



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Efecto del bloqueo de la actividad eléctrica de las neuronas del área rostral periventricular del tercer ventrículo a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral sobre la ovulación de la rata adulta.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA

PRESENTA:

MONTSERRAT BOLAÑOS HURTADO

JURADO DE EXAMEN

Director: Dr. Carlos Camilo Silva Méndez  
Asesora: M. en ISBH. Angélica Flores Ramírez  
Asesora: M en E. María del Carmen Castro González  
Sinodal: Dra. Elizabeth Vieyra Valdez  
Sinodal: Dra. Rosa Linares Culebro



Ciudad de México

Marzo de 2023



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

Laboratorio de Investigación en Cronobiología de la Reproducción

Efecto del bloqueo de la actividad eléctrica de las neuronas del área rostral periventricular del tercer ventrículo a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral sobre la ovulación de la rata adulta.

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA

PRESENTA:

MONTSERRAT BOLAÑOS HURTADO

JURADO DE EXAMEN

Director: Dr. Carlos Camilo Silva Méndez  
Asesora: M. en ISBH. Angélica Flores Ramírez  
Asesora: M en E. María del Carmen Castro González  
Sinodal: Dra. Elizabeth Vieyra Valdez  
Sinodal: Dra. Rosa Linares Culebro



Ciudad de México

Marzo de 2023



**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: **BOLAÑOS HURTADO MONTSERRAT** con número de cuenta **313122071** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **29 de Marzo de 2023** a las **14:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MTRA. FLORES RAMIREZ ANGELICA	
VOCAL	DR. SILVA MENDEZ CARLOS CAMILO	
SECRETARIO	DRA. LINARES CULEBRO ROSA	
SUPLENTE	DRA. VIEYRA VALDEZ ELIZABETH	
SUPLENTE	MTRA. CASTRO GONZALEZ MARIA DEL CARMEN	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

**Efecto del bloqueo de la actividad eléctrica de las neuronas del área rostral periventricular del tercer ventrículo a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral sobre la ovulación de la rata adulta.**

En la modalidad de: **TESIS**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
 CDMX, a 10 de Marzo de 2023

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

# **Financiamiento**

Esta tesis se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto: 236908; el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, proyecto: IN 216015; el Programa de Beca de titulación-extemporáneos 2019-2020 de la Dirección de Becas y Enlace a la Comunidad, UNAM, folio: 75004; y el apoyo del Programa de Ayudante de Investigador del Sistema Nacional de Investigadores por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), expediente de investigador:938ydeayudante:15721.

# Agradecimientos

**Mamá** realmente todo esto es por ti, porque sin tu apoyo nada de esto estaría pasando. Cada momento de desesperación acudía a ti y siempre sabías que decirme. Desde cada presentación del Kinder, hasta este momento has aplaudido mis logros y espero que estes muy orgullosa de mí por qué eres mi motor en todo, te admiro y te amo con todo mi ser.

**Papá** te agradezco todo lo que has hecho por mí, sé que a veces peleamos y me dices que soy tu hija rebelde, pero quiero que sepas que te amo mucho y que tenemos tanto en común. Gracias por enseñarme a no rendirme.

**A mi hermana** le agradezco todo lo que soy, sin ti no sería la Mome que ahora soy. Me has dado fuerza cuando más la necesito, me has apoyado y me has hecho tan feliz. Eres mi mejor confidente y mi mayor orgullo, TE AMO.

También le agradezco a **Carmen** por acompañarme cuando más lo necesito, eres el claro ejemplo de lo que es una madrina y te agradezco por apoyarme y apoyar a mi mamá y a mi hermana. Eres un pilar en mi vida y sin ti y tu apoyo no podríamos solas.

**Paco** me has dado todo el apoyo que he necesitado, has sido mi compañero, mi confidente y me has visto llorar cada vez que siento que no puedo y ahí estas para darme ánimos. Siempre me escuchas y me das consejos, no sé que habría hecho sin ti. Eres mi persona y siempre estaré agradecida contigo, te amo.

**Lalo y Gabo** hermanos, gracias por darle alegría a mi vida y aceptarme tal cual soy, los quiero mucho y **Lupita** no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí, no tengo como agradecértelo.

A mi mejor amigo, **Lezama**. Has sido un amigo incondicional, aceptas todas mis locuras y siempre sabes qué consejo dar. Gracias por los miércoles de elote, siempre mejoraban todo. Te quiero mucho y seremos unos grandes biólogos.

**Camilo** no tengo palabras para agradecerte todo lo que me has apoyado. Siempre me gustaron nuestras revisiones por que aprendía mucho, siempre supiste guiarme. Gracias por

enseñarme no solo de neuroendocrinología sino también a cambiar y ampliar un poco mi visión en la vida. Este trabajo no se habría logrado sin tu apoyo.

**A la maestra Angélica.** Quiero agradecerle por toda la ayuda que me ha ofrecido desde mi llegada a séptimo semestre a la unidad, gracias por escucharme en mis momentos de desesperación y gracias por toda la ayuda administrativa. Sin usted no habría podido llegar a este momento.

**A Mary Carmen,** te agradezco todos los consejos que me diste desde el primer día que nos presentaron, gracias por ayudarme y enseñarme no solo EEG sino también valores humanos. Gracias por apoyarme y ser parte de mi formación.

**A la doctora Elizabeth.** Que desde el momento en el que entre al laboratorio me recibiste muy bien y siempre que necesite ayuda, nunca dudaste en darmela. **A la doctora Rosa** muchas gracias por los comentarios y la ayuda con mi tesis. Siempre voy a recordar verla en los pasillos y saludarme con mucha amabilidad.

**Ivonne** eres la persona más linda y noble que he conocido en mi vida, me enseñaste a ser una mejor amiga, compañera y equipo de laboratorio. Gracias por ser mi team y rescatarme, definitivamente, gracias por apoyarme cuando estuve ausente y mantener el lab a flote.

**A Carlos, Linda e Ilse** gracias por enseñarme todo lo que pudieron en el laboratorio, ustedes me instruyeron a ser una mejor bióloga. Ilse, gracias por ser paciente conmigo, Linda gracias por darme la sabiduría que necesitaba y Carlos gracias por apoyarme, ayudarme y ser un gran amigo.

**A mis amigos del laboratorio 2,** Mirza, Jesús, Alejandra, Ángel, Roberto, Diana y Madison. A todos ustedes les quiero agradecer por ser mis amigos y aceptarme tal como soy. Gracias por dejarme enseñarles y ayudarlos en lo que se necesitaba, ustedes son parte fundamental en mi formación profesional y siempre van a contar conmigo.

**A Luis,** mi primo y mi hermano, eres el mayor cómplice de mis travesuras gracias a ti mi vida siempre ha sido una aventura. Te amo.

**A Nala** por ser mi compañera

Para Vicky H. y Luz M. por que hoy no sería nada sin ustedes  
Mis mujeres maravilla



# Índice

<b>1. Lista de abreviaciones</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	2
<b>3. Marco teórico</b> .....	4
3.1. El ovario, el desarrollo folicular y la ovulación .....	4
3.2. La hipófisis y las gonadotropinas .....	12
3.3. La GnRH y el área preóptica del hipotálamo .....	16
3.4. Regulación circadiana de la reproducción .....	22
3.5. La relación entre el sistema circadiano, el POA, el ARC y el RP3V .....	26
<b>4. Justificación</b> .....	34
<b>5. Hipótesis</b> .....	35
<b>6. Objetivos</b> .....	36
<b>7. Materiales y métodos</b> .....	37
<b>8. Resultados</b> .....	44
<b>9. Discusión</b> .....	55
<b>10. Conclusiones</b> .....	72
<b>11. Perspectivas</b> .....	73
<b>12. Bibliografía</b> .....	74

# 1. Lista de abreviaciones

<b>17<math>\beta</math>-HSD:</b> 17 $\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa	<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>:</b> Ion bicarbonato
<b>3V:</b> Tercer ventrículo	<b>ipRGCs:</b> Células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles
<b>3<math>\beta</math>-HSD:</b> 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa	<b>K<sup>+</sup>:</b> Ion potasio
<b>5-HT:</b> Serotonina	<b>LH:</b> Hormona luteinizante
<b>ACSF:</b> Líquido cefalorraquídeo artificial	<b>LHR:</b> Receptor de la hormona luteinizante
<b>ACTH:</b> Hormona adenocorticotrópica	<b>MeAp:</b> Núcleo medial de la amígdala
<b>AgRP:</b> Proteína relacionada con agutí	<b>Mg<sup>2+</sup>:</b> Ion magnesio
<b>AHA:</b> Área hipotalámica anterior	<b>MSH:</b> Hormona estimulante de los melanocitos
<b>AR:</b> Receptor de andrógenos	<b>Na<sup>+</sup>:</b> Ion sodio
<b>ARC:</b> Núcleo arqueado	<b>NPY:</b> Neuropeptido Y
<b>AVP:</b> Arginina vasopresina	<b>P:</b> Ion fósforo
<b>AVPV:</b> Área anteroventral periventricular	<b>PGCs:</b> Células germinales primordiales
<b>BNST:</b> Núcleo basal de la estría terminal	<b>PKA:</b> Proteína quinasa
<b>Ca<sup>2+</sup>:</b> Ion calcio	<b>POA:</b> Área preóptica
<b>cAMP:</b> Adenosín monofosfato cíclico	<b>POMC:</b> Proopiomelanocorticona
<b>Cl<sup>-</sup>:</b> Ion cloro	<b>PVN:</b> Núcleo paraventricular del hipotálamo
<b>CRF:</b> Factor liberador de corticotropina	<b>RHT:</b> Tracto retino-hipotalámico
<b>CSF:</b> Líquido cefalorraquídeo	<b>RP3V:</b> Área rostral periventricular del tercer ventrículo
<b>CYP11A1:</b> Citocromo P450	<b>SCN:</b> Núcleo supraquiasmático
<b>DMH:</b> Núcleo dorsomedial del hipotálamo	<b>SON:</b> Núcleo supraóptico
<b>E<sub>2</sub>:</b> Estradiol	<b>SP:</b> Sustancia P
<b>ER:</b> Receptor de estradiol	<b>TH:</b> Tirosina hidroxilasa
<b>FSH:</b> Hormona estimulante de los folículos	<b>TTX:</b> Tetrodotoxina
<b>FSHR:</b> Receptor de la hormona estimulante de los folículos	<b>VIP:</b> Péptido intestinal vasoactivo
<b>GABA:</b> Ácido $\gamma$ -aminobutírico	<b>VMH:</b> Núcleo ventromedial del hipotálamo
<b>GnRH:</b> Hormona liberadora de las gonadotropinas	<b><math>\alpha</math>-MSH:</b> Hormona estimulante de los melanocitos alfa
<b>GRP:</b> Péptido liberador de gastrina	<b><math>\beta</math>-MSH:</b> Hormona estimulante de los melanocitos beta

## 2. Introducción

La reproducción de los mamíferos requiere de la producción e interacción de los gametos masculinos y femeninos para dar origen a un nuevo individuo. En el caso de los machos, el gameto es el espermatozoide y su maduración se lleva a cabo en los testículos, mientras que el ovocito, que es el gameto femenino, madura en los folículos ováricos. La ovulación es indispensable para que se pueda llevar a cabo la interacción entre los gametos, ya que es el proceso mediante el cual el ovocito es expulsado del folículo hacia el oviducto, en donde se encuentra con los espermatozoides (Robker *et al.*, 2018).

Las funciones de los ovarios son el resultado de una serie de procesos hormonales y nerviosos que son regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO). La hormona estimulante de los folículos (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que son las gonadotropinas hipofisarias, llegan al ovario a través del sistema circulatorio. Una vez en él, se unen a sus receptores en las células de los folículos ováricos, donde regulan el desarrollo de estos que culminará con la ovulación; así como la síntesis de las hormonas esteroideas y proteicas (Oyola y Handa, 2017). La secreción de las gonadotropinas, depende de la unión de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) a sus receptores ubicados en los gonadotropos hipofisarios (Herbison, 2016).

La GnRH es un decapeptido sintetizado en neuronas hipotalámicas ubicadas principalmente en el área preóptica (POA). Éstas proyectan sus axones hacia la eminencia media, en donde se encuentra un sistema de capilares que distribuye a la GnRH en la hipófisis. La GnRH es secretada en dos patrones: el tónico y el fásico. Ambos son de tipo pulsátil, sin embargo, el primero se caracteriza por una baja frecuencia y amplitud de la secreción, mientras que el segundo presenta una mayor frecuencia y amplitud (Herbison, 2016; Oyola y Handa, 2017). La secreción tónica se presenta durante la mayor parte del ciclo estral de los roedores y resulta en la secreción basal de las gonadotropinas que modula el desarrollo de los folículos ováricos. Por otro lado, la secreción fásica ocurre por la tarde de la etapa del proestro y conlleva a un incremento brusco en la secreción de las gonadotropinas al que se le denomina como “pico preovulatorio”, que estimula la ovulación (Kumar *et al.*, 1997; Themmen y Huhtaniemi, 2000; Herbison, 2016). Se ha mostrado que dicho pico preovulatorio depende de una alta concentración de estradiol y de su convergencia con una señal

nerviosa con periodicidad circadiana que proviene del núcleo supraquiasmático (SCN) y que se presenta entre las 14:00 y las 17:00 horas del proestro (Everett y Sawyer, 1950; Wiegand *et al.*, 1980).

Se ha mostrado que la síntesis y secreción de la GnRH durante todo el ciclo estral depende de la actividad de otros sistemas de neurotransmisión. Las neuronas responsables se encuentran en diferentes áreas del hipotálamo, como es el núcleo dorsomedial, el núcleo ventromedial, el núcleo arqueado (ARC) y el área rostral periventricular del tercer ventrículo (RP3V) (Griffin y Flanagan-Cato, 2011; Putteeraj *et al.*, 2016). Estas dos últimas áreas sintetizan kisspeptina, un estimulante de la secreción de la GnRH cuya función se ha vinculado con la secreción diferencial de la misma. En este sentido, se ha observado que la actividad del ARC está relacionada con la secreción tónica del decapeptido, mientras que la del RP3V con la fásica (Smith *et al.*, 2006). Aunado a esto, se ha mostrado que las neuronas del ARC y del RP3V coexpresan la isoforma alfa del receptor a estradiol (ER $\alpha$ ), por lo que aparentemente son las estructuras que median la comunicación entre el hipotálamo y los ovarios (Dubois *et al.*, 2015; Putteeraj *et al.*, 2016; Wang y Moenter, 2019).

De acuerdo con lo anterior, se ha observado que existen interacciones anatómicas entre el POA, el SCN, que es el reloj principal del sistema circadiano, el ARC y el RP3V, por lo que se ha propuesto que la regulación de la secreción de la kisspeptina, y por ende de la GnRH, no solo depende de señales estrogénicas, sino también circadianas (Putteeraj *et al.*, 2016). El bloqueo de la actividad eléctrica del SCN a las 14:00 horas, independientemente de la etapa del ciclo estral, lo que resulta en un bloqueo de la ovulación. Esto aporta información para sustentar la idea de que el sistema circadiano regula tanto la secreción tónica como fásica de la GnRH (Silva *et al.*, 2020). Por otro lado, el bloqueo de la actividad eléctrica de las neuronas del ARC resulta en la inhibición de la ovulación cuando se realiza en metaestro, diestro y proestro, por lo que se propone que esta estructura no solo modula la secreción tónica, sino también la fásica (Silva, 2021). Con base en lo anterior, nos preguntamos si el RP3V también participa en la regulación de la ovulación en días diferentes al proestro, por lo que evaluamos el efecto del bloqueo de la actividad eléctrica de sus neuronas a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral.

### 3. Marco Teórico

#### 2.1 El ovario, el desarrollo folicular y la ovulación

En los mamíferos, los ovarios son órganos pares que se ubican en la cavidad abdominal, caudal a los riñones y rostral al útero. Reposan sobre un pliegue del peritoneo denominado mesovario, permanecen unidos a la pared pélvica por el ligamento suspensorio y al útero por el ligamento útero-ovárico (Weidner *et al.*, 2009). Los ovarios están compuestos por células germinales, estromales y epiteliales. Adicionalmente, están altamente irrigados por vasos sanguíneos y reciben información nerviosa por parte del nervio ovárico superior, el nervio del plexo ovárico y el nervio vago (Peters, 1969; Duke, 1980; Domínguez *et al.*, 1991).

Estos órganos tienen dos funciones: la producción de ovocitos viables capaces de ser fecundados y la síntesis y secreción de hormonas esteroides y proteicas (Oktem y Oktay, 2008). El desarrollo de los ovocitos se lleva a cabo en estrecha asociación con células somáticas, formando una unidad anatómica y funcional que se conoce como el folículo ovárico (Domínguez *et al.*, 1991). Mientras éstos se desarrollan, sus células somáticas se dividen, diferencian y secretan hormonas. Una vez finalizado el desarrollo del folículo, ocurre la ovulación, que es el resultado de un proceso inflamatorio que culmina con la ruptura del folículo y del epitelio superficial del ovario, lo que resulta en la expulsión del ovocito hacia el oviducto que lo conducirá hacia el útero (Oktem y Oktay, 2008; Duffy *et al.*, 2018).

En el caso de los roedores, el desarrollo del ovario inicia durante la etapa embrionaria. Las células germinales primordiales (PGCs), que darán origen a los gametos, se originan en el saco vitelino y migran hacia el tejido mesodérmico a través del cual alcanzan al intestino primitivo, al que siguen hacia las crestas gonadales, en donde se establecen las gónadas primitivas aproximadamente en el día 10 del desarrollo embrionario del ratón. Estas últimas se desarrollan a partir del engrosamiento del epitelio mesonéfrico y de los cambios fenotípicos que presentan sus células al transformarse en células epiteliales de la cresta gonadal (GREL). Las células GREL y las PGCs comienzan a proliferar, a su vez, la lámina basal del mesonefros se rompe, lo que permite la migración de las células del estroma mesonéfrico y la extensión de vasos sanguíneos. El proceso antes descrito es controlado por la expresión de los factores de

transcripción: *Gata4*, *Fog2*, *Sfl*, *Wt1*, *Lhx9* y *Emx2* (Hummitzsch *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014; Hummitzsch *et al.*, 2019).

La diferenciación sexual de la gónada primitiva sucede aproximadamente en el día 12 del desarrollo embrionario, cuando las PGCs continúan proliferando por mitosis. Las células producidas mediante este proceso son denominadas ovogonias y conforme se desarrollan, se agrupan para formar los denominados “nidos de ovogonias” (Pepling, 2006; Nguyen *et al.*, 2012; Sarraj y Dummond, 2012; Hummitzsch *et al.*, 2019). Alrededor del día 15.5 se da la primera ola de apoptosis y las ovogonias comienzan a dividirse por meiosis, dando origen a los ovocitos primarios (Pepling, 2006; Sarraj y Dummond, 2012). Éstos son rodeados por una capa de células somáticas foliculares, conformando a los folículos primordiales. Cabe mencionar que la meiosis de las ovogonias sucede en la corteza del ovario, mientras que la maduración a ovocitos y la aparición de las primeras células foliculares ocurre entre la corteza y la médula (Pepling, 2006; Hummitzsch *et al.*, 2019). Entre el día 17.5 y el nacimiento ocurre la segunda ola de apoptosis (Sarraj y Dummond, 2012).

Durante los primeros 10 días después del nacimiento, los procesos de desarrollo que ocurren en los ovarios son modulados por factores paracrinos y autocrinos producidos localmente. Aproximadamente entre el cuarto y el quinto día postnatal, las células estromales rodean a los ovocitos formando a los folículos primordiales, que se encuentran muy juntos entre sí. Aproximadamente en el día 12, el estroma intersticial del ovario comienza a expandirse y los folículos comienzan a separarse. Éstos se diferencian hasta el estadio secundario, en el que presentan células de la granulosa adheridas al ovocito y células de la teca, mismas en las que comienza a aumentar la expresión de los receptores a la LH y la FSH (Picut *et al.*, 2015). Alrededor del día 15 se forma la zona pelúcida, que es un conjunto de glicoproteínas que rodean al ovocito y que desempeñan un papel imprescindible durante la fecundación, ya que participa en el reconocimiento del espermatozoide y evita la polispermia (Picut *et al.*, 2015; Gupta, 2018).

Entre los días 21 y 32 se observan folículos antrales grandes y otros que presentan señales de atresia y apoptosis en algunas células. Los receptores a la LH y la FSH aumentan significativamente y se puede observar el hilio ovárico. Finalmente, entre el día 38 y el 46 ocurre la etapa puberal, que se caracteriza por la primera ovulación y por consiguiente la formación del primer cuerpo lúteo (Picut *et al.*, 2015). El proceso antes

descrito es cíclico y ocurrirá durante toda la vida reproductiva del animal, que culmina con la senescencia ovárica al agotarse la reserva de folículos (McGee y Hsueh, 2000).

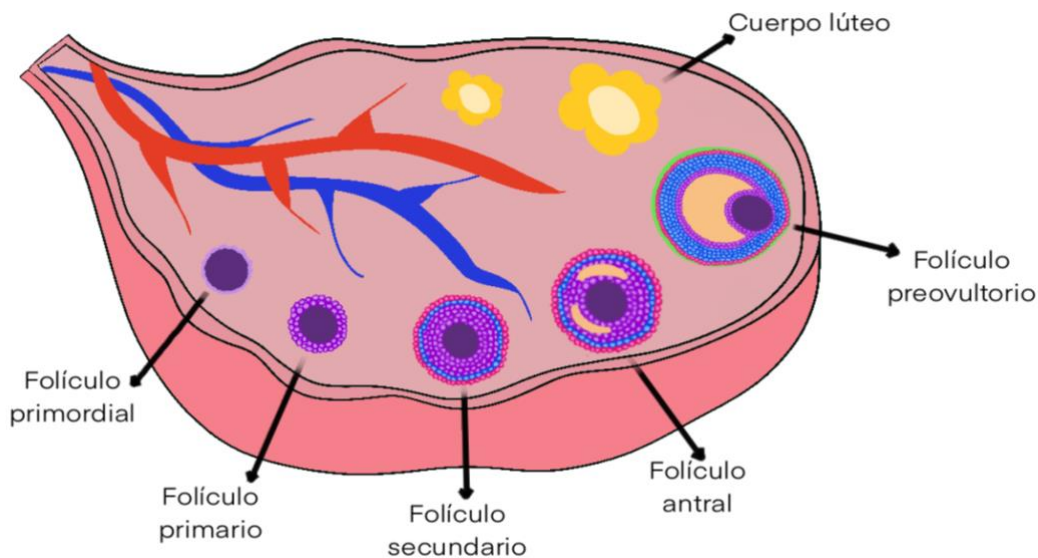
Como se mencionó anteriormente, el desarrollo del ovocito depende de su interacción con células somáticas altamente proliferativas que lo aíslan del resto del ovario. Éstas se conocen como células de la granulosa y de la teca y están separadas por la lámina basal (Domínguez *et al.*, 1991; Rajkovic *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2018; Orisaka *et al.*, 2021). El folículo ovárico es la unidad funcional que está formado por el ovocito, las células de la granulosa y las de la teca (Pepling, 2006; Duffy *et al.*, 2018).

Las células de la granulosa se dividen en dos poblaciones: las del cúmulo y las murales. Las primeras son aquellas que rodean al ovocito, mientras que las segundas se encuentran formando un anillo alrededor del folículo. Cabe mencionar que, además de su distribución, ambas poblaciones se diferencian porque las del cúmulo se encuentran más separadas entre sí. Además, existen diferencias en la expresión y distribución de los receptores a hormonas esteroideas y proteicas (Espey, 1967; Nguyen *et al.*, 2012; Duffy *et al.*, 2018). Por otro lado, las células teca se dividen en la teca interna y la teca externa. Las primeras se caracterizan por ser cuboides y estereoidogénicas, mientras que las segundas son alargadas y altamente vascularizadas. La teca externa se llega a mezclar con la túnica albugínea, que es el tejido conectivo que se encuentra alrededor del folículo. Entre la túnica albugínea y la superficie del epitelio ovárico se encuentra una lámina basal que está compuesta por laminina, entactina y proteoglicanos (Espey, 1967; Duffy *et al.*, 2018).

Los folículos ováricos de los roedores se clasifican en primordiales, primarios, secundarios, antrales y preovulatorios, esto en función de sus características anatómicas y fisiológicas. Los primordiales miden aproximadamente 17  $\mu\text{m}$  de diámetro y se caracterizan por tener un ovocito pequeño, con un diámetro promedio de alrededor de 12.6  $\mu\text{m}$ , que está rodeado parcial o completamente por un anillo de no más de 20 células de la pregranulosa aplanadas. Los folículos primarios, por su parte, miden alrededor de 52.1  $\mu\text{m}$ . El tamaño de su ovocito es de aproximadamente 28.8  $\mu\text{m}$ , rodeado completamente por una capa de células que han madurado hasta convertirse en células de la granulosa cuboidales. En contraste con lo anterior, el folículo secundario tiene más de una capa de células de la granulosa y ya se pueden diferenciar las células de la teca. Sus ovocitos miden aproximadamente 53.8  $\mu\text{m}$  de diámetro y se

encuentran rodeados por la zona pelúcida, lo que resulta en un diámetro total de alrededor de  $104\ \mu\text{m}$  (Figura 1. Griffin *et al.*, 2006; Rodgers e Irving-Rdogers, 2010; Bartlewki *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2018). Conforme los folículos se desarrollan, sus células secretan líquido folicular, que está compuesto por agua, hormonas esteroides, glicoproteínas, proteínas plasmáticas polisacáridos y enzimas (Mariani y Bellver, 2018). Este líquido se acumula entre las células de la granulosa de los folículos secundarios, formando los cuerpos de Call-Exner, que al fusionarse dan origen al antro folicular (Bartlewki *et al.*, 2011).

