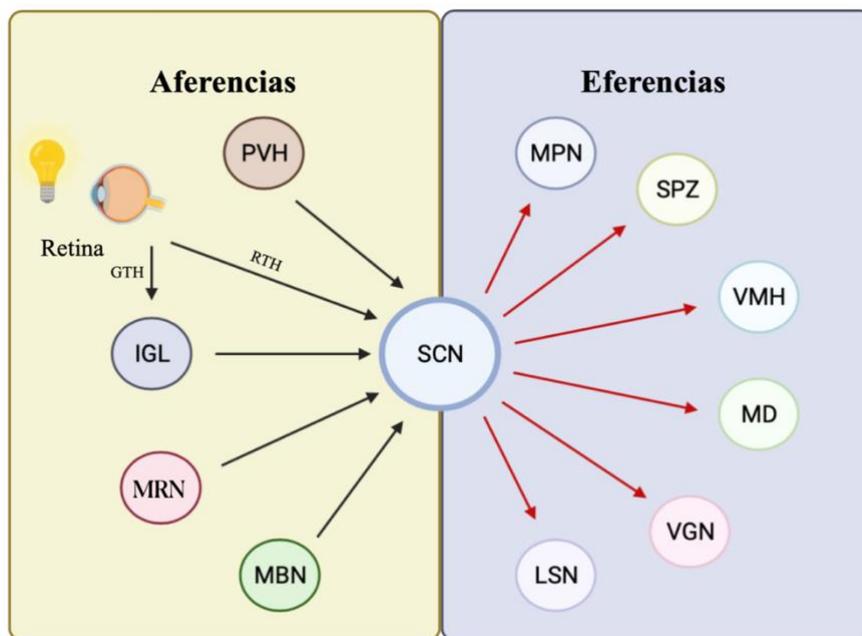
### Proyecciones Eferentes

Existen diferentes eferencias monosinápticas del SCN, éstas se limitan principalmente al hipotálamo y al tálamo (Li *et al.*, 2012). Las fibras neurales del SCN terminan en diferentes núcleos, entre los cuales se encuentran: el núcleo preóptico medial (MPN), la zona subparaventricular (SPZ), el VMH, el núcleo dorsomedial (MD), el núcleo geniculado ventrolateral (VGN) y el núcleo lateral septal (LSN). Las proyecciones que

arriban al tálamo terminan en la parte anterior del PVT (Aguilar-Roblero *et al.*, 2004; Ma y Morrison, 2019) (Figura 9).

La comunicación entre el SCN y los diferentes núcleos hipotalámicos, permiten la sincronización de los relojes periféricos a través de señales humorales o neurales. Entre los órganos periféricos influenciados por la actividad biológica del reloj maestro se encuentran: los pulmones, el hígado, los riñones, el corazón, los músculos, entre otros. Estos órganos sincronizan su actividad con las señales lumínicas que el SCN recibe, traduce y envía a los relojes periféricos, donde a su vez pueden converger con señales endógenas como el momento de ingesta de alimentos y la actividad locomotora (Ma y Morrison, 2019).

El SCN también regula la actividad de la glándula pineal mediante vías multisinápticas. Durante la noche subjetiva, el SCN estimula la liberación de noradrenalina (NA) dentro de la glándula pineal lo que resulta en la síntesis de la melatonina. De esta manera el SCN se ve implicado en la regulación de los ciclos de sueño/vigilia en los organismos (Sack *et al.*, 2007).



**Figura 9. Representación de algunas aferencias y eferencias del SCN.** Aferencias, la retina envía información fótica a través del Tracto Retinohipotalámico (RHT); la retina envía señales lumínicas a la Hojuela Intergeniculada (IGL) a través del Tracto Génico-Hipotalámico (GHT), y posteriormente al SCN; aferencia, del Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (PVN); Núcleo Medial del Rafe (MRN) y Núcleo Basal Magnocelular (MBN). Eferencias, Núcleo Preóptico Medial (MPN), Zona Subparaventricular (SPZ); Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMH); Núcleo Dorsomedial (MD); Núcleo Geniculado Ventral (VGN); y Núcleo Lateral Septal (LSN). (Ma y Morrison, 2019).

## Relación entre el SCN y la secreción de la GnRH

Las funciones ováricas son reguladas por la GnRH, este es un neuropéptido hipotalámico conformado por 10 aminoácidos que regula la secreción de las gonadotropinas (LH/FSH) (Smith, 2009; Matsuda *et al.*, 2019). Las neuronas GnRHérgicas son reguladas por una serie de señales provenientes de otros núcleos hipotalámicos, entre los cuales se encuentra el SCN. En roedores, la mayor parte de neuronas GnRHérgicas que reciben señales del SCN se localizan en el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT), el área preóptica (POA), la banda diagonal de Broca (DBB) y el área hipotalámica anterior (AHA) (Van Der Beek *et al.*, 1997; de la iglesia, 1999; Castañeyra-Ruiz *et al.*, 2013).

Algunos estudios han mostrado la relación que existe entre el SCN y la secreción de la GnRH. Se ha observado que, en ratas, la lesión térmica del SCN resulta en el bloqueo de la ovulación, la modificación del ciclo estral y alteraciones en los patrones de secreción de la GnRH y las gonadotropinas (Brown-Gran *et al.*, 1977; Wiegand *et al.*, 1980; Ramírez *et al.*, 2017).

Estudios anatómicos han revelado que el SCN se conectan con las neuronas GnRHérgicas por vías neurales directas (monosinápticas) e indirectas (multisinápticas) (van der Beek *et al.*, 1993; van der Beek *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2011) (Figura 10).

Las proyecciones directas del SCN a las neuronas GnRHérgicas, se originan a partir de las neuronas de la región ventrolateral del SCN que sintetizan el VIP (Van Der Beek *et al.*, 1997; de la Iglesia *et al.*, 2003; Mahoney y Smale, 2005). La lesión unilateral del SCN disminuye el número de neuronas inmunoreactivas a la GnRH que reciben aferencias VIPérgicas en el POA ipsilateral (van der Beek *et al.*, 1993). Dichas neuronas presentan inmunorreactividad a c-Fos, un marcador de activación celular, durante el pico preovulatorio de la GnRH (van der Beek *et al.*, 1994).

Diversas investigaciones han mostrado el papel estimulante del VIP, en la secreción de la GnRH. Las neuronas de GnRH presentan actividad c-Fos alrededor de la hora en la cual surge el “pico” pre-ovulatorio de la LH, sin embargo la presencia de un oligonucleótido anti-sentido de VIP en el SCN, atenúa la concentración de la LH (Harney *et al.*, 1996; Van Der Beek *et al.*, 1997).

Piet y colaboradores (2016) mostraron que la estimulación de las neuronas GnRH con VIP, durante el ciclo estral en diferentes momentos del día, incrementa la actividad de las neuronas GnRHérgicas, efecto que es mediado a través de la activación del receptor a VIP (VPAC-2). Además, mostraron que el porcentaje de neuronas de GnRH que responden a VIP, y la magnitud de su respuesta, es la misma en las etapas del diestro y el proestro. Estos resultados indican que, en la hembra, la función del receptor a VIP en las neuronas GnRH es relativamente constante durante los días de diestro y proestro que conducen al pico preovulatorio de la LH. Otros estudios sugieren que el VIP puede tener un papel inhibitorio en la regulación de la secreción de la GnRH. Kauffman y colaboradores (2014) observaron que la administración intercerebroventricular de VIP inhibe la actividad neural de las neuronas GnRHérgicas.

Existe una segunda vía de comunicación directa mediada por AVP, se han descrito conexiones anatómicas de AVP entre las neuronas del SCN y las GnRHérgicas (Manoheny y Smale, 2005). Las neuronas GnRHérgicas expresan receptores a AVP (V1a) en POA, donde la cantidad de mRNA depende de la concentración de estradiol (Kalamatianos *et al.*, 2004). A su vez, la inyección intracerebroventricular de un antagonista de AVP resulta en el decremento de la concentración de LH y prolactina (PRL) (Funabashi *et al.*, 1999). En ratas hembras con lesión del SCN, la microinyección de AVP en POA, restablece la concentración de la LH en suero (Palm *et al.*, 1999). Con estos resultados los autores sugieren que el SCN regula a las neuronas GnRHérgicas en POA mediante una vía AVPérgica.

En la tarde del proestro, la microinyección intracerebroventricular de AVP en ratones con alteración en el gen Clock, induce la liberación preovulatoria de la LH, este efecto se pierde tras la microinyección de un antagonista de los V1a, lo que sugiere que la AVP participa en la secreción del pico preovulatorio de la LH a través los receptores V1a (Miller *et al.*, 2006). Estas evidencias respaldan la participación del SCN en la secreción de la GnRH por medio de fibras AVPérgicas monosinápticas.

Las vías indirectas por las cuales el SCN regula la actividad de las neuronas de GnRH, son aquellas en las que el SCN presenta señales eferentes monosinápticas a neuronas localizadas en otras regiones cerebrales, y estas a su vez se comunican con las neuronas GnRHérgicas (Russo *et al.*, 2015).

Entre las vías indirectas más estudiadas, está la que ocurre entre el SCN y el área periventricular rostral del tercer ventrículo (RP3V) y POA. Particularmente, esta vía ha sido de interés ya que el pico pre-ovulatorio de la LH que desencadena la ovulación depende de dos señales: una circadiana proveniente del SCN y del incremento en la concentración del estradiol ovárico (Smarr *et al.*, 2012). La evidencia indica que en el RP3V es donde ocurre la convergencia de ambas señales, ya que las neuronas de esta área expresan el receptor a estrógenos  $\alpha$ .

Las neuronas de kisspeptina (Kiss) localizadas en el RP3V, son las que expresan el receptor a estrógenos  $\alpha$  y son invadidas por neuronas AVPérgicas del SCN. Las neuronas GnRHérgicas no expresan receptores a estrógenos, por lo tanto, las neuronas Kiss que inervan a las de GnRH, informan de la ausencia o presencia de los estrógenos (Williams *et al.*, 2011). En ratones Knockout a *Kiss1* (el gen que codifica la Kiss), el estímulo con Kiss resulta en el incremento en la secreción de GnRH (Messenger *et al.*, 2005), lo que sugiere que Kiss tiene un papel estimulante en la regulación de la secreción de la GnRH. La Kiss induce el marcador de actividad c-Fos en neuronas GnRHérgicas (Irwig *et al.*, 2004), las cuales expresan el gen *Grp54* que codifica al receptor a Kiss (Messenger *et al.*, 2005), además, la Kiss induce la despolarización del 90% de las neuronas GnRHérgicas (Han *et al.*, 2005).

La lesión del SCN, resulta en la inhibición de las señales AVPérgicas que inervan a las neuronas Kiss en el RP3V, lo que resulta en el bloqueo del pico preovulatorio de la LH (Wiegand y Teresawa, 1980; Williams *et al.*, 2011), éste efecto se revierte con la administración intracerebroventricular de la AVP (Palm *et al.*, 1999). Estos resultados indican que las conexiones AVPérgicas del SCN con neuronas Kiss en el RP3V tienen un papel estimulante en la regulación de la secreción preovulatoria de la LH.

Las neuronas de Kiss en el RP3V permiten la integración de la señal circadiana y el estradiol ovárico, se ha observado que el SCN envía señales AVPérgicas de manera constante a lo largo del ciclo estral a las neuronas Kiss (Greer *et al.*, 1986), sin embargo, tras el aumento de las concentraciones de estradiol ovárico incrementa el número de los receptores a la AVP en neuronas Kiss (Treen *et al.*, 2016). Este podría ser un mecanismo

de integración de ambas señales (circadiana y ovárica) que permite la liberación, en la hora óptima, del “pico” pre-ovulatorio de LH.

El GABA, es un neurotransmisor que se encuentran en el RP3V, las neuronas GnRHérgicas presentan receptores al aminoácido del tipo GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (Sliwowska *et al.*, 2006), la unión del neurotransmisor con sus receptores tiene un efecto inhibitorio en la secreción preovulatoria de la LH. Se ha observado que la concentración del GABA disminuye antes de la hora del pico preovulatorio de las gonadotropinas (Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003).

Al igual que en el RP3V, se ha propuesto al núcleo arqueado (ARC) como centro integrador de señales circadianas con señales estrogénicas del ovario. Esta es otra vía multisináptica de comunicación entre el SCN y las neuronas GnRHérgicas (Bayley y Silver, 2014). Las neuronas Kisspeptinérgicas localizadas en el ARC, se pueden distinguir de otras neuronas kiss ya que co-expresan neurokinina B, el receptor para este ligando (TAC3R) y dinorfina (Goodman *et al.*, 2007). Las terminales nerviosas de estas neuronas Kisspeptinérgicas se localizan en la eminencia media (Ramaswarny *et al.*, 2008; Ramaswarny *et al.*, 2010; Yip *et al.*, 2015), lo que sugiere que dichas neuronas regulan la liberación de GnRH (Iremonger *et al.*, 2017). La destrucción selectiva de neuronas Kiss del ARC con saporinas (una toxina que inactiva los ribosomas celulares) dirigidas por el TAC3R, resulta en la disminución en la secreción de LH en ratas ovariectomizadas (Mittelman-Smith *et al.*, 2012).

El SCN se comunica con neuronas kisspeptinérgicas del ARC a través de AVP (Yeo *et al.*, 2019, Méndez-Hernández *et al.*, 2020). En el ARC, existen neuronas que sintetizan Kiss, las cuales presentan receptores a estradiol, sin embargo, a diferencia de las neuronas localizadas en RP3V donde el estradiol estimula la secreción de Kiss, en el ARC tiene un efecto inhibitorio (Treen *et al.*, 2016). Se ha observado que la disminución de los estrógenos ováricos resulta en el incremento del mRNA *Kiss1* en el ARC, efecto que se revierte tras el remplazo con estradiol (Smith *et al.*, 2006).

Otras neuronas presentes en el ARC y que son inervadas por el SCN sintetizan NPY (Turi *et al.*, 2003; Guzman-Ruiz *et al.*, 2014). Se ha establecido el papel de este neuropéptido como regulador homeostático, con gran importancia en la regulación del eje

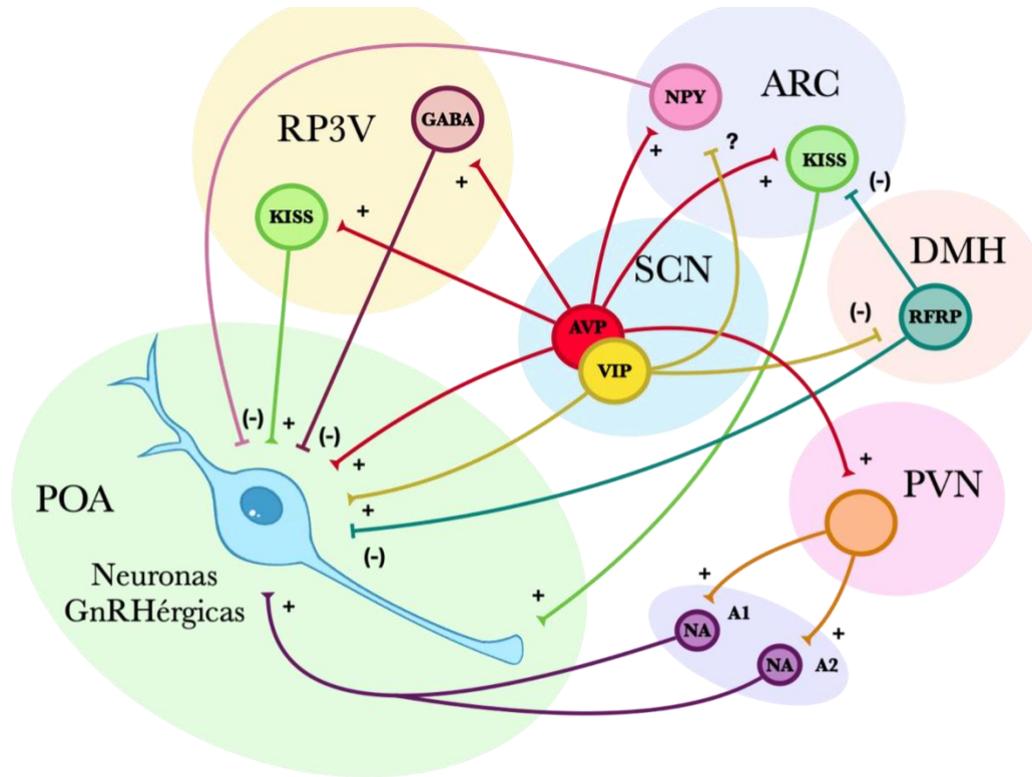
reproductivo (Evans y Anderson, 2018). El NPY regula de manera inhibitoria a las neuronas GnRHérgicas (Klenke *et al.*, 2010; Roa y Herbison, 2012). El incremento en el mRNA del NPY en el ARC podría contribuir a la supresión de la liberación preovulatoria de LH en animales ovariectomizados (Kalamatianos *et al.*, 2008).

El hipotálamo dorsomedial (DMH), es otro núcleo implicado en la regulación de las neuronas GnRHérgicas. En esta región se concentra un conjunto de neuronas que secretan el péptido relacionado con la RFamida (RFRP-3) (Kriegsfeld *et al.*, 2006). Este neuropéptido es considerado un inhibidor de la GnRH y es comparado con la hormona inhibidora de las gonadotropinas (GnIH) de las aves (Kriegsfeld *et al.*, 2018). Existen evidencias anatómicas de la conexión del SCN con las neuronas de RFRP-3, donde el SCN regula estas neuronas por una vía VIPérgica (Russo *et al.*, 2015; Henningsen *et al.*, 2016). A su vez, las neuronas de RFRP-3 inervan de manera monosináptica a las neuronas GnRHérgicas, las cuales expresan el receptor a RFRP-3 (GPR147) (Rizwan *et al.*, 2012). La RFRP-3 inhibe la actividad de las neuronas de GnRH y por lo tanto la liberación de la LH (Ducret *et al.*, 2009).

Otro mecanismo de regulación de las neuronas GnRHérgicas por la RFRP-3, es a través de la inhibición de la actividad de las neuronas de Kiss, al igual que las neuronas GnRHérgicas, las neuronas Kiss expresan el receptor GPR147 (Rizwan *et al.*, 2012). Se ha descrito que el número de neuronas de RFRP-3 inmunoreactivas a c-Fos disminuyen en la tarde del proestro, y esto se ha correlacionado con el incremento en la actividad de las neuronas Kisspeptinérgicas y la liberación preovulatoria de la LH (Henningsen *et al.*, 2017). Al igual que las neuronas Kiss, también se ha considerado que la vía de RFRP-3 podría estar implicada en la regulación de las neuronas GnRHérgicas a través del estradiol, ya que se ha caracterizado la presencia de receptores a estradiol en estas neuronas, los cuales tienen un papel inhibitorio en la secreción de RFRP-3 (Putteeraj *et al.*, 2016).

Otra vía multisináptica, es la que se da entre el SCN, el PVN y el POA. Se ha observado que el SCN mantiene proyecciones AVPérgicas con el PVN (Kalsbeek *et al.*, 1992), el cual contiene núcleos noradrenérgicos (A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>) (Temel *et al.*, 2002) y envía información a las neuronas GnRHérgicas localizadas en el POA (Simonian *et al.*, 1999). El estímulo eléctrico de los núcleos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> produce un incremento en la concentración

de noradrenalina (NA) (Herbison *et al.*, 1990). La NA en POA estimula la secreción de GnRH, que en el día del proestro, deriva en el incremento de la secreción preovulatorio de la LH (Rawson *et al.*, 2001).



**Figura 10 Representación de las vías de comunicación directas e indirectas entre el núcleo supraquiasmático (SCN) y las neuronas GnRHérgicas localizadas en el área preóptica (POA).** Arginina Vasopresina (AVP); Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP); Kisspéptina (Kiss); Ácido Gamma-aminobutírico (GABA); Neuropeptido Y (NPY); Péptido relacionado con el Rfamida (RFRP); Noradrenalina (NA); Área Periventricular Rostral del tercer Ventrículo (RP3V); Núcleo Arqueado (ARC); Hipotálamo dorsomedial (DMH); Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (PVN); Núcleos Noradrenérgicos 1 y 2 (A1 y A2) (Van Der Beek *et al.*, 1997; Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003; Turi *et al.*, 2003; Mahoney y Smale, 2005; Ducret *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2011; Bayley y Silver, 2014; Guzman-Ruiz *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2015; Piet *et al.*, 2016; Kriegsfeld *et al.*, 2018).

## Sistema Colinérgico

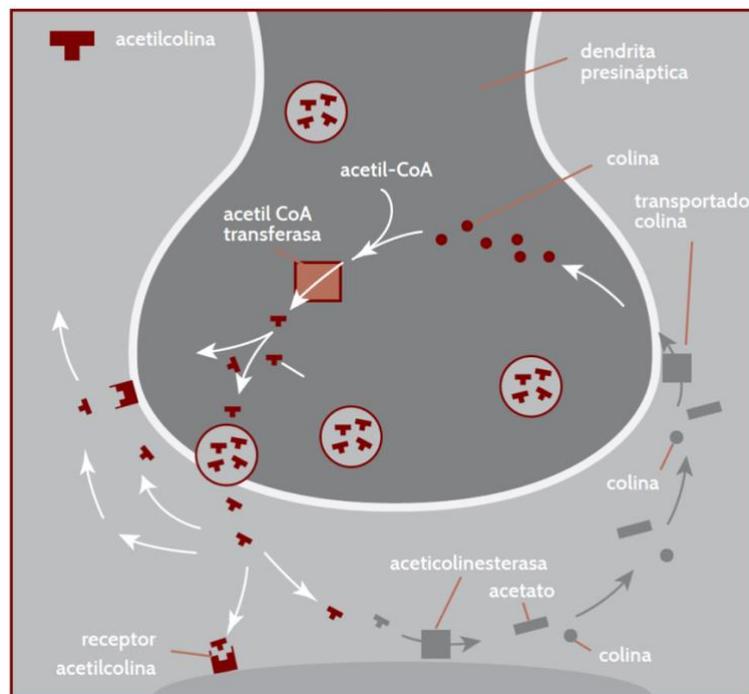
La ACh, es una molécula filogenéticamente antigua en la señalización celular en casi todas las formas de vida del planeta y es el neurotransmisor del sistema colinérgico (Kawashima y Fujii, 2008). Este sistema está conformado por las enzimas acetilcolintransferasa (ChAT), acetilcolinesterasa (AChE), el transportador vesicular de la ACh (VACHT), así como de los receptores muscarínicos (mAChRs) y nicotínicos (nAChRs) (Sanabria-Castro *et al.*, 2017). Este neurotransmisor participa en funciones motoras, neuroendocrinas, parasimpáticas y sensoriales (Sanabria-Castro *et al.*, 2017).

La ACh, es sintetizada en el citoplasma de la neurona presináptica a partir de la colina y de la acetil coenzima A (acetil-CoA) mediante la acción de la ChAT (Picciotto *et al.*, 2012). La acetil-CoA se sintetiza en la mitocondria a partir del citrato, piruvato y acetato. Posterior a su síntesis la acetil-CoA difunde al citoplasma para su posterior unión con la colina (González y Flórez, 1997). La colina de la cual se sintetiza la ACh se origina a partir de tres fuentes (González y Flórez, 1997): 1) Del hígado donde inicialmente se sintetiza, penetra en la neurona colinérgica a través de un sistema de recaptura específico de colina de alta afinidad (SRAA); 2) A partir del metabolismo de la fosfatidilcolina de membrana y 3) Del espacio sináptico, a partir de la hidrólisis de la ACh por la AChE.

La ACh se encuentra en las terminales presinápticas: asociada a la membrana, libre en el citoplasma o, de forma más abundante, almacenada dentro de vesículas (González y Flórez, 1997). La liberación de la ACh sintetizada en el citoplasma, es liberada al espacio sináptico, o transportada al interior de vesículas sinápticas para después ser liberada por exocitosis (Sudhof-TC, 1995) (Figura 11).

El proceso por el cual la ACh es liberada por exocitosis, sucede cuando la vesícula se fusiona con la membrana celular presináptica, este proceso implica diferentes etapas (Sudhof-TC, 1995). Primero, las vesículas introducen al neurotransmisor a su interior mediante una proteína transportadora con 12 dominios transmembranales, que utiliza un gradiente electroquímico generado por una bomba de protones (H<sup>+</sup>) (Flores-Soto y Segura-Torres, 2005). La mayoría de las vesículas sinápticas que poseen al neurotransmisor no están libres en el citoplasma, sino que están ancladas a proteínas del citoesqueleto que interactúan con proteínas de la membrana vesicular (sinapsinas I y II)

en la terminal presináptica (Flores-Soto y Segura-Torres, 2005). Las sinapsinas pueden ser fosforiladas por diferentes kinasas, entre las que se encuentran las kinasas I y II, las cuales son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la proteína calmodulina (CaMK I y CaMK II), y por la PKA. Cuando un potencial de acción alcanza la terminal nerviosa, se genera un potencial de membrana que activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Debido al gradiente electroquímico, un influjo de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , que en conjunto con la calmodulina activan las kinasas CaMk I y CaMk II, las cuales fosforilan a la sinapsina I y II (Flores-Soto y Segura-Torres, 2005). La fosforilación de las sinapsinas debilitan la unión de las vesículas sinápticas al citoesqueleto, lo cual facilita su transporte a la zona activa donde ocurre el proceso de la exocitosis (maduración o “priming”) (Flores-Soto y Segura-Torres, 2005).