Los folículos antrales poseen varias capas de células de la teca y miden de  $187\ \mu\text{m}$  a  $248\ \mu\text{m}$ . El ovocito, por su parte, ha crecido hasta un diámetro promedio de  $70\ \mu\text{m}$ . Al último estadio se le conoce como folículo preovulatorio, capaz de ovular en el ciclo estral en curso. Estos folículos se caracterizan por su gran tamaño, de alrededor de  $424\ \mu\text{m}$ . El líquido folicular se concentra en un antro grande y varias capas de células de la granulosa rodean al ovocito maduro (cerca de  $72.3\ \mu\text{m}$ ) formando al cúmulus, mientras que el resto se adosan a la teca interna y son conocidas como células de la granulosa murales (Figura 1. Griffin *et al.*, 2006; Rodgers e Irving-Rdogers, 2010; Bartlewki *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Desarrollo folicular. Se observan los folículos en sus diferentes estadios de maduración, desde el folículo primordial hasta la formación del cuerpo lúteo, que se lleva a cabo posterior a la ovulación (Imagen elaborada por Fatima Bolaños Hurtado).

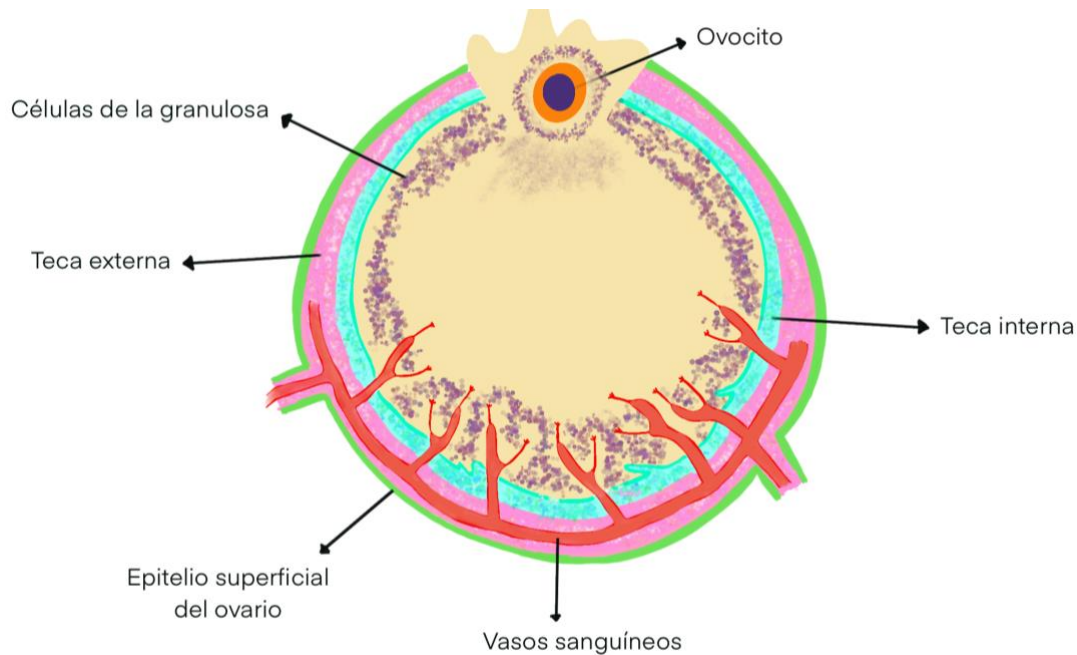
El desarrollo folicular se divide en dos fases: la independiente de las gonadotropinas, que opera en los folículos primordiales y primarios; y la dependiente



de las gonadotropinas, que se presenta a partir de los folículos secundarios tardíos. El punto que divide a ambas etapas es el inicio en la expresión de los receptores a la FSH en las células de la granulosa y a la LH en las células de la teca y de la granulosa murales (McGee y Hsueh, 2000; Orisaka *et al.*, 2021). Una vez que comienza el desarrollo folicular, no se detiene hasta que sucede la ovulación o el folículo se vuelve atrésico. La atresia folicular es el proceso por medio del cual se degradan y reabsorben los folículos, lo que puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo y puede ser inducido por diversos factores como un bloqueo en el pico preovulatorio de las gonadotropinas (Kaipia y Hsueh, 1997; Duffy *et al.*, 2018). La atresia se relaciona con la muerte celular y procesos de fagocitosis, inserción de macrófagos, migración de fibroblastos y síntesis local de colágeno. Los folículos que atraviesan por este proceso se caracterizan por la destrucción temprana de las capas de células de la granulosa, lo que se aprecia por la presencia de picnosis en sus núcleos y en su descamación al interior del antro. También se observa un engrosamiento de las capas de la teca y alteraciones morfológicas y funcionales en el ovocito (Domínguez *et al.*, 1991; Rodgers e Irving-Rodgers, 2010; Duffy *et al.*, 2018). Cabe mencionar que existen factores que pueden rescatar a los folículos de la atresia en sus etapas más tempranas, por ejemplo, las gonadotropinas y la progesterona (Kaipia y Hsueh, 1997).

La ovulación es el proceso mediante el cual un ovocito viable es expulsado del folículo. Esto depende de la ruptura del folículo debido a la degradación de las células y la matriz extracelular de un área entre el antro y el epitelio superficial del ovario. La ovulación se asemeja a un proceso inflamatorio ya que intervienen diversas quimiocinas, citocinas y enzimas que son secretadas por células inmunológicas, así como por el desarrollo y dilatación de vasos sanguíneos (**Figura 2.** Espey, 1967; Medzhitov, 2008; Duffy *et al.*, 2018). La ovulación es desencadenada por la LH, que estimula la separación de las células de la granulosa de su lámina basal a nivel del ápice, que es la porción más delgada del folículo. Posteriormente, los vasos sanguíneos se infiltran en el folículo y ocurre un incremento en su permeabilidad, lo que permite el ingreso de células inmunitarias entre las células de la granulosa y en el antro. Las fibras de colágeno comienzan a degradarse por acción de enzimas hidrolíticas, por lo que la superficie del epitelio ovárico y su lámina basal se rompen. Algunos autores proponen que el estigma, que es el punto del folículo por el que es expulsado el ovocito, se forma por la necrosis del tejido como resultado de una isquemia localizada (**Figura**

2. Espey, 1967; Themmen y Huhtaniemi, 2000; Rajkovic *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Proceso de ovulación. Representación del momento exacto en el que el ovocito es expulsado del folículo. Se puede observar la extensión de los vasos sanguíneos hasta el antro, para el ingreso de las células inmunitarias (Imagen elaborada por Fatima Bolaños Hurtado).

El cuerpo lúteo comienza a formarse a partir del remanente folicular una vez que el ovocito es expulsado (Espey, 1967). Dicho remanente atraviesa por un proceso de angiogénesis asociado a la proliferación de las células endoteliales capilares y a la infiltración de fibroblastos, lo que resulta en la formación de una abundante red de capilares sanguíneos. Éstos aportan, entre otros nutrientes, el colesterol que servirá como precursor de las hormonas esteroideas sintetizadas por el cuerpo lúteo (Weber *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1994). Durante este proceso, la LH estimula un cambio fenotípico en las células de la granulosa y de la teca del que resultan dos tipos de células: las luteales grandes (previamente células de la granulosa) y las luteales pequeñas (previamente células de la teca) (Bartlewski *et al.*, 2011). Las primeras poseen un número relativamente bajo de receptores a la LH, por lo que se han asociado con la producción basal de progesterona en respuesta a la acción de la gonadotropina. Por otro lado, las células luteales pequeñas poseen un mayor número de receptores a la LH, por lo que se les asocia con los incrementos en la secreción de progesterona que se observan cuando se estimula al cuerpo lúteo con la gonadotropina. Estas células también

expresan receptores a la prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , a través de los cuales se inhibe la secreción de la progesterona (Weber *et al.*, 1987; Cooke, 1988; Smith *et al.*, 1994).

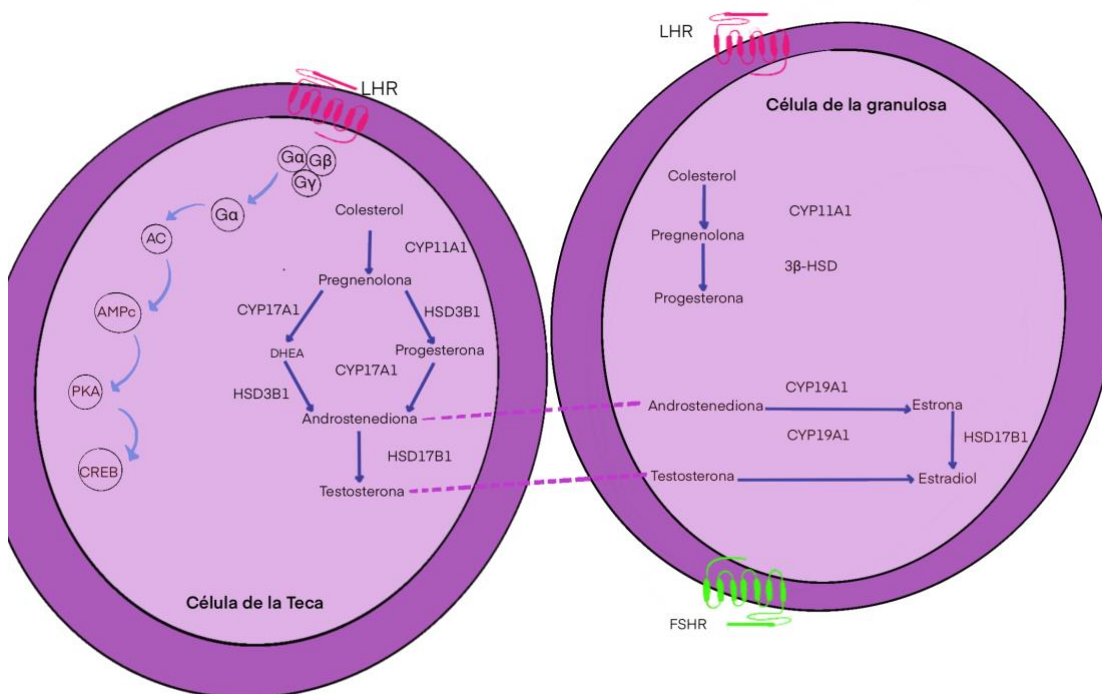
En las ratas cíclicas, el cuerpo lúteo alcanza su tamaño más grande durante el diestro 1 y mantiene ese tamaño hasta el día del diestro 2 del siguiente ciclo. Esto se debe a que el estradiol estimula la actividad luteofílica del cuerpo lúteo (Hilliard, 1973). Por otro lado, durante la gestación, el cuerpo lúteo se hipertrofia y se activa, por lo que hay una mayor concentración de progesterona. Poco antes del parto y durante la lactancia hay un decremento brusco en la concentración de dicha hormona, por lo que se considera que el cuerpo lúteo no se encuentra activo. Aparentemente es la prolactina la que ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad secretora del cuerpo lúteo en este momento (Kurusu *et al.*, 2009).

Además de la producción de gametos, el ovario también tiene la función de sintetizar y secretar hormonas proteicas como la activina, la inhibina y la folistatina; y hormonas esteroides como las progestinas, los andrógenos y los estrógenos (Findlay, 1993). En general, las hormonas esteroides estimulan la proliferación y el desarrollo de las células y regulan al sistema reproductor, principalmente a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Holst *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2018). También se ha observado que participan en procesos no reproductivos; por ejemplo, modulan la sensibilidad de los tejidos a la insulina, previenen la apoptosis en diversos tipos de células, estimulan la dilatación de los vasos sanguíneos, inhiben la degradación de los tejidos conjuntivos, modulan la actividad del sistema nervioso, promueven el metabolismo del tejido adiposo, regulan la retención de líquidos, entre otras (Kumar, *et al.*, 2018). Las hormonas esteroides son derivados del colesterol y el proceso por el cual son sintetizadas se conoce como esteroidogénesis, que en los ovarios ocurre según los mecanismos descritos en la teoría de la doble célula-doble hormona (Holst, *et al.*, 2004; Jamnongjit y Hammes, 2006). La concentración de estas hormonas depende de la etapa del ciclo reproductivo en la que se encuentre el organismo (Jamnongjit y Hammes, 2006).

En el folículo, la síntesis de las hormonas esteroides inicia con la unión de la LH a sus receptores en las células de la teca interna, lo que estimula la traslocación del colesterol a la mitocondria a través de la actividad de la proteína StAR. Una vez en la mitocondria, la enzima citocromo P450 (CYP11A1) transforma a la molécula de colesterol en pregnenolona, que posteriormente es convertida en progesterona por la

enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD). La progesterona es el sustrato de la enzima CYP17A1, que sintetiza androstenediona por medio de dos vías de síntesis; la delta 4 y la delta 5. En la primera vía se convierte a la pregnenolona en progesterona por la catálisis de la enzima  $3\beta$ -HSD y posteriormente por la enzima CYP17A1 se sintetiza a androstenediona. En la vía delta 5 la enzima CYP17A1 convierte a la pregnenolona en dehidroepiandrosterona, que sirve de sustrato a la enzima  $3\beta$ -HSD para sintetizar androstenediona (Figura 3. Miller, 2017; Duffy *et al.*, 2018).

A partir de la androstenediona se pueden seguir dos rutas de síntesis. En la primera, ésta pasa a las células de la granulosa, en donde la enzima CYP19A1 la convierte en estrona en respuesta a la interacción de la FSH con su receptor. Finalmente, el estradiol se sintetiza a partir de la estrona por acción de la enzima  $17\beta$ -Hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD). En la segunda ruta, la androstenediona es transformada en testosterona por la enzima  $17\beta$ -HSD dentro de la célula de la teca interna. Posteriormente, la testosterona es captada por las células de la granulosa, en donde la enzima CYP19A1 la transforma en estradiol en respuesta a la interacción de la FSH con su receptor (Figura 3. Miller, 2017; Duffy *et al.*, 2018).



**Figura 3.** Teoría de la doble célula-doble hormona. La síntesis de las hormonas esteroides inicia cuando la LH y la FSH se unen a sus receptores en las células de la teca interna y de la granulosa. Posteriormente, distintas enzimas catalizan la conversión progresiva del colesterol en progestinas, andrógenos y estrógenos (Imagen elaborada por Fatima Bolaños Hurtado).

## ***2.2 La Hipófisis y las gonadotropinas***

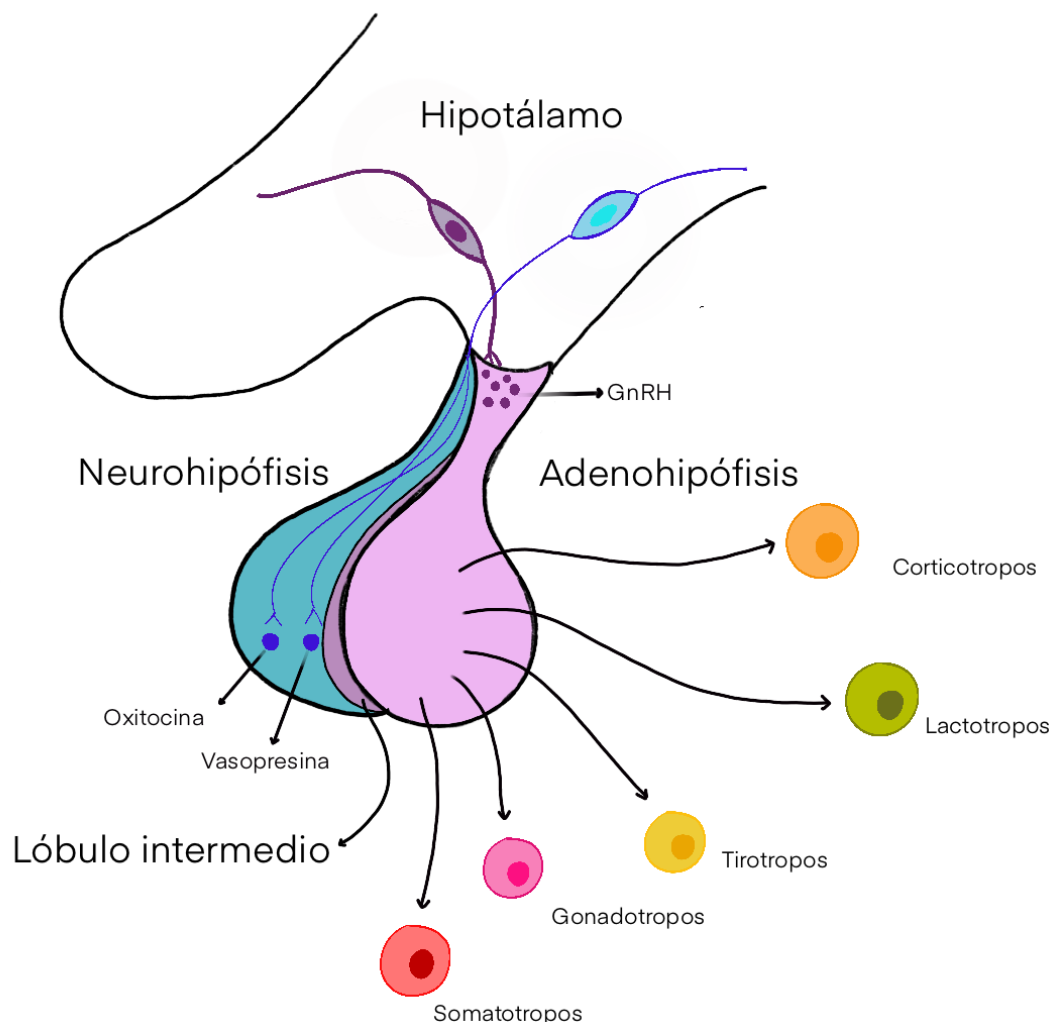
Como se mencionó antes, las funciones ováricas dependen de señales hormonales que provienen de la hipófisis. Ésta es conocida como la glándula maestra, ya que regula la actividad de diversas glándulas endocrinas como las adrenales, la tiroides, la glándula mamaria y las gónadas. La hipófisis se ubica justo por debajo del hipotálamo, en un nicho óseo de la base del cráneo denominado como la silla turca. Esta glándula se divide en un tallo hipofisario y tres lóbulos: el posterior o neurohipófisis, el intermedio y el anterior o adenohipófisis (Daniel, 1976; Dorton, 2000; Hong *et al.*, 2016).

La neurohipófisis secreta principalmente oxitocina y arginina vasopresina (AVP), también conocida como la hormona antidiurética por su función en la regulación de la retención de agua en los riñones (Dorton, 2000; Amar y Weiss, 2003). Tanto la oxitocina como la AVP se sintetizan en el hipotálamo y llegan a la neurohipófisis por medio de fibras nerviosas que componen al tracto hipotálamo-hipofisario (**Figura 4**). En el caso de la oxitocina, es liberada al torrente sanguíneo y llega a su órgano blanco; en el útero estimula la contracción de los músculos lisos durante la labor de parto, y el de las células mioepiteliales de los alveolos de las glándulas mamarias provoca la expulsión de la leche (Amar y Weiss, 2003).

La hipófisis intermedia representa menos del 1% de la masa total de la hipófisis, está altamente inervada y, a diferencia de los otros dos lóbulos, tiene menos vasculatura (**Figura 4**). En el lóbulo intermedio se sintetizan y secretan diversas proteínas como la proopiomelanocortina y las isoformas alfa y beta de la hormona estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -MSH). El órgano blanco de la  $\alpha$ -MSH y la  $\beta$ -MSH es el tejido epitelial, en donde se les ha relacionado con la pigmentación (Amar y Weiss, 2003).

Por otro lado, la adenohipófisis alberga 5 tipos celulares que son los somatotropos, los corticotropos, los tirotropos, los lactotropos y los gonadotropos. Algunos autores consideran que el lóbulo intermedio de la hipófisis es parte funcional de la adenohipófisis, por lo que entonces contendría 6 tipos de células (Dorton, 2000). Estas células sintetizan distintas hormonas que son secretadas al sistema circulatorio, a través del cual alcanzan a sus órganos blanco que, en general, son glándulas endocrinas que retroalimentan a la hipófisis a través de sus propias hormonas (Dorton, 2000). Los somatotropos sintetizan a la hormona del crecimiento, cuyo órgano blanco es el hígado

y el tejido adiposo. Los corticotropos sintetizan a la hormona adenocorticotrópica (ACTH) que actúa sobre las adrenales. Los tirotrópos sintetizan a la hormona estimulante de la tiroides, cuyo órgano blanco es la glándula tiroidea. Los lactotrópos sintetizan a la prolactina, que estimula a las glándulas mamarias. Finalmente, los gonadotrópos sintetizan a las gonadotropinas, que modulan las funciones de los ovarios y los testículos (Dorton, 2000; Hong *et al.*, 2016; Amar y Weiss, 2003). Los gonadotrópos son células basófilas con un prominente aparato de Golgi y retículo endoplasmático y constituyen del 5 al 15% del total de la población celular de la adenohipófisis (Figura 4. Schally *et al.*, 1971; Pierce y Parsons, 1981; Dada *et al.*, 1984; Thompson y Kaiser, 2014; Nedresky y Singh, 2022).



**Figura 4.** Anatomía de la hipófisis en donde se distinguen sus tres lóbulos. En el caso de la neurohipófisis se esquematizan los axones de las neuronas hipotalámicas que sintetizan oxitocina y vasopresina. En la adenohipófisis se observan los distintos tipos de células presentes: somatotropos, gonadotropos, tirotrópos, lactotropos y corticotropos (Imagen elaborada por Fatima Bolaños Hurtado).

Las gonadotropinas son glicoproteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  que interactúan a través de puentes disulfuro. En total, estas hormonas tienen un peso aproximado de entre 30 y 40 kDa. La subunidad  $\alpha$  es común para ambas gonadotropinas y, en los humanos, el gen que la codifica se localiza en el cromosoma 6q12.21. Por otro lado, la subunidad  $\beta$  es la que les da la especificidad a estas hormonas, ya que en el extremo amino terminal se localiza la región que permite la unión con su receptor. En los humanos, el gen que codifica a la subunidad  $\beta$  de la LH se encuentra en el cromosoma 19q13.32, mientras que el de la FSH en el 11p13 (Pierce y Parsons, 1981; Kendall *et al.*, 1995; Themmen y Huhtaniemi, 2000; Fan y Hendrickson, 2005).

En los ovarios, la FSH regula el crecimiento y maduración del folículo y, por otro lado, al unirse a sus receptores en las células de la granulosa estimula la aromatización de los andrógenos por la enzima P450 aromatasa (Findlay y Drummond, 1999; Themmen y Huhtaniemi, 2000; Rajkovic, *et al.*, 2006; Domínguez y Cruz-Morales, 2011). Por su parte, la LH se une a receptores en las células de la teca interna, en donde estimula la acumulación del colesterol y un aumento en la síntesis de los andrógenos y de la aromatasa, lo que resulta en un incremento subsecuente en la síntesis de estrógenos. A su vez, como se mencionó anteriormente la LH promueve la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Themmen y Huhtaniemi, 2000; Domínguez y Cruz-Morales, 2011; Duffy *et al.*, 2018).

La relevancia de las gonadotropinas en la regulación del desarrollo y función gonadal se ha evidenciado a partir de estudios en los que se evalúa el efecto de mutaciones puntuales. Por ejemplo, se ha observado que la expresión del gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  es indispensable para que se exprese posteriormente el de la subunidad  $\beta$ . Además, la deficiencia en la expresión del gen que codifica para cualquiera de las subunidades inhibe la síntesis de las gonadotropinas y, por consecuencia, se presentan anomalías morfológicas y funcionales en las gónadas (Kendall *et al.*, 1995; Kumar *et al.*, 1997).

En el caso particular de la FSH, se ha mostrado que una alteración en la estructura de la cadena  $\alpha$  resulta en infertilidad, sin embargo, esto sólo sucede en las hembras (Kumar *et al.*, 1997; Findlay y Drummond, 1999; Themmen y Huhtaniemi, 2000; Abel *et al.*, 2000). Adicionalmente, las mutaciones en el gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  impiden el acople con la subunidad  $\beta$  y, por lo tanto, no se forma el dímero, lo que



resulta en la presencia de neoplasias en testículo y cérvix (Cox *et al.*, 1997; Findlay y Drummond, 1999; Themmen y Huhtaniemi, 2000). Por otro lado, se ha reportado que las mutaciones en el gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la LH retrasa el inicio de la pubertad y, por consecuencia, favorece la incidencia de infertilidad en humanos (Themmen y Huhtaniemi, 2000; Domínguez y Cruz-Morales, 2011).

Las funciones de ambas gonadotropinas sólo se llevan a cabo cuando éstas interactúan con su receptor, ya sea en las células de la teca, de la granulosa o las luteínicas (Aittomäki *et al.*, 1995; Findlay y Drummond, 1999; Rajkovic *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2018). En los humanos, los genes que codifican para el receptor a la LH y la FSH (LHR y FSHR, respectivamente) se localizan en los cromosomas 2p21 y 2p21-16, respectivamente (Themmen y Huhtaniemi, 2000). Los receptores son de tipo metabotrópico y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Findlay y Drummond, 1999; Themmen y Huhtaniemi, 2000; Rajkovic *et al.*, 2006). Los receptores de las gonadotropinas tienen tres dominios: uno extracelular, uno transmembranal y uno intracelular. El primero contiene al extremo amino terminal y al sitio de unión para el ligando, que presenta múltiples regiones con repeticiones de leucina y difiere entre el LHR y el FSHR por lo que le da la especificidad a cada uno. En el caso del LHR se han identificado 6 sitios de unión, mientras que en el FSHR únicamente 4. El segundo dominio es el transmembranal, que presenta 7 hélices transmembranales vinculadas por 3 bucles extracelulares y 3 bucles intracelulares. Finalmente, el dominio intracelular contiene al extremo carboxilo terminal y es el que interactúa con la proteína G (Aittoki *et al.*, 1995; Themmen y Huhtaniemi, 2000; Rajkovic *et al.*, 2006).

El LHR y el FSHR se acoplan a proteínas G<sub>s</sub>. Éstas activan a la adenil ciclasa en respuesta a la unión del ligando, lo que resulta en la elevación de la concentración intracelular de cAMP. Esto, a su vez, estimula el aumento de calcio dentro de la célula y la activación de ciertas proteínas quinasas (PKA) (Simoni *et al.*, 1997; Themmen y Huhtaniemi, 2000; Abel *et al.*, 2000; Fan y Hendrickson, 2005). Por otro lado, el LHR en las hembras se encuentra en las células de la granulosa, las células de la teca interna, de los folículos antrales y preovulatorios y las células luteínicas, (Themmen y Huhtaniemi, 2000; Phoophitphong *et al.*, 2017). Al igual que con el caso de las gonadotropinas, se ha mostrado que la expresión de los genes que codifican a sus receptores es imprescindible para la fertilidad. Por ejemplo, los ratones con delección



de cualquiera de estos presentan alteraciones en el desarrollo de las gónadas, el crecimiento folicular, el comienzo de la pubertad y también infertilidad (Findlay y Drummond, 1999; Themmen y Huhtaniemi, 2000; Abel *et al.*, 2000; Rajkovic *et al.*, 2006).

### ***2.3 La GnRH y el área preóptica del hipotálamo***

Las gonadotropinas se sintetizan y secretan en respuesta a señales neuroendocrinas que provienen de las neuronas que sintetizan a la GnRH, cuyos somas se encuentran en el hipotálamo, principalmente en el POA. El POA se encuentra en la zona preóptica medial del hipotálamo, lateral al tercer ventrículo y por encima del quiasma óptico (Simerly, 2015; Tsuneoka, 2018). Ésta no es considerada un área homogénea, ya que alberga poblaciones neuronales con distinta identidad neuroquímica que están asociadas a la regulación de distintos procesos fisiológicos y del comportamiento. Adicionalmente, sus células se encuentran dispersas y es un área sexualmente dimórfica (Tsuneoka, 2018), tanto en su densidad neuronal como en su tamaño (Simerly *et al.*, 1984). De acuerdo con diversos autores, el POA se divide en subregiones dependiendo de la densidad neuronal, de las proteínas que se sintetizan o de su morfología. Esta última clasificación es la más común y la divide en la zona lateral, la zona medial y la zona central (Simerly *et al.*, 1986; Simerly y Swanson, 1988; Simerly, 2015; Tsuneoka, 2018).

El POA recibe información nerviosa por parte de varias regiones hipotalámicas y extrahipotalámicas. Entre las estructuras hipotalámicas se encuentra el núcleo ventromedial (VMH), el núcleo premamilar ventral, el SCN, el ARC y el RP3V. En cuanto a las extrahipotalámicas, se han observado proyecciones al POA desde el núcleo basal de la estría terminal (BNST) del telencéfalo y desde el núcleo posterior y medial de la amígdala (MeAp) (Simerly *et al.*, 1986; Simerly, 2015; Tsuneoka, 2018).

Por su parte, el POA envía fibras neuronales a la mayor parte del hipotálamo, a ciertas partes del cerebro medio e incluso a la médula espinal (Simerly y Swanson, 1988). Las regiones del hipotálamo que reciben información del POA son el núcleo supraóptico (SON), el núcleo tuberomamilar, el núcleo supramamilar, el órgano subfornical, el núcleo dorsomedial (DMH) y los núcleos que, a su vez, proyectan al POA (VMH, ARC, SCN, RP3V). Por otro lado, se han encontrado tanto fibras como

botones terminales en el telencéfalo, específicamente en el BNST y en el MeAp. Otras áreas que reciben información del POA son el tálamo, la sustancia innominada, el núcleo del rafe, la comisura anterior y el núcleo septal lateral. Aunque son pocos los botones que se han observado, también se conecta con la corteza prefrontal y algunas fibras se pueden observar en el área infralímbica. Cabe mencionar que la mayoría de las proyecciones del POA a las áreas previamente mencionadas son ipsilaterales (Simerly y Swanson, 1988).

En el POA existen diversas poblaciones neuronales, mismas que sintetizan más de 10 neuropéptidos y diversos neurotransmisores clásicos (Tsuneoka, 2018). De acuerdo con estudios de inmunohistoquímica, se ha descrito que en el POA se encuentran neuronas que sintetizan serotonina (5-HT), dopamina, neuropéptido Y (NPY), sustancia P (SP), péptido intestinal vasoactivo (VIP), neurotensina, factor liberador de corticotropinas (CRF), GnRH, somatostatina, hormona liberadora de tirotrina, oxitocina, AVP, hormona liberadora de corticotropina, hormona estimulante de los melanocitos, entre otros (Simerly *et al.*, 1986). Además de lo anterior, el POA es un área con abundante expresión de receptores a estradiol (ER) y a andrógenos (AR) (Simerly *et al.*, 1990; Herbison y Theodosis; 1992).

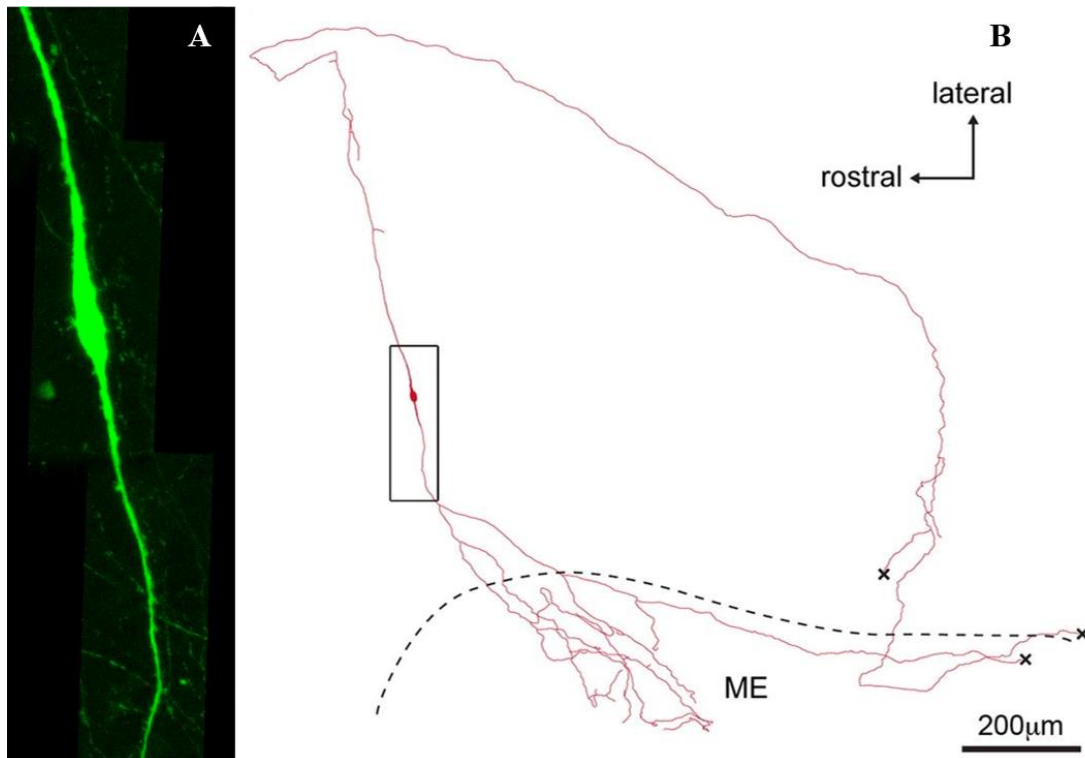
El POA está relacionado con la regulación de diferentes procesos fisiológicos, de entre los cuales destaca la temperatura corporal en los animales homeotermos (Simerly *et al.*, 1984; Boulant, 2000). Evidencia de ello proviene de un estudio realizado por Griffin y colaboradores, en donde se mostró que aproximadamente el 30% de las neuronas del POA son termosensibles. Esto debido a que a mayor temperatura aumenta la cantidad de disparos (Griffin *et al.*, 1984). Al POA también se le ha relacionado con la regulación de la sed hipovolémica, el ciclo del sueño y vigilia, el comportamiento materno, el comportamiento sexual y la ovulación inducida y espontánea (Kaasjager *et al.*, 1971; Tsuneoka, 2018). Esto último se ha observado en los experimentos en los que se realizan lesiones del POA, lo que resulta en un bloqueo de la ovulación (Kaasjager *et al.*, 1971). Por otro lado, la estimulación eléctrica de dicha área induce la ovulación (Barraclough y Gorski, 1961; Kaasjager *et al.*, 1971).

Las neuronas que regulan la ovulación son aquellas que sintetizan a la GnRH, mismas que son consideradas como el último eslabón nervioso en la regulación hipotalámica de este proceso (Herbison y Theodosis; 1992; Herde *et al.*, 2013). En general, las neuronas GnRHégicas son de tipo bipolar y, después de la pubertad,

contienen muchas espinas dendríticas a lo largo de sus axones para incrementar la superficie de contacto con otras neuronas (Herbison 2006). Las neuronas de GnRH están dispersas en diferentes estructuras del encéfalo, incluyendo a los bulbos olfatorios, el núcleo septal medial, la banda diagonal de Broca, el BNST, el órgano subfornical, en el POA, el área hipotalámica anterior (AHA), el ARC, el cuerpo caloso y la corteza cingulada (Silverman *et al.*, 1987; Conn y Crowley, 1994; Herbison 2006; Castañeyra-Ruíz *et al.*, 2013; Maggi *et al.*, 2015; Herbison, 2015; Herbison, 2018). Cabe mencionar que la mayoría de los somas de estas neuronas se encuentran en la zona medial del POA (MPOA) y en el AHA. Adicionalmente, solo éstas proyectan sus axones hasta la eminencia media, donde la neurohormona es secretada al sistema portal hipotalámico-hipofisario, por medio del cual llega a la adenohipófisis (Figura 5. Herbison y Theodosis; 1992; Herde *et al.*, 2013).

La GnRH es un decapeptido que en los mamíferos posee la siguiente secuencia de aminoácidos: pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub> (Khodr y Siler-Khodr, 1978). Se han encontrado 13 isoformas de la GnRH en los vertebrados y todas comparten el extremo amino terminal, el grupo carboxilo terminal y las posiciones 1,4, 9 y 10. De estas isoformas, sólo 3 se encuentran en los mamíferos y se les clasifica como mGnRH o GnRH-I, que fue la primera en describirse, la GnRH-II o GnRH de los pollos y, por último, la GnRH-III o la GnRH de los cobayos (Montaner, *et al.*, 2001). Además del encéfalo, la GnRH también es sintetizada por células que no son neuronas y que se localizan en diferentes órganos y tejidos como el endometrio, la placenta (Khodr y Siler-Khodr, 1978), las glándulas mamarias (Palmon *et al.*, 1994) y los ovarios (Sengupta *et al.*, 2008).

Las funciones de la GnRH dependen de su unión con su receptor transmembranal en los gonadotropos, así como en otras estructuras como las gónadas y la placenta (Conn y Crowley, 1994; Ortmann *et al.*, 2002; Flanagan y Manilall, 2017; Herbison 2018). Este receptor pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y presenta 7 dominios transmembranales. Se ha propuesto que los receptores de GnRH pueden acoplarse a proteínas de tipo G<sub>s</sub>, G<sub>i</sub> y G<sub>q/11</sub>. Existen dos sitios de unión entre la GnRH y su receptor, ubicados en los residuos de Lys121 y en el Glu301, respectivamente (Ortmann *et al.*, 2002; Thompson I y Kaiser U, 2014; Maggi *et al.*, 2015; Flanagan y Manilall, 2017).



**Figura 5.** Neurona de GnRH. Inmunofluorescencia de una neurona bipolar de GnRH en donde se puede observar el soma y sus axones (A). Reconstrucción en cámara lucida de un soma GnRHérgico Esquema y su proyección que llega a la eminencia media (ME) (Imagen tomada y modificada de Herde *et al.*, 2013).

Las neuronas de GnRH experimentan cambios anatómicos durante la pubertad, por ejemplo, la formación de espinas dendríticas. Además, también se han reportado cambios bioquímicos, ya que la síntesis de la GnRH incrementa durante esta etapa (Flanagan y Manilall, 2017). Además de lo anterior, la GnRH comienza a ser secretada de forma pulsátil e intermitente en dos patrones distintos: el tónico y el fásico (Wildt *et al.*, 1981; Herbison 2020). El patrón tónico se caracteriza por una frecuencia baja, ocurre durante la mayor parte del ciclo estral, en las etapas del estro, metaestro y diestro y estimula preferentemente la secreción de la FSH, por lo que modula el desarrollo folicular. Por otro lado, la secreción fásica se caracteriza por una mayor frecuencia y amplitud, se presenta solo durante la tarde del proestro y estimula la liberación preferente de la LH, por lo que está asociada con la ruptura del folículo durante la ovulación. A este evento se le conoce como la secreción o el pico preovulatorio de la GnRH/LH (Thompson I y Kaiser, 2014).

El mecanismo que regula la secreción pulsátil del decapeptido tiene componentes intrínsecos y extrínsecos a la neurona de GnRH. En el primer caso, se ha mostrado que las células GnRHérgicas inmortalizadas de la línea GT1-7 secretan a la GnRH de manera pulsátil, lo que depende de la sincronización entre ellas a través de factores

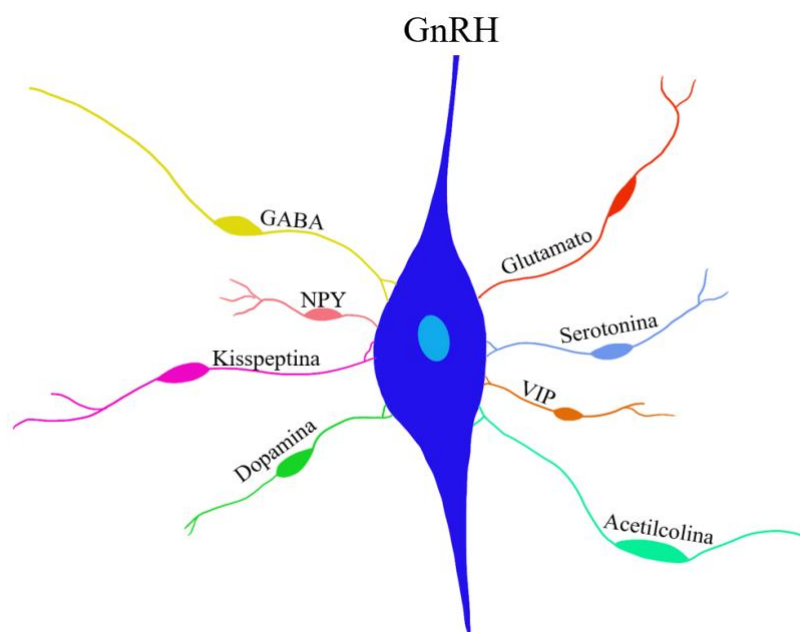
difusibles (Martínez de la Escalera *et al.*, 1992; Wetsel *et al.*, 1992; Weiner y Martínez de la Escalera, 1993). Por otro lado, los componentes extrínsecos implican la comunicación mono o multisináptica entre diversas poblaciones neuronales y los somas GnRHérgicos del POA. Se plantea que a través de estas vías se integra la información de diversos sistemas sensoriales que participan en la regulación de la reproducción, como el fotoperiodo y la disponibilidad de alimentos (Herbison 2006; Herbison 2018; Moore *et al.*, 2018).

Evidencia de las rutas extrínsecas proviene de los estudios de desaferentación, ya que al aislar al POA de las fibras nerviosas que provienen de distintas regiones del encéfalo se suprime el comportamiento de lordosis, el ciclo estral, la secreción de las gonadotropinas y la ovulación espontánea e inducida. Esto sugiere que, en el animal intacto, la actividad secretora de las neuronas de la GnRH es modulada por la información nerviosa que es generada fuera del POA (Phelps *et al.*, 1976; Teresawa y Wiegand, 1978; Carrillo y Sheridan, 1980; Takeo *et al.*, 1993). En concordancia, los estudios con trazadores neuronales han mostrado proyecciones directas e indirectas que arriban específicamente a las neuronas de GnRH del POA y que se originan en distintas estructuras hipotalámicas y extra-hipotalámicas (Van Der Beek *et al.*, 1997; Herbison 2006; Yip *et al.*, 2015).

Entre los neurotransmisores que están presentes en las terminales que inervan a las neuronas de GnRH se encuentran aminoácidos como el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y el glutamato. El primero modula su actividad dependiendo del receptor al que se une, por lo que se han reportado roles estimulantes e inhibitorios (Herbison 2006; Spergel, 2019). Por otro lado, el glutamato siempre induce la síntesis de la GnRH, sin importar si activa los receptores NMDA o los AMPA (Spergel, 2019). También se ha mostrado la presencia de neurotransmisores clásicos como la dopamina, serotonina, noradrenalina y acetilcolina. En estos casos, existen estudios que les atañen roles tanto estimulantes como inhibitorios, lo que parece depender del modelo experimental empleado, por lo que es necesario realizar estudios detallados para describir el rol particular de cada uno sobre la secreción de la GnRH. Finalmente, se ha mostrado la presencia de gasotransmisores como el monóxido de carbono y el óxido nítrico, que estimula e inhibe la actividad de las neuronas de GnRH, respectivamente (Figura 6. Liu y Herbison, 2013; Spergel, 2019).

Además de los sistemas de neurotransmisión anteriores, se han reportado fibras inmunoreactivas a distintos neuropéptidos que inervan a las neuronas de GnRH del POA. Por ejemplo, las fibras que contienen proopiomelanocortina (POMC), NPY, hormona estimulante de los melanocitos (MSH) y  $\beta$ -endorfina que provienen del ARC y otros núcleos asociados con la regulación del metabolismo han sido relacionadas con la integración de señales nutricionales que modulan la secreción de la GnRH (Ward *et al.*, 2009; Roa y Herbison, 2012). Por otro lado, las fibras que contienen oxitocina, probablemente originadas en el SON, inervan a las neuronas GnRHérgicas que expresan receptores al neuropéptido (Caligioni *et al.*, 2007). En concordancia, la administración de oxitocina acentúa la secreción preovulatoria de la GnRH y la LH (Evans y Tulloch, 1995).

De particular importancia para el presente estudio son las fibras que se originan en el SCN y que contienen al VIP o a la AVP. Éstas inervan directa o indirectamente a las neuronas de GnRH, respectivamente, y se ha mostrado que ambos péptidos ejercen un efecto estimulante sobre la síntesis y la secreción de la GnRH (Herbison 2006; Piet *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2019). También son importantes las fibras inmunoreactivas a la kisspeptina, que inervan directamente a los somas GnRHérgicos del POA y que se originan en el RP3V y el ARC. Cabe mencionar que la kisspeptina es el principal estimulante endógeno de la secreción de la GnRH (Figura 6. Gottsch *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005; Yip *et al.*, 2015).



**Figura 6.** Inervación de la neurona de GnRH. La neurona de GnRH (azul) recibe información nerviosa aferente de poblaciones neuronales (diferentes colores), que modulan de manera estimulante, inhibitoria, o ambas, la síntesis y secreción del decapeptido (Imagen elaborada por Fatima Bolaños Hurtado).

## ***2.4 Regulación circadiana de la reproducción***

Se ha mostrado que, además de la concentración de la GnRH y de las gonadotropinas, la actividad de los grupos neuronales que regulan su secreción también fluctúa a lo largo del ciclo estral y de la hora del día, lo que sugiere que los distintos componentes del sistema reproductivo son regulados por el sistema circadiano. Esto se ha observado principalmente mediante el análisis de la concentración de los receptores a estrógenos y neuropéptidos como la AVP, el VIP y la kisspeptina en diferentes momentos y estados hormonales (Smith *et al.*, 1975; Clarke *et al.*, 2006; Olvera-Juárez *et al.*, 2020). Una de las primeras evidencias sobre la interacción entre el sistema reproductivo y el circadiano fue la demostración de que existen señales nerviosas indispensables en la regulación de la ovulación espontánea que se presentan entre las 14:00 y las 16:00 horas del proestro, periodo al que se le conoce como la “ventana crítica”. Esto se observó mediante la inyección de barbitúricos a ratas cíclicas al inicio o al final de dicha ventana, lo que resultó en un bloqueo de la ovulación en el estro esperado solo en los animales tratados a las 14:00 horas. Si se permitía que los animales sobrevivieran, la ovulación ocurría normalmente durante el metaestro esperado, lo que sugiere que la señal nerviosa volvía a presentarse 24 horas después (Everett y Sawyer, 1950). Adicionalmente, la inyección de barbitúricos en distintos horarios del estro, metaestro y diestro mostró que existe una ventana crítica semejante a la del proestro durante cada etapa del ciclo estral y que las señales nerviosas generadas en ellas son indispensables para la ovulación (Domínguez y Smith 1974).

Por otro lado, el descubrimiento de que el SCN es el reloj central del sistema circadiano (Moore y Eichler 1972; Stephan y Sucker, 1972; Inouye y Kawamura 1979) incentivó diversos estudios en los que se lesionó la región del hipotálamo en la que se encuentra y se analizó el efecto sobre diversas funciones reproductivas. Por ejemplo, la destrucción del hipotálamo mediobasal, incluyendo al SCN, resulta en la abolición de la fluctuación en la concentración de las gonadotropinas (Gray *et al.*, 1978) y en la presencia de un estro constante en el frotis vaginal (Ma *et al.*, 1990). Estos resultados, sin embargo, son difíciles de interpretar ya que el hipotálamo mediobasal contiene a las fibras que transportan a la GnRH desde el POA hacia la eminencia media. Por otro lado, estudios más específicos en los que solo se lesionó al SCN, resultaron en el bloqueo del ciclo estral y de la ovulación, así como la eliminación del comportamiento de lordosis (Brown-Grant y Raisman, 1977; Raisman y Brown-Grant, 1977).



El SCN es una estructura alargada que se extiende desde el área ventral periventricular del hipotálamo anterior, por encima del quiasma óptico, hasta el hipotálamo mediobasal, cerca de las comisuras supraópticas (Balsalobre, 2002; Coomans *et al.*, 2015). Está dividido en izquierdo y derecho por el lecho del tercer ventrículo y cada lado mide alrededor de 0.136 mm cúbicos (Balsalobre, 2002; Nogueira *et al.*, 2014). El SCN es diferente a otros núcleos del hipotálamo por su alta densidad neuronal; aproximadamente 10,000 somas en cada lado, que se encuentran muy agrupados entre si (Van den Pol, 1980).

El SCN es heterogéneo ya que está compuesto por neuronas que difieren tanto en su anatomía como en su identidad neuroquímica (Yamaguchi *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2014). Entre los neurotransmisores que se encuentran en sus neuronas está el GABA, el péptido liberador de gastrina (GRP), la somatostatina, el VIP y la AVP (Pennartz *et al.*, 1998; Reghunandan y Reghunandan, 2006). Estos dos últimos están presentes en mayor concentración que los demás y, de acuerdo con la ubicación de las neuronas que los sintetizan, el SCN puede subdividirse en el área ventrolateral (*core*) y en el área dorsomedial (*Shell*), respectivamente (Romjin *et al.*, 1994; Pennartz *et al.*, 1998; Abrahamson y Moore 2001; Reghunandan y Reghunandan, 2006; Nogueira *et al.*, 2014; Angelopoulou *et al.*, 2019).

Se ha mostrado que las neuronas del SCN tienen un periodo de actividad de aproximadamente 24 horas que depende de una maquinaria molecular compuesta por genes reloj y por las proteínas que son codificadas por ellos (Piggins, 2003). En primera instancia se expresan los genes *Clock* y *Bmal1*, que componen al asa estimulante de la maquinaria, y sus proteínas forman un heterodímero en el citoplasma. Éste es trasladado al núcleo, en donde estimula la expresión de los genes *Per* y *Cry*, que conforman el asa inhibitoria. Las proteínas PER y CRY también forman dímeros en el citoplasma que son trasladados al núcleo, en donde inhiben la actividad de CLOCK:BMAL1 y, por lo tanto, su propia transcripción (Ko y Takahashi, 2006). Cabe mencionar que esta maquinaria molecular no solo se encuentra en las neuronas del SCN, sino en todas las células del organismo. En este sentido, el SCN actúa como un maestro de ceremonias que sincroniza la actividad de todos los tejidos y órganos con las variaciones en las condiciones del medio ambiente (Balsalobre, 2002).

La actividad rítmica del SCN se sincroniza con el medio externo a través de rutas sensoriales aferentes que le brindan información sobre el fotoperiodo, la temperatura,

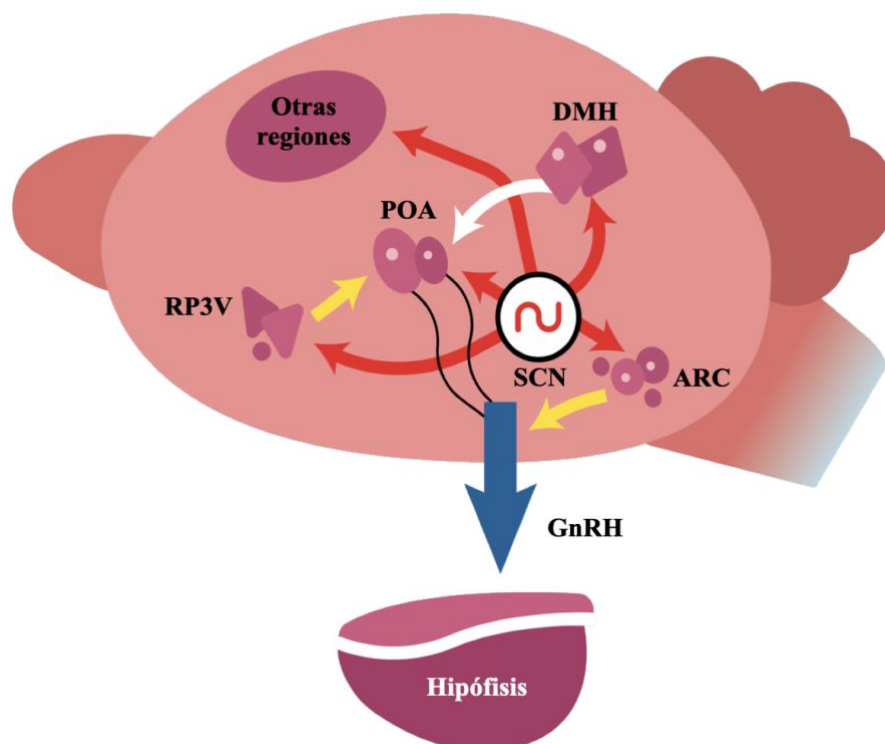


la presencia de depredadores, la disponibilidad de alimento, entre otros. Estas señales del medio son conocidas como *zeitgebers* (Roenneberg *et al.*, 2013) y, en el caso de los mamíferos, el fotoperiodo es el de mayor jerarquía y por ende el más estudiado. Las señales fóticas son captadas por células de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs), conocidas como células ganglionares de tipo “W”. A diferencia de los conos y bastones, las ipRGCs expresan melanopsina y sus axones forman la vía aferente conocida como el tracto retino-hipotalámico (RHT) (Freedman *et al.*, 1999; Berson *et al.*, 2002). El RHT se extiende por el nervio óptico e inerva principalmente al SCN, en donde sus terminales hacen sinapsis con las neuronas del área ventrolateral ipsilateral. A pesar de ello, se ha mostrado que algunas fibras alcanzan al SCN contralateral (Abrahamson y Moore 2001). Además del RHT, el SCN recibe información sobre el fotoperiodo de manera indirecta a través del tracto genículo-hipotalámico, que se origina en la hojuela intergeniculada del tálamo. Por otro lado, la información que concierne a los *zeitgebers* no fóticos proviene de diversas regiones del encéfalo, de entre las cuales destaca un plexo serotoninérgico que se origina en el núcleo del rafé (Moore y Card, 1985; Moga y Moore, 1997).