**Figura 11. Síntesis, almacenamiento y secreción de la acetilcolina.** Tomada de Sanabria *et al.*, 2017. Reproducida bajo permiso Lundbeck Institute.

La propagación del impulso nervioso hacia la terminal axónica despolariza la terminal, llevando su potencial desde  $-70\text{mV}$  hasta  $+20$  o  $+30\text{ mV}$ , esto permite la apertura de canales de calcio sensibles al voltaje en el rango de  $-20$  a  $0\text{ mV}$ . La apertura de estos canales permite la formación de zonas de alta densidad de  $\text{Ca}^{2+}$ , donde la concentración llega a ser hasta de  $100\text{-}200\text{ M}$ , es decir,  $1,000$  veces la concentración en reposo ( $100\text{-}200\text{ nM}$ ) (Flores-Soto y Segura-Torres, 2005). El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  afecta a la sinaptotagmina, una proteína involucrada en la exocitosis que funciona como un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , que termina el proceso de fusión de la

vesícula una vez que se han formado los complejos por proteínas, como la syntaxina, la SNAP-25, el factor sensible a N-etilmaleimida (NSF) y proteínas de unión a NSF o SNAPs (Sudhof-TC, 1995).

Existen diversas enzimas que hidrolizan la ACh. Con base a la especificidad del sustrato se dividen en AChE's y butirilcolinesterasas o pseudocolinesterasas. En las sinapsis colinérgicas, la AChE se encuentra a nivel pre y postsináptico (Silman y Sussman, 2005), mientras que la butirilcolinesterasa se localiza a nivel plasmático y en las células gliales cercanas. Ambas enzimas son capaces de degradar hidrolíticamente la ACh en pocos milisegundos (González y Flores, 1997), lo que previene la desensibilización del receptor, debido a la presencia mantenida del neurotransmisor en la hendidura sináptica (González y Flóres, 1997).

La ACh ejerce sus efectos al unirse a los mAChRs y nAChRs (Sanabria-Castro *et al.*, 2017). Existen 5 tipos de mAChRs ( $m_1$ AChR- $m_5$ AChR) y en células neurales y no neurales un gran número de nAChRs, conformados por la combinación de distintas subunidades ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$ ,  $\alpha_9$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$ ) (Grando *et al.*, 2007; Kawashima y Fujii, 2008).

Los mAChRs están asociados a proteínas G con acción enzimática (GTPasa). En el cerebro están presentes en las terminales sinápticas, en donde regulan la liberación de neurotransmisores (Flores-Soto y Segura-Torres, 2005). Este tipo de receptores se caracterizan por participar en respuestas prolongadas como resultado de la interacción de proteínas G con sistemas de segundos mensajeros (Sanabria-Castro *et al.*, 2017). Los mAChRs se pueden distribuir en dos subfamilias dependiendo de la proteína G efectora a la que están acoplados. Los receptores mAChR1, pertenecen a los receptores “impares” (mAChR1, mAChR2, mAChR5), que estimulan a la proteína G insensible a toxina pertúsica del subtipo Gq/11; y la subfamilia de mAChR2, conformada por los receptores “pares” mAChR2/mAChR4, asociados íntimamente a una proteína G sensibles a toxina pertúsica (González y Flórez, 1997).

Los nAChRs pertenecen a la super familia de canales iónicos, del tipo cys-loop los cuales incluyen a algunos receptores del GABA ( $GABA_A$ ), la glicina y la 5-HT. Esta familia de receptores permite el flujo selectivo de iones al interior celular (Picciotto *et al.*,

2001; Millar y Gotti, 2009; Sanabria-Castro *et al.*, 2017), lo que resulta en la entrada de una gran cantidad de iones al cambiar el potencial de membrana (Flores-Soto y Segura-Torres, 2005), dando respuestas rápidas y breves (Millar y Gotti, 2009). Estos receptores participan en diferentes funciones como la memoria, el aprendizaje, el control motor, el sistema de recompensa y analgésicas (Zoli *et al.*, 2018).

La distribución de los nAChRs en el cerebro es relativamente homogénea, sin embargo, es más densa en regiones del tálamo, la corteza y los ganglios basales. Su ubicación es presináptica, postsináptica o peri sináptica (Albuquerque *et al.*, 2009; Zoli *et al.*, 2018). Los receptores presinápticos funcionan como autorreceptores, los cuales modulan la liberación de la ACh, mientras que los postsinápticos median procesos de transmisión sináptica excitatoria (Zouridakis *et al.*, 2009).

Los nAChRs están conformados por 5 subunidades dispuestas de tal modo que forman un canal que permite el paso de iones (Zoli *et al.*, 2018). Todas las subunidades que conforman al nAChR presentan una misma estructura, la cual consiste en un dominio amino-terminal extracelular, seguido de tres dominios hidrofóbicos transmembranales (M1-M3), un *loop* citoplasmático largo entre los dominios M-3 y M-4, un cuarto dominio transmembranal hidrofóbico (M-4) y un pequeño dominio carboxilo extracelular (Zoli *et al.*, 2015). Los dominios transmembranales forman un poro iónico. El M-2 forma la pared del poro, el M-1 y M-3 protegen al M-2 de la bicapa lipídica circundante, mientras que el M-4 es el dominio con mayor exposición a los lípidos (Ho *et al.*, 2020) (Figura 12A-B).

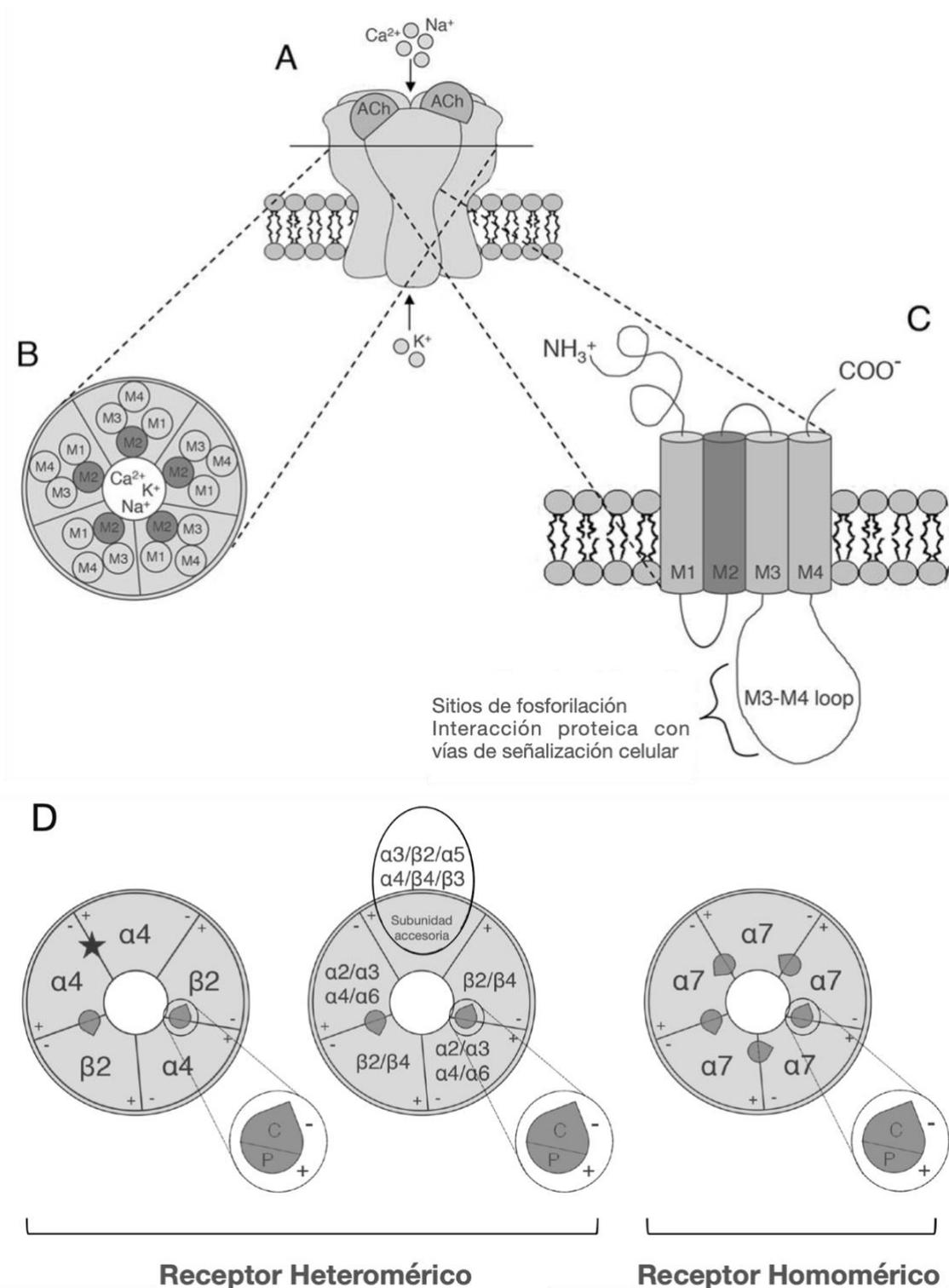
El dominio amino-terminal, así como los dominios transmembranales, están bien conservados entre las diferentes subunidades que conforman a un nAChR, sin embargo, el *bucle* que existe entre los dominios M-3 y M-4 puede presentar variaciones en su tamaño, así como en los aminoácidos que lo conforman (Stokes *et al.*, 2015). Este *bucle* es importante para posicionar al receptor desde el retículo endoplasmático hacia la superficie de la membrana celular, al igual que la movilidad en la misma, a su vez, funge como sitio de fosforilación de diferentes serinas/treoninas y tirosin kinasas (Millar y Harkness, 2008; Crespi *et al.*, 2018).

Los nAChRs están formados por el ensamble de 5 subunidades transmembranales. En mamíferos, se han identificado 17 diferentes subunidades que incluyen 10

subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 10$ ), 4 subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ), y una subunidad  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Ho *et al.*, 2020). Sin embargo, a nivel neural los nAChRs están formados únicamente por subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo los receptores ( $\alpha 7$ ) y  $\alpha 4\beta 7$  los más abundantes (Ren *et al.*, 2005; Schliebs y Arendt, 2011; Zoli *et al.*, 2018; Ho *et al.*, 2020) (Figura 12D).

Existe una amplia diversidad de nAChRs, debido a las diferentes configuraciones que las subunidades pueden formar, los nAChRs conformados por únicamente subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  o  $\alpha 9$ ) se consideran homoméricos, mientras que los que están conformados por subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 6$ ) combinadas con  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ) se les denomina heteroméricos (Dani, 2015; Zoli *et al.*, 2018; Ho *et al.*, 2020).

Los receptores homoméricos, presentan 5 sitios de unión idénticos a la ACh, localizados en la interfase de dos subunidades, mientras que los receptores heteroméricos poseen al menos dos sitios de unión a la ACh, los cuales se localizan en la interfase entre una subunidad  $\alpha$  positiva (+) y una  $\beta$  ( $\beta 2$  o  $\beta 4$ ) negativa (-) (Taly *et al.*, 2009). Para desencadenar la máxima activación neural (Andersen *et al.*, 2013), la ACh se tiene que unir al menos a dos sitios de unión para poder ejercer su efecto en receptores heteroméricos, mientras que solo necesita unirse a un solo sitio de unión en receptores homoméricos ( $\alpha 7$ ) (Figura 12 D). Recientemente se mostró que en los receptores homoméricos  $\alpha 7$ , el *bucle* sirve como sitio de unión de proteínas G, lo que podría promover cascadas de señalización intracelular (King y Kabbani, 2016) (Figura 12C). Los receptores homoméricos  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$  han demostrado que pueden generar corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  comparables con las corrientes generadas por los receptores a glutamato (NMDA), y son mucho más permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  que los receptores heteroméricos (Fucile, 2004). En los receptores heteroméricos existe una subunidad accesoria, la cual no participa directamente en la formación de sitios de unión a la ACh. Se ha observado que las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 4$  pueden ocupar la posición accesoria en receptores funcionales (Zoli *et al.*, 2018) (Figura 12).



**Figura 12. Estructura de los nAChRs neurales.** **A;** Se muestra la organización estructural de los nAChRs y localización de los dos sitios de unión. **B;** Corte transversal de un nAChR donde se observa la organización de las subunidades y la formación del poro catiónico. **C;** Una sola subunidad que forma a un nAChR. Se observa la porción amino-terminal extracelular, seguido de 3 dominios transmembranales (M1-M3), un bucle intracelular largo, un cuarto dominio hidrofóbico (M-4), el dominio M-2 (oscuro) forma la pared del poro catiónico. **D;** Organización de los nAChRs. Del lado izquierdo se observa un receptor heteromérico conformado por subunidades  $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ . En medio las diferentes combinaciones de subunidades que pueden tener los nAChRs. Del lado derecho se representa un nAChR homomérico conformado únicamente por subunidades  $\alpha 7$ . En gris oscuro se representan los sitios de unión a la ACh. Encerrado en un círculo se representa la subunidad accesoria que puede estar conformada por diferentes subunidades. Tomado y modificado de Zoli *et al.*, 2018.

La diversidad de las subunidades que conforman a un receptor determina sus características farmacológicas. En el estudio de la participación de los nAChRs en la regulación de las funciones fisiológicas de los organismos, se utiliza una gran diversidad de fármacos que actúan como agonistas o antagonistas (Tabla 1), dentro de los cuales se encuentra la mecamilamina (MEC), la cual es un antagonista alostérico de los nAChRs.

La MEC tiene una vida media de 1.2 horas y tiene mayor afinidad a estos receptores que otros ligandos como el citrato de la metillicaconitina (Debruyne *et al.*, 2003), esto debido a que su unión al sitio alostérico del receptor provoca un cambio conformacional que lo atrapa y cierra el receptor, impidiéndole la interacción con la ACh (Giniatullin *et al.*, 2000).

**Tabla 1. Fármacos agonistas o antagonistas a receptores nicotínicos (nAChRs).**  
Tomado y modificado de Flores-Soto y Segura-Torres, 2005.

<b>Receptores Nicotínicos</b>	
<b>Agonistas</b>	<b>Antagonistas</b>
Acetilcolina	D-tubocurarina
Nicotina	Succinilcolina
Arecolina	Decametonio
Tetrametilamonio	Galanina
Feniltrimetilamonio	Pempidina
Dimetifenilpiperacina	Mecamilamina
Suberildicolina	$\alpha$ -bungarotoxina

## Sistema Colinérgico y SCN

El SCN es regulado por diferentes sistemas de neurotransmisión, como el colinérgico (Abbott *et al.*, 2013). La ACh en el SCN regula el metabolismo en las neuronas relacionadas con la expresión de diferentes péptidos, la pérdida de las aferencias colinérgicas se traduce en la disminución de VIP y AVP en el SCN, dichos neurotransmisores están implicados en la regulación de la secreción de la GnRH (Bina *et al.*, 1993; Moga y Moore, 1997; Madeira *et al.*, 2004).

El SCN presenta ambos tipos de receptores colinérgicos (mAChRs y nAChRs) por lo que puede responder a información colinérgica proveniente de otros núcleos (Bina *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2016). Algunos estudios han analizado el efecto de la estimulación o el bloqueo farmacológico de los receptores colinérgicos del SCN sobre la actividad locomotora (Keefe *et al.*, 1987), la neuronal (Miller *et al.*, 1987), y la reproducción (Vieyra *et al.*, 2016, 2019, 2020).

Se ha mostrado que la administración intracerebroventricular de carbacol (un agonista colinérgico), al igual que el estímulo lumínico, induce cambios de fase en los ritmos de la actividad locomotora de hámsteres mantenidos en oscuridad constante (Earnest y Turek, 1985). Este efecto se mantiene al bloquear los mAChRs con atropina (antagonista no específico de los mAChRs) (Zatz y Herkenham, 1981), mientras que se atenúa al bloquear los nAChRs (Keefe *et al.*, 1987).

En roedores mantenidos en oscuridad constante, la incidencia de un estímulo lumínico resulta en cambios de fase de los ritmos de actividad locomotora, lo que viene acompañado de la expresión de c-Fos en la mayoría de las neuronas del SCN. Sin embargo, la inyección intracerebroventricular de la MEC inhibe la expresión de c-Fos únicamente en las neuronas localizadas en la región dorsomedial del SCN, lo que implica que el efecto que tiene la luz en el SCN es regulado por los nAChRs y que la MEC actúa en la región ventrolateral del SCN (Zhang *et al.*, 1993).

En el SCN, un estímulo lumínico o farmacológico de los nAChRs con nicotina resulta en el incremento de la tasa de disparo lo que sugiere que la ACh, al igual que la luz, tiene un efecto estimulante sobre la actividad de las neuronas del SCN. Este efecto

se pierde con la administración previa de la MEC, por lo que posiblemente esta respuesta es mediada por los nAChRs (Miller *et al.*, 1987).

La participación del sistema colinérgico en la regulación de la reproducción ha sido estudiada desde la década de los 40, donde el grupo de Everett (1949) propuso que la ACh regula la secreción de las gonadotropinas y la ovulación. Años más tarde, se postuló que la regulación colinérgica de la secreción de las gonadotropinas parece presentar un ritmo circadiano (Domínguez *et al.*, 1982), ya que el bloqueo sistémico de los receptores colinérgicos resultó en la inhibición de la ovulación, lo que depende de la hora y el día del ciclo estral en el cual se realiza el bloqueo de dicho sistema.

El sistema colinérgico del SCN participa en la regulación de la ovulación y la secreción de las hormonas esteroides, ya que la microinyección unilateral de atropina en el SCN durante el proestro, bloquea el pico preovulatorio de la LH y la ovulación (Vieyra *et al.*, 2016). Por otro lado, la estimulación de los receptores nicotínicos resulta en un incremento del número de folículos en crecimiento, lo que conlleva a una mayor liberación de ovocitos en el día del estro (Vieyra *et al.*, 2019). Con base en ello, sugerimos que la información colinérgica que arriba al SCN, así como aquella que es generada en él, estimula la actividad de las neuronas VIPérgicas y/o AVPérgicas del SCN, modulando directa o indirectamente la secreción de la GnRH, el desarrollo folicular y la ovulación.

## Planteamiento del Problema

Existen evidencias anatómicas que apoyan la idea de que el SCN regula a las neuronas GnRHérgicas. Específicamente en el día del proestro, la secreción de GnRH, LH y la ovulación, son reguladas por señales colinérgicas que arriban al SCN, así como aquella que es generada en él. En la rata, la microinyección de atropina en el SCN resulta en el bloqueo de la secreción de la LH y por tanto de la ovulación, efecto que depende el SCN estudiado, mientras que la estimulación de los nAChRs resulta en un incremento del número de folículos ováricos en crecimiento, así como en el número de ovocitos liberados. Sin embargo, no se tiene información de cuál es el efecto del bloqueo de los nAChRs del SCN a lo largo del ciclo estral, sobre la regulación de las funciones ováricas, por lo que en el presente estudio se analizaron los efectos de la microinyección de mecamilamina (antagonista no selectivo de nAChRs) en el SCN en cada día del ciclo estral, sobre la proporción de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados, el crecimiento folicular y el ciclo estral.

## Hipótesis

Si la estimulación farmacológica de los nAChRs del SCN en el día del proestro, resulta en un mayor número de folículos en crecimiento y del número de ovocitos liberados, entonces, el bloqueo de dichos receptores por la microinyección de mecamilamina, resultará en una menor respuesta ovárica, lo que dependerá del día del ciclo estral y del SCN estudiado.

## Objetivo General

Analizar los efectos del bloqueo farmacológico de los nAChRs del SCN en cada día del ciclo estral, sobre las funciones ováricas.

## Objetivos Particulares

- Analizar los efectos del bloqueo farmacológico de los nAChRs del SCN izquierdo o derecho, en cada día del ciclo estral, sobre la proporción de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados.
- Analizar los efectos del bloqueo farmacológico de los nAChRs del SCN izquierdo o derecho, en cada día del ciclo estral, sobre el crecimiento folicular.
- Analizar los efectos del bloqueo farmacológico de los nAChRs del SCN izquierdo o derecho, sobre el ciclo estral.

## Metodología

### Selección de Animales

Se utilizaron ratas hembra cíclicas vírgenes de 90 días de edad de la cepa CII-ZV, con un peso corporal entre 230 y 270 gramos. Los animales fueron mantenidos en grupos de 7 individuos, en jaulas acrílicas claras, no porosas (45x22x20 cm), con reja superior de acero inoxidable y con un fotoperiodo de 14 horas luz: 10 horas oscuridad a una temperatura de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , con acceso libre a agua y alimento (Purina S.A, México).

Durante todos los procedimientos se cumplió con lo estipulado por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), Especificaciones técnicas para la protección, cuidado y uso de los animales de laboratorio. El proyecto contó con la aprobación del Comité Interno de Evaluación Ética de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM; FESZ / DEPI / CI / 374/18). Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales a utilizar y su sufrimiento.

Dos semanas antes de iniciar con los tratamientos, los animales fueron anestesiados y marcados con un horador de orejas. Se llevó a cabo el monitoreo del ciclo estral a través del análisis del frotis vaginal y se utilizaron únicamente aquellos animales que presentaron dos ciclos consecutivos de cuatro días de duración. La toma de muestra se realizó a las 07:00 horas diariamente con asas bacteriológicas. Estas muestras fueron teñidas con la técnica de hematoxilina/eosina (5 min/ 2 min), y observadas al microscopio Labophot-2 (Nikon Instruments Inc., USA).

## Grupos Experimentales

Al cumplir los tres meses de edad, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en alguno de los grupos experimentales descritos a continuación y cada grupo se conformó de 8-9 animales

### Testigo Absoluto (TA)

Animales intactos, sin ningún tipo de manipulación fueron sacrificados en el día del estro vaginal por decapitación.

### Microinyección de solución salina (vehículo) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D)

Entre las 09:00-10:00 horas de cada día del ciclo estral (estro, diestro 1, diestro 2 o proestro) (Figura 13) los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina ( $40 \text{ mg Kg}^{-5}$ ) y Xilazina ( $5 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) y se montaron en un aparato estereotáxico modelo 900 (David Kopf Instruments, USA) colocando la barra de los incisivos en -0.5 (5 mm por debajo de las barras de las orejas). Se les realizó un corte dorsal en la cabeza y, con ayuda de una disolución 1:1 de agua oxigenada, se removió el periostio exponiendo el cráneo y se procedió a colocar la aguja del sistema de microinyección en el bregma para obtener las coordenadas de referencia y calcular la localización del SCN. Posteriormente se realizó una perforación con un torno dental de 1 mm. Las coordenadas que se utilizaron para la localización del SCN son las descritas por Paxinos y Watson (2006) las cuales fueron modificadas de acuerdo a la cepa de animales de este estudio (A partir del Bregma, SCN-I: antero-posterior = -0.3, medio-lateral = +0.3, dorso-ventral = -9.1; SCN-D: antero-posterior = -0.3, medio-lateral = -0.2, dorso-ventral = -9.1). Una vez obtenidas las coordenadas, se procedió a bajar la aguja de microinyección al SCN.

El sistema de microinyección se conectó a una jeringa Hamilton de 25  $\mu\text{l}$ , a través de un tubo de teflón (0.65mm OD  $\times$  0.12 mm ID; Bioanalytical Systems, Inc.,USA). La jeringa se montó en una bomba de infusión de un canal Legato 100 (Kd scientific, USA).

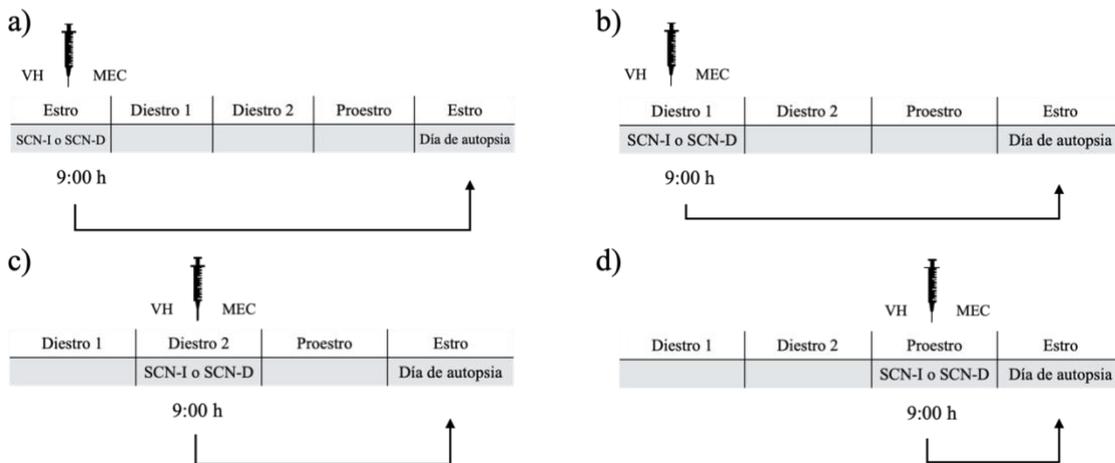
Finalmente se realizó la microinyección de 0.3  $\mu$ l de solución salina/1 minuto. Dicha solución fungió como vehículo (VH), posterior a la microinyección se mantuvo la aguja durante 1 min para evitar el reflujo de la solución administrada y se procedió a suturar la herida.