La información temporal que es integrada y organizada dentro del SCN es enviada a distintas regiones del encéfalo y a los órganos periféricos que, en última instancia, producen los ritmos circadianos observables como el ciclo del sueño y vigilia, la actividad locomotora, la ingesta de agua y alimento y la secreción de diversas hormonas (Moore y Eichler 1972; Moore y Abrahamson, 2006). La información que sale del SCN es transmitida a través de las vías eferentes humorales, nerviosas o neuroendocrinas (Moore y Eichler 1972; Balsalobre, 2002; Moore y Abrahamson, 2006). Las primeras son aquellas que no implican conexiones sinápticas, sino que dependen de la difusión de agentes neuroquímicos sintetizados en el SCN que actúan sobre neuronas aledañas para regular ritmos como el de actividad locomotora. Esto se ha mostrado mediante experimentos de trasplante, en los que hámsteres son sometidos a la lesión del SCN, lo que resulta en la pérdida del ritmo de actividad locomotora. Posteriormente, se les injerta tejido de SCN fetal dentro de una cápsula semipermeable para evitar el desarrollo de nuevas fibras nerviosas, encontrando una restauración del ritmo de actividad con el periodo del animal donador (Silver *et al.*, 1996).

Por otro lado, se ha observado que no todos los ritmos circadianos son restaurados después del trasplante de SCN, como es el caso de los ritmos en la secreción de

hormonas (Lehman *et al.*, 1987). Adicionalmente, la destrucción de las fibras nerviosas que parten del SCN provoca arritmicidad circadiana, lo que sugiere que muchos ritmos dependen de vías eferentes nerviosas (Abrahamson y Moore, 2006). Un ejemplo de ello es la proyección multisináptica que el SCN envía a la glándula pineal para regular la secreción de melatonina. En este caso, se han mostrado relevos de la información a nivel del núcleo paraventricular (PVN), la columna intermediolateral y el ganglio cervical superior (Kalsbeek *et al.*, 2006). Mediante el uso de trazadores neuronales se ha mostrado que el SCN envía proyecciones mono y multisinápticas a diferentes áreas del cerebro y, aunado a esto, se ha podido dilucidar el tipo neuronal que envía dichas proyecciones (Kalsbeek *et al.*, 1993). El séptum lateral, el ARC y el RP3V reciben información de las neuronas AVPérgicas del SCN. Por otro lado, el órgano vasculoso de la lámina terminal, el núcleo supraóptico (SON), la hojuela intergeniculada, el núcleo paraventricular del tálamo, el núcleo periventricular de hipotálamo, el DMH y el POA son inervados por fibras que contienen AVP y también por otras que contienen VIP (Figura 7. Kalsbeek *et al.*, 1993; Abrahamson y Moore 2001).



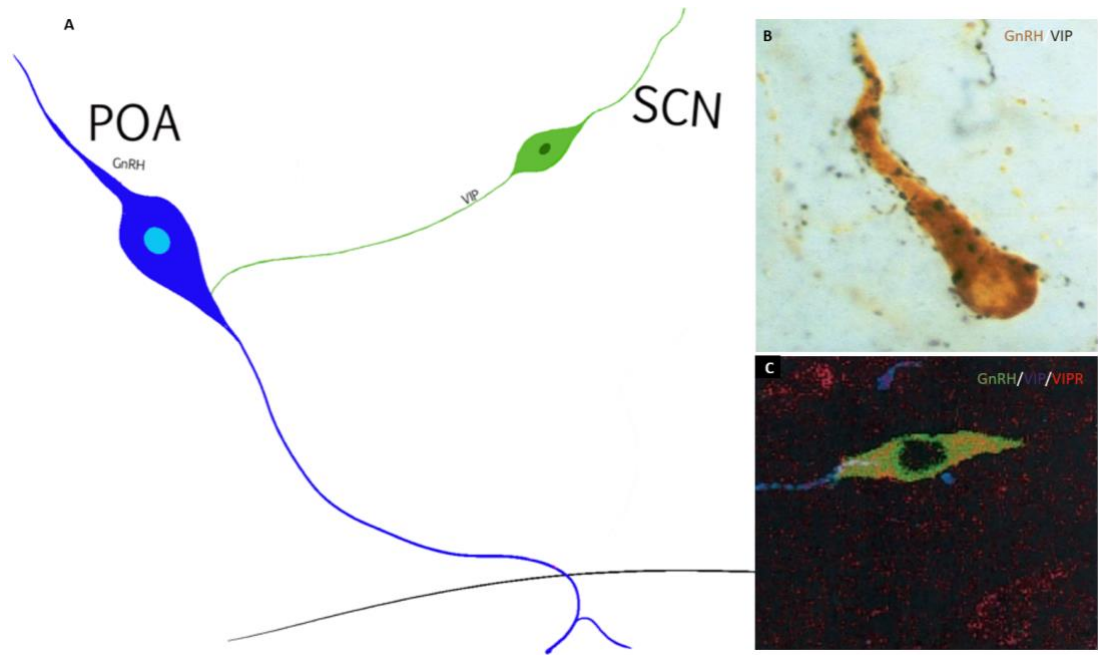
**Figura 7.** Regulación circadiana de la secreción de la GnRH. El núcleo supraquiasmático (SCN) sincroniza la síntesis y secreción de la GnRH por medio de conexiones sinápticas directas a las neuronas del área preóptica (POA), o bien, por conexiones multisinápticas con otras áreas hipotalámicas como el núcleo dorsomedial (DMH), el núcleo arqueado (ARC) y el área rostral periventricular del tercer ventrículo (RP3V) (Imagen tomada y modificada de Silva y Domínguez, 2020).

Finalmente, las vías neuroendocrinas son aquellas que regulan ritmos endocrinos mediante fibras nerviosas que hacen sinapsis en las células neuroendocrinas del hipotálamo que, a su vez, modulan la actividad de la adenohipófisis (Kalsbeek *et al.*, 1993). Ejemplo de ello es el caso de la regulación del ritmo de secreción de las gonadotropinas y sus conexiones directa e indirectas con las neuronas de GnRH (van der Beek *et al.*, 1993; van der Beek *et al.*, 1997). Adicionalmente, la sección de las fibras que parten del SCN hacia el POA resulta en la inhibición de la secreción de las gonadotropinas, lo que sugiere que la integridad de las conexiones entre ambas estructuras es indispensable para la regulación de las funciones de la hipófisis (Figura 7. Kawakami *et al.*, 1980).

### ***2.5 La relación entre el sistema circadiano, el POA, el ARC y el RP3V***

Se han propuesto dos vías por las que el SCN regula a las neuronas de GnRH del POA, una directa y una indirecta (Smarr *et al.*, 2012; Piet *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2020). En el primer caso, se ha mostrado que aproximadamente el 40% de las neuronas de GnRH del POA reciben aposiciones cercanas de fibras nerviosas que se originan en la porción ventrolateral del SCN (Smith *et al.*, 2000). Mediante estudios de microscopía electrónica y de luz, van Der Beek y colaboradores (1994; 1997) determinaron que dichas aposiciones forman sinapsis verdaderas, cuyo principal neurotransmisor es el VIP, lo que concuerda con el hecho de que las neuronas de GnRH expresan su receptor (Figura 8. Smith *et al.*, 2000).

Se ha planteado que esta vía estimula la secreción de la GnRH durante el pico preovulatorio del proestro. Evidencia de lo anterior proviene de estudios en los que se observó que las neuronas de GnRH que son inervadas por las fibras VIPérgicas expresan *c-fos*, un marcador de actividad neuronal, durante el pico preovulatorio, lo que en general no ocurre en las neuronas que no reciben estas fibras (van der Beek *et al.*, 1993; 1994). Adicionalmente, la activación de las neuronas de GnRH está relacionada con la activación de las neuronas del SCN ipsilateral (de la Iglesia *et al.*, 2003). Finalmente, cabe mencionar que las neuronas de GnRH también inervan a las neuronas localizadas en la periferia del SCN, lo que se ha interpretado como una posible vía de retroalimentación en este sistema (van der Beek *et al.*, 1997).



**Figura 8.** Comunicación directa entre el área preóptica (POA) y el núcleo supraquiasmático (SCN). Las neuronas de GnRH del POA (azul) son inervadas por los axones de las neuronas que sintetizan péptido intestinal vasoactivo (VIP) en la porción ventrolateral del SCN (A). Micrografía de campo claro de una neurona inmunorreactiva a GnRH (Café) en el POA que presenta aposiciones inmunorreactivas a VIP (negro) (B). Inmunofluorescencia de una neurona de GnRH (verde) a nivel del POA en donde se observa la colocalización con el receptor a VIP (VIPR, rojo) y las aposiciones de terminales que contienen VIP (azul). (Imagen A elaborada por Fatima Bolaños Hurtado, imágenes B y C tomadas y modificadas de van der Beek *et al.*, 1993 y Smith *et al.*, 2000, respectivamente).

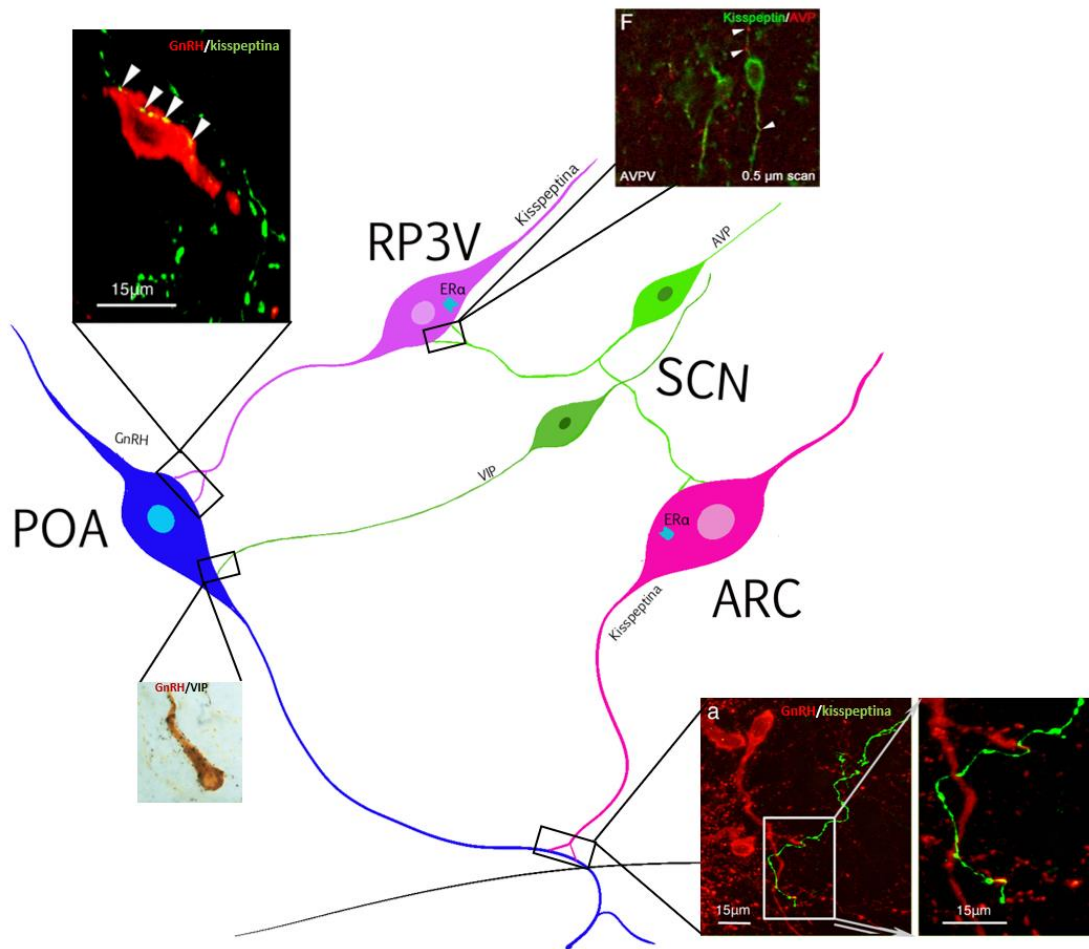
Por otro lado, la vía indirecta involucra a las fibras nerviosas que se originan en el SCN y que hacen relevo en áreas hipotálamicas que, a su vez, regulan la actividad de las neuronas de GnRH. De particular importancia para el presente estudio son las fibras AVPérgicas que parten de la porción dorsomedial del SCN. Éstas inervan al ARC y al RP3V, dos estructuras que proyectan sus axones hacia las neuronas de GnRH del POA y que además expresan receptores a estradiol y kisspeptina, el principal estimulante de la secreción del decapeptido. Con base en estas características, se piensa que las neuronas de kisspeptina interpretan las señales estrogénicas y les informan a las neuronas de GnRH sobre el estado de maduración de los folículos ováricos, modulando la ocurrencia del patrón tónico y fásico del decapeptido (Figura 9. de la iglesia *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2005; Putteraj *et al.*, 2016; Uneoyama *et al.*, 2021).

La kisspeptina, también conocida como metastina, es un péptido de la familia RF-amida que es codificado por el gen Kiss-1 y que fue descubierto en 1996 como un supresor de metástasis de células cancerígenas (Lee *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005; 2006; Dedes, 2012). El precursor codificado por Kiss-1 consta de 145

aminoácidos, mismo que es procesado enzimáticamente para obtener fragmentos más cortos conocidos como kisspeptina-54, kisspeptina-14, kisspeptina-13 y kisspeptina-10. Ésta última contiene los últimos 10 aminoácidos de la cadena polipeptídica, que son los que le confieren la actividad biológica (Dedes, 2012).

El receptor a kisspeptina es denominado GPR54 (Clarkson *et al.*, 2008; Gore, 2008; Dedes, 2012), pertenece a la familia de los receptores transmembranales acoplados a proteínas G, específicamente a la  $G\alpha$  (Lee *et al.*, 1999; Kotani *et al.*, 2001; Dedes, 2012). Se ha mostrado que el GPR54 se expresa en la médula espinal, en la amígdala, en el mesencéfalo, en el hipocampo, en el hipotálamo, entre otras regiones (Kotani *et al.*, 2001). La activación de este receptor estimula la despolarización de la neurona de GnRH (Han *et al.*, 2005) y por lo tanto la secreción de la neurohormona, por lo que está asociada a los procesos regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Figura 10A. Gottsch *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2005). Esto concuerda con la evidencia encontrada en humanos con mutaciones en el gen que codifica para el GPR54, ya que presentan retrasos en el inicio de la pubertad, hipogonadismo hipogonadotrópico e infertilidad (Dedes, 2012). Cabe mencionar, que la terapia con GnRH exógena puede llegar a restablecer ciertas funciones reproductivas en estos individuos (Navarro *et al.*, 2005; Pallais *et al.*, 2006; Dedes, 2012).

El ARC y el RP3V albergan neuronas kisspeptinérgicas, que establecen proyecciones recíprocas con las neuronas de GnRH del POA y aunado a eso reciben información del SCN (Smith *et al.*, 2006; Putteeraj *et al.*, 2016; Uenoyoma *et al.*, 2021). A través de estudios de lesión e inactivación farmacológica se ha mostrado que la integridad del ARC y el RP3V es fundamental en la regulación del desarrollo y función folicular, el inicio de la pubertad, la madurez sexual y la ovulación, sin embargo, aún no es clara su participación en los mecanismos circadianos que regulan dichos procesos (Smith *et al.*, 2006; Joly-Amado *et al.*, 2014; Uenoyoma *et al.*, 2021). Además de la comunicación anatómica, algunos autores han mostrado evidencia sobre una relación funcional entre el sistema circadiano y las neuronas de kisspeptina. Por ejemplo, la lesión unilateral del SCN inhibe la actividad y la síntesis de kisspeptina en el RP3V ipsilateral a la lesión. Además de esto, se mostró que la actividad del RP3V está principalmente asociada con la activación de la porción dorsomedial del SCN (Figura 9. Smarr *et al.*, 2012).



**Figura 9.** Interacción entre el sistema circadiano y el sistema kisspeptinérgico con las neuronas de GnRH. Las neuronas que sintetizan el péptido intestinal vasoactivo (VIP) del núcleo supraquiasmático (SCN, verde oscuro) inervan de forma directa a la neurona de GnRH del área preóptica (POA, azul). A su vez, las neuronas del SCN inervan a poblaciones kisspeptinérgicas en el núcleo arqueado (ARC, rosa) y en el área rostral periventricular del tercer ventrículo (RP3V, morado). Los axones de las neuronas del ARC contactan a la neurona de GnRH a nivel del axón, mientras que los axones de las neuronas del RP3V al soma (Imagen elaborada por Fatima Bolaños Hurtado, insertos tomados y modificados de van der Beek *et al.*, 1993; Williams y Kriegsfeld., 2012; Yip *et al.*, 2015).

El ARC se encuentra en la base del hipotálamo, lateral al tercer ventrículo, por encima de la eminencia media y muy cerca de la barrera hematoencefálica. Es considerado uno de los núcleos más grandes y densamente poblados del hipotálamo (Chronwall, 1985; Joly-Amado *et al.*, 2014). Sus neuronas sintetizan diversos neurotransmisores como la acetilcolina, ACTH, POMC, dopamina,  $\alpha$ -MSH,  $\gamma$ -MSH, encefalina, GABA, neurotensina, proteína relacionada con agutí (AgRP), prolactina, somatostatina, sustancia P, NPY, neuroquinina, dinorfina y kisspeptina (Chronwall, 1985; Joly-Amado *et al.*, 2014). Las neuronas del ARC proyectan a diferentes estructuras hipotalámicas como el SON, el PVN, el RP3V, el SCN, el POA, la amígdala y la eminencia media (Chronwall, 1985; Yeo *et al.*, 2011; Joly-Amado *et al.*, 2014;



Moore *et al.*, 2019). Cabe mencionar que los axones de las neuronas del ARC inervan a las neuronas de GnRH en la porción terminal del axón, cerca de la eminencia media. Con base en esto, algunos autores sugieren que esta estructura regula la secreción de la GnRH, más no su síntesis (Yip *et al.*, 2015).

La diversidad de péptidos y neuropéptidos que se encuentran en el ARC, así como sus conexiones con otras estructuras del encéfalo, le confieren un papel importante en la regulación de diferentes procesos fisiológicos como la ingesta de alimento, la respuesta al estrés, la temperatura corporal y el metabolismo energético (Chronwall, 1985; Joly-Amado *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2019; Yeo *et al.*, 2011). Por ejemplo, las neuronas que expresan NPY/AgRP se comunican con las de POMC/ MSH/ACTH (Millington, 2007; Joly-Amado *et al.*, 2014) y ambas han sido relacionadas con la regulación de la ingesta de alimento, ya que un aumento en la concentración de NPY estimula una mayor ingesta (Clark *et al.*, 1984). Cabe mencionar que este tipo de neuronas tiene conexiones directas con las neuronas de GnRH del POA. Esta conexión es relevante ya que se ha mostrado que a una mayor concentración de NPY, se inhibe la secreción de la GnRH. Esto concuerda con observaciones en donde el sistema reproductivo se ve afectado en momentos en donde disminuye la concentración de nutrientes disponibles (Roa y Herbison, 2012).

En el caso de las neuronas de kisspeptina del ARC, se ha mostrado que también sintetizan dinorfina y neuroquinina B, por lo que se les conoce como neuronas KNDy (Navarro *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2019). Ambos neuropéptidos participan en la autorregulación de la secreción de kisspeptina, la dinorfina la inhibe, mientras que la neuroquinina B la estimula (Navarro *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 2010). Como se mencionó antes, la kisspeptina estimula la secreción de la GnRH, por lo que la integridad de las neuronas KNDy es indispensable para que ocurra el desarrollo folicular y la ovulación. En particular, se ha observado que estas neuronas se encuentran activas y liberan kisspeptina cuando la concentración de estradiol es basal, contrario a lo que ocurre cuando la concentración incrementa durante la tarde del proestro. Considerando esto, se ha asociado a esta población neuronal con la regulación de la secreción tónica de la GnRH (**Figura 10B**. Gottch *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005; Wakabayashi *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2015).

Además de lo anterior, se ha mostrado que las neuronas KNDy están involucradas en la regulación de procesos asociados con el metabolismo energético, la respuesta al

estrés, la regulación de la temperatura corporal, la secreción prolactina y eventos reproductivos como el inicio de la pubertad y de la menopausia (Jayasena *et al.*, 2015; Stathopoulos *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2019). La función de estas células no solo depende de la concentración de estradiol, sino de la diversos nutrientes y hormonas, por lo que son consideradas como uno de los intermediarios que vinculan las funciones reproductivas con el estado metabólico del animal (Smith *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2019).

La otra población de neuronas de kisspeptina se localiza en el RP3V, una región pequeña en el hipotálamo anterior que se extiende hasta el POA. El RP3V incluye tres áreas hipotalámicas, el núcleo preóptico mediano, el núcleo periventricular y el área anteroventral periventricular (AVPV). Adicionalmente, es un área sexualmente dimórfica, ya que en las hembras es más grande que en los machos y el número de neuronas también es mayor (Gore, 2008; Lehman *et al.*, 2013; Yip *et al.*, 2015; Herbison, 2018; Wang y Moenter, 2020). Las neuronas de esta área sintetizan diferentes neurotransmisores en adición a la kisspeptina, como el GABA, glutamato, dinorfina, encefalina, galanina, sustancia P, calcitonina, neurotensina y dopamina (Clarkson y Herbison, 2011; Herbison, 2018).

Al igual que en el ARC, las neuronas del RP3V expresan receptores a esteroides sexuales, principalmente estradiol y progesterona (Quadros *et al.*, 2002; Chakraborty *et al.*, 2003; Gore, 2008). Dicha expresión se ha mostrado principalmente en las neuronas que sintetizan glutamato, neurotensina o kisspeptina, mismas que incrementan sus despolarizaciones espontáneas en presencia de estradiol. Aunado a esto, las neuronas de GnRH reciben fibras inmunoreactivas a estos neurotransmisores y expresan sus receptores, por lo que se propone que modulan la secreción diferencial de la GnRH en respuesta a la concentración del estradiol (Simerly *et al.*, 1997; Gore, 2008; Clarkson y Herbison, 2011; Herbison, 2018).

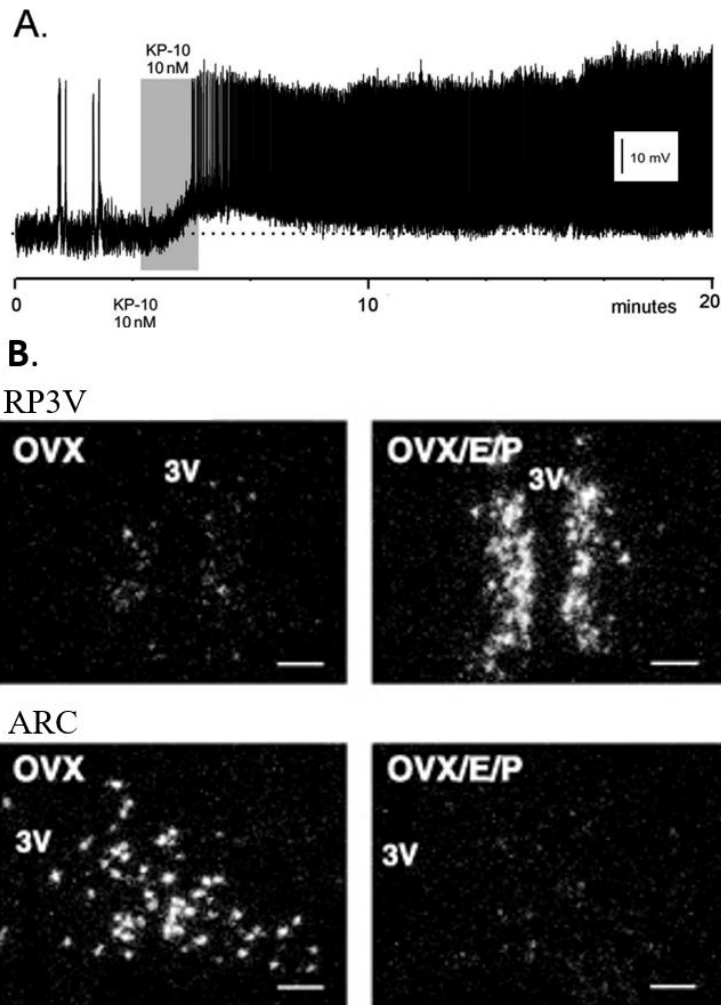
Las neuronas de kisspeptina del RP3V coexpresan dopamina (Simerly *et al.*, 1997) y reciben fibras de las neuronas kisspeptinérgicas del ARC (Gottch *et al.*, 2004; Uenoyama *et al.*, 2021). A su vez, los axones de estas neuronas inervan a la banda diagonal de Broca, el órgano vasculoso de la lámina media, el séptum medial, el núcleo paraventricular, la amígdala medial y el POA. Específicamente en el POA, se han reportado aposiciones inmunorreactivas a tirosina hidroxilasa (TH) y kisspeptina en los somas GnRHérgicos, lo que sugiere una conexión monosináptica. En conjunto,



estos resultados permiten diferenciar a las neuronas de kisspeptina del ARC y del RP3V por los neurotransmisores que coexpresan y por la estructura en la que contactan a la neurona de GnRH (Gore, 2008; Clarkson y Herbison, 2011; Lehman *et al.*, 2013; Yip *et al.*, 2015; Herbison, 2018; Wang y Moenter, 2020). Además de esto, la influencia del estradiol sobre su actividad también difiere, ya que la expresión del gen Kiss1 en el RP3V se ve exacerbada cuando la concentración de estradiol es alta, por lo que se le ha asociado con la regulación de la secreción fásica de la GnRH y, por tanto, con la ovulación (**Figura 10B.** Smith *et al.*, 2005; Clarkson *et al.*, 2008; Uenoyoma *et al.*, 2021).