Al terminar el procedimiento los animales se mantuvieron en una caja equipada con una manta térmica, se les colocó gotas de hipromelosa para evitar el desecamiento de los ojos y como analgésico se les administró 0.2 mg  $K^{-1}$  de Meloxicam vía intraperitoneal (Meloxinn, InnoPharma, México). Una vez recuperados, fueron devueltos al bioterio y al día siguiente de la cirugía se retomó el frotis vaginal.

### Microinyección de mecamilamina (MEC) en el SCN-I o SCN-D

Entre las 09:00-10:00 horas de cada día del ciclo estral (estro, diestro 1, diestro 2 o proestro), se realizó la microinyección de MEC (0.225 $\mu$ g en 0.3  $\mu$ l de VH) (Keefe *et al.*, 1987), en el SCN-I o SCN-D, (siguiendo el mismo protocolo de los animales microinyectados con VH (Figura 13).

#### Protocolo de microinyección



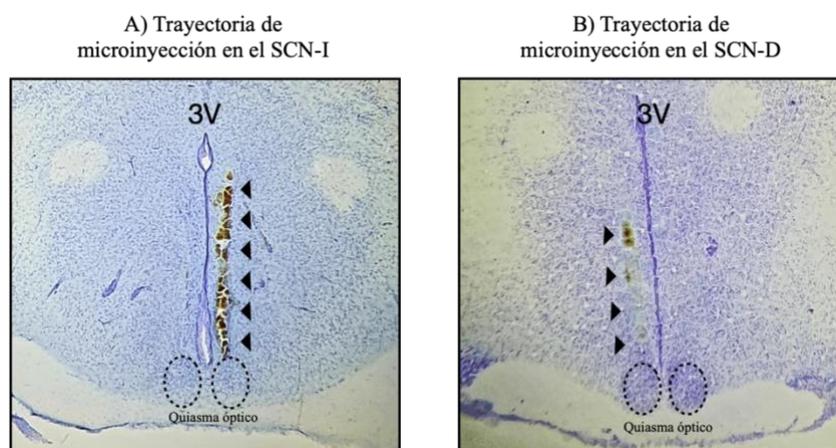
**Figura 13. Representación esquemática de los grupos con microinyección.** Animales microinyectados con VH o MEC en el SCN izquierdo o derecho a las 09:00 horas del a) Estro, b) Diestro-1, c) Diestro-2 o d) Proestro. Los animales fueron sacrificados al siguiente estro vaginal.

## Autopsia

Entre la 09:00-10:00 horas del estro vaginal (posterior al tratamiento) los animales fueron sacrificados por decapitación. Se disecaron los ovarios y se colectaron los oviductos con el fin de contar el número de ovocitos liberados con ayuda de un estereoscopio C-PS (Nikon Instruments Inc., USA). Además, se extrajeron los cerebros de los animales microinyectados y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su análisis.

### Procesamiento del Cerebro

Para verificar el sitio de la microinyección en el SCN, se realizaron cortes coronales seriados de  $60\ \mu\text{m}$  de espesor en un criostato CM1520 (Leica, Alemania). Estos cortes se montaron en un portaobjetos con gelatina para cerebro y posteriormente fueron teñidos con la técnica de Nissl (violeta de cresilo al 1%). Posteriormente éstos cortes se observaron en un estereoscopio C-PS. En este estudio sólo se consideraron los animales donde la trayectoria de microinyección se visualizó en la región del SCN como se observa en la figura 14.



**Figura 14.** Trayectorias de microinyección en el SCN izquierdo (A) o derecho (B).

## Análisis Morfométrico del Ovario

A la autopsia se extrajeron los ovarios (izquierdo y derecho), se pesaron en una balanza analítica y fueron fijados con solución de Bouin, incluidos en paraplast y finalmente se realizaron cortes seriados de 10  $\mu\text{m}$  de grosor. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina y analizados al microscopio óptico con un ocular micrométrico (10X). Se midieron los diámetros perpendiculares de todos los folículos que presentaron el núcleo y el nucléolo del ovocito. De acuerdo con la clasificación de Hirshfield y Midgley (1978), los folículos fueron clasificados en pequeños (90-390  $\mu\text{m}$  de diámetro), medianos (391-500  $\mu\text{m}$  de diámetro) o preovulatorios (mayor a 501  $\mu\text{m}$  de diámetro). Estos mismos fueron divididos en sanos o atrésicos, considerando como signos de atresia folicular: descamación de las células de la granulosa al interior del antro, engrosamiento de las tecas, picnosis en el núcleo de las células de la granulosa y/o alteraciones morfológicas en el ovocito.

## Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa Prisma 8.4.01, GraphPad. El número de ovocitos liberados y la dinámica folicular se analizaron por pruebas no paramétricas; la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunn. Para comparación entre dos grupos se utilizó la prueba de U Mann Whitney. El porcentaje de animales ovulantes y animales con modificación del ciclo estral se analizó con una prueba exacta de Fisher. Aquellas diferencias cuya probabilidad sea igual o menor a 0.05 se consideraron como estadísticamente significativas.

## Resultados

### Animales intactos

El 100% de los animales intactos ovularon el día del estro vaginal y liberaron una mediana de 13.0, IQR 11-14 ovocitos. Al cuantificar los folículos ováricos de estos animales, se encontró una mediana de 144, IQR 123-161 folículos ováricos (pequeños: mediana 135, IQR 120-156, medianos: mediana 3, IQR 1-8, preovulatorios: mediana 2, IQR 1-4), de los cuales mediana 133, IQR 114-150 fueron sanos y mediana 9, IQR 9-13 atrésicos. Se consideró que el 100% de los animales tuvieron un ciclo estral de cuatro días de duración, ya que presentaron un estro, diestro-1, diestro-2 y proestro.

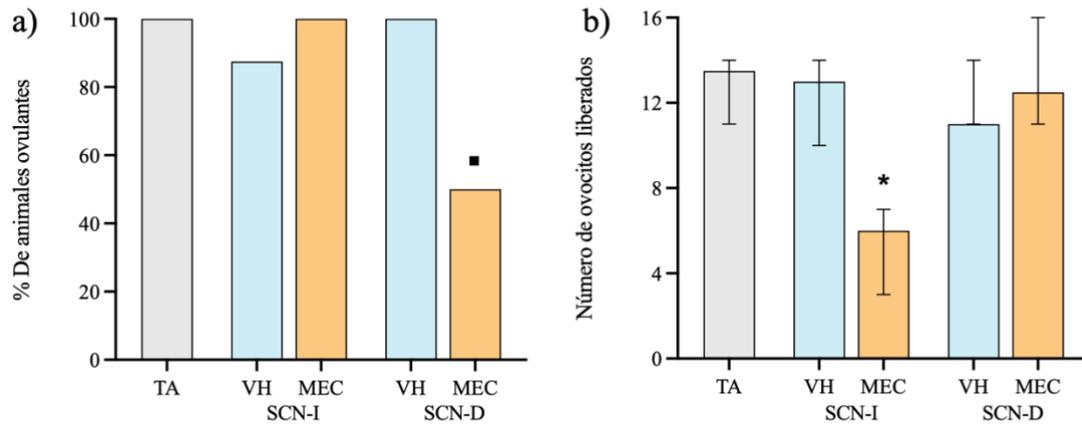
## Efecto de la microinyección de solución salina (vehículo) o mecamilamina en el SCN en el día del estro sobre las funciones ováricas

### Ovulación

En el día del estro, la microinyección de VH en el SCN izquierdo o derecho no modificó la proporción de animales ovulantes, ni el número de ovocitos liberados, en comparación con el grupo TA (Figura 15).

La microinyección de MEC en el SCN izquierdo no modificó el porcentaje de animales ovulantes (MEC SCN-I: 7/8 *vs.* VH SCN-I: 9/9, prueba exacta de Fisher), mientras la microinyección de MEC en el SCN derecho, resultó en el bloqueo de la ovulación del 50% de los animales en estudio, en comparación con el grupo VH (MEC SCN-D: 4/8 *vs.* VH SCN-D: 9/9,  $p < 0.05$ , prueba exacta de Fisher) (Figura 15a). El tratamiento con MEC en el SCN izquierdo resultó en la disminución del número de ovocitos liberados, en comparación con los animales microinyectados con VH (MEC SCN-I: mediana 6, IQR 3-7 *vs.* VH SCN-I: mediana 13, IQR 10-14,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), sin embargo, el número de ovocitos liberados de los animales microinyectados en el SCN derecho fue similar a los tratados con VH (MEC SCN-D: mediana 12, IQR 11-16 *vs.* VH SCN-D: mediana 11, IQR 11-14, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) (Figura 15b).

## Estro



**Figura 15. a)** Porcentaje de animales ovulantes y mediana-IQR del número de ovocitos liberados de ratas testigo absoluto (TA) o microinyectadas con solución salina (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del estro y sacrificadas al presentar el siguiente estro vaginal. <sup>■</sup> $p < 0.05$  vs. VH SCN-D (Prueba exacta de Fisher). **b)**  $*p < 0.05$  vs. VH SCN-I (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn).

## Desarrollo Folicular

La microinyección de VH en el SCN izquierdo o derecho no modificó el número de folículos totales, sanos, ni atrésicos, en comparación con los animales TA (Figura 16).

La microinyección de MEC en el SCN izquierdo o derecho resultó en la disminución del número de folículos totales (MEC SCN-I: mediana 120, IQR 94-124 *vs.* VH SCN-I: mediana 144, IQR 139-148; MEC SCN-D: mediana 107, IQR 101-116 *vs.* VH SCN-D: mediana 141, IQR 125-161,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney) y sanos (MEC SCN-I: mediana 94 IQR 72-103 *vs.* VH SCN-I: mediana 131, IQR 118-145,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney; MEC SCN-D: mediana 86, IQR 79-98 *vs.* VH SCN-D: mediana 134, IQR 119-154,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), mientras que el número de folículos atrésicos aumentó (MEC SCN-I: mediana 21 IQR 18-26 *vs.* VH SCN-I: mediana 7, IQR 6-13,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney; MEC SCN-D: mediana 23, IQR 22-27 *vs.* VH SCN-D: mediana 7, IQR 4-10,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) en comparación con su respectivo grupo microinyectado con VH (Figura 16).

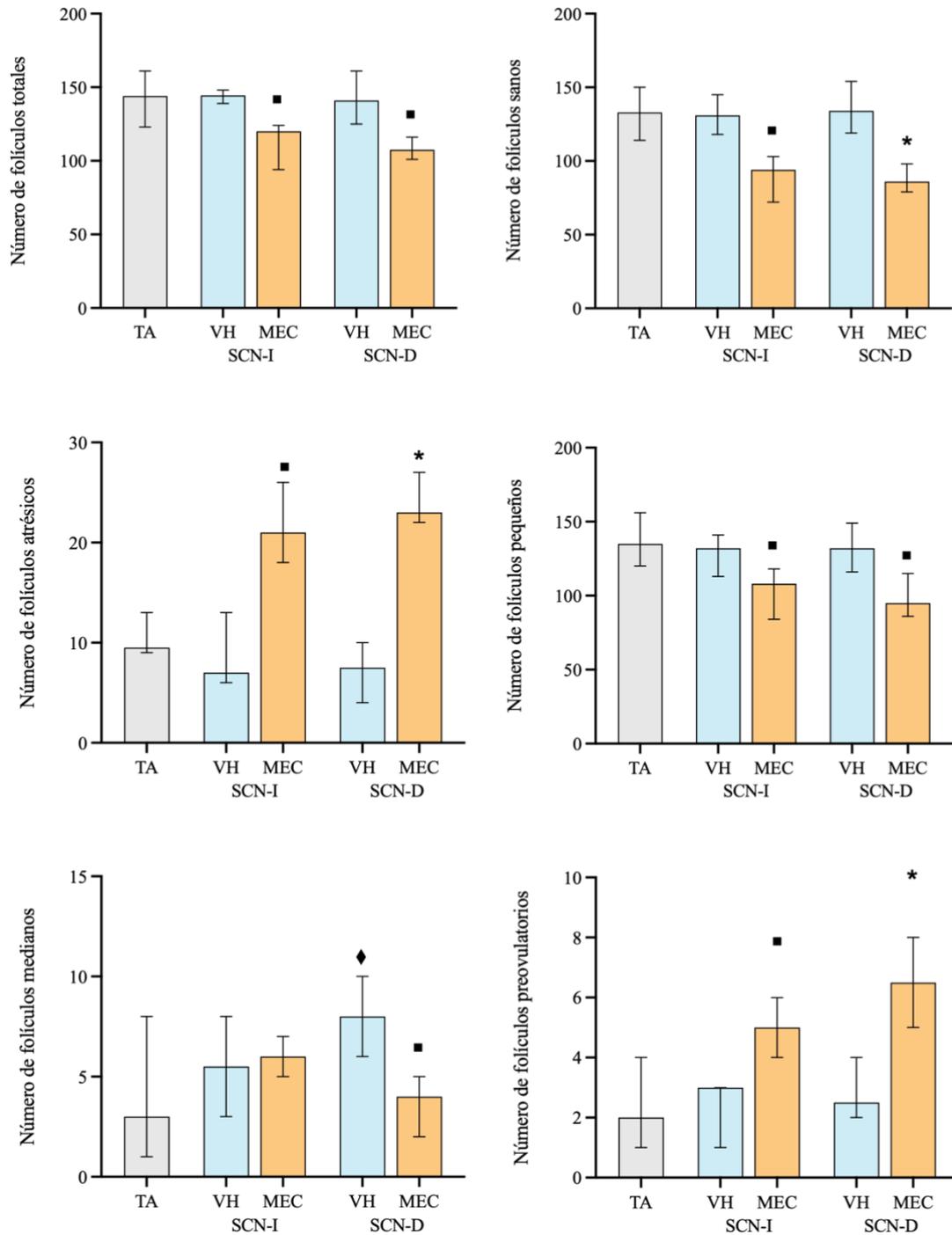
El número de folículos pequeños, medianos y pre-ovulatorios son similares entre los animales TA y los microinyectados con VH en el SCN izquierdo. De igual forma la microinyección de VH en el SCN derecho no modificó el número de folículos pequeños y pre-ovulatorios, sin embargo, si incrementó el número de folículos medianos (VH SCN-D mediana 8, IQR 6-10 *vs.* TA: mediana 3, IQR 1-8,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn) (Figura 16).

La microinyección de MEC en el SCN, independientemente del núcleo microinyectado, resultó en la disminución del número de folículos pequeños (MEC SCN-I: mediana 108, IQR 84-118 *vs.* VH SCN-I: mediana 132, IQR 113-141; MEC SCN-D: mediana 95, IQR 86-115 *vs.* VH SCN-D mediana 132, IQR 116-149,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney) y en el incremento de los folículos preovulatorios (MEC SCN-I: mediana 5, IQR 4-6 *vs.* VH SCN-I: mediana 3, IQR 1-3,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney; MEC SCN-D: mediana 6, IQR 5-8 *vs.* VH SCN-D mediana 2, IQR 2-4,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn). La microinyección de MEC en el SCN izquierdo no modificó el número de folículo medianos (MEC SCN-I:

mediana 6, IQR 5-7 vs. VH SCN-I: mediana 5, IQR 3-8, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), sin embargo, el tratamiento en el SCN derecho resultó en una disminución (MEC SCN-D: mediana 4, IQR 2-5 vs. VH SCN-D: mediana 8, IQR 6-10,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney), en comparación con los animales tratados con VH (Figura 16).

## Estro

### Dinámica Folicular



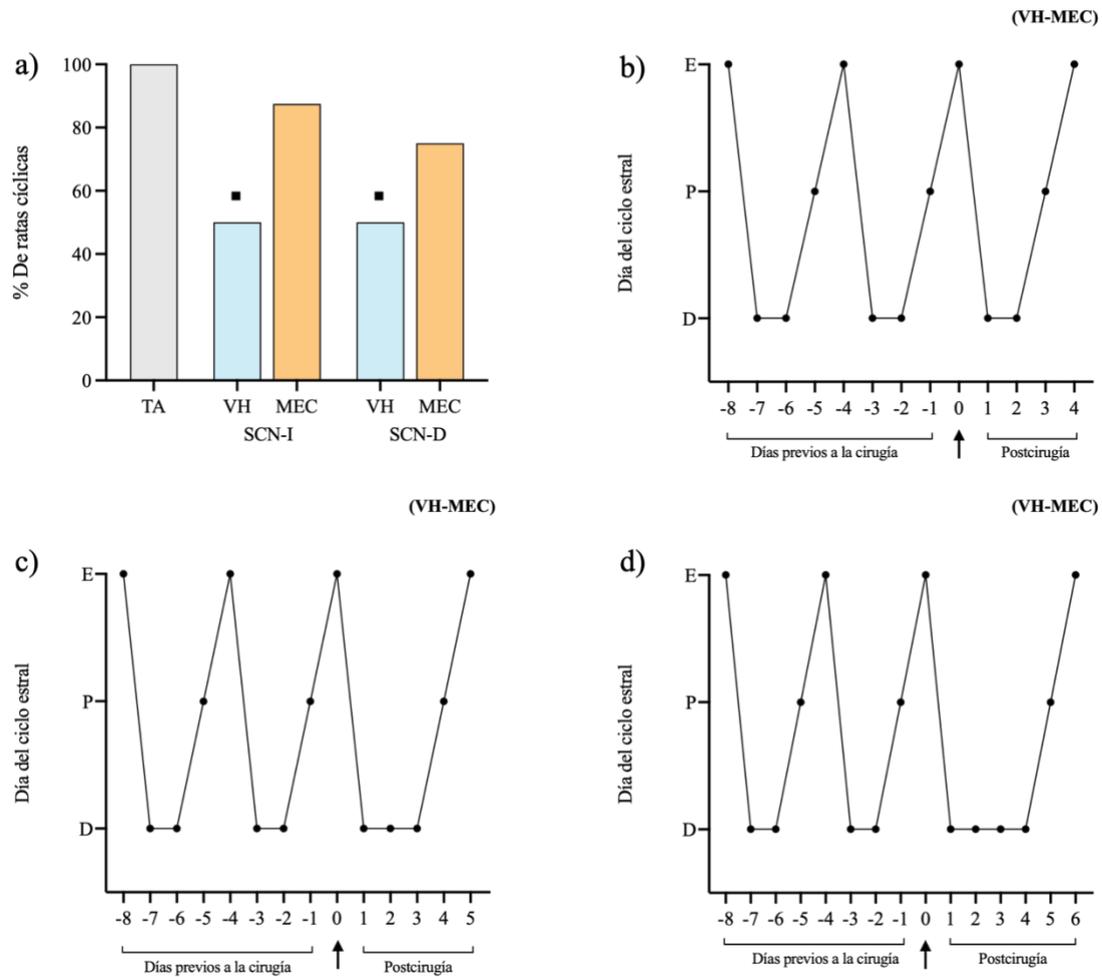
**Figura 16.** Mediana e IQR de la dinámica folicular de ratas testigo absoluto (TA) o sometidas a la microinyección de solución salina (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del estro y sacrificadas al siguiente estro vaginal. \* $p < 0.05$  vs. con respecto a su grupo VH (Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn). # $p < 0.05$  vs. con respecto a su grupo VH (Prueba de U Mann Whitney). ♦ $p < 0.05$  vs. TA (Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn).

## Ciclo Estral

La microinyección unilateral de VH en el SCN, modificó el ciclo estral del 50.0% de los animales tratados, en comparación con el grupo TA (VH SCN-I: 4/4; VH SCN-D: 4/4 *vs.* TA: 8/8,  $p < 0.05$ , prueba exacta de Fisher) (Figura 17a). Del 50.0% de los animales con alteración del ciclo estral, el 75.0% de estos animales presentaron en la citología vaginal abundancia de leucocitos durante tres días consecutivos, lo que indicó que se alargó la fase del diestro, por lo que el día del estro vaginal se presentó un día después del estro esperado (Figura 17c). Adicionalmente, se observó que un solo animal presentó cuatro días de diestro (Figura 17d).

La microinyección de MEC en el SCN izquierdo o derecho no modificó el patrón de ciclo estral (Figura 17b), ya que del 75.0% al 87.5%, de los animales presentaron un ciclo estral sin alteraciones (MEC SCN-I: 6/8; MEC SCN-D: 7/8 *vs.* TA: 8/8, prueba exacta de Fisher). Sin embargo, de los animales que presentaron alteración en su patrón de ciclo estral, presentaron un ciclo estral similar al representado en la figura 17d. Lo que retrasó el estro vaginal 48 horas en comparación con el esperado.

## Estro



**Figura 17. a)** Porcentaje de ratas sin alteración del ciclo estral (TA) o sometidas a la microinyección de vehículo (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del estro y sacrificadas al presentar el siguiente estro vaginal. \* $p < 0.05$  vs. TA (Prueba exacta de Fisher). **b)** Representación del patrón del ciclo estral sin alteración, de animales microinyectados con VH o MEC en el SCN-I o SCN-D. Cada punto representa un día del ciclo estral, el día 0 representa el día de la cirugía (flecha negra), en el eje de las ordenadas se representan los días del ciclo estral. **c)** Representación del patrón del ciclo estral con alteración, de animales microinyectados con VH o MEC en el SCN-I o SCN-D (Retraso de 24 horas). **d)** Representación del segundo tipo del ciclo estral con alteración, de animales microinyectados con VH o MEC en el SCN-I o SCN-D (Retraso de 48 horas).

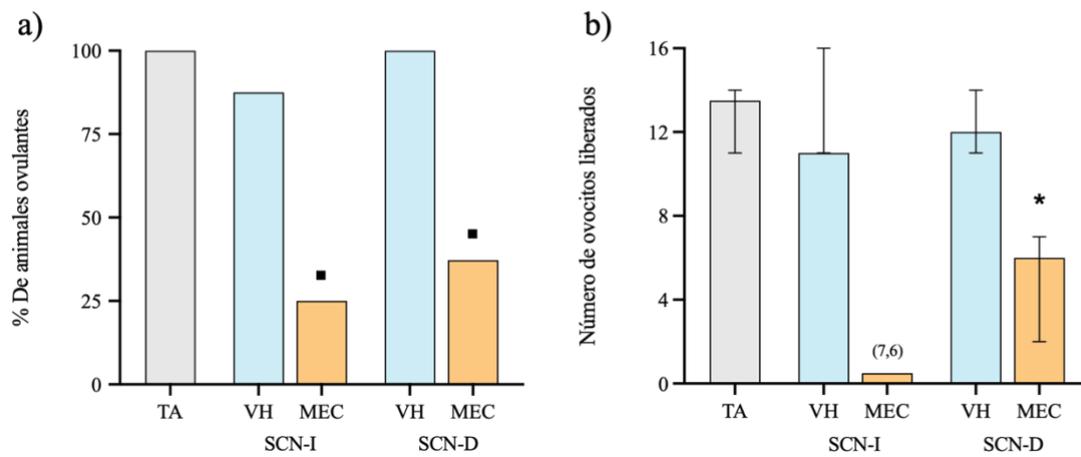
## Efecto de la microinyección de vehículo (VH) o mecamilamina (MEC) en el SCN en el día del diestro-1, sobre las funciones ováricas

### Ovulación

En el día del diestro-1, la microinyección de VH en el SCN izquierdo o derecho no modificó la proporción de animales ovulantes, ni el número de ovocitos liberados, en comparación con el TA (Figura 18).

La microinyección de MEC en el SCN izquierdo o derecho resultó en la disminución del porcentaje de animales ovulantes, ya que solo ovularon entre el 25.0 y 37.2 % de los animales (MEC SCN-I: 2/8 vs. VH SCN-I: 7/8; MEC SCN-D: 3/8 vs. VH SCN-D: 9/9,  $p < 0.05$ , prueba exacta de Fisher), en comparación con su respectivo grupo microinyectado con VH (Figura 18a). En comparación con la microinyección de VH, la microinyección de MEC en el SCN izquierdo, resultó en la disminución del número de ovocitos liberados por parte de los animales que ovularon (7 y 6 ovocitos totales, respectivamente). La microinyección de MEC en el SCN derecho resultó en la disminución significativa del número de ovocitos liberados (MEC SCN-D: mediana 6, IQR 2-7 vs. VH SCN-D: mediana 12, IQR 11-14,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) (Figura 18b).

## Diestro-1



**Figura 18.** a) Porcentaje de animales ovulantes y mediana-IQR del número de ovocitos liberados de ratas testigo absoluto (TA) o microinyectadas con solución salina (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del diestro-1 y sacrificadas al estro vaginal. \* $p < 0.05$  vs. VH SCN-D (Prueba exacta de Fisher). b) \* $p < 0.05$  vs. VH SCN-I (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn).

## Desarrollo Folicular

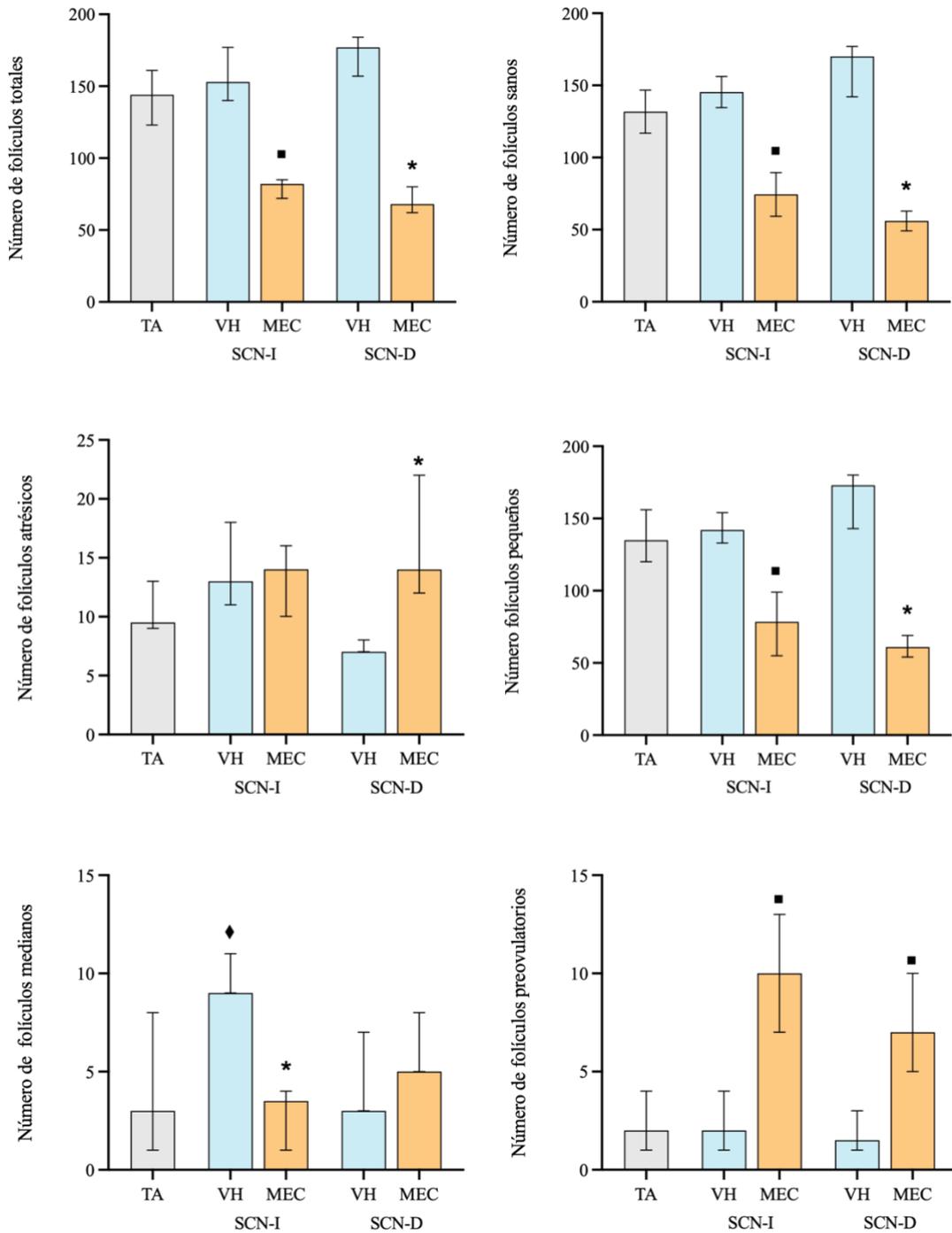
La microinyección de VH en el SCN izquierdo o derecho no modificó el número de folículos totales, sanos ni atrésicos, en comparación con el grupo TA (Figura 19). Mientras que, la microinyección de MEC en el SCN izquierdo o derecho resultó en la disminución del número de folículos totales (MEC SCN-I: mediana 82, IQR 72-85 vs. VH SCN-I: mediana 153, IQR 140-177,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney; MEC SCN-D: mediana 68, IQR 62-80 vs. VH SCN-D: mediana 177, IQR 157-184,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn) y sanos (MEC SCN-I: mediana 72, IQR 58-98 vs. VH SCN-I: mediana 146, IQR 129-159,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney; MEC SCN-D: mediana 55, IQR 47-66 vs. VH SCN-D: mediana 170, IQR 142-177,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn) en comparación con su respectivo grupo microinyectado con VH (Figura 19). Por otro lado, la microinyección de MEC en el SCN izquierdo no modificó el número de folículos atrésicos (MEC SCN-I: mediana 14, IQR 10-16 vs. VH SCN-I: mediana 13, IQR 11-18, prueba de U Mann-Whitney), sin embargo, la microinyección en el SCN derecho, resultó en el incremento del número de folículos atrésicos, en comparación con los animales microinyectados con VH (MEC SCN-D: mediana 14, IQR 12-22 vs. VH SCN-D: mediana 7, IQR 7-8,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn) (Figura 19).

Al clasificar los folículos, en función de su tamaño, se observó que la microinyección de VH en el SCN izquierdo o derecho no modificó el número de folículos pequeños o preovulatorios, en comparación con el grupo TA (Figura 19). De igual forma, la microinyección de VH en el SCN derecho no modificó el número de folículos medianos, mientras que la microinyección en el SCN izquierdo, resultó en el incremento en estos folículos, en comparación con el grupo TA (VH SCN-I: mediana 9, IQR 9-11 vs. TA: mediana 3, IQR 1-8,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn) (Figura 19). Independientemente del SCN microinyectado con MEC, el número de folículos pequeños disminuyó, en comparación con su grupo VH (MEC SCN-I: mediana 78, IQR 55-99 vs. VH SCN-I: mediana 142, IQR 133-154,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney; MEC SCN-D: mediana 61, IQR 54-69 vs. VH SCN-D: mediana 173, IQR 143-180,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn). La microinyección de MEC en el SCN izquierdo, no modificó el número de folículos

medianos cuando se compara con el TA (MEC SCN-I: mediana 3, IQR 1-4 vs. TA: mediana 3, IQR 1-8, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn). Efectos similares fueron observados cuando se microinyectó la MEC en el SCN derecho, en comparación con su grupo VH (MEC SCN-D: mediana 5, IQR 5-8 vs. VH SCN-D: mediana 3, IQR 3-7, prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn). Finalmente incrementó el número de folículos preovulatorios, en comparación con los animales tratados con VH (MEC SCN-I: mediana 10, IQR 7-13 vs. VH SCN-I: mediana 2, IQR 1-4; MEC SCN-D: mediana 7, IQR 5-10 vs. VH SCN-D: mediana 1, IQR 1-3,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney) (Figura 19).

## Diestro-1

### Dinámica Folicular



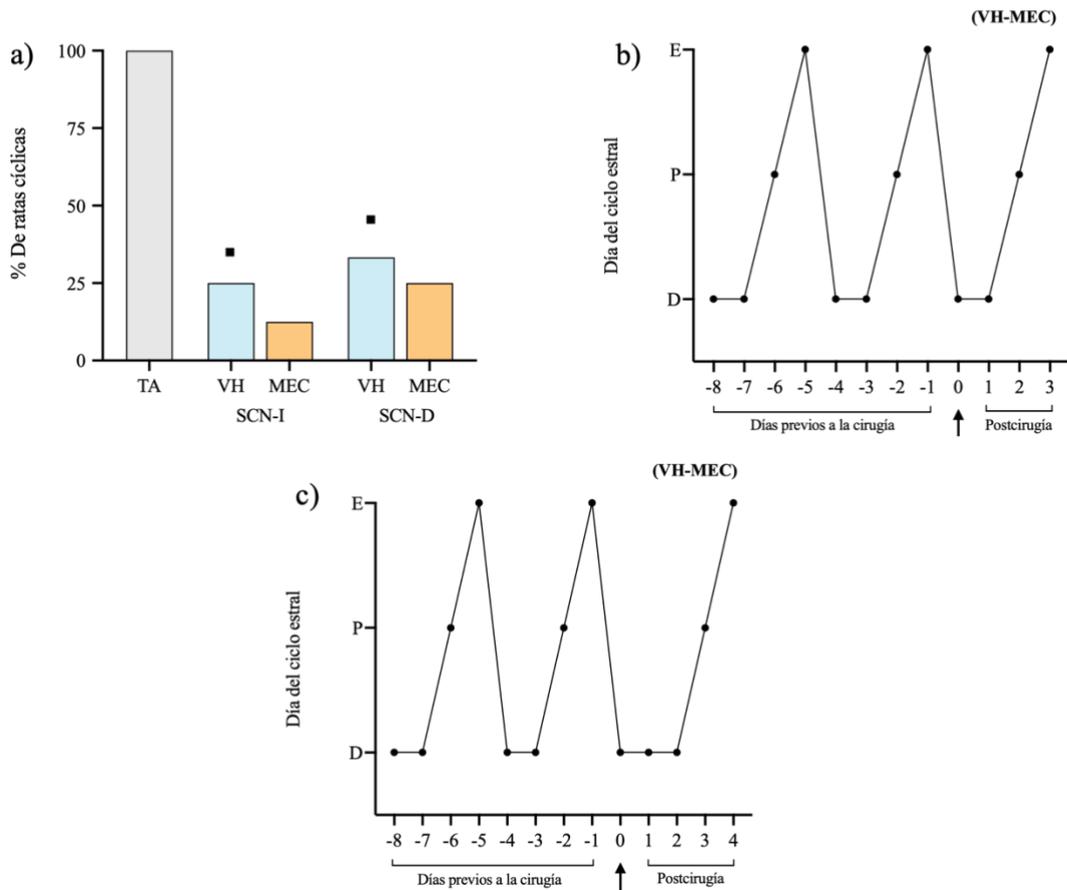
**Figura 19.** Mediana y IQR de la dinámica folicular de ratas testigo absoluto (TA) o sometidas a la microinyección de solución salina (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del diestro-1 y sacrificados al estro vaginal. \* $p < 0.05$  vs. respecto a su grupo VH (Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn). ■  $p < 0.05$  vs. respecto a su grupo VH (Prueba de U Mann Whitney). ◆  $p < 0.05$  vs. TA (Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn).

## Ciclo Estral

Cuando se analizó el ciclo estral de los animales microinyectados con VH o MEC, se observó que del 75% al 87.5 % de los animales se les modificó el patrón del ciclo estral, independientemente del tratamiento o SCN estudiado (VH SCN-I: 2/8; VH SCN-D: 3/9; MEC SCN-I: 1/8; MEC SCN-D: 2/8 vs. TA: 8/8,  $p < 0.05$ , prueba exacta de Fisher) (Figura 20a).

En la Figura 20, se representa el patrón de un ciclo estral sin alteración (panel b) o con alteración (panel c). Los animales con alteración del ciclo estral, fueron sacrificados 24 horas después del estro esperado. Después de la cirugía, en el frotis vaginal permanecieron leucocitos, característicos de las etapas del diestro-1/diestro-2, por lo que a estos animales se les alargó la etapa del diestro 24 horas.

## Diestro-1



**Figura 20. a)** Porcentaje de ratas sin alteración del ciclo estral (TA) o sometidas a la microinyección de vehículo (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del diestro-1 y sacrificadas al estro vaginal. \* $p < 0.05$  vs. TA (Prueba exacta de Fisher). **b)** Representación del patrón del ciclo estral sin alteración, de animales microinyectados con VH o MEC en el SCN-I o SCN-D. Cada punto representa un día del ciclo estral, el día 0 representa el día de la cirugía (flecha negra), en el eje de las ordenadas se representan los días del ciclo estral. **c)** Representación del patrón del ciclo estral con alteración, de animales microinyectados con VH o MEC en el SCN-I o SCN-D.

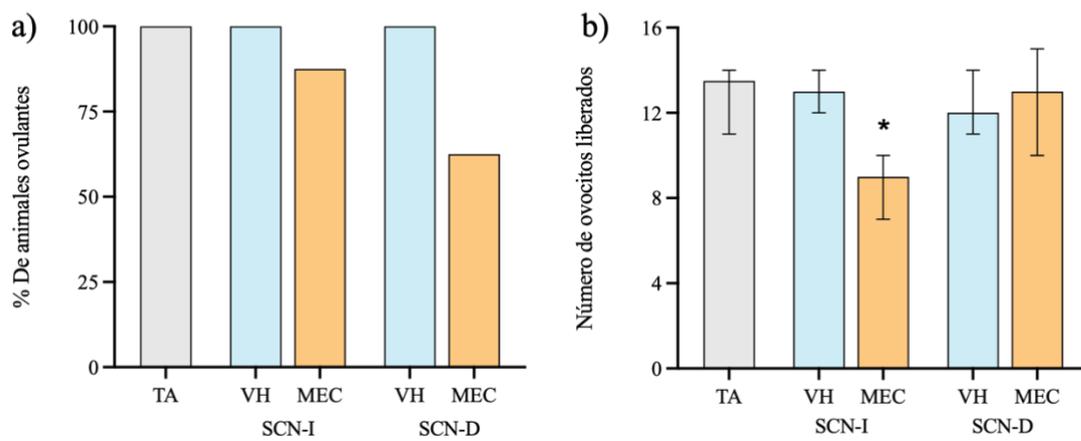
## Efecto de la microinyección de solución salina (vehículo) o mecamilamina (MEC) en el SCN en el día del diestro-2 sobre las funciones ováricas

### Ovulación

En el día del diestro-2, la microinyección de VH en el SCN izquierdo o derecho no modificó el porcentaje de animales ovulantes ni el número de ovocitos liberados, en comparación con animales TA (Figura 21).

El tratamiento con MEC en el SCN izquierdo, no modificó la proporción de animales ovulantes, en comparación con el grupo microinyectado con VH (MEC SCN-I: 7/8 vs. VH SCN-I: 8/8, prueba exacta de Fisher), sin embargo, disminuyó el número de ovocitos liberados (MEC SCN-I: mediana 9, IQR 7-10 vs. VH SCN-I: mediana 13, IQR 12-14,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) (Figura 21). En los animales microinyectados con MEC en el SCN-D, hay una tendencia a la disminución en el porcentaje de animales ovulantes, sin llegar a ser estadísticamente significativa ya que únicamente en el 37.5 % de los animales tratados se bloqueó la ovulación (MEC SCN-D: 5/8 vs. VH SCN-D: 8/8, prueba exacta de Fisher). De los animales que ovularon, no se modificó el número de ovocitos liberados, en comparación con su grupo VH (MEC SCN-D: mediana 13, IQR 10-15 vs. VH SCN-D: mediana 12, IQR 11-14, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) (Figura 21).

## Diestro-2



**Figura 21. a)** Porcentaje de animales ovulantes y mediana-IQR del número de ovocitos liberados de ratas testigo absoluto (TA) o microinyectadas con solución salina (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del diestro-2 y sacrificadas al estro vaginal. **b)** \* $p < 0.05$  vs. VH SCN-I (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn).

## Desarrollo Folicular

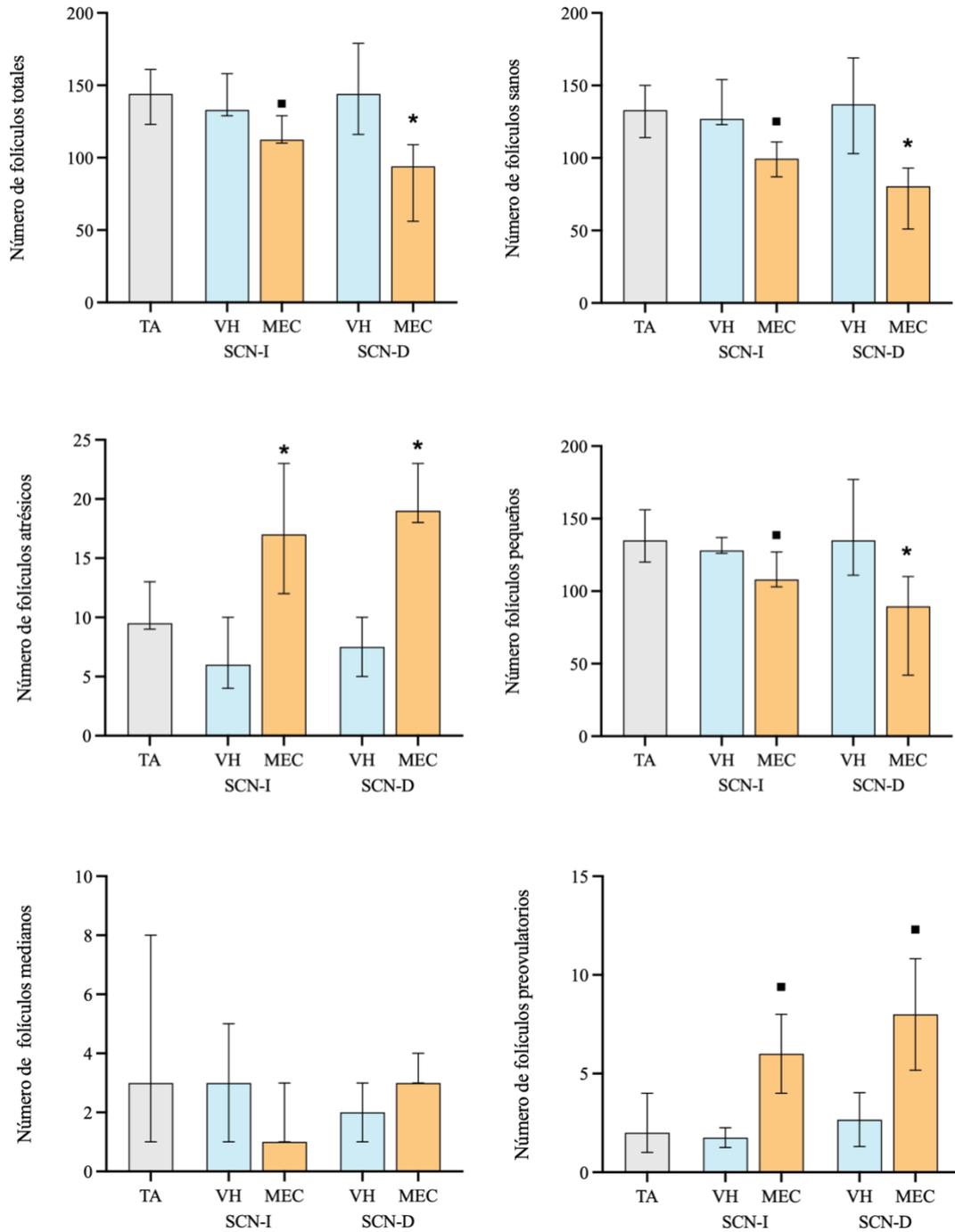
Sin importar el SCN estudiado, el tratamiento con VH no modificó el número de folículos totales, sanos ni atrésicos, en comparación con los encontrados en animales TA (Figura 22).

La microinyección de MEC en cualquiera de los SCN decrementó el número de folículos totales (MEC SCN-I: mediana 112, IQR 110-129 vs. VH SCN-I: mediana 133, IQR 129-158,  $p < 0.05$ , prueba de U Matt-Whiney; MEC SCN-D: mediana 94, IQR 56-109 vs. VH SCN-D: mediana 144, IQR 116-179,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) y sanos (MEC SCN-I: mediana 99, IQR 87-111 vs. VH SCN-I: mediana 127, IQR 123-154,  $p < 0.05$ , prueba de U Matt-Whiney; MEC SCN-D: mediana 80, IQR 51-93 vs. VH SCN-D: mediana 137, IQR 103-169,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), e incrementó el número de folículos atrésicos (MEC SCN-I: mediana 17, IQR 12-23 vs. VH SCN-I: mediana 6, IQR 4-10; MEC SCN-D: mediana 19, IQR 18-23 vs. VH SCN-D: mediana 7, IQR 5-10,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), en comparación con su grupo VH (Figura 22).

La microinyección de VH en cualquiera de los SCN, no modificó el número de folículos pequeños, medianos o preovulatorios en comparación a los animales TA. Sin embargo, la microinyección de MEC resultó en la disminución en el número de folículos pequeños (MEC SCN-I: mediana 108, IQR 103-127 vs. VH SCN-I: mediana 128, IQR 126-137;  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney; MEC SCN-D: mediana 89, IQR 42-110 vs. VH SCN-D: mediana 135, IQR 111-177;  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), sin modificar los medianos (MEC SCN-I: mediana 1, IQR 1-3 vs. VH SCN-I: mediana 3, IQR 1-5; MEC SCN-D: mediana 3, IQR 3-4 vs. VH SCN-D: mediana 2, IQR 1-3; prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) e incrementó el número de los preovulatorios MEC SCN-I: mediana 6, IQR 3-9 vs. VH SCN-I: mediana 2, IQR 1-2; MEC SCN-D: mediana 7, IQR 5-11 vs. VH SCN-D: mediana 3, IQR 1-4;  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney), en comparación con las ratas microinyectadas con VH (Figura 22).

## Diestro-2

### Dinámica Folicular

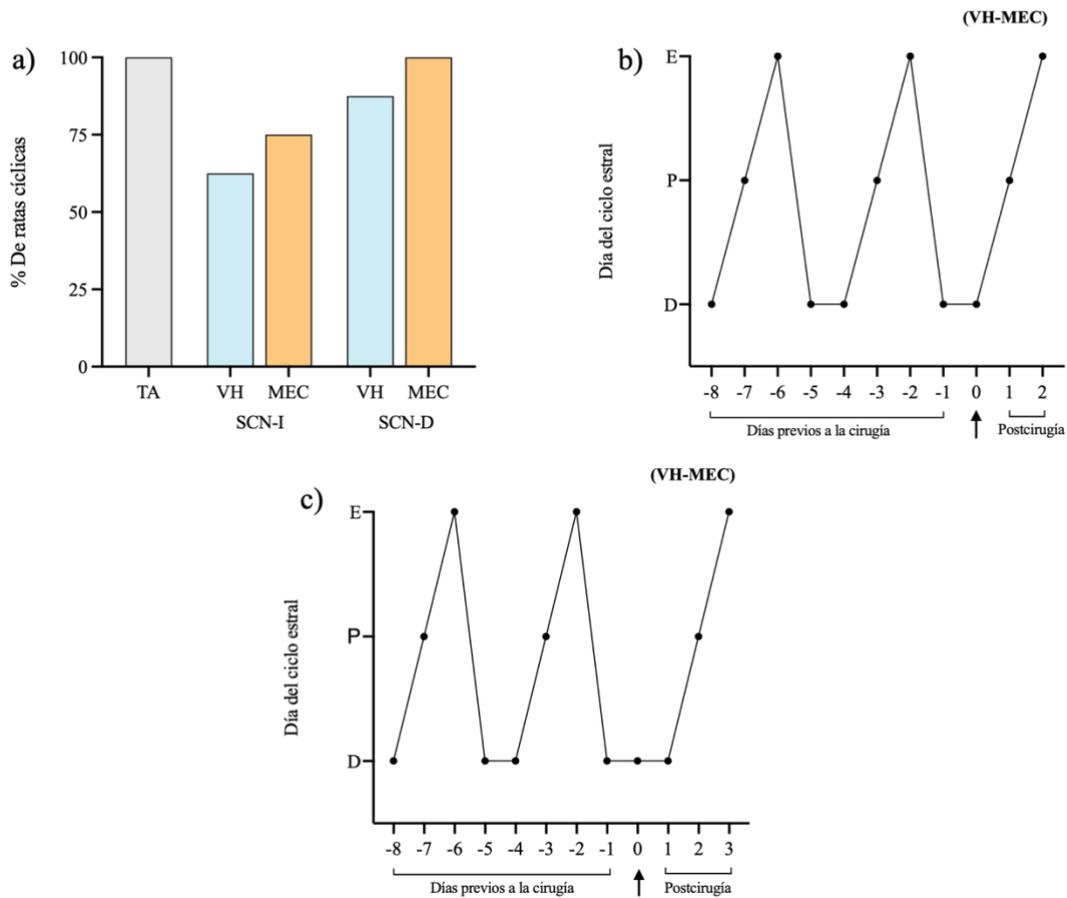


**Figura 22.** Mediana e IQR de la dinámica folicular de ratas testigo absoluto (TA) o sometidas a la microinyección de solución salina (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del diestro-2 y sacrificados al estro vaginal. \*p < 0.05 vs. con respecto a su grupo VH (Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn). ■p < 0.05 vs. con respecto a su grupo VH (Prueba de U Mann Whitney).