Si bien se ha reportado la presencia de neuronas inmunoreactivas a receptores de estradiol en el POA y el SCN, la mayoría de los estudios concuerdan con que no se presenta la isoforma ER $\alpha$  (Hrabovszky *et al.*, 2000). Esto es relevante ya que los animales transgénicos que no expresan este receptor presentan infertilidad asociada a la inhibición de la secreción fásica de las gonadotropinas, mientras que los animales que carecen del ER $\beta$  presentan una fertilidad reducida pero sí se observan los efectos de la retroalimentación estimulante mediada por estradiol (Mayer *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Yaşar *et al.*, 2016). Las neuronas de kisspeptina del ARC y del RP3V expresan el ER $\alpha$  en una concentración mayor que el ER $\beta$  (Simonian *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2012; Yaşar *et al.*, 2016) y la expresión de ambos varía en función de la etapa del ciclo, aunque no se han realizado estudios al respecto en cada área por separado (Olvera-Juárez *et al.*, 2020).

Con los antecedentes previamente descritos, se ha propuesto que las neuronas kisspeptinérgicas del ARC y del RP3V son las que reciben la información estrogénica que proviene del ovario y la interpretan para modular la secreción diferencial de la GnRH. En este sentido, el ARC está asociado con la estimulación de la secreción tónica, producto de la retroalimentación inhibitoria que ejercen los estrógenos. Por otro lado, el RP3V modula la secreción fásica asociada a la retroalimentación estimulante. Adicionalmente, se ha propuesto que ambas estructuras integran la información circadiana que proviene del SCN, por lo que serían un eslabón fundamental en los mecanismos de regulación ovárica al integrar las señales del medio interno y externo (**Figura 10B.** Simonian *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2007; Uenoyoma *et al.*, 2021).



**Figura 10.** La kisspeptina como inductor de la secreción diferencial de la GnRH. Registro electrofisiológico *in vitro* de una neurona de GnRH en respuesta a la estimulación con kisspeptina 10 (franja gris), en la que se aprecia un incremento en la despolarización espontánea (A). Micrografías a nivel del área rostral periventricular del tercer ventrículo (RP3V, primer renglón) y el núcleo arqueado (ARC, segundo renglón) en el que se muestra la expresión del gen Kiss-1 a través de la técnica de hibridación *in situ*. La columna de la izquierda corresponde a animales ovariectomizados (OVX) y la segunda a animales ovariectomizados tratados con estradiol y progesterona (OVX/E/P). Se observa que la concentración del transcrito de kisspeptina es baja en el RP3V cuando la concentración de estradiol es baja, opuesto a lo observado en el ARC. Por otro lado, cuando la concentración de estradiol es alta, el transcrito incrementa el RP3V y disminuye en el ARC (B. Imagen tomada y editada de Han *et al.*, 2005 y Smith *et al.*, 2006, respectivamente).

## 4. Planteamiento del problema

La actividad de las neuronas de GnRH y por ende la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, es modulada por múltiples factores. Entre éstos destaca la fluctuación en la concentración del estradiol proveniente de los ovarios y su convergencia con señales circadianas que son generadas en el SCN durante cada etapa del ciclo estral (Herbison, 2016; Silva y Domínguez, 2020). A través de estudios con trazadores neuronales se han observado conexiones mono y multisinápticas entre las neuronas de GnRH del POA, el SCN y las neuronas que expresan receptores a estradiol y kisspeptina ubicadas en el ARC y el RP3V. La mayoría de estas conexiones son recíprocas, por lo que se ha propuesto un sistema de regulación en el que el ARC y el RP3V censan la concentración de estradiol a lo largo del ciclo estral e integran la información circadiana que proviene del SCN. De esta manera, la secreción de la GnRH es modulada por la kisspeptina que liberan las neuronas de ambas áreas en función del estado de madurez de los folículos ováricos y en congruencia con el medio externo en el que vive el animal (Van del Beek *et al.*, 1993; Watson *et al.*, 1995; Yi *et al.*, 2006; Smarr, *et al.*, 2012; Piet *et al.*, 2015; Yip *et al.*, 2015; Putteeraj *et al.*, 2016; Yeo *et al.*, 2019).

Un estudio realizado en nuestro laboratorio muestra que las señales nerviosas generadas en el SCN a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral son esenciales para que ocurra la ovulación (Silva *et al.*, 2020b). Por otro lado, la inhibición de las señales nerviosas provenientes del ARC en el mismo horario bloquea la ovulación cuando se realiza en las etapas de metaestro, diestro y proestro, lo que sugiere que este núcleo modula procesos asociados con la secreción tónica y fásica de la GnRH (Silva, 2021). Esto contrasta con la concepción de que el ARC modula únicamente la secreción tónica de la GnRH, por lo que nos preguntamos: el RP3V, que previamente se ha asociado con la regulación de la secreción fásica, ¿también modula procesos que ocurren en etapas del ciclo estral distintas al proestro? Para responder a dicha pregunta, en el presente estudio analizamos el efecto del bloqueo de la actividad eléctrica del RP3V a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral sobre la progresión del ciclo y de la ovulación espontánea de la rata adulta.

## **5. Hipótesis**

1. Si las neuronas del RP3V están involucradas en la regulación de la secreción tónica y fásica de la GnRH, el bloqueo de su actividad eléctrica resultará en alteraciones del ciclo estral y en un bloqueo de la ovulación independientemente de la etapa del ciclo estral en la que se realice el tratamiento.
2. Si el papel de las neuronas del RP3V se restringe a la regulación de la secreción fásica, entonces el bloqueo de su actividad eléctrica resultará en alteraciones de la ovulación solo cuando el tratamiento se realice en el día del proestro.

## **6. Objetivos**

### **General**

Analizar el efecto de la inhibición de la actividad eléctrica de las neuronas del RP3V a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.

### **Particulares**

1. Analizar el efecto de la inhibición de la actividad eléctrica de las neuronas del RP3V a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral sobre la progresión del ciclo estral.
  
2. Analizar el efecto de la inhibición de la actividad eléctrica de las neuronas del RP3V a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral sobre la masa de los ovarios, útero y adrenales.

## 7. Materiales y métodos

### Animales de experimentación

Todos los experimentos del presente estudio se realizaron siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se utilizaron ratas hembra de tres meses de edad de la cepa CIIZ-V (n=135) proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Los animales fueron alojados en grupos de cinco individuos en jaulas convencionales de polipropileno claro. Éstas se encontraban en una sala con las siguientes condiciones controladas: fotoperiodo de luz y oscuridad de 14:10 (luces encendidas a partir de las 05:00), temperatura constante a 25 °C y una humedad del 40%. A los animales se les proporcionó alimento y agua a libre demanda.

Se realizó la toma del frotis vaginal todos los días entre las 10:00 y las 12:00 horas. Las muestras fueron recolectadas con ayuda de un asa bacteriológica, se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina (hematoxilina: 6 minutos, agua de la llave: 6 minutos, eosina: 2 minutos y se eliminó el exceso de colorante con etanol al 70%) y se analizaron en un microscopio óptico para registrar la progresión del ciclo estral de cada animal. Se consideraron en proestro aquellos animales que presentaron muestras con predominancia de células nucleadas, en estro a los que presentaron predominancia de células cornificadas sin núcleo y en metaestro-diestro a aquellos animales con predominancia de leucocitos. Solo se tomaron en cuenta aquellos animales que presentaron tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración, con una masa corporal de entre 230 y 280 gramos.

### Determinación de las coordenadas y el volumen de microinyección

Las coordenadas que se utilizaron para implantar las cánulas guía (14 mm) en el borde superior del RP3V fueron: AP=+0.2, ML=±0.1, DV=-9.0, mismas que se calcularon a partir del atlas del cerebro de rata ([Paxinos y Watson 2014](#)) en un estudio previo de nuestro laboratorio ([Bolaños, 2019](#)). Diecisiete animales fueron sometidos a la cirugía para implantar las cánulas en el RP3V, sin embargo, ocho de ellos no recuperaron el ciclo estral y los nueve restantes tardaron hasta 24 días para mostrar un ciclo normal (véase resultados, **Figura 11**). Con base en ello, se decidió implantar cánulas guía más cortas a través de las cuales los microinyectores pudieran alcanzar al RP3V el día del tratamiento. Estas cánulas se dirigieron al núcleo septal medial, entre el límite inferior

de los ventrículos laterales y el límite superior de las comisuras anteriores. Para ello, se utilizaron las coordenadas AP=+0.2, ML=±0.1, DV=-4.0 en cuatro animales, en los que además se determinó que un volumen de 100 nL era suficiente para cubrir el área de interés sin afectar otros núcleos hipotalámicos mediante inyecciones de colorante.

### **Elaboración de las cánulas cortas, obturadores y microinyectores**

Las cánulas, obturadores e inyectores se elaboraron de acuerdo con las especificaciones reportadas por Silva y colaboradores (Silva *et al.*, 2020a). Brevemente, se utilizaron agujas hipodérmicas de calibre 23G (Becton, Dickinson and Company, USA) que se separaron del plástico de la vaina y se les removió el pegamento restante. Posteriormente, se cortaron segmentos de 12 mm, que se limaron hasta obtener segmentos de 10 mm. Dos de ellos se colocaron paralelamente sobre una base de arcilla para moldear a una distancia equivalente a la que existe entre el RP3V izquierdo y derecho en las ratas utilizadas en este experimento (calculada en un experimento piloto). Los segmentos se soldaron en uno de los extremos con soldadura, para ello, se utilizó una mezcla de pasta para soldar (Truper, México) y ácido clorhídrico al 10% en una proporción de 2:1. Una vez soldadas ambas cánulas entre sí, se soldó un soporte de alambre resiliente de acero inoxidable de 0.35 mm de diámetro (American Orthodontics, USA) para que la cánula pudiera ser sujeta al estereotáxico. Finalmente, se limpiaron las cánulas bilaterales con etanol al 70% y luego con agua estéril para remover cualquier resto de mezcla de pasta para soldar y ácido clorhídrico, también se revisaron en el microscopio estereoscópico para remover cualquier impureza del metal.

Para los obturadores se utilizó el mismo alambre resiliente de los soportes antes mencionados, que fue cortado en segmentos de 12 mm. Con ayuda de unas pinzas hemostáticas se sostuvo uno de los segmentos de 1 mm de las cánulas apoyado sobre la mesa de trabajo y se insertó el alambre hasta que entrara en contacto con la misma, el resto que quedó por fuera de la cánula se dobló en un ángulo de 90°.

Los microinyectores se elaboraron con agujas de calibre 30G y 23G (Becton, Dickinson and Company, USA), las cuales se separaron del plástico como se mencionó antes. A las agujas 30G se les removió únicamente el bisel, mientras que las 23G se cortaron en segmentos de 6 mm. Dichos segmentos fueron limados hasta obtener



segmentos de 4 mm. Los segmentos de calibre 30G se insertaron, por el lado en el que se cortó el bisel, en los segmentos de 4 mm y se colocó una gota de pegamento de cianoacrilato para unirlos, teniendo cuidado de que el pegamento no penetrara en el conducto interno de la aguja 30G, se dejó secar por 15 minutos y se comprobó la patencia.

### **Procedimiento preoperatorio**

Un total de 105 ratas fueron sometidas a la cirugía de implantación de cánulas cortas en la etapa de diestro, ya que estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la recuperación es más eficiente. Los procedimientos preoperatorios se realizaron en una mesa distinta a la de cirugía para evitar la pérdida de esterilidad. Los animales fueron pesados en una balanza y se anotó la masa corporal en la hoja de datos. Se utilizó un esterilizador de perlas modelo 18000-45 (Fine Science Tools Inc., USA), para esterilizar todo el material quirúrgico, para lo cual se introdujeron las puntas del instrumental durante 15 segundos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Los tornillos de sujeción, las cánulas y los obturadores se colocaron en un vaso de precipitados de 10 mL que se introdujo en el esterilizador de perlas durante cinco minutos.

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de un coctel que contiene 91 mg de ketamina y 9.1 mg xilacina (Laboratorio PiSA, México) y se inyectó 0.1 mL por cada 100 g de masa corporal. Se esperó a que el anestésico hiciera efecto durante aproximadamente cinco minutos y posteriormente se realizó la revisión del plano de anestesia mediante la técnica de la punción en la punta de la cola y en la planta de la pata. Una vez que las ratas alcanzaron el plano anestésico apropiado, se les removió el pelo de la cabeza con una rasuradora eléctrica y se eliminaron los pelos sueltos con un rodillo quita pelusa. A continuación, se les administró por vía subcutánea, 2mg/kg de meloxicam como analgésico y antiinflamatorio no esteroideo (Laboratorio Aranda, México) y 5mg/kg de enrofloxacina como antibiótico (Laboratorio Senosiain, México). La inyección de meloxicam se realizó a la altura de las cervicales, mientras que la de enrofloxacina a la altura de las lumbares; ya que pueden producir úlceras si se mezclan. Finalmente, se aplicaron gotas oftálmicas de hipromelosa (Laboratorios Sophia, México) en ambos ojos para evitar que se secan durante la cirugía.

## **Cirugía**

Todo el procedimiento se realizó con medidas asépticas. Se colocó la cánula bilateral en el sujetador del manipulador modelo 960 (KOPF Instruments, USA) de un aparato estereotáxico David Kopf modelo 900 (KOPF Instruments, USA). Las ratas fueron montadas en el aparato usando barras anti-trauma para oreja de rata modelo 1955 (KOPF Instruments, USA). Posteriormente, se realizó una limpieza quirúrgica en el área de cirugía en el siguiente orden: yodopovidona jabonosa, alcohol 70%, yodopovidona neutra, alcohol 70%, yodopovidona neutra, alcohol 70%. La limpieza se realizó con gasas estériles en forma de espiral, comenzando en el centro de la cabeza y desplazándose hacia la periferia sin volver a pasar por los lugares previamente limpiados.

Con un bisturí y una hoja del número 15 se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm que abarcó la piel y el músculo, comenzando desde la parte posterior de los ojos y hasta la región anterior de las orejas. Seguido a esto, se limpió el cráneo para remover el periostio, lo que permitió observar y ubicar el punto bregma con mayor facilidad. A partir de bregma, que se utilizó como punto 0 de referencia, se calculó la posición deseada utilizando las coordenadas  $AP=+0.2$ ,  $ML=\pm 0.1$   $DV=-4.0$ . Se marcó el punto correspondiente a la intersección de la coordenada AP y ML y posteriormente se realizaron tres incisiones formando un triángulo equilátero a su alrededor con una herramienta rotativa Dremel 3000 (Dremel, USA). Estas incisiones no atravesaron el cráneo y se utilizaron para la colocación de los tornillos quirúrgicos que sirvieron de sujeción para la cánula. Posteriormente, se realizó una craneotomía y se cortaron las meninges para permitir el paso de la cánula evitando seccionar al seno sagital superior. Con ayuda de una aguja, se movió al seno sagital hacia un lado, evitando dañarlo, mientras que se bajaron las cánulas hasta alcanzar la coordenada DV. Finalmente, se aseguró la posición de la cánula al cráneo con cemento dental y se esperó a que el implante quedara completamente seco antes de remover el manipulador del estereotáxico, cortar el soporte de acero inoxidable y colocar los obturadores.

## **Procedimiento postoperatorio**

Posterior a la cirugía, los animales recibieron un mL de solución salina vía intraperitoneal para recuperar los fluidos perdidos durante la implantación de la cánula y se mantuvieron en una caja de recuperación con una almohadilla térmica. Los

animales estuvieron en observación durante las dos horas posteriores a la cirugía y una vez que recuperaron los reflejos posturales se trasladaron al bioterio, en donde se alojaron individualmente en cajas limpias de polipropileno claro con agua y comida a libre demanda. A las 24 horas posteriores a la cirugía, se revisó la salud del animal y se les administró meloxicam y enrofloxacin como se reportó previamente. Éste paso se repitió 48 horas después de la cirugía. Al tercer día se retomó la toma del frotis vaginal diario.

## **Microinyección**

Los animales microinyectados fueron divididos aleatoriamente en dos grupos:

1. El grupo vehículo, que fue microinyectado con 100 nL de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF, BASi, USA).
2. El grupo fármaco, que fue microinyectado con 100 nL de tetrodotoxina (TTX, Alomone Labs, Israel) disuelta en ACSF a una concentración de 10 ng/mL. Para el uso de la TTX, todo el procedimiento se realizó con lentes de seguridad, cubre bocas y guantes. Todos los materiales utilizados y la mesa de trabajo se limpiaron con cloro al 10% para inactivar la toxina.

Las microinyecciones se realizaron a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral. Previo a la microinyección, los animales fueron pesados en una balanza y se registró su masa corporal en la hoja de datos. Posteriormente, se les removieron los obturadores de las cánulas. Para el procedimiento se usaron jeringas Hamilton de 10  $\mu$ L unidas al microinyector por medio de un tubo de teflón de 0.65mm OD x 0.12mm ID (BASi instruments). El sistema fue controlado con ayuda de una bomba de microinyección de dos canales modelo Legato (KD Scientific, USA).

El sistema se revisó previo a la microinyección y se aseguró que no estuviera obstruido y que la solución correspondiente pasara libremente por el sistema hasta la punta de los microinyectores. Éstos se insertaron en las cánulas evitando que se doblaran y se infundió a una tasa de 50 nL por minuto durante dos minutos, posterior a lo cual, los microinyectores se dejaron dentro de la cánula durante un minuto más para evitar el reflujo del líquido. Durante todo el procedimiento, la rata fue privada de movimiento con ayuda de una manta y, una vez terminado, el animal fue regresado a su caja.

## **Eutanasia**

Después de la microinyección se continuó con la toma de frotis vaginal y los animales fueron sacrificados en el día del estro esperado inmediato al tratamiento. Para ello, se les administró una sobredosis (75 mg/kg) de pentobarbital sódico (PiSA agropecuaria, México), se les realizó el frotis vaginal correspondiente y fueron pesados. Una vez que perdieron la conciencia, los animales fueron decapitados con ayuda de una guillotina para roedores. Se extrajeron los ovarios, el útero y las adrenales, a los que se les removió todo el tejido conjuntivo con ayuda de una navaja. De los ovarios, con ayuda de un microscopio estereoscópico, se separaron los oviductos, que se colocaron en un portaobjetos sobre hielo. Se buscó la ampolla y una vez ubicada se realizó una incisión con una aguja para la extracción de los ovocitos, los cuales fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina para su posterior conteo. Todos los órganos fueron pesados en una balanza analítica Mettler AT261 Delta Range (Marshall Scientific, USA). También se extrajo el cerebro, que se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para su análisis histológico. Para ello, se realizaron cortes seriados de 50  $\mu\text{m}$  en un criostato Leica modelo CM1520 (Leica Biosystems, Alemania). Los cortes fueron colocados en portaobjetos previamente tratados con poly-L-lisina y teñidos con la técnica de Nissl para determinar la posición final de las cánulas y la difusión de los fármacos. Nueve animales intactos, que conformaron el grupo control absoluto, fueron sacrificados en la etapa del estro y se siguió el mismo protocolo de eutanasia con excepción de los pasos referentes al procesamiento del encéfalo.

## **Análisis estadístico**

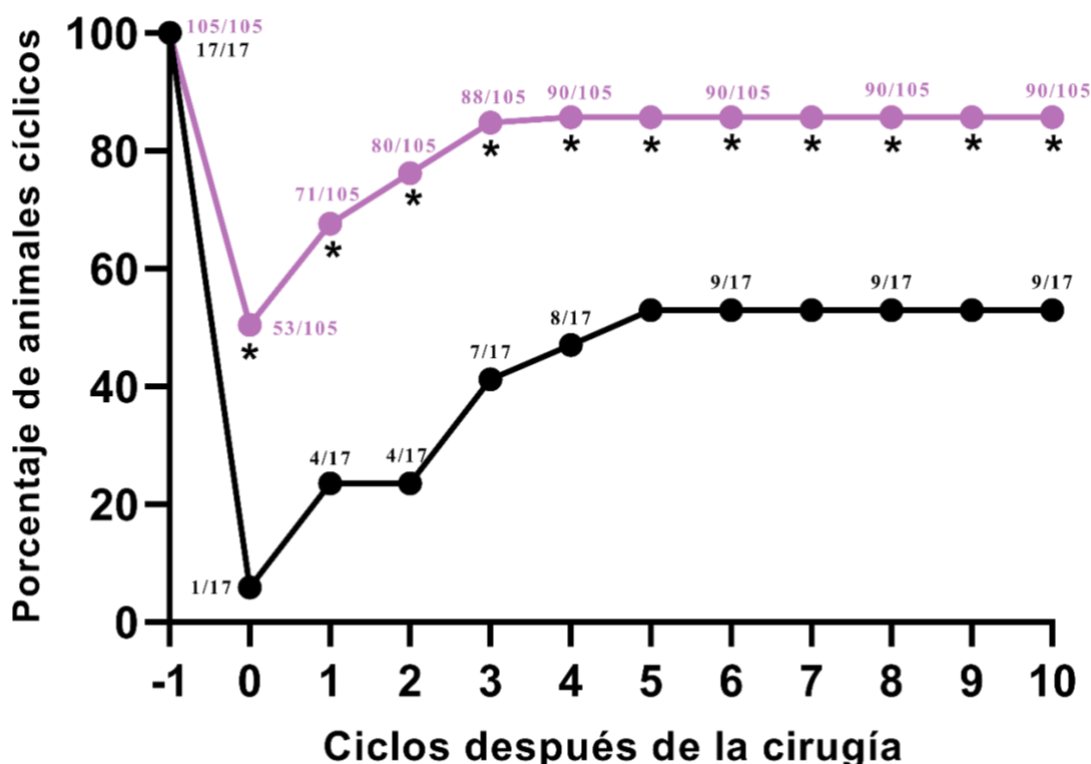
Se calculó la tasa de animales cíclicos (número de animales cíclicos/n) y la tasa de animales ovulantes (número de animales ovulantes/n) para cada grupo experimental, mismas que fueron analizadas mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher. El número de ovocitos liberados se expresó como la mediana y el rango intercuartil y se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba *post hoc* de Dunn. Aquellas comparaciones entre dos grupos fueron realizadas mediante la prueba U de Mann- Withney. En el caso de la masa de los órganos, se expresaron como la masa relativa (mg) a 100 g del animal y se realizaron pruebas de normalidad (ómnibus de D'Agostino-Pearson, prueba de Shapiro-Wilk y prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (prueba de Bartlett para homogeneidad de varianzas) y

posteriormente se compararon mediante un análisis de varianza múltiple (ANOVA) seguido de la prueba *post hoc* de múltiples comparaciones de Tukey. En el caso de comparaciones ente dos grupos, se realizó la prueba t de Student. Sólo se tomaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor a 0.05. Todas las comparaciones se realizaron en el programa GraphPad Prism versión 8.4.3 para Windows (GraphPad Software, California, USA).

## 8. Resultados

### *Efecto de la implantación de cánulas bilaterales en el RP3V*

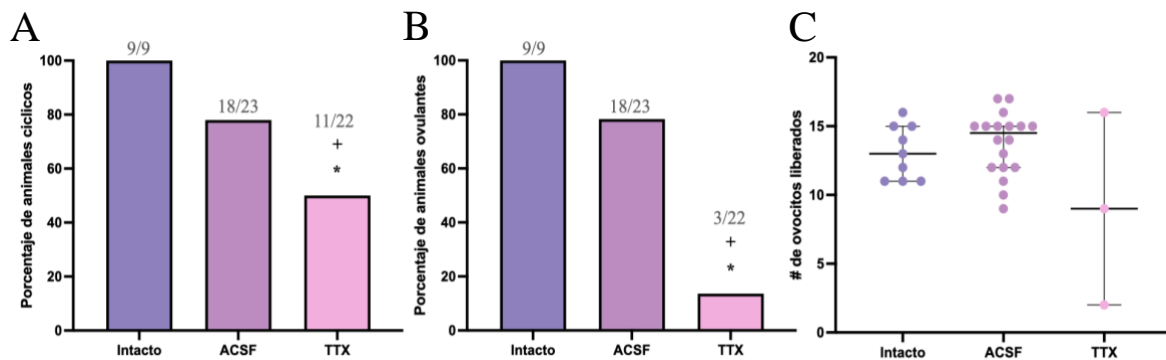
Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, los primeros 17 animales fueron implantados con cánulas de 14 mm (cánulas largas) dirigidas al borde superior del RP3V. Se observaron anomalías, en el ciclo estral posterior a la cirugía, ya que el 94.12% de los animales no mostraron una secuencia normal. Para el quinto ciclo después de la cirugía, el 52.9% recuperaron el ciclo, mientras que el resto permaneció acíclico por al menos 20 días adicionales, momento en el que fueron sacrificados. Con base en ello, se optó por diseñar cánulas cortas de 10 mm, con las que se obtuvo un decremento de la ciclicidad de solo el 49.53% en el ciclo inmediato a la cirugía. Para el cuarto ciclo se obtuvo un porcentaje de animales cíclicos del 85.71, que no se modificó en los siguientes 20 días del estudio. Como se observa en la **Figura 11**, en todos los puntos evaluados el porcentaje de ciclicidad fue mayor en los animales implantados con las cánulas cortas, por lo que el resto de los datos presentados en esta tesis provienen de dicho grupo.



**Figura 11.** Porcentaje acumulado de animales cíclicos antes y después de ser implantados con cánulas largas (negro) o cortas (morado). Se muestra la fracción de animales cíclicos por encima de cada punto evaluado. \* $p \leq 0.001$  vs cánulas largas, prueba de probabilidad exacta de Fisher.