## Ciclo Estral

La microinyección de VH o MEC en el SCN derecho no modificó el porcentaje de animales con ciclos estrales regulares, en comparación con el grupo TA (VH SCN-D: 7/8; MEC SCN-D: 8/8 vs. TA: 8/8, prueba exacta de Fisher) (Figura 23a). En los animales microinyectados con VH o MEC del 62.5 % al 75.0 % de estos, coincidió el estro vaginal con el estro esperado (Figura 23a). Sin importar el tratamiento, aquellos animales que presentaron un ciclo estral con alteraciones después de la cirugía, en la citología vaginal se observaron leucocitos típicos de los días del diestro, por lo que estos animales permanecieron en un diestro 24 horas más que los animales sin alteración del ciclo estral (Figura 23c).

## Diestro-2



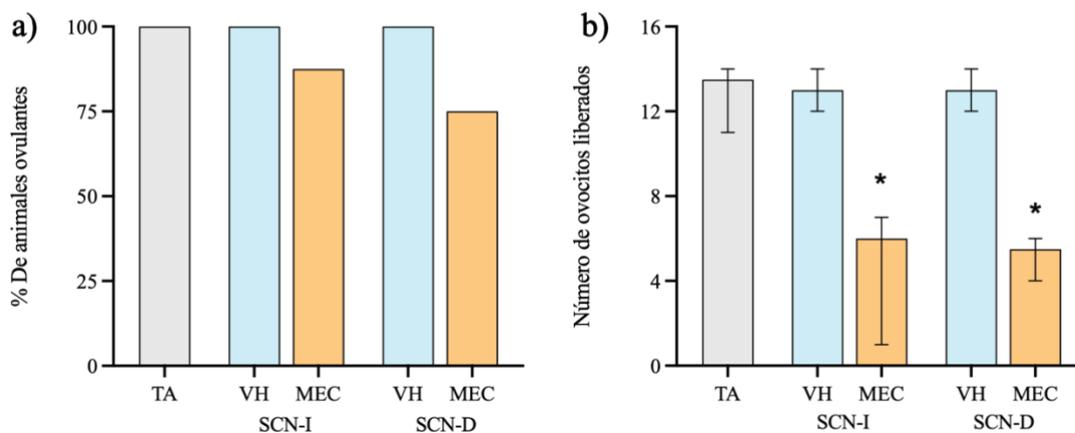
**Figura 23. a)** Porcentaje de ratas sin alteración del ciclo estral (TA) o sometidas a la microinyección de vehículo (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del diestro-2 y sacrificadas al estro vaginal. **b)** Representación del patrón del ciclo estral sin alteración, de animales microinyectados con VH o MEC en el SCN-I o SCN-D. Cada punto representa un día del ciclo estral, el día 0 representa el día de la cirugía (flecha negra), en el eje de las ordenadas se representan los días del ciclo estral. **c)** Representación del patrón del ciclo estral con alteración, de animales microinyectados con VH o MEC en el SCN-I o SCN-D.

## Efecto de la microinyección de solución salina (vehículo) o mecamilamina en el SCN en el día del proestro sobre las funciones ováricas

### Ovulación

En el día del proestro, la microinyección de VH o MEC en cualquiera de los núcleos no modificó el porcentaje de animales ovulantes, en comparación con el grupo TA (VH SCN-I: 8/8; VH SCN-D: 8/8; MEC SCN-I: 7/8; MEC SCN-D: 6/8 vs. TA: 8/8, prueba exacta de Fisher) (Figura 24a). El número de ovocitos liberados no se modificó en animales microinyectados con VH en el SCN izquierdo o derecho, en comparación con el grupo TA. Mientras que, la microinyección de MEC en cualquiera de los SCN resultó en la disminución del número de ovocitos liberados (MEC SCN-I: mediana 6, IQR 1-7 vs. VH SCN-I: mediana 13, IQR 12-14; MEC SCN-D: mediana 5, IQR 4-6 vs. VH SCN-D: mediana 13, IQR 12-14,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) (Figura 24b).

### Proestro



**Figura 24.** a) Porcentaje de animales ovulantes y mediana-IQR del número de ovocitos liberados de ratas testigo absoluto (TA) o microinyectadas con solución salina (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del diestro-2 y sacrificadas al estro vaginal. b) \* $p < 0.05$  vs. VH SCN-I (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn).

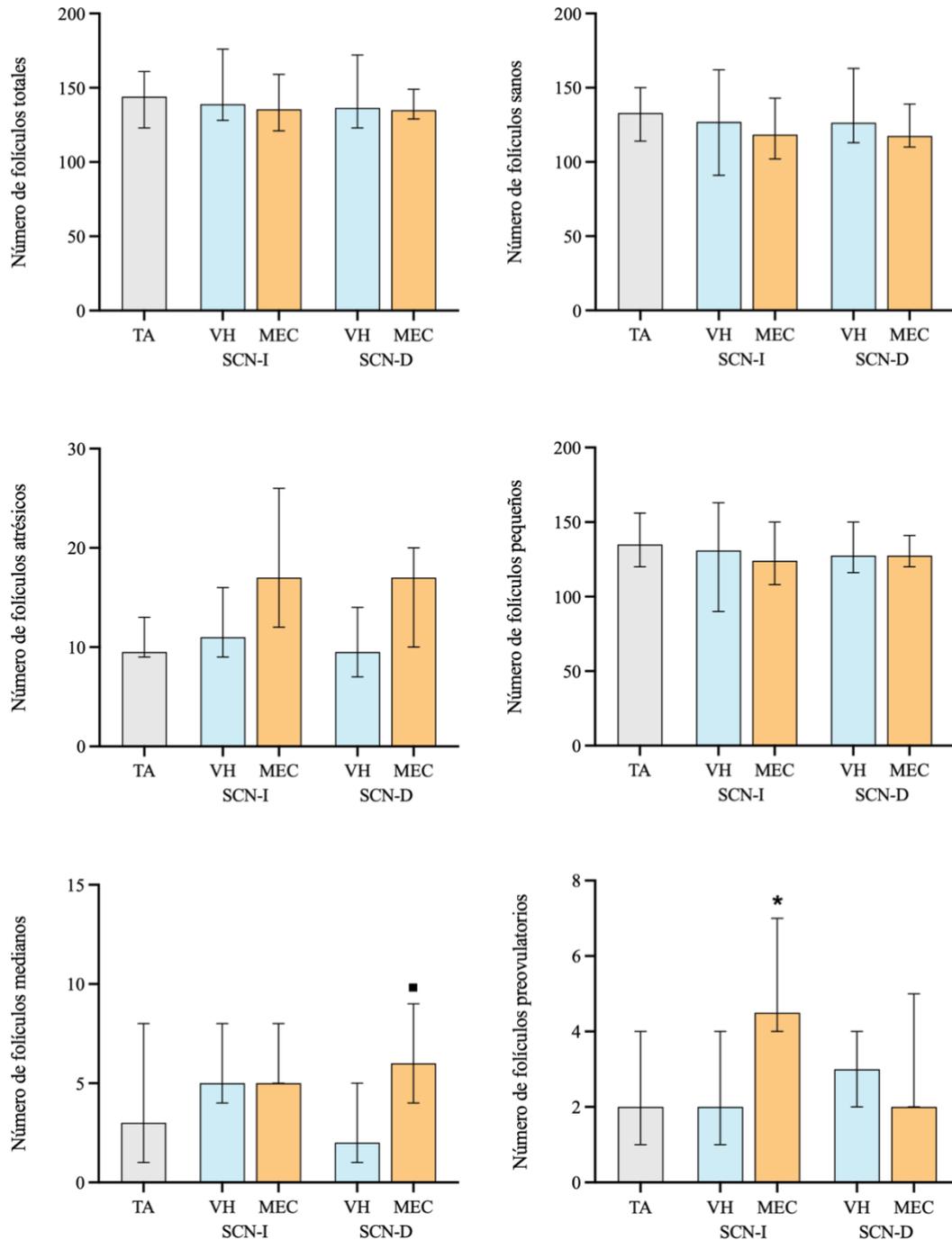
## Desarrollo Folicular

La microinyección unilateral de VH, no modificó el número de folículos totales, sanos y atrésicos, en comparación con los animales TA (Figura 25). Al igual que el VH, la microinyección de MEC en cualquiera de los SCN, no modificó el número de folículos totales (MEC SCN-I: mediana 135, IQR 121-159 vs. VH SCN-I: mediana 139, IQR 128-176; MEC SCN-D: mediana 135, IQR 129-149 vs. VH SCN-D: mediana 136, IQR 123-172, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), sanos (MEC SCN-I: mediana 118, IQR 102-143 vs. VH SCN-I: mediana 127, IQR 91-162; MEC SCN-D: mediana 117, IQR 110-139 vs. VH SCN-D: mediana 126, IQR 113-163, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) ni atrésicos (MEC SCN-I: mediana 17, IQR 12-26 vs. VH SCN-I: mediana 11, IQR 9-16; MEC SCN-D: mediana 17, IQR 10-20 vs. VH SCN-D: mediana 9, IQR 7-14, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), en comparación con su respectivo grupo microinyectado con VH (Figura 25).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de folículos pequeños, medianos ni preovulatorios de animales microinyectados con VH en el SCN izquierdo o derecho, en comparación con el grupo TA (Figura 25). La microinyección de MEC en el SCN izquierdo, no modificó el número de folículos pequeños (MEC SCN-I: mediana 124, IQR 108-150 vs. VH SCN-I: mediana 131, IQR 90-163, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), ni medianos (MEC SCN-I: mediana 5, IQR 5-8 vs. VH SCN-I: mediana 5, IQR 4-8, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn), en comparación con su grupo VH, sin embargo, incrementó el número de folículos preovulatorios (MEC SCN-I: mediana 4, IQR 4-7 vs. VH SCN-I: mediana 2, IQR 1-4,  $p < 0.05$ , prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) (Figura 25). Por otro lado, la microinyección de MEC en el SCN derecho, incrementó el número de folículos medianos en comparación con el grupo VH (MEC SCN-D: mediana 6, IQR 4-9 vs. VH SCN-D: mediana 2, IQR 1-5,  $p < 0.05$ , prueba de U Mann-Whitney), en tanto que el número de folículos pequeños (MEC SCN-D: mediana 127, IQR 120-141 vs. VH SCN-D: mediana 127, IQR 116-150, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) y preovulatorios (MEC SCN-D: mediana 2, IQR 2-5 vs. VH SCN-D: mediana 3, IQR 2-4, prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn) no se modificaron (Figura 25).

## Proestro

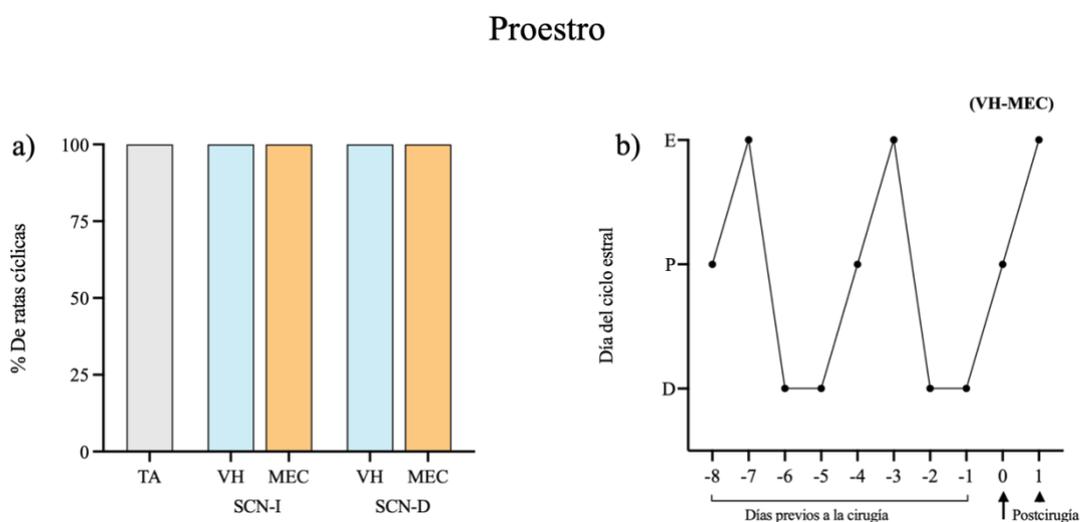
### Dinámica Folicular



**Figura 25.** Mediana y IQR de la dinámica folicular de ratas testigo absoluto (TA) o sometidas a la microinyección de solución salina (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 horas del proestro y sacrificadas al estro vaginal. \* $p < 0.05$  vs. respecto a su grupo VH (Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn). ■ $p < 0.05$  vs. respecto su grupo VH (Prueba de U Mann Whitney).

## Ciclo Estral

En el día del proestro el 100% de los animales tratados con VH o MEC presentaron un ciclo estral sin alteraciones (Figura 26).



**Figura 26. a)** Porcentaje de ratas sin alteración del ciclo estral (TA) o sometidas a la microinyección de vehículo (VH) / mecamilamina (MEC) en el SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) a las 09:00 del proestro y sacrificadas al estro vaginal. **b)** Representación del patrón del ciclo estral sin alteración, de animales microinyectados con VH o MEC en el SCN-I o SCN-D. Cada punto representa un día del ciclo estral, el día 0 representa el día de la cirugía (flecha negra), en el eje de las ordenadas se representan los días del ciclo estral.

## Resumen de Resultados

En la tabla 2, se presenta un resumen de los efectos de la microinyección de MEC en el SCN izquierdo o derecho a las 09:00 horas de cada etapa del ciclo estral.

**Tabla 2. Efecto del bloqueo de los nAChRs con MEC en el SCN sobre la regulación de las funciones ováricas.** Las flechas rojas representan disminución en el parámetro analizado. Las flechas azules representan un incremento y el guion verde indica que no hubo diferencias en los parámetros analizados. Los cambios observados son respecto a los grupos microinyectados con VH en el SCN izquierdo o derecho.

		Porcentaje de Animales Ovulantes	Número de Ovocitos Liberados	Número de Folículos Totales	Número de Folículos Sanos	Número de Folículos Atrésicos	Número de Folículos Pequeños	Número de Folículos Medianos	Número de Folículos Pre-ovulatorios	Alteración del ciclo estral
Estro	SCN-I	—	↓	↓	↓	↑	↓	—	↑	NO
	SCN-D	↓	—	↓	↓	↑	↓	—	↑	NO
Diestro-1	SCN-I	↓	↓	↓	↓	—	↓	—	↑	SI
	SCN-D	↓	↓	↓	↓	↑	↓	—	↑	SI
Diestro-2	SCN-I	—	↓	↓	↓	↑	↓	—	↑	NO
	SCN-D	—	—	↓	↓	↑	↓	—	↑	NO
Proestro	SCN-I	—	↓	—	—	—	—	—	↑	NO
	SCN-D	—	↓	—	—	—	—	↑	—	NO

## Discusión

Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que entre las 09:00-11:00 horas de cada día del ciclo estral la información colinérgica que arriba al SCN, así como aquella que se genera en él, es mediada por los nAChRs y regula de manera estimulante el desarrollo folicular y la ovulación, dicha regulación tiene mayor participación en los días previos al día de la ovulación.

En la rata hembra, se ha sugerido que existen señales nerviosas colinérgicas y noradrenérgicas que exhiben un patrón diario de actividad en cada día del ciclo estral y que regulan las funciones reproductivas (Domínguez y Smith, 1974; Domínguez *et al.*, 1982;1987). Mediante la inyección sistémica de atropina, se analizó la participación del sistema colinérgico en la ovulación, se observó que el bloqueo de los mAChRs resultó en la disminución del número de animales ovulantes, efecto que depende del día y la hora en la cual se administra la atropina (Domínguez *et al.*, 1982). En el presente estudio, la microinyección unilateral de mecamilamina en el SCN en cada día del ciclo estral, independientemente del SCN microinyectado, resultó en la disminución del número de ovocitos liberados, lo cual nos permite sugerir que en la mañana de cada día del ciclo estral existe una señal colinérgica proveniente de cada SCN, mediada por los nAChRs, que participa el desarrollo folicular y la ovulación. Tomadas en conjunto estas evidencias, podemos sugerir que en la regulación de las funciones ováricas se requiere de la participación de los mAChRs y de los nAChRs.

Previamente reportamos que en el día del diestro-1, el bloqueo de los mAChRs del SCN, por la microinyección de atropina, no modifica la respuesta ovárica (Vieyra *et al.*, 2016), en el presente estudio observamos que en los días previos a la ovulación, el bloqueo de los nAChRs del SCN con mecamilamina, resulta en la disminución del número de folículos en crecimiento y del número de ovocitos liberados, por lo que sugerimos que durante el diestro-1, las señales neurales colinérgicas que surgen del SCN, y que son mediadas por los nAChRs, regulan de manera estimulante el desarrollo folicular y la ovulación.

Domínguez y colaboradores (1982), reportan que a las 09:00 h del diestro-1, la administración sistémica de atropina resulta en el bloqueo total de la ovulación, efectos análogos se observaron cuando la aplicación de los implantes de atropina fue focalizada en el POA (Cruz *et al.*, 1989). Los resultados del presente estudio son similares a los efectos que se obtienen después de bloquear a los mAChRs de todo el sistema o de un área específica del sistema nervioso central, ya que la microinyección de mecamilamina entre las 09:00-10:00 horas del diestro-1 en cualquiera de los SCN, resultó en la disminución significativa del porcentaje de animales ovulantes y en la disminución del número de ovocitos liberados. Lo cual se podría explicar, por el aumento de los folículos preovulatorios observados en los cortes histológicos de los ovarios, indicándonos posiblemente que dichos folículos no recibieron la señal de gonadotropinas necesarias para que el folículo expulsara al ovocito, posiblemente por una alteración a nivel de la comunicación, entre las señales colinérgicas producidas en el SCN y el POA.

Diversos estudios han explicado la participación de la GnRH y de las gonadotropinas en la regulación de la maduración de los folículos ováricos y la biosíntesis de hormonas esteroideas y proteicas (Arai *et al.*, 1996; Arai *et al.*, 1998; Orisaka *et al.*, 2013). En ratas, la administración intravenosa del antisuero a la GnRH (GnRH-AS) en el diestro-1, inhibe el desarrollo folicular, esta inhibición está acompañada por la disminución en la concentración sérica de la LH, el estradiol, la progesterona y la inhibina, sin embargo, la concentración de la FSH fue mayor. Los autores proponen que este incremento es el resultado de la disminución en la secreción de la inhibina, ya que dicha hormona inhibe la secreción de la FSH a nivel hipofisiario (Arai *et al.*, 1998). Por estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado que en células de la granulosa incubadas con la FSH, disminuye la expresión del receptor a la FSH casi de manera inmediata al estímulo con la gonadotropina, sin embargo, después de 72 horas, la expresión de estos receptores aumenta progresivamente hasta llegar a un punto máximo (Tano *et al.*, 1999). En nuestro estudio, la disminución en el número de ovocitos liberados podría ser el resultado de la inhibición de las señales que regulan de manera estimulante la secreción de la GnRH, de tal forma que la disminución de la GnRH podría resultar en el incremento de la FSH, resultado así en la disminución de la secreción de la inhibina. El incremento de la FSH podría disminuir la expresión o sensibilidad de los receptores a la FSH en los folículos ováricos, lo que explicaría la disminución en el crecimiento folicular (Noguchi *et al.*, 1993; Stamatiades *et al.*, 2019). Por lo tanto, sugerimos que en la mañana del

diestro-1, se originan señales colinérgicas que surgen del SCN, mediadas por los nAChRs y estimulan la secreción de la GnRH.

El bloqueo de los nAChRs del SCN, resultó en el incremento de los folículos atrésicos. Diversos grupos de investigación han demostrado que el estradiol y la FSH funcionan como factores de supervivencia y evitan que los folículos se vuelvan atrésicos (Ginther *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2019). Arai y colaboradores (1998), mostraron que, en ratas hembra, el uso de un antagonista a la GnRH durante el diestro-1, disminuye la concentración de estradiol e incrementa la de la FSH. Este decremento de la señal estrogénica, aunado a la disminución en la expresión de receptores a la FSH en los folículos ováricos, podría resultar en el incremento de la atresia folicular.

Al bloquear los receptores nicotínicos del SCN en el diestro-1, se observó que a pesar de que hubo una disminución en el número de folículos totales, el número de folículos preovulatorios incrementó, de los cuales el 71%, presentó signos de atresia. Considerando que la administración intravenosa de un antagonista de la GnRH durante el diestro-1, disminuye la secreción de la LH a lo largo del ciclo estral (Arai *et al.*, 1998), posiblemente los folículos preovulatorios no fueron capaces de liberar al ovocito por ser atrésicos, ya que se ha planteado que esta gonadotropina tiene un efecto inhibitorio en la atresia de los folículos preovulatorios (Erickson y Danforth, 1995). Cabe resaltar que en ratas con lesión eléctrica del SCN disminuye la expresión del promotor a la GnRH y la secreción de la LH (Ma *et al.*, 1990), efecto similar al que se consigue con el bloqueo de las señales colinérgicas mediante la microinyección de atropina en el SCN (Vieyra *et al.*, 2016).

Se ha planteado que la disminución del desarrollo folicular está acompañada de una menor concentración de la LH y de estradiol (Arai *et al.*, 1998). La LH está implicada en la secreción de andrógenos en células de la teca, los cuales son aromatizados en las células de la granulosa hasta su biotransformación a estrógenos (Drummond, 2006). La biosíntesis de estrógenos está relacionada con la maduración de los folículos ováricos, se sabe que conforme incrementa el número de folículos preovulatorios, incrementa la concentración de estradiol (Hiller, 1981; Drummond, 2006). Cabe resaltar que, la liberación preovulatoria de la LH requiere de la integración de una señal neural proveniente del SCN y una señal estrogénica de los ovarios, que le indica al hipotálamo

que los folículos están preparados para liberar al ovocito. Con base en nuestros resultados, planteamos que en aquellos animales a los cuales se les bloqueó el sistema nicotínico del SCN, posiblemente la señal estrogénica proveniente de los ovarios se retrasó como resultado de la disminución en el desarrollo folicular. Esto nos podría indicar un retraso en la liberación preovulatoria de la LH y por lo tanto que los animales no ovularan en el estro vaginal.

En ratas adultas de la cepa CII-ZV, la liberación preovulatoria de la LH ocurre a las 17:00 horas del proestro (Domínguez-González *et al.*, 1998). En el presente estudio, sugerimos que el bloqueo de los nAChRs del SCN en el diestro-1, resulta en el retraso de la liberación preovulatoria de la LH en aproximadamente 24 horas, ya que los animales presentaron un estro vaginal un día después del estro esperado. En el diestro-1, el bloqueo sistémico de los mAChRs provoca un retraso de 24 horas del estro vaginal, retraso que se pierde tras la inyección de la hormona coriónica humana (hCG), la cual simula los efectos de la LH, por lo que los autores sugieren que la alteración de las señales neuroendocrinas inducidas por la atropina al inicio del ciclo estral resulta en un retraso de 24 horas en la liberación de gonadotropinas (Domínguez *et al.*, 1982). En el estudio de Arai y colaboradores (1998), en el grupo con inyección intravenosa de vehículo, el pico preovulatorio de la LH ocurre en la tarde del proestro, sin embargo, la inhibición de la secreción de la GnRH con GnRH-AS en el diestro-1, retrasa aproximadamente 24 horas la secreción preovulatoria de la LH. Estos resultados respaldan la idea de que el bloqueo de los nAChRs del SCN podría retrasar la secreción de la GnRH/LH 24 horas, lo que explicaría el alargamiento del ciclo estral.

Hasta el momento, el retraso del estro vaginal se lo hemos atribuido a las señales colinérgicas que surgen en el SCN, sin embargo, la microinyección de solución salina en cualquiera de los SCN también alargó el ciclo estral 24 horas. Este efecto del ciclo estral, se presentó cuando se realizaron las microinyecciones de solución salina durante el diestro-1 y parcialmente en el estro, lo cual puede ser explicado por la activación del eje del estrés. Se sabe, que el incremento de los corticosteroides puede inhibir la secreción de GnRH/gonadotropinas y bloquear la ovulación (Kalantaridou *et al.*, 2010), también puede alterar el patrón de ciclo estral en la rata (Pollart *et al.*, 1975). El implante de cánulas a nivel de SCN modifica el patrón de ciclo estral, y aparentemente los animales se ven más afectados si la cirugía se realiza en los días del diestro-1 o estro (Silva *et al.*,

2019). Los autores analizaron los cortes histológicos de cerebro de los animales canulados, y no encontraron cambios estructurales entre los cerebros de ratas con alteración del ciclo estral, y los cerebros de ratas que conservaron su patrón de ciclicidad, por lo que sugieren que la alteración del ciclo estral, es el resultado de la susceptibilidad individual al estrés de los animales (Silva *et al.*, 2019). Esto explica el hecho de que, en el presente estudio, el tratamiento con solución salina pero no con mecamilamina en el día del estro resulta en la alteración del ciclo estral.

En el presente estudio, la microinyección de mecamilamina en el SCN izquierdo o derecho en el diestro-2, no modificó el porcentaje de animales ovulantes, sin embargo, se presentó una tendencia al bloqueo cuando se realizó la microinyección en el SCN derecho. Estos resultados son similares a los reportados por Cruz y colaboradores (1989), donde 5/7 ratas con implantes de cristales de atropina en el POA-AHA derecho ovularon. A su vez, se ha descrito que existe una comunicación ipsilateral entre el SCN y las neuronas GnRHérgicas localizadas en el POA-AHA (de la Iglesia, 2003). Las evidencias, en conjunto con nuestros resultados, nos hacen sugerir que durante el diestro-2 surge una señal ipsilateral proveniente del SCN derecho, que regula la actividad de las neuronas GnRHérgicas en el POA-AHA derecho y regula la ovulación. El estudio histológico de los ovarios de los animales que no ovularon después de la microinyección de mecamilamina en el SCN derecho, mostró que los folículos preovulatorios eran atrésicos, lo que explica el bloqueo parcial de la ovulación en los animales tratados en diestro-2 del lado derecho del SCN.

A diferencia del tratamiento con mecamilamina en el SCN derecho, la microinyección en el SCN izquierdo, si disminuyó el número de ovocitos liberados. Al revisar la morfometría ovárica observamos que incrementó el número de folículos preovulatorios, de los cuales el 92 % presentaban signos de atresia, lo cual nos explicaría la disminución en el número de ovocitos liberados. Estos resultados se asemejan a los presentados por Arai y colaboradores (1998), donde el tratamiento con un antagonista a GnRH en ratas adultas durante el diestro-2, resulta en la disminución significativa del número de ovocitos liberados acompañado con la disminución en la secreción de la LH y el estradiol. Dado que este efecto se pierde tras la administración de hCG, los autores sugieren que la secreción tónica de la LH durante esta fase es importante para el desarrollo folicular y la secreción de las hormonas esteroideas. Estos resultados, en conjunto con los

reportados en el presente estudio nos permiten sugerir que durante el diestro-2, el SCN podría estar modulando la secreción tónica de la GnRH/LH, el desarrollo folicular y la ovulación. A su vez, esta disminución en el número de ovocitos liberados podría ser el resultado de un menor desarrollo folicular e incremento de la atresia. Este efecto puede ser explicado por un posible decremento de los factores de supervivencia y secreción de la FSH y la LH al inhibirse las señales GnRHérgicas (Arai *et al.*, 1998).

En nuestro laboratorio, hemos mostrado el papel de los receptores colinérgicos presentes en el SCN en la regulación de las funciones ováricas. Así, el bloqueo de los mAChRs durante la mañana del proestro, resulta en el bloqueo de la ovulación e inhibe la secreción preovulatoria de la LH (Vieyra *et al.*, 2016). A su vez, la estimulación de los nAChRs del SCN, acelera el crecimiento folicular, e incrementa la secreción de estradiol, en respuesta a un mayor número de folículos preovulatorios, lo cual explica el incremento en el número de ovocitos liberados (Vieyra *et al.*, 2019). En el presente estudio, el bloqueo de los nAChRs, realizado en el día del proestro, disminuyó el número de ovocitos liberados sin modificar el porcentaje de animales ovulantes, lo que nos permite sugerir que la ovulación es regulada por las señales colinérgicas del SCN, a través de ambos tipos de receptores colinérgicos.

Cuando se realizó el bloqueo de los mAChRs con atropina se sugirió que las señales colinérgicas del SCN, mediadas por los mAChRs, únicamente participan en la mañana del proestro, ya que, el mismo tratamiento en el diestro-1 no modificó la respuesta ovárica (Vieyra *et al.*, 2016). A diferencia del presente, el bloqueo unilateral de los nAChRs del SCN disminuye la respuesta ovárica sin importar el día del ciclo estral en el cual se realiza la microinyección de mecamilamina, lo que nos permite sugerir que los nAChRs participan activamente modulando las señales colinérgicas del SCN durante todo el ciclo estral, mientras que los mAChRs tienen mayor participación en el día del proestro.

Durante el proestro, la microinyección de nicotina en el SCN resulta en el incremento del desarrollo folicular, sugiriendo una regulación estimulante por parte de los nAChRs del SCN (Vieyra *et al.*, 2019). El tratamiento con fluido folicular porcino (pFF), el cual tiene un efecto antagónico de la FSH, no modifica el desarrollo folicular, ni la secreción de gonadotropinas, por lo que, durante este día, la FSH no participa en la regulación del desarrollo de los folículos (DePaolo *et al.*, 1979). Estas evidencias podrían

ayudarnos a explicar el porqué, en el día del proestro, el bloqueo de los nAChRs no modificó el crecimiento folicular.

En el presente estudio observamos que, en el día del proestro, el tratamiento con mecamilamina en el SCN izquierdo o derecho no modificó la proporción de animales ovulantes, lo que sugiere que el pico preovulatorio de la LH no se vio modificado, como cuando se bloquearon los mAChRs (Vieyra *et al.*, 2016), entonces, posiblemente los nAChRs durante el proestro no participan en la regulación de la secreción preovulatoria de las gonadotropinas. Cabe resaltar que, en este día, al igual que en el diestro-2, en el análisis morfométrico de los ovarios reveló un aumento en el número de folículos preovulatorios, lo cual explicaría la disminución en el número de ovocitos liberados.

Si bien sugerimos que los nAChRs no participan en la secreción de gonadotropinas durante el proestro, entonces, ¿Cómo se explica la disminución del número de ovocitos liberados? Previamente se ha descrito la comunicación multisináptica entre los ovarios y el sistema nervioso central (Gerendai *et al.*, 2009). Una vía descrita, es la conexión neural entre los ovarios y el núcleo del tracto solitario, núcleo que da origen al nervio vago, el cual presenta conexiones anatómicas con el SCN (Buijs *et al.*, 2014).

El SCN es uno de los núcleos hipotalámicos que regula la actividad de diversos órganos por vías multi-sinápticas, entre ellos la glándula adrenal, el hígado, el páncreas, el tejido graso, el corazón y los ovarios (Buijs, 2013; Leliavski y col., 2015). La regulación que ejerce el SCN sobre los órganos periféricos utiliza vías simpáticas y parasimpáticas. Buijs y Kalsbeek, (2001) han mostrado que las neuronas pre-autonómicas del PVN, proyectan vías simpáticas pre-ganglionares a la columna intermedio-lateral de la médula espinal, las cuales regulan la información simpática que llega a los órganos periféricos. Otras neuronas parasimpáticas del PVN proyectan neuronas hacia el núcleo dorsal motor del vago (DMV) y al núcleo del tracto solitario (NTS). La información simpática generada por algunos órganos periféricos regresa a la médula espinal a nivel de los estratos I y V del asta dorsal y llegan al hipotálamo, por sus sinapsis en el núcleo parabraquial. La información sensorial vagal generada en los órganos periféricos llega al NTS, es enviada al DMV y alcanza al hipotálamo por vías directas o indirectas a través del núcleo parabraquial (Buijs *et al.*, 2006; Buijs, 2013). Se ha mostrado que el SCN se comunica de forma directa con el NTS, uno de los centros donde se integra la información

sensorial (Travagli, 2007; Buijs *et al.*, 2014), los autores sugieren que ésta es una vía de comunicación directa entre el NTS y el SCN que puede proporcionar una vía de regulación entre el SCN y los órganos periféricos. Esta vía, podría alterarse por la inhibición de las señales eferentes del SCN, que son mediadas por los nAChRs.

Ramírez y colaboradores (2017), plantearon que posiblemente existe una señal nerviosa proveniente del SCN que llega al ovario a través del nervio ovárico superior (SON), y modifica la reactividad de los folículos a la LH de manera estimulante, lo que permite la ovulación. Ya que sugerimos que el bloqueo de los nAChRs del SCN durante el proestro no modifica la secreción de gonadotropinas, posiblemente el mecanismo por el cual disminuye el número de ovocitos liberados, sea por una vía nerviosa, donde las señales neurales entre el SCN y el NPV se vean inhibidas por el bloqueo de los nAChRs, lo cual impide que la información que se origina en el SON lleguen a los ovarios, modificando así la reactividad de los folículos preovulatorios a la LH, resultando en el bloqueo de la liberación de los ovocitos a pesar de que se origine el pico preovulatorio de la LH. No podemos descartar que la sensibilidad del ovario a las gonadotropinas dependa de las señales generadas por el SCN o por el propio ovario. Sellix *et al.* (2010), propusieron que los ritmos de sensibilidad ovárica a las gonadotropinas pueden deberse a que el propio ovario tiene su reloj circadiano.

Otra de las vías nerviosas por las cuales el SCN posiblemente regule la actividad de las funciones ováricas, es la vía parasimpática que viaja a través del nervio vago. Diferentes estudios han mostrado la participación del nervio vago en la regulación de las funciones ováricas (Morales-Ledesma *et al.*, 2004; Linares *et al.*, 2013), se ha observado que el SCN se comunica con los núcleos que dan origen al nervio vago como se describió anteriormente. En nuestro laboratorio, hemos observado que el nervio vago, en el animal con bloqueo del sistema muscarínico del SCN, tiene un papel estimulante en la regulación de la ovulación (García, 2016). Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir, que el bloqueo de las señales colinérgicas, mediadas por los nAChRs, del SCN, podrían alterar la vía parasimpática que regula la ovulación, lo que explicaría la disminución del número de ovocitos liberados. No se puede descartar que estas vías simpáticas/parasimpáticas que regulan las funciones ováricas, pudieran influenciar de igual manera en los resultados obtenidos durante el resto de los días reportados en el presente estudio.

En el día del estro, la microinyección de mecamilamina en el SCN derecho, bloqueó la ovulación en el 50 % de los animales. Cruz y colaboradores (1989) mostraron que el implante de cristales de atropina en el POA-AHA derecho, resulta en el bloqueo total de la ovulación de los animales, posiblemente esta diferencia en el porcentaje de bloqueo se deba al área del estudio y a la diferencia del horario de la cirugía, mientras que el implante de cristales de atropina se realizó a las 11:00 horas (Cruz *et al.*, 1989), en este estudio el bloqueo se realizó entre las 09:00-10:00 horas. Además, se ha observado que el bloqueo de las señales colinérgicas que afecta la respuesta ovárica está en función de la hora del tratamiento (Domínguez *et al.*, 1982), y del tipo de receptor colinérgico que se analiza y del SCN estudiado.

El bloqueo de los nAChRs del SCN durante el estro, resulta en la disminución del desarrollo folicular, aumento de la atresia y el número de folículos preovulatorios retenidos en los ovarios, este análisis morfométrico puede explicar el bloqueo de la ovulación de los animales microinyectados en el SCN derecho, y la disminución en el número de ovocitos liberados cuando se inyecta en el SCN izquierdo. Como se ha descrito previamente en este estudio, esta disminución podría ser explicada por la modificación de las señales neuroendocrinas que regulan al eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

En estudios electrofisiológicos se ha analizado la participación de los nAChRs en la generación de los potenciales de acción de las neuronas del SCN, se ha observado que el potencial de acción en neuronas del SCN puede ser estimulado por la luz o por el tratamiento con nicotina, dicho potencial se pierde con la previa administración de mecamilamina (Miller *et al.*, 1987). Posiblemente en nuestro estudio, el bloqueo de los nAChRs, inhibió una señal que se genera entre las 09:00-11:00 horas de cada día del ciclo estral en el SCN, y que regula la secreción de la GnRH/gonadotropinas, modificando así la respuesta ovárica.

Considerando que los nAChRs pertenecen a la familia de receptores de tipo *cys-loop*, la interrupción de corrientes de  $Ca^{2+}$  podría impedir la liberación de neurotransmisores del SCN. Los nAChRs permiten el flujo selectivo de iones al interior de la célula (Sanabria-Castro *et al.*, 2017), el estímulo de los nAChRs- $\alpha 7$  puede generar grandes corrientes de  $Ca^{2+}$  implicadas en la activación de las cascadas de señalización que

permiten la liberación de los neurotransmisores (Flores-Soto y Segura-Torres, 2005). Posiblemente la microinyección de mecamilamina en el SCN, podría interrumpir el flujo de  $Ca^{2+}$  impidiendo la liberación de los neurotransmisores involucrados en los circuitos neurales que regulan la actividad de las neuronas GnRHérgicas.

El SCN es considerado un núcleo de naturaleza colinérgica, ya que posee las enzimas necesarias para la síntesis y degradación de la ACh, a su vez, posee ambos tipos de receptores colinérgicos (mAChRs/nAChRs). Existen aferencias colinérgicas que podrían estar regulando la actividad de las neuronas del SCN (Bina *et al.*, 1993). Ejemplo de esto, es que la lesión del NMB con ácido quinolinico, un núcleo colinérgico que presenta eferencias hacia el SCN, resulta en la disminución en la expresión del VIP y de la AVP al igual que el mRNA de estos neurotransmisores, los autores sugieren que la ACh es esencial en el metabolismo de las neuronas del SCN (Madeira *et al.*, 2004).

Si bien la eliminación de las señales colinérgicas que llegan al SCN, resultan en la disminución de la expresión de los neurotransmisores VIP/AVP involucrados en la comunicación con las neuronas GnRHérgicas (Madeira *et al.*, 2004) y que los nAChRs se localizan en la porción dorsomedial del SCN (Van der Zee, 1991), sugerimos que posiblemente la vía AVPérgica es regulada por los nAChRs al inicio del ciclo estral, y que la microinyección de mecamilamina en el SCN, resulte en la inhibición de las señales AVPérgicas.

La AVP está involucrada en la comunicación indirecta entre el SCN y las neuronas GnRHérgicas (Funabashi *et al.*, 1999; Kalamatianos *et al.*, 2004; Manoheny y Smale, 2005; Williams *et al.*, 2011; Smarr *et al.*, 2012), por lo que sugerimos que la microinyección de mecamilamina bloquea las señales AVPérgicas del SCN, señales que estimulan la secreción de Kiss en otros núcleos hipotalámicos como el RP3V y el ARC (Williams *et al.*, 2011; Bayley y Silver, 2014). Hay que recordar que estos núcleos son el centro de convergencia entre las señales del SCN y las señales estrogénicas de los ovarios, que regulan la actividad de las neuronas GnRHérgicas, por lo que explicaría el hecho de que esta red de comunicación se pudiera afectar por la modificación en la secreción de estrógenos, debido a la disminución del desarrollo folicular, y la inhibición temporal de las señales colinérgicas en el SCN. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de

que la microinyección de mecamilamina afecte la vía de comunicación directa entre el SCN y las neuronas GnRHérgicas por VIP.

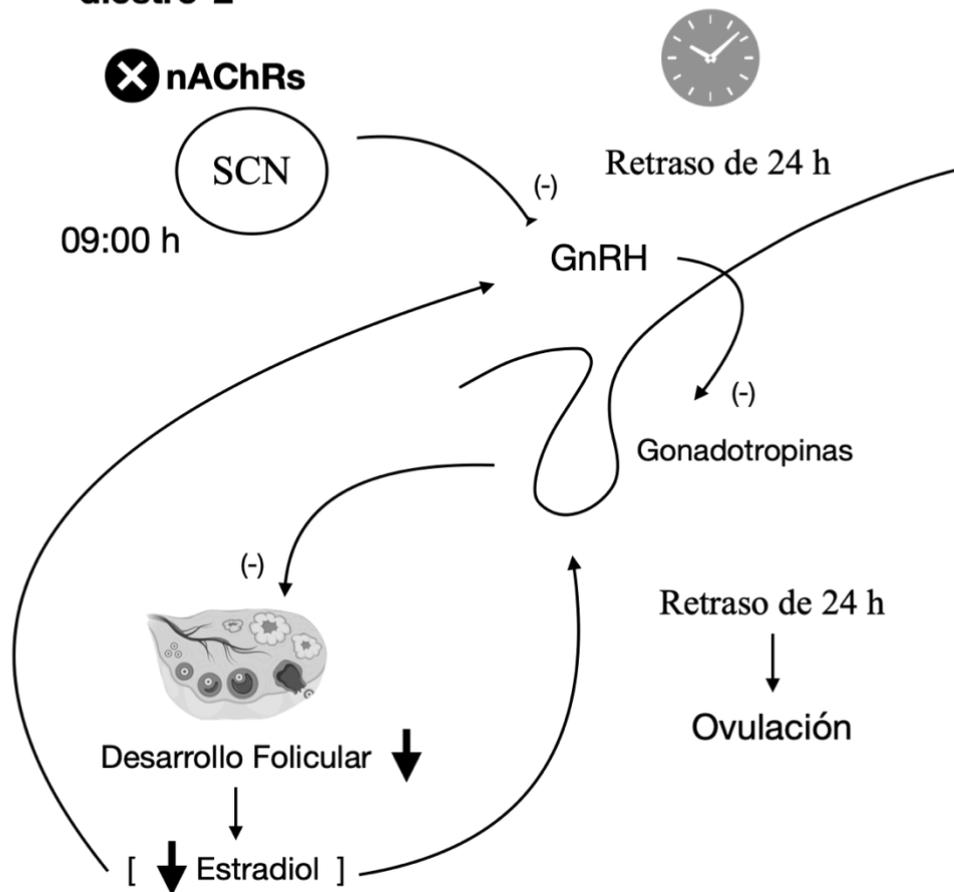
Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir la existencia de una señal colinérgica, mediada por los nAChRs, que surge en el SCN o que arriba a él entre las 09:00-11:00 horas de cada día del ciclo estral y que regula las funciones ováricas. Sin embargo, esta señal es particularmente importante en el día del diestro-1, donde podría participar en las diferentes señales, neuroendocrinas que regulan el desarrollo folicular y la ovulación.

## Modelos

Los resultados del presente estudio nos permiten plantear los siguientes modelos, por los cuales se podrían explicar los efectos del bloqueo farmacológico de los nAChRs del SCN, sobre la respuesta ovárica.

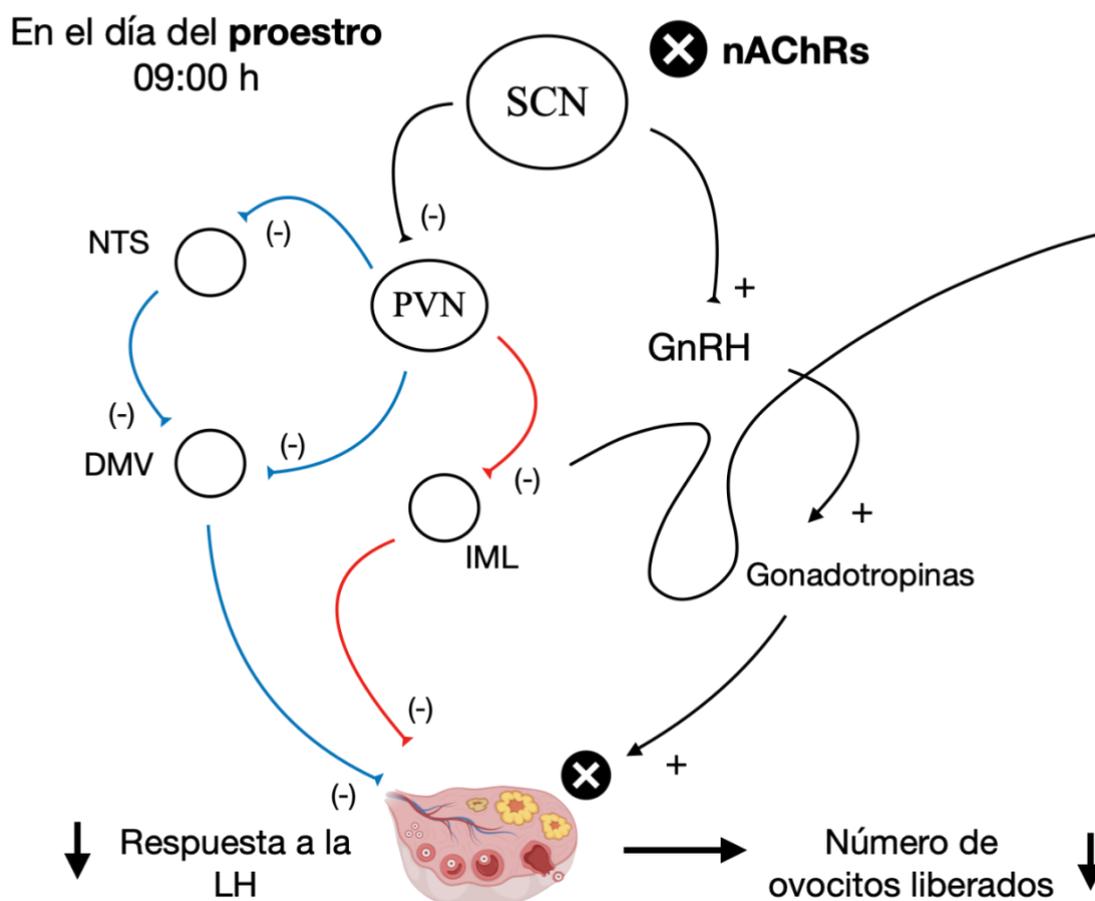
### Modelo 1

Durante los días del **estro, diestro-1 y diestro-2**



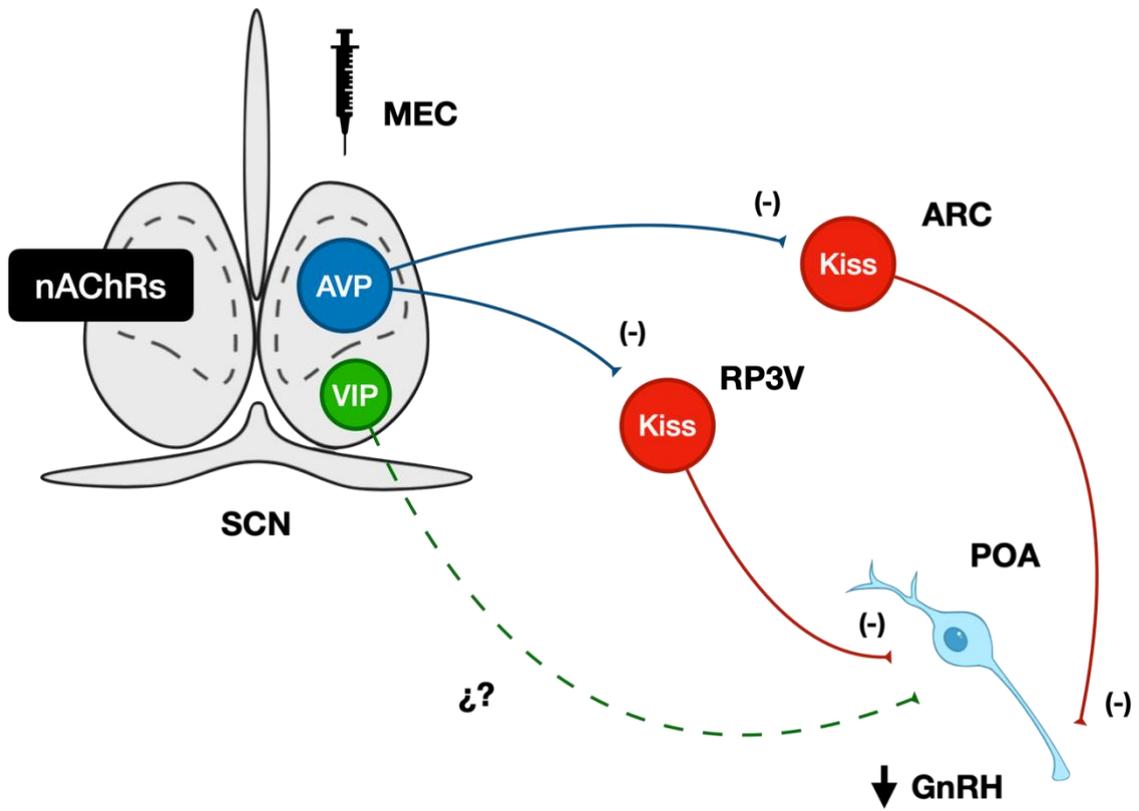
**Figura 27. Modelo 1.** Durante los días del estro, diestro-1 y diestro-2, las señales colinérgicas que se originan en el SCN o que arriban a él, son mediadas por los nAChRs y podrían estar regulando de manera estimulante la secreción de la GnRH/gonadotropinas. Por lo que, la inhibición de las señales colinérgicas originadas en el SCN resultaría en la disminución de la secreción de la GnRH/gonadotropinas y del desarrollo folicular, dando como resultado la disminución/retraso en la secreción de estradiol. Debemos considerar que para que ocurra la liberación preovulatoria de la LH y se dé la ovulación, se requiere de la integración de las señales circadianas del SCN con las señales estrogénicas del ovario en el hipotálamo, posiblemente el desfase de las señales neuroendocrinas podría explicar el retraso de la ovulación.