## *Efecto del bloqueo de la actividad eléctrica del RP3V a las 14:00 horas sin considerar la etapa del ciclo estral*

La **figura 12A** muestra el porcentaje de animales cíclicos en el grupo intacto y en el grupo microinyectado con ACSF o TTX. Si bien se observa una tendencia al decremento en el grupo tratado con ACSF, no es estadísticamente significativa (Intacto: 9/9 vs ACSF: 18/23,  $p=0.1671$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Por otro lado, el porcentaje de animales cíclicos del grupo tratado con TTX disminuyó significativamente contra el grupo intacto y el de ACSF (Intacto: 9/9 vs TTX: 11/22,  $p=0.0083$ ; ACSF: 18/23 vs TTX: 11/22,  $p=0.0471$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). En el caso de la tasa de animales ovulantes se observó un comportamiento semejante, ya que únicamente decreció de manera significativa en los animales tratados con TTX (Intacto: 9/9 vs ACSF: 18/23,  $p=0.1671$ ; Intacto: 9/9 vs TTX: 3/22,  $p<0.0001$ ; ACSF: 18/23 vs TTX: 3/22,  $p<0.0001$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher, **Figura 12B**). No se encontraron diferencias significativas en el número de ovocitos liberados, sin embargo, se observó una gran dispersión en los datos de los tres animales que ovularon en el grupo de TTX: 2, 9 y 16 ovocitos, respectivamente (Intacto:  $M=13$ ,  $RI=11-15$  vs ACSF:  $M=14.50$ ,  $RI=12-15$  vs TTX:  $M=9$ ,  $RI=2-16$ ,  $p=0.4118$ , prueba de Kruskal-Wallis, **Figura 12C**).



**Figura 12.** **A)** Porcentaje de animales cíclicos en el grupo intacto, en el tratado con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o con tetrodotoxina (TTX), \* $p=0.0083$  vs intacto; + $p=0.0471$  vs ACSF, prueba de probabilidad exacta de Fisher. **B)** Tasa de animales ovulantes \* $p<0.0001$  vs Intacto; + $p<0.0001$  vs ACSF, prueba de probabilidad exacta de Fisher. **C)** Mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados. En todas las figuras se muestran los datos de todos los animales de cada grupo, sin considerar la etapa del ciclo estral en que fueron tratados.



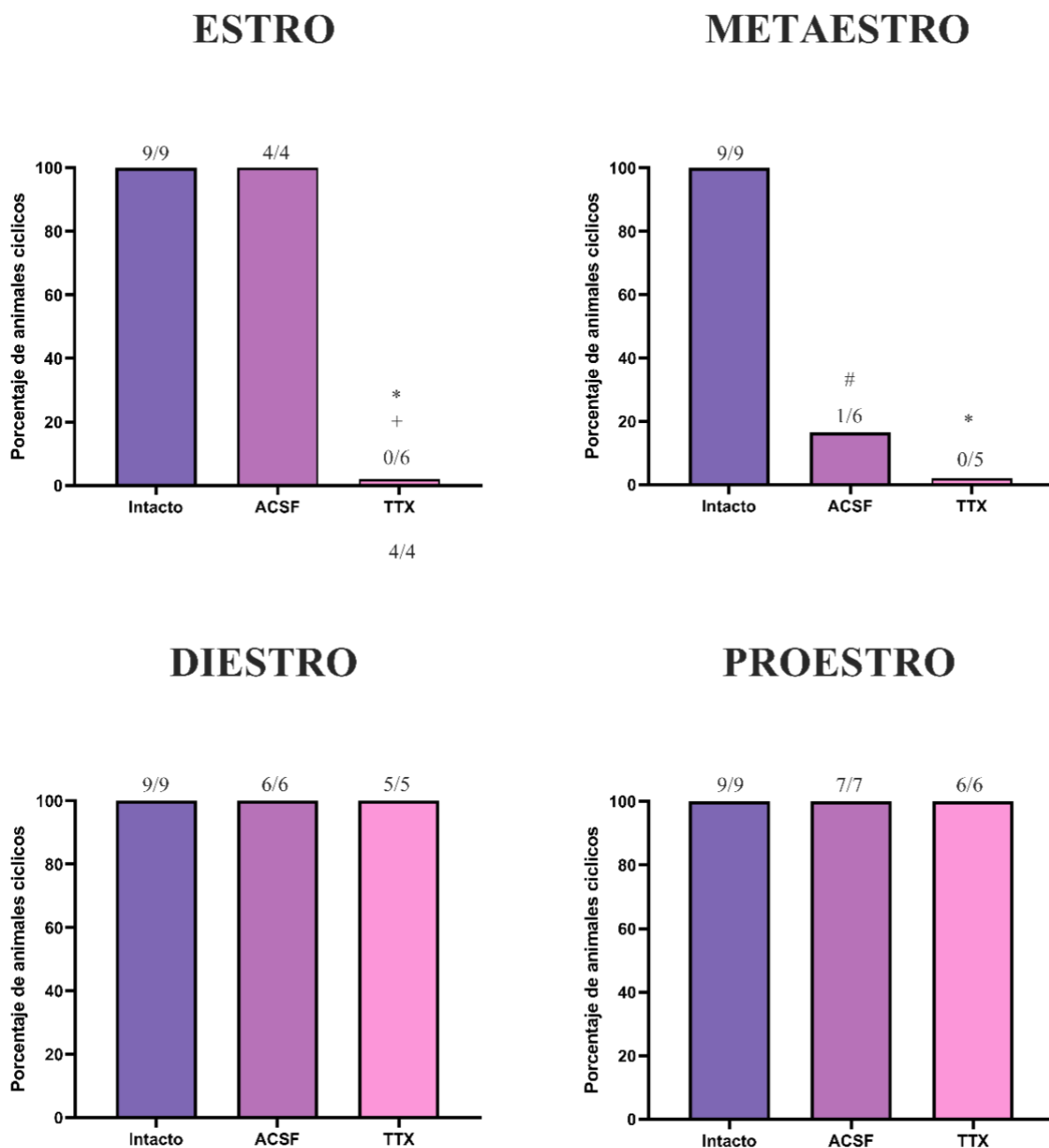
Finalmente, como se aprecia en el **Cuadro 1**, el análisis de la masa relativa de los órganos mostró que no se alteraron los ovarios ( $p=0.1226$ , ANOVA) ni las adrenales ( $p=0.4251$ , ANOVA). Contrario a esto, la masa del útero de los animales tratados con TTX disminuyó significativamente con respecto al grupo intacto ( $p=0.0036$ , prueba de múltiples comparaciones de Tukey) y al grupo tratado con ACSF ( $p=0.0009$ , prueba de múltiples comparaciones de Tukey).

	<b>Intacto</b>	<b>ACSF</b>	<b>TTX</b>
<b>Ovarios</b>	28.19 ± 0.70	28.36 ± 0.90	27.39 ± 0.58
<b>Útero</b>	172.00 ± 7.52	166.50 ± 5.70	<b>132.7 ± 7.04*+</b>
<b>Adrenales</b>	23.83 ± 0.79	25.72 ± 0.97	24.35 ± 0.95

**Cuadro 1.** La media y el error estándar de la masa de los ovarios, útero y adrenales de los animales intactos, tratados con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o tetrodotoxina (TTX), sin considerar la etapa de ciclo estral en el que se realizó la microinyección. \* $p=0.0036$  vs intacto; + $p=0.0009$  vs ACSF, prueba de múltiples comparaciones de Tukey.

### ***Efecto del bloqueo de la actividad eléctrica del RP3V a las 14:00 horas de cada etapa del ciclo estral***

En el día del estro, la microinyección de ACSF no modificó el porcentaje de animales cíclicos (Intacto: 9/9 vs ACSF: 4/4,  $p>0.9999$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Por otro lado, esta variable decreció significativamente en los animales tratados con TTX con respecto al grupo intacto (Intacto: 9/9 vs TTX: 0/6,  $p=0.0002$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher) y el grupo de ACSF (ACSF: 4/4 vs TTX: 0/6,  $p=0.0048$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). En el metaestro, la ciclicidad se alteró tras la microinyección de ACSF (Intacto: 9/9 vs ACSF: 1/6,  $p=0.0020$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher) o de TTX (Intacto: 9/9 vs TTX: 0/5,  $p=0.0005$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Por el contrario, en el diestro y proestro ninguno de los tratamientos alteró la ciclicidad de los animales (Diestro: Intacto 9/9 vs ACSF 6/6 vs TTX 5/5, Proestro: Intacto 9/9 vs ACSF 7/7 vs TTX 6/6,  $p>0.9999$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher, **Figura 13**).

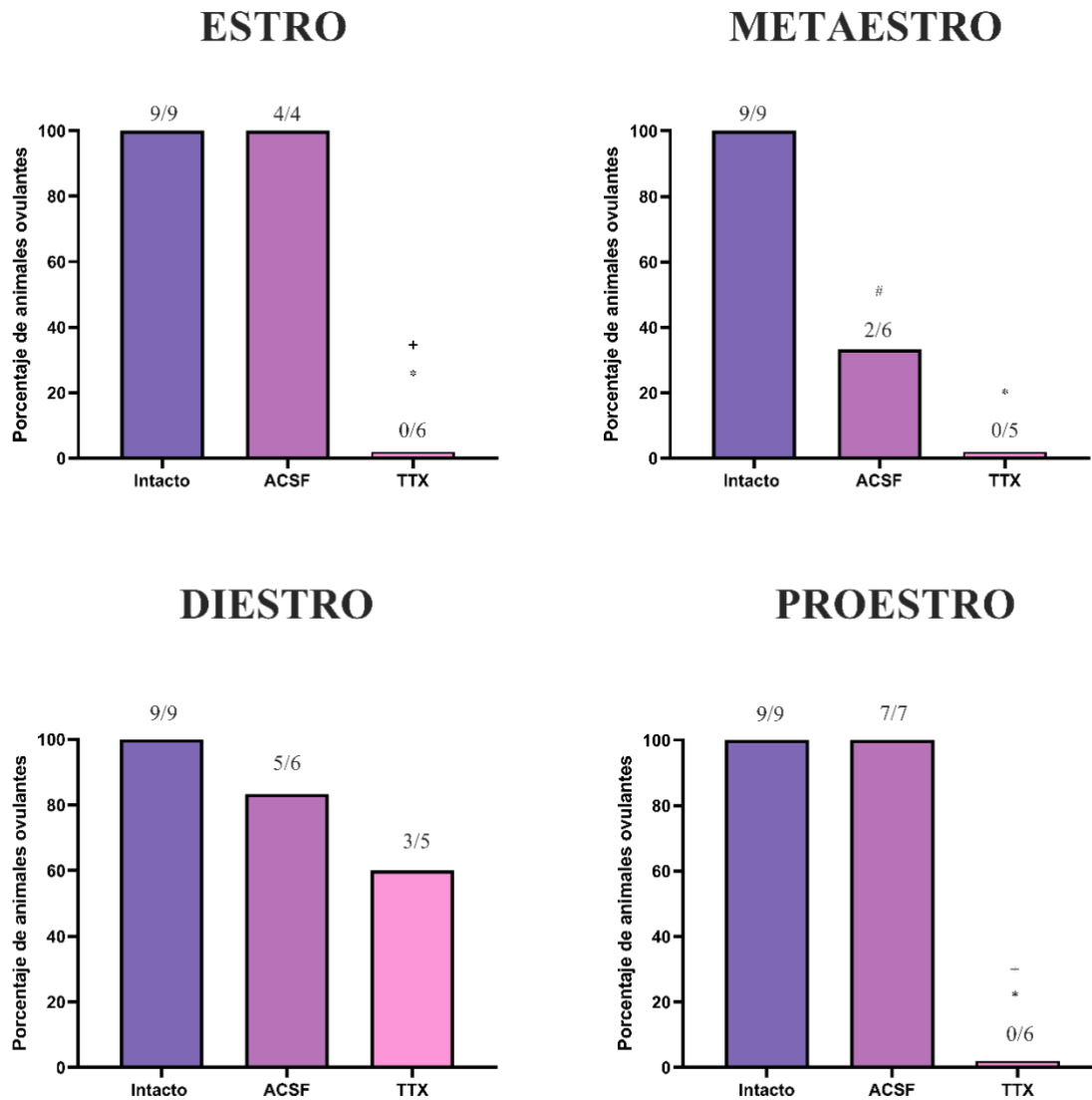


**Figura 13.** Porcentaje de animales cíclicos del grupo Intacto, tratado con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o con tetrodotoxina (TTX) a las 14:00 horas de la etapa del estro, metaestro, diestro o proestro (Estro: \* $p=0.0002$  vs Intacto, + $p=0.0048$  vs ACSF; Metaestro: \* $p=0.0005$  vs Intacto, # $p=0.0020$  vs Intacto, prueba de probabilidad exacta de Fisher).

En cuanto a la tasa de animales ovulantes (**Figura 14**), en el día del estro, la inyección de ACSF no modifico dicho parámetro (Intacto: 9/9 vs ACSF: 4/4,  $p>0.9999$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher), mientras que la de TTX bloqueó la ovulación por completo (Intacto: 9/9 vs TTX: 0/6,  $p=0.0002$ ; ACSF: 4/4 vs TTX: 0/6,  $p=0.0048$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). En el metaestro se observó que, independientemente de la

solución inyectada, el porcentaje de animales ovulantes disminuyó significativamente (Intacto: 9/9 vs ACSF: 2/6,  $p=0.0110$ ; Intacto: 9/9 vs TTX: 0/5,  $p=0.0005$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). En el diestro la inyección de ambas soluciones resultó en una tendencia al decremento, pero ésta no fue estadísticamente significativa (Intacto: 9/9 vs ACSF: 5/6,  $p=0.4000$ ; Intacto: 9/9 vs TTX: 3/5,  $p=0.1099$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Por último, en el día del proestro solo la inyección de TTX resultó en el bloqueo de la ovulación (Intacto: 9/9 vs ACSF: 7/7  $p>0.9999$ ; Intacto: 9/9 vs TTX: 0/6  $p=0.0002$ ; ACSF: 7/7 vs TTX: 0/6  $p=0.0006$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Como se muestra en la **Cuadro 2**, no se encontraron diferencias en el número de ovocitos liberados por los animales que ovularon en los grupos tratados con ACSF. Cabe resaltar que los únicos animales que ovularon fueron aquellos animales que recibieron el tratamiento con TTX en el día del diestro, que son responsables de la dispersión observada en la **Figura 12**.

En el **Cuadro 3** se muestran los resultados del análisis de la masa relativa de los órganos estudiados. El análisis de la masa de los ovarios no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos y en ninguna de las etapas ( $p\geq 0.05$ , ANOVA). En el caso de la masa relativa del útero, no se encontraron diferencias en ninguno de los grupos de estro y proestro ( $p\geq 0.05$ , ANOVA). Por el contrario, se encontró una disminución significativa en el peso del útero de los animales tratados con TTX en el metaestro (Intacto:  $172.00\pm 7.52$  vs ACSF:  $171.60\pm 14.71$  vs TTX:  $108.00 \pm 4.60$ ,  $p\leq 0.001$ , ANOVA seguida de Tukey) o en el diestro (Intacto:  $172.00\pm 7.52$  vs ACSF:  $178.40\pm 9.73$  vs TTX:  $126.30\pm 8.24$ ,  $p\leq 0.0046$ , ANOVA seguida de Tukey). En cuanto a las adrenales, no se encontró ninguna diferencia significativa en los grupos tratados en estro, metaestro o proestro ( $p\geq 0.05$ , ANOVA). En el diestro, la masa de estas glándulas tendió a incrementar en el grupo de ACSF, sin embargo, no fue estadísticamente significativa. El grupo tratado con TTX mostró un decremento significativo, pero únicamente contra el grupo de ACSF (Intacto:  $23.83\pm 0.79$  vs ACSF:  $27.40 \pm 1.67$  vs TTX:  $22.20 \pm 0.95$ ,  $p\leq 0.02$ , ANOVA seguida de Tukey), lo que sugiere que esta diferencia es un artefacto producido por errores metodológicos en el grupo vehículo.



**Figura 14.** Porcentaje de animales ovulantes del grupo Intacto, tratado con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o con tetrodotoxina (TTX) a las 14:00 horas de la etapa del estro, metaestro, diestro o proestro (Estro: \* $p=0.0002$  vs Intacto, + $p=0.0048$  vs ACSF; Metaestro: \* $p=0.0005$  vs Intacto, # $p=0.0110$  vs Intacto; Proestro: \* $p=0.0002$  vs Intacto, + $p=0.0006$  vs ACSF, prueba de probabilidad exacta de Fisher).

### ***Resultados de los animales que fueron microinyectados fuera del RP3V***

De acuerdo al análisis histológico de los cerebros, se determinó que las cánulas de 45 animales fueron implantadas en áreas anteriores o posteriores al RP3V y en algunos casos una de las cánulas rompió la pared del tercer ventrículo y penetró en el mismo. Debido al número de casos, no fue posible hacer un análisis para cada área afectada y tampoco para cada etapa del ciclo, por lo que los datos se agruparon en: inyección de ACSF fuera del RP3V ( $n=10$ ), inyección de ACSF en el tercer ventrículo ( $n=21$ ), inyección de TTX fuera del RP3V ( $n=7$ ) e inyección de TTX en el 3V ( $n=7$ ). Como se muestra en la **Figura 15A**, no

se encontraron diferencias significativas en la ciclicidad de los animales a los que se les microinyectó ACSF fuera del RP3V o en el tercer ventrículo ( $p \geq 0.0914$  vs Intacto o el grupo inyectado dentro del RP3V, prueba de probabilidad exacta de Fisher). En los animales tratados con TTX no se observó el decremento en la ciclicidad reportado previamente en la **Figura 12A** para el grupo microinyectado dentro del RP3V ( $p \geq 0.1076$  vs Intacto o el grupo inyectado dentro del RP3V, prueba de probabilidad exacta de Fisher).

	ESTRO		METAESTRO		DIESTRO		PROESTRO	
	Mediana	RI	Mediana	RI	Mediana	RI	Mediana	RI
<b>INTACTO</b>	13	11-15						
<b>ACSF</b>	15	13.5-16.5	11.5	9-14	15	11.50-15	14	12-16
<b>TTX</b>	—	—	—	—	9	2-16	—	—

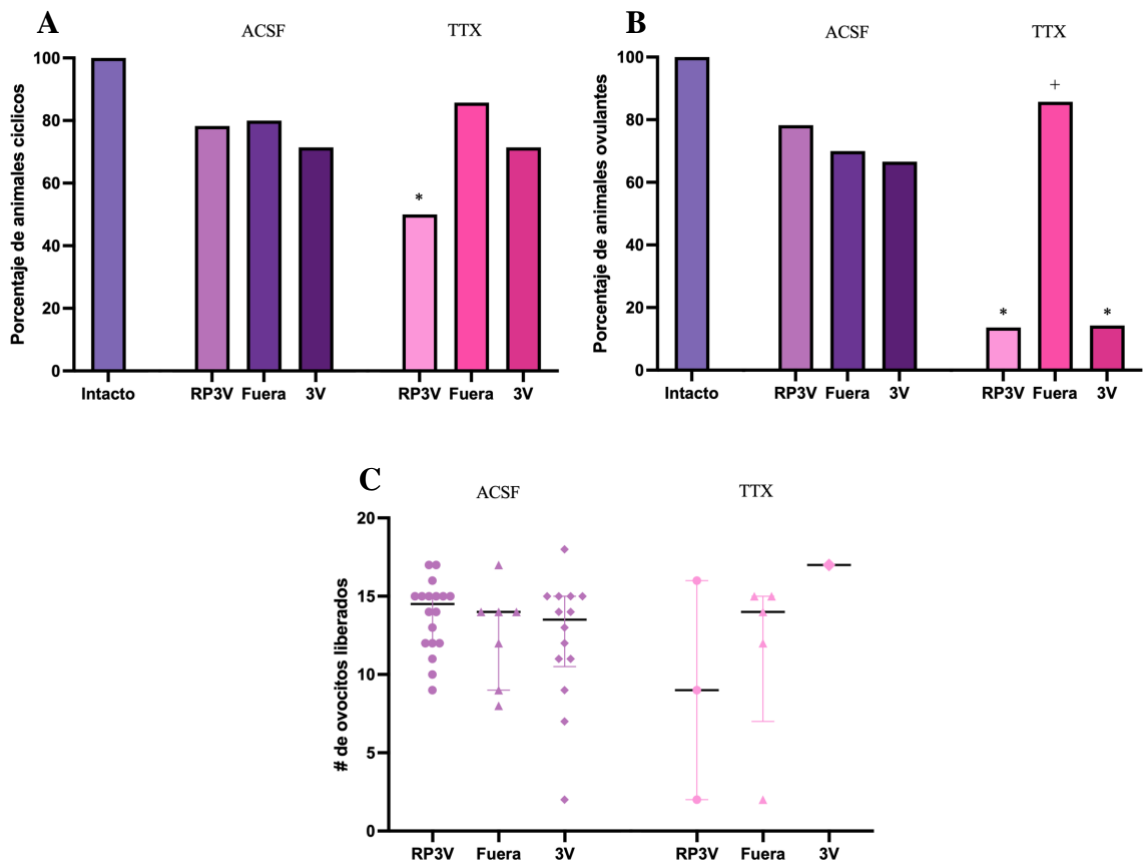
**Cuadro 2.** La mediana y el rango intercuartil del número de ovocitos liberados por los animales intactos, tratados con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o tetrodotoxina (TTX) a las 14:00 horas del estro, metaestro, diestro o proestro. Las líneas horizontales indican que el número de observaciones no permitió realizar la estadística descriptiva correspondiente.

En la **Figura 15B** se muestra el porcentaje de animales ovulantes. Éste tampoco se modificó en los animales tratados con ACSF fuera del RP3V o en el tercer ventrículo ( $p \geq 0.0571$  vs Intacto o el grupo inyectado dentro del RP3V, prueba de probabilidad exacta de Fisher). En el caso de los animales a los que se les inyectó TTX, no se encontraron diferencias significativas en el grupo fuera del RP3V al compararlo con el grupo intacto (Intacto: 9/9 vs TTX-fuera: 5/7,  $p=0.1750$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher) o con su respectivo grupo de ACSF (ACSF-fuera: 7/10 vs TTX-fuera: 5/7,  $p=0.6855$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Contrario a esto, al compararlo con el grupo inyectado dentro del RP3V se encontró una diferencia significativa (TTX-fuera: 5/7 vs TTX-dentro: 3/22,  $p=0.0079$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Los animales inyectados con TTX dentro del tercer ventrículo se asemejaron a los del grupo de RP3V, por lo que también fueron distintos de manera significativa contra el grupo intacto (Intacto: 9/9 vs TTX-3V: 1/7,  $p=0.0009$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher) y su respectivo vehículo (ACSF-3V: 14/21 vs TTX-3V: 1/7,  $p=0.0232$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Esto sugiere que la TTX pudo alcanzar al RP3V y otras estructuras relacionadas con la regulación de la ovulación a través del sistema ventricular del cerebro. Finalmente, en la **Figura 15C** se

observa que el número de ovocitos liberados no se modificó en ninguno de los grupos ( $p \geq 0.3274$ , prueba Kruskal-Wallis). A pesar de ello, se aprecia un decremento en la dispersión en los animales tratados fuera del RP3V, por lo que se asemejan más a los grupos

<b>ESTRO</b>	<b>Intacto</b>	<b>ACSF</b>	<b>TTX</b>
<b>Ovarios</b>	28.19 ± 0.70	29.98 ± 1.52	27.15 ± 0.80
<b>Útero</b>	172.00 ± 7.52	159.40 ± 18.88	132.00 ± 20.08
<b>Adrenales</b>	23.83 ± 0.79	21.50 ± 2.62	23.95 ± 1.64
<b>METAESTRO</b>			
<b>Ovarios</b>		26.57 ± 1.46	27.74 ± 1.36
<b>Útero</b>		171.60 ± 14.71	<b>108.00 ± 4.60<sup>*+</sup></b>
<b>Adrenales</b>		25.10 ± 1.40	23.34 ± 3.12
<b>DIESTRO</b>			
<b>Ovarios</b>		26.98 ± 1.06	27.04 ± 1.89
<b>Útero</b>		178.40 ± 9.73	<b>126.30 ± 8.24<sup>*+</sup></b>
<b>Adrenales</b>		27.40 ± 1.67	<b>22.20 ± 0.95<sup>+</sup></b>
<b>PROESTRO</b>			
<b>Ovarios</b>		30.14 ± 2.30	27.62 ± 0.91
<b>Útero</b>		156.00 ± 4.47	159.30 ± 7.19
<b>Adrenales</b>		27.21 ± 1.85	27.38 ± 1.21

**Cuadro 3.** La media y el error estándar de la masa de los ovarios, el útero y las adrenales de aquellos animales intactos, tratados con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o con tetrodotoxina (TTX), en estro, metaestro, diestro o proestro. <sup>\*</sup> $p \leq 0.0046$  vs Intacto, <sup>+</sup> $p \leq 0.02$  vs ACSF, ANOVA seguido por la prueba de múltiples comparaciones de Tukey.



**Figura 15.** **A)** Porcentaje de animales cíclicos del grupo intacto y de los grupos tratados con líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o tetrodotoxina (TTX) dentro del área rostral periventricular del tercer ventrículo (RP3V), fuera de ella (Fuera) o en el tercer ventrículo (3V), \* $p=0.0083$  vs intacto, prueba de probabilidad exacta de Fisher. **B)** Tasa de animales ovulantes \* $p<0.0001$  vs Intacto; + $p<0.0079$  vs RP3V, prueba de probabilidad exacta de Fisher. **C)** Mediana y rango intercuartil del número de ovocitos liberados, en el grupo tratado con TTX en 3V solo ovuló un animal (17 ovocitos).