## Modelo 2



**Figura 28. Modelo 2.** Durante el proestro, las señales neurales colinérgicas que surgen y que llegan al SCN, podrían no participar en la regulación de la secreción de la GnRH/gonadotropinas, si no, en la regulación de las vías neurales simpáticas y/o parasimpáticas que regulan las funciones ováricas. Por lo tanto, planteamos que el bloqueo de los nAChRs del SCN, posiblemente dio como resultado la disminución de una señal colinérgica que podría estar inhibiendo la comunicación entre el PVN, los núcleos que dan origen al nervio vago (NTS, DMV) (vía parasimpática, líneas azules) y la columna intermediolateral (vía simpática, líneas rojas), lo que daría como resultado una menor reactividad de los folículos ováricos a las gonadotropinas (LH), explicando así la disminución en el número de ovocitos liberados.

### Modelo 3



**Figura 29. Modelo 3.** Se ha propuesto que la mayoría de los nAChRs se localizan en región dorsomedial del SCN, en dicha región se encuentran la mayoría de las neuronas que sintetizan la AVP, involucrada en la comunicación indirecta entre el SCN y las neuronas GnRHérgicas. En el presente modelo proponemos que la mecamilamina actúa en la región dorsomedial del SCN e inhibe las señales AVPérgicas del SCN que estimulan la secreción de Kiss en el RP3V y el ARC y que a su vez regulan la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y la ovulación.

## Conclusiones

La participación de las señales colinérgicas mediadas por los nAChRs del SCN en la regulación de la ovulación y del desarrollo folicular, dependen de la etapa del ciclo estral.

- Las señales colinérgicas mediadas por los nAChRs del SCN entre las 09:00-11:00 horas de cada día del ciclo estral, regulan de manera estimulante el desarrollo folicular y la respuesta ovulatoria.
- En los días del estro, diestro-1 y diestro-2, los nAChRs del SCN regulan de manera estimulante los mecanismos implicados en el desarrollo folicular y la ovulación. Mientras que la atresia folicular es regulada de manera inhibitoria.
- En el proestro, los nAChRs del SCN parecen no participar en la regulación del desarrollo folicular, pero si, en lo mecanismos que con llevan a la liberación de los ovocitos.
- Las señales mediadas por los nAChRs del SCN son necesarias para la sucesión del ciclo estral.
- En los días del estro y el diestro-2, los nAChRs del SCN regulan de manera asimétrica las funciones ováricas.

## Perspectivas

Los resultados del presente estudio, nos permite plantear las siguientes perspectivas:

1. Cuantificar la concentración de las gonadotropinas, de las hormonas esteroides, así como de la inhibina, con el fin de sustentar las hipótesis planteadas en el presente estudio.
2. Analizar la expresión de los nAChRs en el SCN en los días del estro, diestro-1, diestro-2 o proestro, para saber si la participación diferencial de las señales colinérgicas provenientes del SCN, se debe a la expresión diferencial de los nAChRs a lo largo del ciclo estral.
3. Cuantificar los receptores a las gonadotropinas en los folículos ováricos, con el fin de conocer sí el bloqueo de los nAChRs en el SCN, modifica la respuesta de los folículos a las gonadotropinas.
4. Analizar la participación de los nAChRs, en las vías AVPérgicas y VIPérgicas por las cuales el SCN regula la actividad de las neuronas GnRHérgicas.

## Referencias

- Abbott, S. M., Arnold, J. M., Chang, Q., Miao, H., Ota, N., Cecala, C., ... y Gillette, M. U. (2013). Signals from the brainstem sleep/wake centers regulate behavioral timing via the circadian clock. *PLoS One*, 8(8), e70481.
- Abrahamson, E. E., y Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain research*, 916(1-2), 172-191.
- Aguilar-Roblero, R., Guadarrama, P., Mercado, C., y Chávez, J. L. (2004). El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. *Temas Selectos de Neurociencia III*, 321–330.
- Ajayi, A. F., y Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility research and practice*, 6(1), 1-15.
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M., y Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological reviews*, 89(1), 73-120.
- Andersen, N., Corradi, J., Sine, S. M., y Bouzat, C. (2013). Stoichiometry for activation of neuronal  $\alpha 7$  nicotinic receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20819-20824.
- Antle, M. C., y Silver, R. (2005). Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends in neurosciences*, 28(3), 145-151.
- Arai, K., Ohshima, K. I., Watanabe, G., Arai, K., Uehara, K., y Taya, K. (1998). Inhibition of ovarian follicular development associated with a decrease in luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrine journal*, 45(4), 539-546.
- Arai, K., Watanabe, G., Taya, K., y Sasamoto, S. (1996). Roles of inhibin and estradiol in the regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone secretion during the estrous cycle of the rat. *Biology of reproduction*, 55(1), 127-133.
- Auersperg, N., Wong, A. S., Choi, K. C., Kang, S. K., y Leung, P. C. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine reviews*, 22(2), 255-288.
- Bailey, M., y Silver, R. (2014). Sex differences in circadian timing systems: implications for disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(1), 111-139.
- Barbacka-Surowiak, G., Surowiak, J., y Stokłosowa, S. (2003). The involvement of suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. *Reproductive biology*, 3(2), 99-129.

- Berga, S., y Naftolin, F. (2012). Neuroendocrine control of ovulation. *Gynecological Endocrinology*, 28(sup1), 9-13.
- Biello, S. M., Janik, D., y Mrosovsky, N. (1994). Neuropeptide Y and behaviorally induced phase shifts. *Neuroscience*, 62(1), 273-279.
- Bina, K. G., Rusak, B., y Semba, K. (1993). Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *Journal of Comparative Neurology*, 335(2), 295-307.
- Brown Grant, K., Murray, M. A. F., Raisman, G., y Sood, M. C. (1977). Reproductive function in male and female rats following extra- and intra hypothalamic lesions. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, 198(1132), 267-278.
- Brüel, A., Christensen, E. I., Trandum-Jensen, J., Qvortrup, K., y Geneser, F. (2015). Geneser histología (No. H200 GEN 4a. ed.). Ed. Panamericana. México.
- Buhr, E. D., Yoo, S. H., y Takahashi, J. S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330(6002), 379-385.
- Buijs, F. N., Cazarez, F., Basualdo, M. C., Scheer, F. A. J. L., Perusquía, M., Centurion, D., y Buijs, R. M. (2014). The suprachiasmatic nucleus is part of a neural feedback circuit adapting blood pressure response. *Neuroscience*, 266, 197-207.
- Buijs, R. M. (2013). The autonomic nervous system: a balancing act. *Handbook of clinical neurology*, 117, 1-11.
- Buijs, R. M., Scheer, F. A., Kreier, F., Yi, C., Bos, N., Goncharuk, V. D., y Kalsbeek, A. (2006). Organization of circadian functions: interaction with the body. *Progress in brain research*, 153, 341-360.
- Buijs, R. M., y Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(7), 521-526.
- Castañeyra-Ruiz, L., González-Marrero, I., Castañeyra-Ruiz, A., González-Toledo, J. M., Castañeyra-Ruiz, M., de Paz-Carmona, H., ... Castañeyra-Perdomo y Carmona-Calero, E. M. (2013). Luteinizing hormone-releasing hormone distribution in the anterior hypothalamus of the female rats. *International Scholarly Research Notices*, 201313, 1-6.
- Chappell, P. E., Goodall, C. P., Tonsfeldt, K. J., White, R. S., Bredeweg, E., y Latham, K. L. (2009). Modulation of gonadotrophin-releasing hormone secretion by an endogenous circadian clock. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(4), 339-345.
- Cora, M. C., Kooistra, L., y Travlos, G. (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic pathology*, 43(6), 776-793.

- Costanzo, L. S. (2018). *Fisiología*. Elsevier Health Sciences. España. Elsevier.
- Crespi, A., Colombo, S. F., y Gotti, C. (2018). Proteins and chemical chaperones involved in neuronal nicotinic receptor expression and function: an update. *British journal of pharmacology*, 175(11), 1869-1879.
- Cruz, M. E., Jaramillo, L. P., y Domínguez, R. (1989). Asymmetric ovulatory response induced by a unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *Journal of endocrinology*, 123(3), 437-439.
- Cui, W. (2021). Oocyte Spontaneous Activation: An Overlooked Cellular Event That Impairs Female Fertility in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 380.
- da Silva Bitecourt, F., Horta, C. O. D., Lima, K. S., Godoi, B. B., Bello, F. L. M., Rodrigues, C. M., ... y Honorato-Sampaio, K. (2018). Morphological study of apoptosis in granulosa cells and ovulation in a model of atresia in rat preovulatory follicles. *Zygote*, 26(4), 336-341.
- Dani, J. A. (2015). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor structure and function and response to nicotine. *International Review of Neurobiology*, 124, 3-19.
- de la Cruz, R. R., y Pásaro, R. (1998). Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: Una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. In *Revista de Enseñanza Universitaria: Vol. Extraordin* (pp. 545–554).
- de la Iglesia, HO. (1999). Oestrogen Receptor- $\alpha$ -Immunoreactive Neurons Project to the Suprachiasmatic Nucleus of the Female Syrian Hamster. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(7), 481-490.
- de la Iglesia, HO., Meyer, J., y Schwartz, W. J. (2003). Lateralization of circadian pacemaker output: activation of left-and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone neurons involves a neural rather than a humoral pathway. *Journal of Neuroscience*, 23(19), 7412-7414.
- Debruyne, D., Sobrio, F., Hirschberger, A., Camsonne, R., Coquerel, A., y Barre, L. (2003). Short-term pharmacokinetics and brain distribution of mecamylamine as a preliminary to carbon-11 labeling for nicotinic receptor investigation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(5), 1051-1057.
- DePaolo, L. V., Hirshfield, A. N., Anderson, L. D., Barraclough, C. A., y CHANNING, C. P. (1979). Suppression of pituitary secretion of follicle-stimulating hormone by porcine follicular fluid during pro-oestrus and oestrus in the rat: effects on gonadotrophin and steroid secretion, follicular development and ovulation during the following cycle. *Journal of Endocrinology*, 83(3), 355-368.

- Dibner, C., Schibler, U., y Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology*, 72, 517-549.
- Dibner, C., Schibler, U., y Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual review of physiology*, 72, 517-549.
- Domínguez-González, A., Damian-Matsumura, P., Timossi, C., Cruz, M. E., y Domínguez, R. (1998). Characterization of monoamine neural activity in the preoptic anterior hypothalamic area and medial basal hypothalamus in rats during the day of pro-o estrus and its relation to gonadotrophin and sexual steroid hormone plasma levels. *Medical Science Research*, 26(4), 275-278.
- Dominguez, R., Gaitan, C. M., Mendez, S. A., y Ulloa-Aguirre, A. (1987). Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrous cycle on ovulation and gonadotrophin levels in the rat. *Journal of Endocrinology*, 113(1), 37-44.
- Dominguez, R., Riboni, L., Zipitria, D., y Revilla, R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?. *Journal of Endocrinology*, 95(2), 175-180.
- Domínguez, R., y Smith, E. R. (1974). Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology*, 14(3-4), 212-223.
- Drummond, A. E. (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4(1), 1-11.
- Ducret, E., Anderson, G. M., y Herbison, A. E. (2009). RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology*, 150(6), 2799-2804.
- Duffy, D. M., Ko, C., Jo, M., Brannstrom, M., y Curry Jr, T. E. (2019). Ovulation: parallels with inflammatory processes. *Endocrine reviews*, 40(2), 369-416.
- Earnest, D. J., y Turek, F. W. (1985). Neurochemical basis for the photic control of circadian rhythms and seasonal reproductive cycles: Role for acetylcholine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4277-4281.
- Erickson, G. F., y Danforth, D. R. (1995). Ovarian control of follicle development. *American journal of obstetrics and gynecology*, 172(2), 736-747.
- Espey, L. L. (1967). Ultrastructure of the apex of the rabbit Graafian follicle during the ovulatory process. *Endocrinology*, 81(2), 267-276.

- Evans, M. C., y Anderson, G. M. (2018). Integration of circadian and metabolic control of reproductive function. *Endocrinology*, 159(11), 3661-3673.
- Everett, J. W., Sawyer, C. H., y Markee, J. E. (1949). A neurogenic timing factor in control of the ovulatory discharge of luteinizing hormone in the cyclic rat. *Endocrinology*, 44(3), 234-250.
- Fan, J., Zeng, H., Olson, D. P., Huber, K. M., Gibson, J. R., y Takahashi, J. S. (2015). Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus provide sparse GABAergic outputs to local neurons with circadian regulation occurring distal to the opening of postsynaptic GABAA ionotropic receptors. *Journal of Neuroscience*, 35(5), 1905-1920.
- Flores Soto, M. E., y Segura-Torres, J. E. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci*, 6(4), 315-326.
- Fucile, S. (2004). Ca<sup>2+</sup> permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell calcium*, 35(1), 1-8.
- Funabashi, T., Aiba, S., Sano, A., Shinohara, K., y Kimura, F. (1999). Intracerebroventricular injection of arginine-vasopressin V1 receptor antagonist attenuates the surge of luteinizing hormone and prolactin secretion in proestrous rats. *Neuroscience Letters*, 260(1), 37-40.
- García, J.C. (2016). La información vagal regula la actividad ovárica en animales con bloqueo del sistema colinérgico del núcleo supraquiasmático. (Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM).
- Gartner, L. P., y Hiatt, J. L. (2008). *Texto atlas de histología*. McGraw-Hill. México.
- Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkői, Z., y Halász, B. (2009). Recent findings on the organization of central nervous system structures involved in the innervation of endocrine glands and other organs; observations obtained by the transneuronal viral double-labeling technique. *Endocrine*, 36(2), 179-188.
- Giniatullin, R. A., Sokolova, E. M., Di Angelantonio, S., Skorinkin, A., Talantova, M. V., y Nistri, A. (2000). Rapid relief of block by mecamylamine of neuronal nicotinic acetylcholine receptors of rat chromaffin cells in vitro: an electrophysiological and modeling study. *Molecular Pharmacology*, 58(4), 778-787.
- Ginsburg, M. A. L. K. A., Snow, M. H., y McLAREN, A. N. N. E. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110(2), 521-528.

- Ginther, O. J., Beg, M. A., Kot, K., Meira, C. D., y Bergfelt, D. R. (2003). Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, 68(2), 524-529.
- González, A. M., y Flórez, J. (1997). Transmisión colinérgica. Fármacos agonistas colinérgicos. *Farmacología Humana*. Editorial Masson SA, 213-28.
- Goodman, R. L., Lehman, M. N., Smith, J. T., Coolen, L. M., De Oliveira, C. V., Jafarzadehshirazi, M. R., ... y Clarke, I. J. (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*, 148(12), 5752-5760.
- Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., ... y Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical pharmacology*, 78(7), 703-711.
- Grando, S. A., Kawashima, K., Kirkpatrick, C. J., y Wessler, I. (2007). Recent progress in understanding the non-neuronal cholinergic system in humans. *Life sciences*, 80(24-25), 2181-2185.
- Greer, E. R., Caldwell, J. D., Johnson, M. F., Prange Jr, A. J., y Pedersen, C. A. (1986). Variations in concentration of oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. *Life sciences*, 38(25), 2311-2318.
- Guzmán-Ruiz, M., Saderi, N., Cazarez-Márquez, F., Guerrero-Vargas, N. N., Basualdo, M. C., Acosta-Galván, G., y Buijs, R. M. (2014). The suprachiasmatic nucleus changes the daily activity of the arcuate nucleus  $\alpha$ -MSH neurons in male rats. *Endocrinology*, 155(2), 525-535.
- Han, S. K., Gottsch, M. L., Lee, K. J., Popa, S. M., Smith, J. T., Jakawich, S. K., ... y Herbison, A. E. (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *Journal of Neuroscience*, 25(49), 11349-11356.
- Hannibal, J., Hundahl, C., Fahrenkrug, J., Rehfeld, J. F., y Friis-Hansen, L. (2010). Cholecystokinin (CCK)-expressing neurons in the suprachiasmatic nucleus: innervation, light responsiveness and entrainment in CCK-deficient mice. *European Journal of Neuroscience*, 32(6), 1006-1017.
- Harney, J. P., Scarbrough, K., Rosewell, K. L., y Wise, P. M. (1996). In vivo antisense antagonism of vasoactive intestinal peptide in the suprachiasmatic nuclei causes aging-like changes in the estradiol-induced luteinizing hormone and prolactin surges. *Endocrinology*, 137(9), 3696-3701.

- Hastings, M. H., Maywood, E. S., y Brancaccio, M. (2018). Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(8), 453-469.
- Hastings, M. H., Smyllie, N. J., y Patton, A. P. (2020). Molecular-genetic manipulation of the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *Journal of molecular biology*, 432(12), 3639-3660.
- Hastings, M. H., Smyllie, N. J., y Patton, A. P. (2020). Molecular-genetic manipulation of the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *Journal of molecular biology*, 432(12), 3639-3660.
- Henningsen, J. B., Ancel, C., Mikkelsen, J. D., Gauer, F., y Simonneaux, V. (2017). Roles of RFRP-3 in the daily and seasonal regulation of reproductive activity in female Syrian hamsters. *Endocrinology*, 158(3), 652-663.
- Henningsen, J. B., Poirel, V. J., Mikkelsen, J. D., Tsutsui, K., Simonneaux, V., y Gauer, F. (2016). Sex differences in the photoperiodic regulation of RF-Amide related peptide (RFRP) and its receptor GPR147 in the syrian hamster. *Journal of Comparative Neurology*, 524(9), 1825-1838.
- Herbison, A. E., Heavens, R. P., y Dyer, R. G. (1990). Oestrogen modulation of excitatory Al noradrenergic input to rat medial preoptic gamma aminobutyric acid neurones demonstrated by microdialysis. *Neuroendocrinology*, 52(2), 161-168.
- Herzog, E. D., Hermanstynne, T., Smyllie, N. J., y Hastings, M. H. (2017). Regulating the suprachiasmatic nucleus (SCN) circadian clockwork: interplay between cell-autonomous and circuit-level mechanisms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(1), a027706.
- Hillier, S. G. (2009). Paracrine support of ovarian stimulation. *Molecular human reproduction*, 15(12), 843-850.
- Hirshfield, A. N., y Rees Midgley Jr, A. (1978). Morphometric analysis of foilicular development in the rat. *Biology of reproduction*, 19(3), 597-605.
- Ho, T. N., Abraham, N., y Lewis, R. J. (2020). Structure-Function of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Inhibitors Derived From Natural Toxins. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 1209.
- Hu, C. L., Cowan, R. G., Harman, R. M., y Quirk, S. M. (2004). Cell cycle progression and activation of Akt kinase are required for insulin-like growth factor I-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. *Molecular endocrinology*, 18(2), 326-338.
- Hughes, S., Jagannath, A., Hankins, M. W., Foster, R. G., y Peirson, S. N. (2015). Photic regulation of clock systems. *Methods in enzymology*, 552, 125-143.

- Hussein, M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human reproduction update*, 11(2), 162-178.
- Iremonger, K. J., Porteous, R., y Herbison, A. E. (2017). Spike and neuropeptide-dependent mechanisms control GnRH neuron nerve terminal Ca<sup>2+</sup> over diverse time scales. *Journal of Neuroscience*, 37(12), 3342-3351.
- Irwig, M. S., Fraley, G. S., Smith, J. T., Acohido, B. V., Popa, S. M., Cunningham, M. J., ... y Steiner, R. A. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology*, 80(4), 264-272.
- Johnson, A. L., y Bridgham, J. T. (2002). Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction-Cambridgcambri-*, 124(1), 19-27.
- Kalamatianos, T., Grimshaw, S. E., Poorun, R., Hahn, J. D., y Coen, C. W. (2008). Fasting reduces KiSS-1 expression in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV): effects of fasting on the expression of KiSS-1 and neuropeptide Y in the AVPV or arcuate nucleus of female rats. *Journal of neuroendocrinology*, 20(9), 1089-1097.
- Kalamatianos, T., Kallo, I., Goubillon, M. L., y Coen, C. W. (2004). Cellular expression of V1a vasopressin receptor mRNA in the female rat preoptic area: effects of oestrogen. *Journal of neuroendocrinology*, 16(6), 525-533.
- Kalantaridou, S. N., Zoumakis, E., Makrigiannakis, A., Lavasidis, L. G., Vrekoussis, T., y Chrousos, G. P. (2010). Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: an update. *Journal of reproductive immunology*, 85(1), 33-39.
- Kalsbeek, A., Buijs, R. M., Van Heerikhuizen, J. J., Arts, M., y Van der Woude, T. P. (1992). Vasopressin-containing neurons of the suprachiasmatic nuclei inhibit corticosterone release. *Brain research*, 580(1-2), 62-67.
- Kauffman, A. S., Sun, Y., Kim, J., Khan, A. R., Shu, J., y Neal-Perry, G. (2014). Vasoactive intestinal peptide modulation of the steroid-induced LH surge involves kisspeptin signaling in young but not in middle-aged female rats. *Endocrinology*, 155(6), 2222-2232.
- Kawashima, S. K., y Fujii, T. (2008). Basic and Clinical Aspects of Non-neuronal Acetylcholine: Overview of Non-neuronal Cholinergic Systems and Their Biological. *Journal of pharmacological sciences*, 106(2), 167-173.
- Keefe, D. L., Earnest, D. J., Nelson, D., Takahashi, J. S., y Turek, F. W. (1987). A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks the phase-shifting effects of light on the circadian rhythm of locomotor activity in the golden hamster. *Brain research*, 403(2), 308-312.

- King, J. R., y Kabbani, N. (2016). Alpha 7 nicotinic receptor coupling to heterotrimeric G proteins modulates RhoA activation, cytoskeletal motility, and structural growth. *Journal of neurochemistry*, 138(4), 532-545.
- Klenke, U., Constantin, S., y Wray, S. (2010). Neuropeptide Y directly inhibits neuronal activity in a subpopulation of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons via Y1 receptors. *Endocrinology*, 151(6), 2736-2746.
- Knight, P. G., Satchell, L., y Glister, C. (2012). Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Molecular and cellular endocrinology*, 359(1-2), 53-65.
- Kriegsfeld, L. J., Jennings, K. J., Bentley, G. E., y Tsutsui, K. (2018). Gonadotrophin-inhibitory hormone and its mammalian orthologue RF amide-related peptide-3: Discovery and functional implications for reproduction and stress. *Journal of neuroendocrinology*, 30(7), e12597.
- Kriegsfeld, L. J., Mei, D. F., Bentley, G. E., Ubuka, T., Mason, A. O., Inoue, K., ... y Silver, R. (2006). Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(7), 2410-2415.
- Kriegsfeld, L. J., y Silver, R. (2006). The regulation of neuroendocrine function: timing is everything. *Hormones and behavior*, 49(5), 557-574.
- Krysko, D. V., Diez-Fraile, A., Criel, G., Svistunov, A. A., Vandenabeele, P., y D'Herde, K. (2008). Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis*, 13(9), 1065-1087.
- Kuhlman, S. J., Craig, L. M., y Duffy, J. F. (2018). Introduction to chronobiology. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(9), a033613.
- Leak, R. K., Card, J. P., y Moore, R. Y. (1999). Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain research*, 819(1-2), 23-32.
- Legan, S. J., y Karsch, F. J. (1975). A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology*, 96(1), 57-62.
- Lehman, M. N., Silver, R., Gladstone, W. R., Kahn, R. M., Gibson, M., y Bittman, E. L. (1987). Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience*, 7(6), 1626-1638.
- Lei, L., y Spradling, A. C. (2013). Mouse primordial germ cells produce cysts that partially fragment prior to meiosis. *Development*, 140(10), 2075-2081.