### *Alteraciones en el comportamiento de los animales*

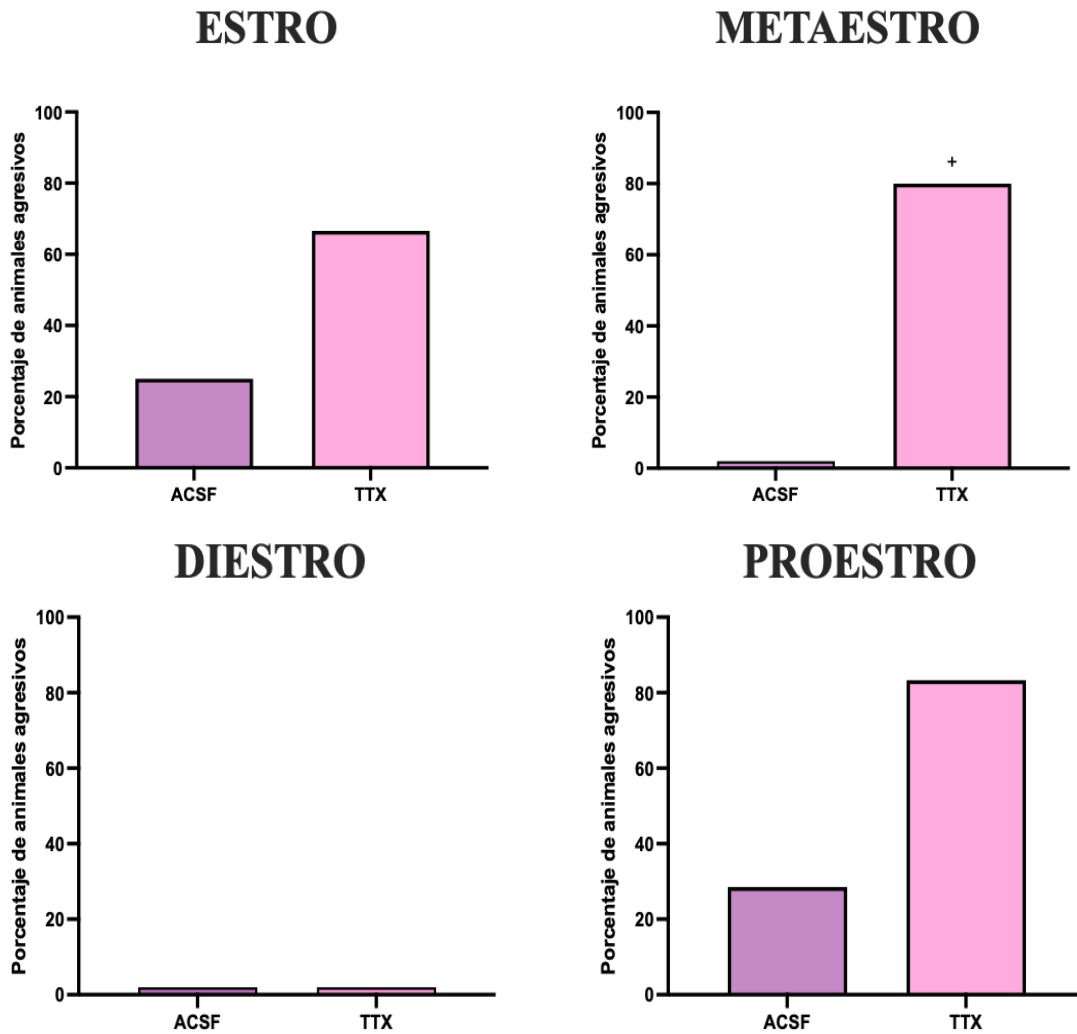
Un resultado inesperado que encontramos en el presente estudio fue la presencia de comportamientos agresivos en algunos animales durante la microinyección y las 24 horas posteriores a la misma. Se consideraron como comportamientos agresivos aquellos reportados por Blanchard y Blanchard (1977), por ejemplo, piloerección, postura de amenaza, movimientos ofensivos laterales, movimientos bruscos hacia las paredes de la jaula e intento de mordida. Sin considerar la etapa, se observaron comportamientos agresivos en el 13.04% de los animales del grupo de ACSF, y en el 59.09% del grupo de TTX, lo cual



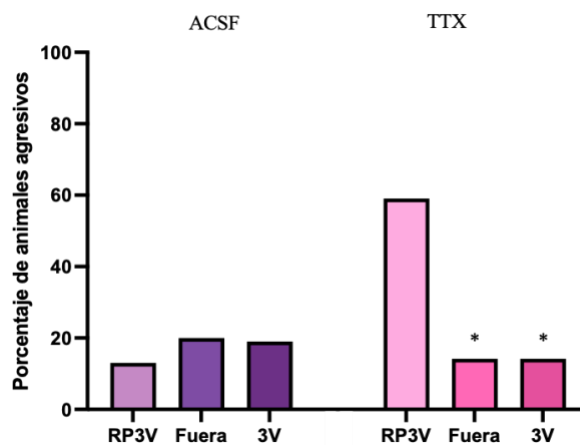
es estadísticamente significativo (ACSF: 3/23 vs TTX: 13/22,  $p=0.0015$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher).

Al analizar los datos de agresividad considerando a la etapa del ciclo estral como variable, se encontró una tendencia al alza en la etapa del estro, sin embargo, no se alcanzó la significancia estadística (ACSF: 1/4 vs TTX: 4/6,  $p=0.2619$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). En el metaestro se encontró una diferencia significativa (ACSF: 0/6 vs TTX: 4/5,  $p=0.0152$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Contrario al resto de las etapas, ninguno de los animales tratados en diestro mostró comportamientos agresivos sin importar la solución microinyectada (ACSF: 0/6 vs TTX: 0/5,  $p>0.9999$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Finalmente, los animales tratados en proestro mostraron una tendencia al alza semejante a la observada en estro, pero tampoco se alcanzó la significancia estadística (ACSF: 2/7 vs TTX: 5/6,  $p=0.0775$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher **Figura 16**).

En la **Figura 17** se observa que, al igual que en el caso de la ovulación, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de los comportamientos agresivos en aquellos animales en los que se microinyectó ACSF fuera del RP3V (RP3V: 3/23 vs Fuera: 2/10,  $p=0.4851$  prueba de probabilidad exacta de Fisher) o dentro del tercer ventrículo (RP3V: 3/23 vs 3V: 4/21,  $p=0.4466$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Por otro lado, los comportamientos agresivos de los animales microinyectados con TTX fuera del RP3V o dentro del tercer ventrículo se asemejan al grupo vehículo, pero son estadísticamente distintos a los del grupo de RP3V (RP3V: 13/22 vs Fuera: 1/8,  $p=0.0296$ ; RP3V: 13/22 vs 3V: 1/7,  $p=0.049$ , prueba de probabilidad exacta de Fisher). Estos resultados muestran que los efectos del bloqueo de la actividad eléctrica sobre la agresividad son específicos al área de estudio.



**Figura 16.** Porcentaje de animales que mostraron comportamientos agresivos tras la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o tetrodotoxina (TTX) en las distintas etapas del ciclo estral. <sup>+</sup>p=0.0152 vs ACSF, prueba de probabilidad exacta de Fisher).



**Figura 17.** Porcentaje de animales que mostraron comportamientos agresivos tras la microinyección de líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) o tetrodotoxina (TTX) en el área rostral periventricular del tercer ventrículo (RP3V), fuera de ella (Fuera) o en el tercer ventrículo (3V). \*p=0.0490 vs RP3V, prueba de probabilidad exacta de Fisher.

## 9. Discusión

Como se mencionó antes, el RP3V está involucrada en la regulación de la secreción preovulatoria de la GnRH (Han *et al.*, 2005; Herbison, 2008; Stevenson *et al.*, 2022). Debido a que sus neuronas de kisspeptina expresan al ER $\alpha$  y su actividad incrementa por la tarde del proestro, se ha propuesto que el RP3V actúa como el intermediario en la retroalimentación estimulante que ejercen los estrógenos ováricos y envía una señal a las neuronas de GnRH que resulta en el pico preovulatorio (Smith *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2022). La mayoría de los estudios mencionados se han realizado en hembras ovariectomizadas con o sin un reemplazo de estradiol, por lo que actualmente contamos con un modelo sobresimplificado en el que se propone que el RP3V únicamente regula la ovulación durante la tarde del proestro. Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que el SCN y el ARC, que también se pensaba que solo participaban en momentos muy discretos del ciclo estral, desempeñan un papel importante a lo largo de todo el ciclo (Domínguez y Smith, 1974; Silva *et al.*, 2020b; Silva, 2021). Considerando lo anterior, es importante analizar el papel del RP3V sobre la regulación de la ovulación en etapas distintas al proestro.

### **Efecto de la implantación de las cánulas guía sobre la ciclicidad estral**

En la primera etapa del experimento se realizaron las cirugías estereotáxicas con las cánulas previamente utilizadas en nuestro laboratorio (14 mm), sin embargo, fue necesario modificarlas ya que observamos un porcentaje alto de animales acíclicos (52.9%). Es posible que esto se deba a que las cánulas de 14 mm, que alcanzan el límite superior del RP3V, hayan causado un daño mecánico considerable, alterando su función y por ende la progresión del ciclo estral. En concordancia, se ha mostrado que la lesión electrolítica de esta área resulta en un estro constante (Wiegand *et al.*, 1980), lo que también observamos en nuestros animales.

Contrario a lo anterior, la mayoría de los animales implantados con cánulas de 10 mm se recuperaron de la cirugía de manera satisfactoria y solo se observó aciclicidad permanente en el 14.2%. Esto podría atribuirse a que en esos animales existieron ligeras diferencias en la ubicación final de las cánulas que no pudieron ser detectadas objetivamente bajo el microscopio estereoscópico. Otra posibilidad es la variabilidad en la respuesta al estrés entre individuos. En este caso, se ha mostrado que la implantación de cuerpos extraños en el

cerebro resulta en la activación crónica del sistema inmunitario y del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Sharon *et al.*, 2021; Wellman *et al.*, 2019).

La respuesta del sistema inmunitario del sistema nervioso central a la presencia de un cuerpo extraño comienza con un proceso inflamatorio local caracterizado por la activación de las células de la microglía, que actúan como macrófagos y son consideradas la primera línea de defensa. Esta respuesta comienza aproximadamente 30 minutos después de la implantación (Kozai *et al.*, 2012; Sharon *et al.*, 2021). Las células de la microglía que se activan adquieren un estado de movilidad que involucra la extensión y retracción del cuerpo celular. Posteriormente, en el estado de transición, se observan modificaciones morfológicas hasta que su cuerpo alcanza una forma ameboide. Finalmente, el estado de locomoción se caracteriza porque las células comienzan a moverse por el tejido cerebral en dirección al cuerpo extraño para encapsularlo mediante la extensión de lamelopodios (Kozai *et al.*, 2012; Kozai *et al.*, 2015). Adicionalmente, se ha mostrado que los astrocitos también participan en esta respuesta, formando una capa compacta alrededor de la microglía que encapsula al cuerpo extraño y que ayuda a terminar de formar la cicatriz glial (Kozai *et al.*, 2015; Wellman *et al.*, 2019).

Durante el proceso inflamatorio incrementa la expresión de la caspasa-3 en las neuronas, lo que induce la apoptosis en dichas células. A su vez, las células de la glía liberan factores pro-inflamatorios como la interleucina-1, la interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Biran *et al.*, 2005; Wellman *et al.*, 2019). Esto induce un daño en la barrera hematoencefálica que provoca la extensión de los vasos sanguíneos y la infiltración de células inflamatorias como los neutrófilos, monocitos, y eosinófilos al parénquima cerebral (Kozai *et al.*, 2015). Se ha mostrado que la interleucina-1 y el TNF- $\alpha$  también promueven la apoptosis en las neuronas (Biran *et al.*, 2005; Wellman *et al.*, 2019). Como puede deducirse de lo anterior, durante la respuesta inflamatoria las neuronas son desplazadas por las células gliales, lo que resulta en la pérdida de las sinapsis entre circuitos, desmielinización de los axones, cambios en la excitabilidad neuronal y, finalmente, en la neurodegeneración (Biran *et al.*, 2005; Kozai *et al.*, 2012; Nolte *et al.*, 2015). Considerando lo anterior, es posible que en los animales acíclicos la implantación de las cánulas haya estimulado una reacción inmunitaria más severa. Esto podría haber provocado la interrupción de las conexiones que son necesarias para la regulación de la secreción de la

GnRH y, por lo tanto, la secreción cíclica de las gonadotropinas y los esteroides gonadales pudo alterarse.

Por otro lado, también es posible que la activación del sistema inmunitario haya estimulado al eje de respuesta al estrés, lo que resulta en la inhibición de muchos de los procesos que son regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Chrousos 1995; Kalantaridou *et al.*, 2004; Narayan y Parisella, 2017). En este sentido, se ha observado que las citocinas secretadas por las células gliales durante un proceso inflamatorio estimulan al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Perlstein *et al.*, 1993; Toufexis *et al.*, 2014). Por ejemplo, la administración intracerebroventricular de interleucina-1 estimula la síntesis de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) al actuar sobre el PVN (Imura *et al.*, 1991). De manera similar, la administración de TNF- $\alpha$  a cultivos de hipotálamo resulta en un incremento de la síntesis y secreción de la CRH (Bernardini *et al.*, 1990; Perlstein *et al.*, 1993). En el caso de la interleucina-6, se sabe que puede actuar directamente a nivel de la hipófisis anterior, ya que estimula la secreción de la hormona adenocorticotropica (ACTH), lo que estimularía, a su vez, la secreción de glucocorticoides (Naitoh *et al.*, 1988).

Distintos autores mencionan que el incremento en el contenido hipotalámico de la CRH inhibe la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas (Williams *et al.*, 1990; Maeda y Tsukamura, 2006). Dicha inhibición parece ser indirecta ya que las neuronas de GnRH no expresan el receptor a CRH (Ozawa, 2021). Entre las estructuras que podrían mediar esta respuesta se encuentra precisamente el RP3V, ya que contiene una gran cantidad de neuronas GABAérgicas que inervan a las neuronas de GnRH y que inhiben su actividad durante la exposición al estrés (Lin *et al.*, 2012). Adicionalmente, las neuronas de kisspeptina del RP3V expresan el receptor a CRH y son inervadas por fibras CRHérgicas del PVN, por lo que el efecto de esta neurohormona sobre la secreción de GnRH podría depender también de la modulación de la secreción de kisspeptina (Ozawa, 2021). Por otro lado, la CRH también puede inhibir al sistema reproductivo a nivel periférico, ya que el incremento en su concentración sérica induce estrés oxidativo en las células de la granulosa e incluso puede generar apoptosis, por lo que se altera el desarrollo folicular y la esteroidogénesis, lo que también explicaría la aciclicidad observada en los animales utilizados en el presente estudio (Narayan y Parisella, 2017; Casillas *et al.*, 2021).

Por su parte, los glucocorticoides que se sintetizan en la corteza adrenal en respuesta a la secreción de la CRH y la ACTH, también ejercen un efecto inhibitorio sobre las funciones

reproductivas. Por ejemplo, se ha reportado que los gonadotropos expresan el receptor a corticosterona y que el incremento de ésta inhibe la secreción de la LH y del estradiol (Nequin *et al.*, 1975; Breen y Karsch, 2006; Maeda y Tsukamura, 2006; Pierce *et al.*, 2009; Toufexis *et al.*, 2014). De manera semejante, el cortisol suprime la secreción de las gonadotropinas y el desarrollo folicular en ovejas, lo que resulta en anovulación (Pierce *et al.*, 2009; Narayan y Parisella, 2017; Wei *et al.*, 2019). También se ha mostrado que los glucocorticoides inhiben la secreción de la GnRH actuando a nivel central. En este caso, las neuronas del DMH que sintetizan al péptido relacionado con la RFamida 3 (RFRP-3), un ortólogo de la hormona inhibitoria de la GnRH de las aves, expresan el receptor a glucocorticoides e inhiben la secreción de la GnRH en respuesta al estrés (Kirby *et al.*, 2009).

Finalmente, cuando se activa el eje del estrés y existe un aumento en el contenido de CRH en el PVN, éste envía información a los ovarios a través de los nervios simpáticos. La información que llega al ovario por el nervio del plexo ovárico y por el nervio ovárico superior estimula un aumento en la síntesis de andrógenos, lo que puede resultar en el desarrollo de quistes foliculares (Toufexis *et al.*, 2014). A pesar de que esta es una posibilidad, sólo se podrá confirmar con el análisis histológico de los ovarios de los animales tratados en este experimento.

### **La microinyección de ACSF en el RP3V, sin considerar la etapa del ciclo estral en que se realiza, no altera la ciclicidad estral ni la ovulación**

Esto sugiere que la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario no se modificó a pesar de la microinyección de un fluido extraño en una región que es imprescindible para la regulación de la ovulación. Los resultados antes mencionados concuerdan con el hecho de que no encontramos modificaciones en la masa del útero ni de los ovarios, por lo que probablemente la secreción de hormonas esteroideas y el desarrollo folicular continuaron con normalidad en la mayoría de los individuos. Resultados semejantes se han obtenido en nuestro laboratorio tras la microinyección del ACSF en otras estructuras relacionadas con la regulación de la ovulación como el POA (Contreras, 2022; Castillo, 2022; Romero, 2022), el SCN (Silva *et al.*, 2020b) y el ARC (Silva, 2021), por lo que aparentemente el vehículo no interfiere con los parámetros analizados en el presente estudio.

La ausencia de efectos secundarios de la microinyección de ACSF sobre la ovulación concuerda con las observaciones de que la perfusión del tejido nervioso con este fluido, durante diversas condiciones quirúrgicas y experimentales, resulta en un menor daño en comparación con otros como la solución salina y la solución de Ringer con lactato. Entre otras variables, se ha reportado una mejoría en el daño general, no causa daños excesivos o alarmantes, la presencia de edemas postoperatorios, la permeabilidad vascular y la activación de rutas proapoptóticas e inflamatorias en las neuronas y células de la glía (Enomoto *et al.*, 2004; Doi *et al.*, 2006; Kasim *et al.*, 2010; Miyajima *et al.*, 2012). A pesar de lo anterior, es importante notar que este análisis sin considerar la etapa del ciclo enmascaró un efecto perjudicial del ACSF, ya que los cinco animales que presentaron alteraciones en la ciclicidad/ovulación fueron microinyectados en metaestro, lo que se discute a continuación.

### **La sensibilidad del RP3V a los cambios en el medio extracelular varía en función de la etapa del ciclo estral**

Al analizar los datos del grupo de ACSF, considerando la etapa en la que los animales fueron microinyectados, no encontramos diferencias significativas en estro, diestro ni proestro en comparación con el grupo intacto. Por otro lado, el porcentaje de animales cíclicos y ovulantes decreció significativamente en aquellos tratados en metaestro, por lo que sugerimos que en esta etapa cualquier alteración del medio extracelular del RP3V resulta en una interrupción de la comunicación con las neuronas de la GnRH. En primera instancia, este efecto podría depender de la estimulación mecánica por el movimiento del ACSF al ser infundido en el cerebro. Esto posiblemente sea mediado por las neuronas de contacto con el líquido cefalorraquídeo (CSF), que se encuentran en los órganos circunventriculares como el RP3V (Vigh *et al.*, 2004). Éstas actúan como mecanorreceptores que responden a los movimientos de fluidos liberando GABA (Jalalvand *et al.*, 2018), que a su vez inhibiría la actividad de otras poblaciones neuronales dentro del RP3V.

Por otro lado, el ACSF utilizado en este estudio tiene una concentración de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> similar a la reportada para el CSF humano y de rata (150 mM, 3 mM y 1.4 mM, respectivamente), sin embargo, la de Cl<sup>-</sup> es mayor (155 mM vs. 125 mM) y la de Mg<sup>2+</sup> y P es menor (0.8mM vs. 2.4 mM y 1 mM vs. 3 mM, respectivamente, Friedman y Levinson, 1955; Sterkers *et al.*, 1982; Sun *et al.*, 2009; Liddelow *et al.*, 2013; Bjorefeldt *et al.*, 2015).

En este sentido, el cambio en la osmolaridad local podría explicar nuestros resultados, ya que resultaría en una disminución en la generación de los potenciales de acción en el RP3V, mismos que son necesarios para estimular la liberación de kisspeptina en las terminales nerviosas que alcanzan al POA. En apoyo a lo anterior, se ha descrito que la perfusión de neuronas corticales con ACSF decrece su actividad eléctrica (Bjorefeldt *et al.*, 2015). Aunado a esto, se han detectado grupos de neuronas en el hipotálamo anterior que actúan como sensores de los cambios en la osmolaridad, modificando su actividad en función de la concentración extracelular de iones (Tremblay *et al.*, 2011).

Como se mencionó antes, la concentración de  $Mg^{2+}$  en nuestro ACSF es mucho menor que la del CSF de rata. Esto es importante ya que existe evidencia de que la disminución en la concentración extracelular de  $Mg^{2+}$  en el cerebro provoca la vasoconstricción de las arterias locales (Mori *et al.*, 2013), lo que a su vez resulta en una menor distribución de oxígeno y glucosa (Bola y Kiyatkin, 2018). Esto es muy relevante ya que dicha azúcar es la principal fuente de energía para el proceso de neurotransmisión e incluso la actividad glial (Mergenthaler *et al.*, 2013; Deitmer *et al.*, 2019). Considerando que el ACSF utilizado no contiene glucosa, la inyección resultaría en una dilución de su concentración alrededor de las neuronas del RP3V (que en el CSF es de entre 0.47 mM y 4.4 mM). Las alteraciones en esta variable también podrían explicar nuestros resultados ya que diversos estudios han mostrado que los cambios bruscos en la concentración de glucosa alteran la actividad neuronal. Si la concentración incrementa, se observa una mayor frecuencia de disparo, mientras que lo opuesto ocurre ante un medio extracelular bajo en glucosa (Akasu *et al.*, 1996; Kirchner *et al.*, 2006; An *et al.*, 2008).

Los cambios en el pH local también podrían explicar los efectos inhibitorios del ACSF, ya que el del CSF de la rata es de 7.3, mientras que el de nuestro ACSF es de 7.2. A pesar de que la diferencia es ligera, cabe mencionar que el ACSF no contiene  $HCO_3^-$ , cuya función es la de amortiguar los cambios en el pH del CSF, en donde su concentración es de alrededor de 24.5 mM. En el RP3V, los cambios del pH extracelular estimulan un incremento en la excitabilidad de las neuronas de contacto con el CSF, que responden liberando GABA (Jalalvand *et al.*, 2018), por lo que una posible explicación de las alteraciones observadas es que la liberación de este neurotransmisor inhibitorio afectó la actividad de las neuronas de kisspeptina adyacentes. Cabe mencionar que esta información debe tomarse con reservas ya que las evidencias de la actividad de las neuronas de contacto con el CSF del RP3V se han obtenido exclusivamente en peces, reptiles y aves (Vigh *et al.*, 2004).



Como se puede deducir, las hipótesis abordadas en los párrafos anteriores no explican el hecho de que el tratamiento con ACSF únicamente alteró la ciclicidad y la ovulación cuando ocurrió en metaestro. En este caso, proponemos que en metaestro las neuronas son más sensibles a cambios en el ambiente extracelular, ya que se ha reportado que la fluctuación en la concentración de las hormonas ováricas altera la excitabilidad neuronal y modifica la unión de los neurotransmisores a sus receptores (Paul y Purdy, 1992). En las etapas de estro y metaestro se presenta la menor concentración de estradiol y progesterona a lo largo del ciclo (Smith *et al.*, 1975; Levine, 2015), lo que se relaciona con el incremento en la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub> en el cerebro (Lovick, 2012). Si esto ocurre en el RP3V, entonces se amplificaría el efecto inhibitorio mediado por las neuronas de contacto con el CSF que se mencionó en párrafos anteriores. En apoyo a esta idea, la inyección de ACSF en el SCN o el ARC también resulta en una tendencia al decremento en el porcentaje de animales cíclicos y ovulantes (Silva, 2021).

En el caso específico del RP3V, se ha mostrado que la concentración circulante de hormonas ováricas modifica su anatomía y fisiología. Por ejemplo, la cantidad de sinapsis axosomáticas en esta región es basal durante el metaestro e incrementa gradualmente en el proestro y estro, lo que sugiere que la neurotransmisión en su interior decrece cuando la concentración de estradiol es baja. Cabe mencionar que las neuronas en las que se aprecia esta diferencia son las mismas que expresan el ER $\alpha$  y por ende la kisspeptina (Langub Jr. *et al.*, 1993). Esto último es relevante porque el mismo equipo reportó un menor tamaño del soma de estas neuronas en el metaestro en comparación con el proestro/estro, lo que concuerda con la observación de que las neuronas de kisspeptina del RP3V sintetizan una menor concentración del péptido en respuesta al decremento en la concentración de estradiol (Smith *et al.*, 2006).

Por último, también se han reportado cambios en la actividad eléctrica de estas neuronas que dependen de la etapa del ciclo. En metaestro/diestro presentan una menor excitabilidad que en el proestro, debido a cambios en la actividad de distintos canales catiónicos que dependen de la concentración de estradiol (Wang *et al.*, 2016). Un ejemplo de esto se observa en el decremento en la expresión de los canales activados por hiperpolarización y nucleótidos cíclicos que ocurre durante el metaestro/diestro, lo que es relevante ya que estos canales son responsables de la reducción de la resistencia de membrana y por ende de la despolarización (Piet *et al.*, 2013). Esto, a su vez, resulta en el decremento en la cantidad de disparos espontáneos que se reporta en las mismas etapas, que además son más irregulares que en

otros momentos del ciclo estral (Ducret *et al.*, 2010). En conjunto, la evidencia mencionada sugiere que la conectividad entre las neuronas del RP3V, su actividad eléctrica y bioquímica es menor en el metaestro que en las otras etapas del ciclo, por lo que cualquier modificación del medio extracelular en ese momento podría resultar en una inhibición completa del sistema.

### **El bloqueo de la actividad eléctrica del RP3V altera el ciclo estral e inhibe la ovulación**

Al realizar el análisis estadístico del grupo tratado con TTX, se observó un incremento significativo en el porcentaje de animales que presentaron anomalías en el ciclo estral, caracterizadas por un arresto en la etapa de diestro. Esto coincide con los resultados de la tasa de animales ovulantes, que también decreció significativamente en comparación con el grupo intacto y vehículo. Una posible explicación para ello es que la inhibición de la actividad eléctrica de las neuronas del RP3V resultó en la interrupción de su comunicación con las neuronas de la GnRH del POA, lo que a su vez alteraría la actividad de las gónadas. Esto es respaldado por experimentos en donde se lesionó electrolíticamente al RP3V y se observó aciclicidad en los animales (Wiegand *et al.*, 1980; Wiegand y Teresawa, 1982).