- Leliavski, A., Dumbell, R., Ott, V., y Oster, H. (2015). Adrenal clocks and the role of adrenal hormones in the regulation of circadian physiology. *Journal of biological rhythms*, 30(1), 20-34.
- Levine, J. E. (2015). Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction: Two-Volume Set (Fourth Edi, Vol. 2)*. Elsevier.
- Li, J. D., Hu, W. P., y Zhou, Q. Y. (2012). The circadian output signals from the suprachiasmatic nuclei. *Progress in brain research*, 199, 119-127.
- Linares, R., Hernández, D., Morán, C., Chavira, R., Cárdenas, M., Domínguez, R., y Morales-Ledesma, L. (2013). Unilateral or bilateral vagotomy induces ovulation in both ovaries of rats with polycystic ovarian syndrome. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1), 1-9.
- Liu, Y. X., Liu, X. M., Nin, L. F., Shi, L., y Chen, S. R. (2013). Serine protease and ovarian paracrine factors in regulation of ovulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 18, 650-664.
- Ma, M. A., y Morrison, E. H. (2019). Neuroanatomy, Nucleus Suprachiasmatic. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls.
- Ma, Y. J., Kelly, M. J., y RÖNNEKLEI, O. K. (1990). Pro-gonadotropin-releasing hormone (ProGnRH) and GnRH content in the preoptic area and the basal hypothalamus of anterior medial preoptic nucleus/suprachiasmatic nucleus-lesioned persistent estrous rats. *Endocrinology*, 127(6), 2654-2664.
- Madeira, M. D., Pereira, P. A., Silva, S. M., Cadete-Leite, A., y Paula-Barbosa, M. M. (2004). Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 125(4), 889-901.
- Mahoney, M. M., Sisk, C., Ross, H. E., y Smale, L. (2004). Circadian Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and the Preovulatory Surge in Luteinizing Hormone in the Diurnal Rodent, *Arvicanthis niloticus*, and in a Nocturnal Rodent, *Rattus norvegicus*1. *Biology of Reproduction*, 70(4), 1049–1054.
- Mahoney, M. M., y Smale, L. (2005). Arginine vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide fibers make appositions with gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor cells in the diurnal rodent *Arvicanthis niloticus*. *Brain research*, 1049(2), 156-164.
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., y Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, 58(1), 44-50.
- Matsuda, F., Ohkura, S., Magata, F., Munetomo, A., Chen, J., Sato, M., ... y Tsukamura, H. (2019). Role of kisspeptin neurons as a GnRH surge generator: Comparative aspects in

- rodents and non-rodent mammals. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 45(12), 2318-2329.
- Maywood, E. S., Chesham, J. E., O'Brien, J. A., y Hastings, M. H. (2011). A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(34), 14306-14311.
- McGee, E. A., y Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21(2), 200-214.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Méndez-Hernández, R., Escobar, C., y Buijs, R. M. (2020). Suprachiasmatic nucleus–arcuate nucleus axis: interaction between time and metabolism essential for health. *Obesity*, 28, S10-S17.
- Mermillod, P., Dalbiès-Tran, R., Uzbekova, S., Thélie, A., Traverso, J. M., Perreau, C., ... y Monget, P. (2008). Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle?. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 393-400.
- Messenger, S. Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MB, Colledge WH, Caraty A, and Aparicio SA. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor, 54, 1761-1766.
- Meyer-Bernstein, E. L., y Morin, L. P. (1996). Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *Journal of Neuroscience*, 16(6), 2097-2111.
- Mieda, M. (2019). The network mechanism of the central circadian pacemaker of the SCN: do AVP neurons play a more critical role than expected?. *Frontiers in neuroscience*, 13, 139.
- Millar, N. S., y Gotti, C. (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 56(1), 237-246.
- Millar, N. S., y Harkness, P. C. (2008). Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular membrane biology*, 25(4), 279-292.
- Miller, B. H., Olson, S. L., Levine, J. E., Turek, F. W., Horton, T. H., y Takahashi, J. S. (2006). Vasopressin regulation of the proestrous luteinizing hormone surge in wild-type and Clock mutant mice. *Biology of reproduction*, 75(5), 778-784.
- Miller, B. H., y Takahashi, J. S. (2014). Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers in endocrinology*, 4, 195.

- Miller, J. D., Murakami, D. M., y Fuller, C. A. (1987). The response of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and nicotinic stimuli. *Journal of Neuroscience*, 7(4), 978-986.
- Mittelman-Smith, M. A., Williams, H., Krajewski-Hall, S. J., Lai, J., Ciofi, P., McMullen, N. T., y Rance, N. E. (2012). Arcuate kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) neurons mediate the estrogen suppression of gonadotropin secretion and body weight. *Endocrinology*, 153(6), 2800-2812.
- Moga, M. M., y Moore, R. Y. (1997). Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 389(3), 508-534.
- Mohawk, J. A., y Takahashi, J. S. (2011). Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in neurosciences*, 34(7), 349-358.
- Moore, R. Y., Speh, J. C., y Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and tissue research*, 309(1), 89-98.
- Moore, R. Y., y Eichler, V. B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain research*. 42(1), 201-206.
- Moore, R. Y., y Lenn, N. J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 146(1), 1-14.
- Morales-Ledesma, L., Betanzos-García, R., y Domínguez-Casalá, R. (2004). Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepubertal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Archives of medical research*, 35(4), 279-283.
- Morin, L. P., y Blanchard, J. H. (2001). Neuromodulator content of hamster intergeniculate leaflet neurons and their projection to the suprachiasmatic nucleus or visual midbrain. *Journal of Comparative Neurology*, 437(1), 79-90.
- Morse, D., y Sassone-Corsi, P. (2002). Time after time: Inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends in Neurosciences*, 25(12), 632-637.
- Myslivecek, J., Farar, V., y Valuskova, P. (2017). M 4 Muscarinic Receptors and Locomotor Activity Regulation. *Physiological research*, 66.
- Naftolin, F., Garcia-Segura, L. M., Horvath, T. L., Zsarnovszky, A., Demir, N., Fadiel, A., ... y Parducz, A. (2007). Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reproductive Sciences*, 14(2), 101-116.
- Nakamaru-Ogiso, E., Miyamoto, H., Hamada, K., Tsukada, K., y Takai, K. (2012). Novel biochemical manipulation of brain serotonin reveals a role of serotonin in the circadian rhythm of sleep-wake cycles. *European Journal of Neuroscience*, 35(11), 1762-1770.

- Noguchi, J., Watanabe, G., Taya, K., y Sasamoto, S. (1993). Suppression of basal secretion of FSH inhibits follicular development and maturation during the oestrous cycle of the rat. *Journal of endocrinology*, 139(2), 287-293.
- O'Hara, B. F., Edgar, D. M., Cao, V. H., Wiler, S. W., Heller, H. C., Kilduff, T. S., y Miller, J. D. (1998). Nicotine and nicotinic receptors in the circadian system. *Psychoneuroendocrinology*, 23(2), 161-173.
- Ono, D., Honma, K. ichi, Yanagawa, Y., Yamanaka, A., y Honma, S. (2019). GABA in the suprachiasmatic nucleus refines circadian output rhythms in mice. *Communications Biology*, 2(1), 1–12.
- Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S., Mizutani, T., Miyamoto, K., Sato, T., ... y Yoshida, Y. (2013). Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology*, 154(8), 2870-2880.
- Palm, I. F., van der Beek, E. M., Wiegant, V. M., Buijs, R. M., y Kalsbeek, A. (1999). Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 93(2), 659-666.
- Pau, K. Y., Berria, M. A. T. T. H. E. W., Hess, D. L., y Spies, H. G. (1993). Preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in ovarian-intact rhesus macaques. *Endocrinology*, 133(4), 1650-1656.
- Pawlina, W. (2015). *Histología Texto Y Atlas Correlación con Biología Molecular y Celular*. In Ross *Histología texto y atlas*. Ed. Medica Panamerica. México
- Paxinos, G., y Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.
- Picciotto, M. R., Caldarone, B. J., Brunzell, D. H., Zachariou, V., Stevens, T. R., y King, S. L. (2001). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacology y therapeutics*, 92(2-3), 89-108.
- Picciotto, M. R., Higley, M. J., y Mineur, Y. S. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, 76(1), 116-129.
- Piet, R., Dunckley, H., Lee, K., y Herbison, A. E. (2016). Vasoactive intestinal peptide excites GnRH neurons in male and female mice. *Endocrinology*, 157(9), 3621-3630.
- Pollard, I., White, B. M., Bassett, J. R., y Cairncross, K. D. (1975). Plasma glucocorticoid elevation and desynchronization of the estrous cycle following unpredictable stress in the rat. *Behavioral biology*, 14(1), 103-108.

- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Par, H. W., & Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 340-345.
- Putteeraj, M., Soga, T., Ubuka, T., y Parhar, I. S. (2016). A “timed” kiss is essential for reproduction: lessons from mammalian studies. *Frontiers in endocrinology*, 7, 121.
- Quirk, S. M., Cowan, R. G., Harman, R. M., Hu, C. L., y Porter, D. A. (2004). Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *Journal of animal science*, 82(suppl\_13), E40-E52.
- Raju, T. N. (1999). The Nobel Chronicles. *The Lancet*, 353(9159), 1196
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C., y Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247(4945), 975-978.
- Ramaswamy, S., Guerriero, K. A., Gibbs, R. B., y Plant, T. M. (2008). Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology*, 149(9), 4387-4395.
- Ramaswamy, S., Seminara, S. B., Ali, B., Ciofi, P., Amin, N. A., y Plant, T. M. (2010). Neurokinin B stimulates GnRH release in the male monkey (*Macaca mulatta*) and is colocalized with kisspeptin in the arcuate nucleus. *Endocrinology*, 151(9), 4494-4503.
- Ramírez, D. A., Vieyra, E., González, A. I., Morán, C., Domínguez, R., y Morales-Ledesma, L. (2017). Both the suprachiasmatic nucleus and the superior ovarian nerve contribute to the processes of ovulation and steroid hormone secretion on proestrus. *Reproductive Sciences*, 24(6), 844-855.
- Rawson, J. A., Scott, C. J., Pereira, A., Jakubowska, A., y Clarke, I. J. (2001). Noradrenergic projections from the A1 field to the preoptic area in the brain of the ewe and Fos responses to oestrogen in the A1 cells. *Journal of neuroendocrinology*, 13(2), 129-138.
- Ren, X. Q., Cheng, S. B., Treuil, M. W., Mukherjee, J., Rao, J., Braunewell, K. H., ... y Anand, R. (2005). Structural determinants of  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor trafficking. *Journal of Neuroscience*, 25(28), 6676-6686.
- Richards, J. S. (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological reviews*, 60(1), 51-89.
- Richards, J. S., y Ascoli, M. (2018). Endocrine, paracrine, and autocrine signaling pathways that regulate ovulation. *Trends in Endocrinology y Metabolism*, 29(5), 313-325.
- Richards, J.S. et al. (2015) Ovulation. In Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction* (4th edn) (Plant, T.M. and Zeleznik, A.J., eds), pp. 997–1021, Academic Press

- Rizwan, M. Z., Poling, M. C., Corr, M., Cornes, P. A., Augustine, R. A., Quennell, J. H., ... y Anderson, G. M. (2012). RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology*, 153(8), 3770-3779.
- Roa, J., y Herbison, A. E. (2012). Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology*, 153(11), 5587-5599.
- Robker, R. L., Hennebold, J. D., y Russell, D. L. (2018). Coordination of ovulation and oocyte maturation: a good egg at the right time. *Endocrinology*, 159(9), 3209-3218.
- Rusak, B., y Bina, K. G. (1990). Neurotransmitters in the mammalian circadian system. *Annual review of neuroscience*, 13(1), 387-401.
- Russo, K. A., La, J. L., Stephens, S. B., Poling, M. C., Padgaonkar, N. A., Jennings, K. J., ... y Kriegsfeld, L. J. (2015). Circadian control of the female reproductive axis through gated responsiveness of the RFRP-3 system to VIP signaling. *Endocrinology*, 156(7), 2608-2618.
- Sack, R. L., Auckley, D., Auger, R. R., Carskadon, M. A., Wright Jr, K. P., Vitiello, M. V., y Zhdanova, I. V. (2007). Circadian rhythm sleep disorders: part I, basic principles, shift work and jet lag disorders. *Sleep*, 30(11), 1460-1483.
- Sanabria-Castro, A., Alvarado-Echeverría, I., y Monge-Bonilla, C. (2017). Neurotransmisión Colinérgica Central: Aspectos Moleculares. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 18(2), 76-87.
- Sato, E. (2015). Intraovarian control of selective follicular growth and induction of oocyte maturation in mammals. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 91(3), 76-91.
- Schliebs, R., y Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural brain research*, 221(2), 555-563.
- Schwartz, W. J. (2002). Suprachiasmatic nucleus. *Current Biology*, 12(19), R644.
- Shibata, S., Liou, S. Y., y Ueki, S. (1983). Different effects of amino acids, acetylcholine and monoamines on neuronal activity of suprachiasmatic nucleus in rat pups and adults. *Neuroscience letters*, 39(2), 187-192.
- Silman, I., y Sussman, J. L. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current opinion in pharmacology*, 5(3), 293-302.
- Silva, C. C., Cortés, G. D., Javier, C. Y., Flores, A., y Domínguez, R. (2020). A neural circadian signal essential for ovulation is generated in the suprachiasmatic nucleus during each stage of the oestrous cycle. *Experimental physiology*, 105(2), 258-269.

- Silver, R., y Rainbow, M. (2013). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timekeeping system of the body. *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, 33, 1847–1888.
- Simonian, S. X., Spratt, D. P., y Herbison, A. E. (1999). Identification and characterization of estrogen receptor  $\alpha$ -containing neurons projecting to the vicinity of the gonadotropin-releasing hormone perikarya in the rostral preoptic area of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 411(2), 346-358.
- Simonneaux, V., Bahougne, T., y Angelopoulou, E. (2017). Daily rhythms count for female fertility. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 31(5), 505–519.
- Singh, R., Ali, A., Jeyabalan, G., y Semwal, A. (2013). An overview of the current methodologies used for evaluation of aphrodisiac agents. *Journal of Acute Disease*, 2(2), 85-91.
- Sliwowska, J. H., Billings, H. J., Goodman, R. L., y Lehman, M. N. (2006). Immunocytochemical colocalization of GABA-B receptor subunits in gonadotropin-releasing hormone neurons of the sheep. *Neuroscience*, 141(1), 311-319.
- Smarr, B. L., Gile, J. J., y De La Iglesia, H. O. (2013). Oestrogen-independent circadian clock gene expression in the anteroventral periventricular nucleus in female rats: Possible role as an integrator for circadian and ovarian signals timing the luteinising hormone surge. *Journal of neuroendocrinology*, 25(12), 1273-1279.
- Smarr, B. L., Morris, E., y de la Iglesia, H. O. (2012). The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of *Kiss1* and the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 153(6), 2839-2850.
- Smith, J. T., Popa, S. M., Clifton, D. K., Hoffman, G. E., y Steiner, R. A. (2006). *Kiss1* neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroscience*, 26(25), 6687-6694.
- Smith, M. S. (2009). Estrus and menstrual cycles: Neuroendocrine control. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1–5.
- Stamatiades, G. A., Carroll, R. S., y Kaiser, U. B. (2019). GnRH—a key regulator of FSH. *Endocrinology*, 160(1), 57-67.
- Stephan, F. K., y Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(6), 1583-1586.
- Stokes, C., Treinin, M., y Papke, R. L. (2015). Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in pharmacological sciences*, 36(8), 514-523.

- Südhof, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein–protein interactions. *Nature*, 375(6533), 645-653.
- Taly, A., Corring, P. J., Guedin, D., Lestage, P., y Changeux, J. P. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nature reviews Drug discovery*, 8(9), 733-750.
- Tano, M., Minegishi, T., Kishi, H., Kameda, T., Abe, Y., y Miyamoto, K. (1999). The effect of follicle-stimulating hormone (FSH) on the expression of FSH receptor in cultured rat granulosa cells. *Life sciences*, 64(12), 1063-1069.
- Temel, S., Lin, W., Lakhiani, S., y Jennes, L. (2002). Expression of estrogen receptor- $\alpha$  and cFos in norepinephrine and epinephrine neurons of young and middle-aged rats during the steroid-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 143(10), 3974-3983.
- Travagli, R. A. (2007). The nucleus tractus solitarius: an integrative centre with ‘task-matching’ capabilities. *The Journal of physiology*, 582(Pt 2), 471.
- Treen, A. K., Luo, V., Chalmers, J. A., Dalvi, P. S., Tran, D., Ye, W., ... y Belsham, D. D. (2016). Divergent regulation of ER and Kiss genes by 17 $\beta$ -estradiol in hypothalamic ARC versus AVPV models. *Molecular endocrinology*, 30(2), 217-233.
- Tresguerres J., Ariznavarreta C., Cachofeiro V., Cardinale D., Escrich E., Gil P., Lahera V., Mora F., Romano M. y Tamargo j. (2005). *Fisiología Humana*. Ed McGraw-Hill Interamericana España. Pp. 1500
- Turi, G. F., Liposits, Z., Moenter, S. M., Fekete, C., y Hrabovszky, E. (2003). Origin of neuropeptide Y-containing afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice. *Endocrinology*, 144(11), 4967-4974.
- Van Der Beek, E. M., Horvath, T. L., Wiegant, V. M., Van Den Hurk, R., y Buijs, R. M. (1997). Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *Journal of comparative neurology*, 384(4), 569-579.
- Van Der Beek, E. M., Horvath, T. L., Wiegant, V. M., Van Den Hurk, R., y Buijs, R. M. (1997). Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *Journal of comparative neurology*, 384(4), 569-579.
- van der Beek, E. M., Horvath, T. L., Wiegant, V. M., Van Den Hurk, R., y Buijs, R. M. (1997). Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the

- gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *Journal of comparative neurology*, 384(4), 569-579.
- Van der Beek, E. M., Wiegant, V. M., van der Donk, H. A., van den Hurk, R., y Buijs, R. M. (1993). Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *Journal of neuroendocrinology*, 5(2), 137-144.
- van der Beek, E. M., Wiegant, V. M., van der Donk, H. A., van den Hurk, R., y Buijs, R. M. (1993). Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *Journal of neuroendocrinology*, 5(2), 137-144.
- Van Der Horst, G. T. J., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S. I., Takao, M., De Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P. M., Van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H. J., y Yasui, A. (1999). Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, 398(6728), 627–630.
- Van der Zee, E. A., Streefland, C., Strosberg, A. D., Schro, H., y Luiten, P. G. M. (1991). Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors in cholinceptive neurons of the suprachiasmatic region in young and aged rats. *Brain research*, 542(2), 348-352.
- Van Voorhis B.J. (1999). Follicular steroidogenesis. En: *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press 389-396
- Vieyra-Valdez, E., Linares-Culebro, R., Rosas-Gavilán, G., Ramírez-Hernández, D., Domínguez-Casalá, R. y Morales-Ledesma., L. (2020). Role of cholinergic system and vagal innervation in the regulation of GnRH secretion and ovulation: Experimental evidence. *Brain research bulletin*. 165:129-138
- Vieyra, E., Ramírez, D. A., Lagunas, N., Cárdenas, M., Chavira, R., Damián-Matsumura, P., ... y Morales-Ledesma, L. (2016). Unilaterally blocking the muscarinic receptors in the suprachiasmatic nucleus in proestrus rats prevents pre-ovulatory LH secretion and ovulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 1-11.
- Vieyra, E., Ramírez, D. A., Linares, R., Rosas, G., Domínguez, R., y Morales-Ledesma, L. (2019). Stimulation of nicotinic receptors in the suprachiasmatic nucleus results in a higher number of growing follicles and ova shed. *Experimental physiology*, 104(8), 1179-1189.

- Wang, Q., Leader, A., y Tsang, B. K. (2013). Follicular stage-dependent regulation of apoptosis and steroidogenesis by prohibitin in rat granulosa cells. *Journal of ovarian research*, 6(1), 1-10.
- Wang, X. L., Wu, Y., Tan, L. B., Tian, Z., Liu, J. H., Zhu, D. S., y Zeng, S. M. (2012). Follicle-stimulating hormone regulates pro-apoptotic protein Bcl-2-interacting mediator of cell death-extra long (BimEL)-induced porcine granulosa cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10166-10177.
- Welsh, D. K., Takahashi, J. S., y Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual review of physiology*, 72, 551-577.
- Westwood, F. R. (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic pathology*, 36(3), 375-384.
- Wiegand, S. J., Terasawa, E. I., Bridson, W. E., y Goy, R. W. (1980). Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. *Neuroendocrinology*, 31(2), 147-157.
- Williams III, W. P., Jarjisian, S. G., Mikkelsen, J. D., y Kriegsfeld, L. J. (2011). Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 152(2), 595-606.
- Yan, L., y Okamura, H. (2002). Gradients in the circadian expression of *Per1* and *Per2* genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 15(7), 1153–1162.
- Yang, J. J., Wang, Y. T., Cheng, P. C., Kuo, Y. J., y Huang, R. C. (2010). Cholinergic modulation of neuronal excitability in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of neurophysiology*, 103(3), 1397-1409.
- Yeo, S. H., Kyle, V., Blouet, C., Jones, S., y Colledge, W. H. (2019). Mapping neuronal inputs to *Kiss1* neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *PloS one*, 14(3), e0213927.
- Yip, S. H., Boehm, U., Herbison, A. E., y Campbell, R. E. (2015). Conditional viral tract tracing delineates the projections of the distinct kisspeptin neuron populations to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the mouse. *Endocrinology*, 156(7), 2582-2594.
- Yoshida, M., Sanbuissyo, A., Hisada, S., Takahashi, M., Ohno, Y., y Nishikawa, A. (2009). Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *The Journal of toxicological sciences*, 34(Special), SP189-SP197.
- Yuan, X. S., Wei, H. H., Xu, W., Wang, L., Qu, W. M., Li, R. X., y Huang, Z. L. (2018). Whole-brain monosynaptic afferent projections to the cholecystokinin neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers in neuroscience*, 12, 807.

- Zatz, M., y Brownstein, M. J. (1981). Injection of  $\alpha$ -bungarotoxin near the suprachiasmatic nucleus blocks the effects of light on nocturnal pineal enzyme activity. *Brain Research*, 213(2), 438-442.
- Zatz, M., y Herkenham, M. A. (1981). Intraventricular carbachol mimics the phase-shifting effect of light on the circadian rhythm of wheel-running activity. *Brain research*, 212(1), 234-238.
- Zhang, W. X., Chen, S. Y., y Liu, C. (2016). Regulation of reproduction by the circadian rhythms. *Sheng li xue bao:[Acta physiologica Sinica]*, 68(6), 799-808.
- Zhang, Y., Zee, P. C., Kirby, J. D., Takahashi, J. S., y Turek, F. W. (1993). A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks light-induced Fos immunoreactivity in specific regions of the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain research*, 615(1), 107-112.
- Zhou, J., Peng, X., y Mei, S. (2019). Autophagy in ovarian follicular development and atresia. *International journal of biological sciences*, 15(4), 726.
- Zoli, M., Pistillo, F., y Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96 (Pt B): 302–311.
- Zoli, M., Pucci, S., Vilella, A., y Gotti, C. (2018). Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Current neuropharmacology*, 16(4), 338-349.
- Zouridakis, M., Zisimopoulou, P., Poulas, K., y Tzartos, S. J. (2009). Recent advances in understanding the structure of nicotinic acetylcholine receptors. *IUBMB life*, 61(4), 407-423.
- Zsarnovszky, A., Horvath, T. L., Garcia-Segura, L. M., Horvath, B., y Naftolin, F. (2001). Oestrogen-induced changes in the synaptology of the monkey (*Cercopithecus aethiops*) arcuate nucleus during gonadotropin feedback. *Journal of neuroendocrinology*, 13(1), 22-28.

Organización conjunta:



Universidad  
de Guadalajara



Centro Universitario  
de Ciencias de la Salud



LXIII CONGRESO NACIONAL  
DE LA SOCIEDAD MEXICANA  
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

Sociedad Mexicana  
de Ciencias Fisiológicas A.C.

OTORGA LA PRESENTE

# CONSTANCIA

a:

**Calderón Ramos R, Morales Ledesma L, Ramos Puga D. A,  
Vieyra Valdez E, Domínguez Casalá R**

POR LA PRESENTACIÓN DEL TRABAJO:

“EN EL DÍA DEL DIESTRO-2, LA MECAMILAMINA EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO IZQUIERDO INHIBE LAS  
SEÑALES NEURALES QUE REGULAN LA OVULACIÓN”

EN EL MARCO DEL **LXIII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C.**

REALIZADO EN LÍNEA DEL 13 AL 15 DE NOVIEMBRE DEL 2020

**DR. DANIEL ORTUÑO SAHAGÚN**  
PRESIDENTE DE LA SOCIEDAD MEXICANA  
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

**DRA. MA. DEL CARMEN CORTÉS SÁNCHEZ**  
VICE-PRESIDENTA DE LA SOCIEDAD MEXICANA  
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

**DRA. MARISELA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**  
SECRETARIA DE LA SOCIEDAD MEXICANA  
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

**DRA. ARGELIA E. ROJAS MAYORQUÍN**  
TESORERA DE LA SOCIEDAD MEXICANA  
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



# Reconocimiento

Que otorga la  
**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA**  
a través de la División de  
Estudios de Posgrado e  
Investigación

A *Roberto Calderón Ramos, David Alfonso Ramos Puga, Hugo Alberto Zarco Juárez, Elizabeth Vieyra Valdéz, Roberto Domínguez Casalá, Leticia Morales Ledesma*

Como ponentes del trabajo **Los receptores nicotínicos del núcleo supraquiasmático regulan de manera asimétrica la ovulación** (BIO-05), en el marco del *16° Congreso de Investigación de la FES Zaragoza*, los días 23 al 27 de noviembre del 2020, en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad de México, a 22 de enero de 2021

**Dr. David Nahum Espinosa Organista**

Jefe de la División



**Constancia provisional**



Otorga la presente

## Constancia a

**Calderón-Ramos R, Ramos-Puga DA, Vieyra-Valdez E,  
Domínguez-Casalá R y Morales-Ledesma L.**

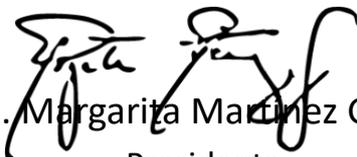
Por la presentación del trabajo

**El bloqueo de los receptores nicotínicos del núcleo  
supraquiasmático, en el día del diestro 1, inhibe el desarrollo  
folicular**

En las actividades de la

**46 Reunión Anual**

Boca del Río, Ver., 24 de mayo de 2021.

  
Dra. Margarita Martínez Gómez  
Presidenta  
Consejo Directivo 2019-2021