Semejante a lo anterior, Halász y Pupp (1965) observaron que la sección mecánica de las fibras que parten del RP3V y alcanzan al POA, induce un estado de diestro o estro constante. En el primer caso se observa la presencia de cuerpos lúteos persistentes en los ovarios, mientras que, en el segundo, múltiples folículos antrales. Los autores no explican a qué se debe la presencia de dos alteraciones opuestas tras el mismo tratamiento, sin embargo, en nuestro experimento todos los animales presentaron diestro persistente. Esto sugiere que disminuyó la secreción de hormonas esteroideas, lo que podría explicar la tendencia al decremento que observamos en la masa de los ovarios. En este escenario, la inyección de TTX en el RP3V inhibiría las señales que estimulan la secreción de la GnRH/gonadotropinas, lo que suprimiría la proliferación de las células foliculares y podría alterar el desarrollo folicular e incluso inducir atresia. Esto impediría que la mayoría de los folículos se desarrollaran hasta la etapa preovulatoria y podría alterar también el desarrollo de los órganos que dependen de las hormonas gonadales (Kumar *et al.*, 1997; Kumar y Sait, 2011).

La hipótesis anterior podría explicar el hecho de que los tres animales que ovularon tras la inyección de TTX liberaron un número menor de ovocitos, lo que se ve reflejado en la gran dispersión en el rango intercuartílico de ese grupo. Asimismo, el decremento significativo en la masa uterina que obtuvimos respalda la idea de una alteración en la secreción de hormonas ováricas, ya que el desarrollo endometrial depende del incremento gradual en la concentración de estradiol y progesterona que ocurre a partir del metaestro (Marcus, 1974; Wood *et al.*, 2007). Otra posibilidad es que, al no generarse una fluctuación normal en la concentración de estradiol, no ocurrió el pico preovulatorio de gonadotropinas y por lo tanto no se desencadenó la ruptura de los folículos (Andersson *et al.*, 2013; Duffy *et al.*, 2018). Para poder contrastar las propuestas antes mencionadas, es necesario realizar el análisis del desarrollo folicular en los ovarios de los animales tratados en el presente experimento. Adicionalmente, valdría la pena realizar un grupo de animales a los que se les inyecte la TTX y se cuantifique la concentración de hormonas esteroideas en muestras obtenidas a lo largo del ciclo estral.

Es posible que la inhibición del sistema kisspeptinérgico del RP3V explique los resultados antes mencionados. Esto se debe a que los estudios de trazado condicional han revelado que las fibras kisspeptinérgicas del RP3V establecen aposiciones cercanas con el soma y las dendritas de las neuronas de GnRH del POA, así como con sus axones a nivel de la eminencia media (Yip *et al.*, 2015). Adicionalmente, la estimulación optogenética de las neuronas de kisspeptina del RP3V incrementa la actividad eléctrica de las neuronas de GnRH de manera coordinada (Piet *et al.*, 2018). Finalmente, los animales transgénicos cuyas neuronas de GnRH no expresan el receptor a kisspeptina presentan anomalías en la secreción de la GnRH/LH, por lo que se inhibe el desarrollo folicular, se altera el ciclo estral y no son capaces de ovular (Uenoyama *et al.*, 2009; Kirilov *et al.*, 2013; Novaira *et al.*, 2014).

Además de la inhibición a nivel de los somas kisspeptinérgicos del RP3V, nuestros resultados podrían deberse al bloqueo de las señales aferentes que son recibidas desde el ARC, ya que se ha mostrado que la TTX inhibe la transmisión de potenciales de acción en fibras de paso y terminales nerviosas (van Duuren *et al.*, 2007). En ese sentido, se ha mostrado que las neuronas kisspeptinérgicas del ARC envían proyecciones a las neuronas kisspeptinérgicas del RP3V (Yeo y Herbison, 2011; Shen *et al.*, 2022). Dichas proyecciones contienen glutamato, lo que concuerda con la expresión de los receptores glutamatérgicos en las neuronas que las reciben (Ottem *et al.*, 2004). Cabe mencionar que la estimulación optogenética de dichas fibras a nivel del RP3V estimula la secreción de la GnRH/LH (Qiu

*et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2022), lo que además concuerda con observación previa de que las neuronas kisseptinergicas del RP3V se despolarizan en respuesta a la adición de glutamato (Zhang *et al.*, 2013).

Finalmente, otra posible explicación de nuestros resultados es que la TTX inhibió la generación de señales eferentes originadas en el RP3V pero que dependen de otros sistemas de neurotransmisión. Por ejemplo, se ha mostrado que, además de kisspeptina, las fibras que se originan en el RP3V contienen dopamina y GABA, que actúan como inhibidores de la secreción de la GnRH (Clarkson y Herbison, 2011; Liu y Herbison, 2011; Liu y Herbison, 2013). Por su parte, el GABA también se une a receptores GABA<sub>B</sub> en la terminal presináptica que lo libera, por lo que inhibe la liberación de kisspeptina (Ducret *et al.*, 2010; Liu y Herbison, 2011). En ambos casos, la inyección de la TTX resultaría en una secreción sostenida de GnRH, que previamente se ha mostrado que inhibe la actividad de los gonadotropos y la función gonadal (Belchetz *et al.*, 1978). Debido a que la inactivación neuronal en este estudio no fue específica, no sabemos con certeza cuál es la contribución particular de cada uno de estos sistemas de neurotransmisión, por lo que sería pertinente realizar estudios en los que se microinyecten antagonistas para cada uno de ellos.

Considerando que no se modificó la ciclicidad ni la ovulación en los animales microinyectados fuera del RP3V, concluimos que los efectos observados son específicos de la inactivación de esta área. Con base en ello, sugerimos que el RP3V no solamente juega un papel importante en el desencadenamiento del pico preovulatorio de la GnRH/LH, sino también en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la progresión del ciclo estral. Debido a que la morfología y la actividad eléctrica del RP3V de las hembras varía en función de la concentración de hormonas gonadales (Ducret *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016; Jamieson *et al.*, 2021), fue necesario realizar un análisis del efecto de su inactivación en otras etapas además del proestro.

### **La participación del RP3V sobre la regulación del ciclo estral y la ovulación varía en función de la etapa**

Como se mencionó al inicio de esta discusión, la mayoría de los estudios publicados concuerda con que el papel del RP3V en la regulación de la ovulación es el de mediar la retroalimentación estimulante del estradiol durante la tarde del proestro. Considerando que la inactivación mediada por la TTX dura menos de 24 horas (Zhuravin y Bures, 1991), esperaríamos que la inyección en otras etapas no afectara la progresión del ciclo ni la

ovulación, sin embargo, el 100% de los animales tratados en estro o metaestro se volvieron acíclicos y no ovularon. Estos resultados sugieren que al inicio del ciclo estral las neuronas del RP3V producen señales nerviosas que son indispensables para la regulación de la ciclicidad y la ovulación.

En el caso del estro, proponemos que la actividad del RP3V es necesaria para mantener una secreción tónica de kisspeptina y, en consecuencia, la secreción basal de la GnRH que regula el desarrollo folicular y la secreción de hormonas ováricas. En otras palabras, el RP3V participaría en la regulación de la secreción tónica del decapeptido en adición a la fásica que ya se ha reportado. Esto concuerda con el hecho de que las neuronas de kisspeptina del RP3V son moduladas por señales AVPérgicas del SCN durante esta etapa, mismas que inhiben su actividad hasta en un 75%, lo que no ocurre en el diestro ni proestro (Jamieson *et al.*, 2021). Dichos resultados coinciden con la conclusión de Langub Jr. y colaboradores (1994), que mencionaron que el RP3V no solo es regulado por los estrógenos provenientes del ovario, sino también por circuitos neuronales que varían en función de la etapa del ciclo, ya que la cantidad de sinapsis que reciben sus neuronas es 39% mayor en el periodo que transcurre entre el proestro y el estro con respecto a los días del diestro.

Por otro lado, es complicado determinar la contribución particular del RP3V en los mecanismos que regulan el ciclo estral y la ovulación durante el metaestro, ya que tanto el grupo de ACSF como el de TTX alteraron de manera significativa ambos procesos. A pesar de ello, proponemos que durante esta etapa también genera señales importantes para el mantenimiento de la secreción tónica de la GnRH. Evidencia de ello es el decremento significativo en la masa del útero de los animales del grupo de TTX, lo que nos permite sugerir que se alteró el desarrollo folicular y por ende la secreción de estradiol, que es indispensable para la regulación del engrosamiento endometrial (Marcus, 1974). Además de ello, también se ha observado una modulación nerviosa de las neuronas kisspeptinérgicas del RP3V durante esta etapa, ya que coexpresan GABA y presentan en sus terminales la isoforma del receptor GABA<sub>B</sub> que inhibe la actividad de canales de Ca<sup>2+</sup>, lo que sugiere un mecanismo de autorregulación inhibitoria. De acuerdo a estudios de electrofisiología, este mecanismo parece operar de forma permanente en los machos, mientras que en las hembras actúa en estro, metaestro y diestro, para posteriormente ser inhibido durante el proestro, lo que abriría la ventana de secreción fásica de kisspeptina responsable de estimular el pico preovulatorio de la GnRH (Liu y Herbison, 2011).

Contrario a lo observado en estro y metaestro, la administración de la TTX en el diestro no afectó de manera significativa la ciclicidad ni la ovulación, por lo que concluimos que durante esta etapa, el RP3V no participa de manera relevante en la regulación de la secreción tónica de la GnRH. A pesar de esto, en los animales del grupo tratado con TTX se registró un decremento significativo en la masa de las adrenales y el útero con respecto al grupo vehículo. Para explicar estos resultados proponemos que el RP3V regula la actividad de las células que sintetizan CRH a nivel del PVN, por lo que su inhibición resultaría en una alteración del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, responsable de la mayor secreción de progesterona a lo largo del ciclo estral (Flores *et al.*, 2008).

En este sentido, existe evidencia anatómica de que el RP3V envía fibras nerviosas al PVN (Yeo y Herbison, 2011), de las cuales, un porcentaje considerable contiene kisspeptina/GABA e inerva directamente a las neuronas parvocelulares secretoras de CRH (Stincic *et al.*, 2021). Por su parte, las neuronas del PVN expresan receptores a kisspeptina y GABA (Higo *et al.*, 2016) y su actividad eléctrica disminuye tras la activación optogenética de las terminales kisspeptinérgicas/GABAérgicas que las inervan, por lo que se sugiere que el RP3V ejerce un efecto inhibitorio sobre este sistema (Stincic *et al.*, 2021). Considerando que la progesterona bloquea la mitosis de las células endometriales (Wood *et al.*, 2007; Taraborrelli, 2015), la inyección de la TTX resultaría en un incremento en su secreción y por ende en un decremento en la masa uterina. Esto concuerda con el hecho de que la mitosis incrementa en el endometrio por la tarde del diestro (Marcus, 1974; Ajayi y Akhigbe 2020), cuando la concentración de progesterona es relativamente baja (Smith *et al.*, 1975; Flores *et al.*, 2008).

Finalmente, los resultados obtenidos en la etapa del proestro eran predecibles, ya que la microinyección de la TTX a las 14:00 horas interfiere con la emisión de las señales nerviosas que se generan en el RP3V previo al pico preovulatorio de la GnRH/gonadotropinas. Al respecto, se ha reportado que durante el pico preovulatorio del proestro incrementa la expresión de c-Fos en el RP3V (Le *et al.*, 1999). Similar a ello, en ratas ovariectomizadas con un implante que libera altas concentraciones de estradiol, también incrementa la expresión de c-Fos y kisspeptina (Adachi *et al.*, 2007). Por otro lado, la inyección de un anticuerpo contra la kisspeptina en el POA de estos animales inhibe la secreción de la LH. Esto sugiere que el RP3V, a través de la kisspeptina, estimula la secreción fásica de la GnRH actuando directamente sobre las neuronas que la sintetizan (Adachi *et al.*, 2007; Stevenson *et al.*, 2022).

Estudios de electrofisiología a nivel celular han mostrado un incremento en la cantidad de potenciales de acción generados por las neuronas de kisspeptina del RP3V durante el proestro, en comparación con el diestro. Aparentemente esto depende de un rebote del estado hiperpolarizado que es mediado por corrientes persistentes de Na<sup>+</sup>, mismas que son moduladas por el estradiol (Ducret *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016). Al usar un fármaco que bloquea los canales de sodio, posiblemente alteramos la cantidad de dicho catión que necesita la neurona para mantener la actividad en ráfaga característica del proestro y, por lo tanto, la capacidad de liberar neurotransmisores como la kisspeptina. En este estudio mostramos que la señal generada en el RP3V, específicamente al momento en que se genera el pico preovulatorio, es de vital importancia para que los animales ovulen, con lo que podemos concluir que la comunicación entre las neuronas del RP3V y las de GnRH es coordinada de manera muy precisa.

El bloqueo de la ovulación que observamos también podría deberse a la interrupción de señales aferentes que arriban al RP3V y que son necesarias para la generación del pico preovulatorio de gonadotropinas (Smith *et al.*, 2006; Herbison, 2008; Jamieson *et al.*, 2021). Por ejemplo, se ha mostrado que la estimulación mediada por la AVP que proviene del SCN dorsomedial durante el día del proestro incrementa la actividad de las neuronas de kisspeptina del RP3V (Jamieson *et al.*, 2021). Como discutimos previamente, también existe una vía estimulante entre el ARC y el RP3V que se activa durante la retroalimentación estimulante del estradiol (Ottem *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2018). En este caso, se ha reportado que las neuronas de kisspeptina del RP3V reciben proyecciones glutamatérgicas monosinápticas e ipsilaterales de las neuronas de kisspeptina del ARC (Yeo y Herbison, 2011; Qiu *et al.*, 2016). En concordancia, la activación optogenética de estas últimas estimula la secreción fásica de la LH en ratas en proestro o en animales ovariectomizados tratados con dosis altas de estradiol (Lin *et al.*, 2021). Resultados semejantes se han obtenido mediante la estimulación de las terminales de estas neuronas a nivel del RP3V, con la novedad de que los animales estimulados en proestro presentan mayor secreción de LH que aquellos estimulados en estro o en los días del diestro (Shen *et al.*, 2022). En concordancia con estos resultados, se ha mostrado que durante el proestro existe una mayor expresión de los receptores a glutamato de tipo 1 en el RP3V (Gu *et al.*, 1999) y que la administración de antagonistas de glutamato en la misma región inhibe la actividad de sus neuronas kisspeptinérgicas (Yeo y Herbison, 2011; Qiu *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2022).



La síntesis y secreción de la kisspeptina no solo depende de las señales nerviosas antes mencionadas ni de la integración de señales estrogénicas, sino que también se ha mostrado la necesidad del acoplamiento de la progesterona con sus receptores (Chapell *et al.*, 2000; Micevych y Sinchak, 2011; Chuon *et al.*, 2022). Cuando incrementa la concentración del estradiol, los astrocitos del RP3V comienzan a secretar neuroprogesterona, que actúa en las neuronas kisspeptinérgicas aledañas estimulando la síntesis del neuropéptido (Sinchak *et al.*, 2020). En este sentido, es posible que la TTX también haya bloqueado la secreción de neuroprogesterona y que por lo tanto la síntesis de kisspeptina haya sido deficiente, produciendo los efectos observados en la ovulación de nuestros animales. En apoyo a esta idea, se ha mostrado que la liberación de sustancias por parte de las células gliales también es dependiente de la actividad de los canales de Na<sup>+</sup> (Reiser *et al.*, 1983; Boscia *et al.*, 2016).

### **El bloqueo de la actividad eléctrica del RP3V incrementa la exhibición de comportamientos agresivos**

Durante este estudio se obtuvo un resultado que no se contempló en el diseño del experimento; la presencia de comportamientos agresivos en los animales inyectados con TTX en el RP3V. En el metaestro el porcentaje de animales agresivos fue significativamente mayor, mientras que en estro y proestro se observó una tendencia al alza muy marcada, pero que escapó a la significancia estadística. Por el contrario, los animales tratados en diestro no mostraron comportamientos agresivos. Cabe mencionar que aquellos animales que tendieron a ser agresivos fueron los mismos que presentaron alteraciones en el ciclo estral y anovulación.

Los resultados mencionados implican que la actividad de las neuronas del RP3V está relacionada no solo con la regulación de la ovulación, sino también con la exhibición de la agresión. Esto es importante desde el punto de vista de la biología reproductiva de las hembras, ya que la agresión representa una estrategia adaptativa pues es útil para conseguir recursos como el agua y el alimento, así como para defender el territorio y a las crías (Takahashi y Miczek, 2014). En ese sentido, Scott (1966) menciona que la agresión es en sí un sistema compuesto por patrones del comportamiento que tiene la función de facilitar la adaptación a situaciones que involucran un conflicto físico y, por ende, un riesgo potencial para el organismo. A pesar de que en los mamíferos lo anterior aplica para ambos sexos, la



mayoría de los estudios sobre etología y neuroendocrinología de la agresión se han enfocado en machos, ya que son naturalmente más propensos a ser agresivos.

Lo anterior debe de tomarse en consideración para la interpretación de nuestros resultados, ya que existe evidencia de que los mecanismos neuroendocrinos que modulan la agresividad son sexualmente dimórficos. Por ejemplo, se ha reportado que la mayoría de los comportamientos agresivos de las hembras son dirigidos contra otras hembras y que rara vez atacan a los machos, quienes atacan preferentemente a otros machos. Por otro lado, la ovariectomía no afecta la probabilidad de que se presente la agresión, pero la orquiectomía sí la reduce. En las hembras castradas el tratamiento con una dosis suprafiológica de benzoato de estradiol reduce la incidencia de ataques contra sus congéneres, mientras que el propionato de testosterona incrementa la agresión contra los machos (DeBold y Miczek, 1981). Los resultados anteriores sugieren que las hembras presentan un mecanismo de agresión que depende de estructuras nerviosas que son sensibles a los esteroides sexuales. También implica la participación de tejidos esteroideogénicos extragonadales, probablemente las glándulas adrenales, cuya actividad ha sido relacionada con los comportamientos agresivos (Munley *et al.*, 2018).

El hipotálamo anterior es un buen candidato para mediar los comportamientos agresivos que son dependientes de la fluctuación en la concentración de hormonas esteroideas, ya que contiene poblaciones de neuronas que expresan receptores para las mismas. En concordancia, las ratas lactantes que agreden a un macho invasor presentan un incremento en la expresión de c-Fos en diversas poblaciones neuronales dentro del POA (Gammie y Nelson, 2001; Lonstein y Gammie, 2022). Adicionalmente, se ha reportado que la lesión electrolítica de esta área disminuye las posturas de dominación, los ataques laterales y las mordidas en roedores de ambos sexos (Hamond y Rowe, 1976; Albert *et al.*, 1986; Edwards *et al.*, 1993). Cabe mencionar que las lesiones realizadas en dichos estudios abarcan en su totalidad al RP3V, por lo que no se puede atribuir el efecto observado a la destrucción del mPOA como sugieren los autores. Esto concuerda con el hecho de que, en nuestro estudio, aquellos animales en los que la microinyección de TTX ocurrió en la región caudal al RP3V, en donde se ubica el mPOA, no se mostraron agresivos en ningún momento.

Según nuestro conocimiento, solamente existe un estudio en el que se ha evaluado la participación del RP3V sobre la agresión. En éste se analizó la co-expresión de c-Fos en las neuronas de kisspeptina del RP3V y en las de RFRP-3 del DMH de machos que exhibieron

comportamientos agresivos ante un intruso del mismo sexo en su jaula. Los autores muestran un decremento significativo en la actividad de las neuronas de RFRP-3, por lo que concluyeron que éstas modulan de manera inhibitoria la agresión. Por otro lado, observaron una tendencia al alza en la actividad de las neuronas de kisspeptina, sin embargo, al no ser significativa, concluyeron que este péptido no participa en la regulación de la agresión (Jenning *et al.*, 2016). Esta conclusión nos parece apresurada ya que en sus gráficas se aprecia una gran dispersión de los datos de células inmunoreactivas a kisspeptina+c-Fos, que no se aprecia en las de RFRP-3+c-Fos, lo que sugiere que la variabilidad entre los individuos podría estar enmascarando un papel del RP3V en la regulación de la agresión.

En apoyo a esta idea, se ha mostrado que el RP3V establece una comunicación nerviosa con estructuras relacionadas directamente con la agresión como la amígdala medial (Canteras *et al.*, 1995; Haller, 2018) y el PVN (Yeo y Herbison, 2011; Csabafi *et al.*, 2013). Adicionalmente, en el lagarto de manchas laterales (*Uta stansburiana*), la administración de kisspeptina resulta en un incremento en la agresión producto de la estimulación de la secreción de testosterona (Neuman-Lee *et al.*, 2017). Este resultado es importante ya que, si bien no vincula directamente al RP3V con la agresión, sí establece un mecanismo de modulación de la conducta que depende de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada a través de la kisspeptina. Lamentablemente, este estudio solo contempló a los machos y no se han realizado otros semejantes en mamíferos. Adicionalmente, se ha estudiado el efecto de la kisspeptina sobre estados asociados a la agresión como la ansiedad y el estrés (Mora *et al.*, 1996; Morgan y Pfaff, 2002). Un artículo reporta que la administración sistémica de kisspeptina aumenta la concentración de corticosterona (Ibos *et al.*, 2021). En cuanto a la ansiedad, se han reportado efectos ansiolíticos (Mills *et al.*, 2022) y ansiogénicos (Csabafi *et al.*, 2013; Delmas *et al.*, 2018).

Considerando la influencia que ejercen las hormonas esteroideas sobre el comportamiento, se ha analizado si la agresividad contra otras hembras fluctúa a lo largo del ciclo estral. En estos experimentos se han encontrado resultados ambiguos que dependen de la especie y del método utilizado. Por ejemplo, en los hámsteres se aprecia una ligera variación con puntos máximos en metaestro y diestro y un mínimo en proestro y estro, aunque las diferencias no alcanzan a ser estadísticamente significativas (Giordano *et al.*, 1986). En el ratón sí se observan picos significativos en la agresión durante el proestro y metaestro (Hyde y Sawyer, 1977). En el caso de las ratas, un estudio mostró que la agresividad incrementa cuando no son receptivas al macho (metaestro y diestro) y decrece

cuando sí lo son (proestro y estro). En estos animales la ovariectomía inhibió la aparición de los comportamientos agresivos, mientras que el reemplazo de estradiol y progesterona los reestableció (Ho *et al.*, 2001). A pesar de lo anterior, la mayoría de los reportes sugiere que en las ratas no existen diferencias que dependan de la etapa del ciclo estral, aunque cabe mencionar que en algunos de estos experimentos el método de determinación de la etapa del ciclo es cuestionable, ya que se basa en el comportamiento sexual (Melchior *et al.*, 2004; de Jong *et al.*, 2014; Oliveira y Bakker, 2022).

El hecho de que no exista evidencia clara de que la agresividad de las ratas varíe en función de la etapa del ciclo estral podría deberse al modelo empleado para cuantificarla. Si bien las ratas hembra son más agresivas con otras hembras, esto parece formar parte de un mecanismo que les permite determinar la jerarquía en sus colonias (Schweinfurth, 2020), por lo que no se esperaría que fluctuara a lo largo del ciclo. Por otro lado, la restricción de la receptividad sexual en la tarde del proestro y la exhibición de agresividad contra el macho durante el resto del ciclo (Hardy, 1972), sugiere que la agresión forma parte de un mecanismo que evita la cópula cuando la probabilidad de preñez es baja. En este sentido, se ha mostrado que las neuronas kisspeptinérgicas del RP3V de las hembras son activadas por feromonas masculinas (Bakker *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2017; Hellier *et al.*, 2018), mismas que modifican el comportamiento sexual de la hembra (Hellier *et al.*, 2018). Esto podría depender del circuito nervioso que se forma entre los bulbos olfatorios, la amígdala y el RP3V, cuya actividad también depende de la concentración de estradiol (Simerly *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2011; Comninou *et al.*, 2017).

En el escenario de que el RP3V module un circuito de agresión asociada a la cópula, su participación sería imprescindible para interpretar la concentración de estradiol y por ende el grado de madurez de los folículos ováricos. Proponemos que el RP3V inhibe la agresión ya que el bloqueo de su actividad la incrementa. Adicionalmente, su contribución se modifica en función de la etapa del ciclo estral, por lo que probablemente depende del microambiente hormonal. Al respecto de esto último, no encontramos un patrón claro entre el efecto del bloqueo del RP3V y la concentración sérica de progesterona, testosterona y estradiol, por lo que se necesitan más estudios para determinar los mecanismos que regulan su actividad dentro de este circuito.

## **10. Conclusiones**

Los resultados obtenidos en el presente estudio difieren del modelo clásico en el que se ha propuesto que el RP3V únicamente regula la secreción fásica de la GnRH, por lo que proponemos que también participa en la regulación de la secreción tónica. Adicionalmente, el RP3V regula la exhibición de comportamientos agresivos en función de la etapa del ciclo estral, probablemente como parte de un mecanismo para impedir la cópula en momentos inapropiados del ciclo.

## 11. Perspectivas

Para comprender mejor el papel del RP3V en la regulación del ciclo estral, la ovulación y el comportamiento, nos planteamos las siguientes perspectivas:

- Realizar el análisis histológico de los ovarios de aquellos animales que fueron microinyectados con ACSF o con TTX en el RP3V.
- Cuantificar la concentración de hormonas esteroideas y de gonadotropinas en los grupos en los que se alteró la ciclicidad, la ovulación y el comportamiento.
- Realizar un análisis del comportamiento en animales microinyectados con TTX en estro, metaestro o proestro a través del paradigma de la hembra o el macho intruso para dilucidar si el RP3V modula la agresividad de dominancia o de receptividad.

## 12. Bibliografía

- Abel M., Wootton A., Wilkins V., Huhtaniemi I., Knight P., y Charlton H. (2000). The effect of null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*. 141(5), 1795-1803.
- Abrahamson E. y Moore R. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*. 916(1-2):172-91.
- Abrahamson E. y Moore R. (2006). Lesions of suprachiasmatic nucleus efferents selectively affect rest-activity rhythm. *Molecular and Cellular Endocrinology* 252(1-2), 46–56.
- Adachi S., Yamada S., Takatsu Y., Matsui H., Kinoshita M., Takase K., Sugiura H., Ohtaki T., Matsumoto H., Uenoyama Y., Tsukamura H., Inoue K. y Maeda K. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *The Journal of reproduction and development*. 53(2): 367-378.
- Aittomäki K., Dieguez J., Pakarinen P., Sistonen P., Tapanainen J., Gromoll J., Kaskikari K., Sankila E., Lehväislahti H., Engel A., Nieschlag E., Huhtaniemi I., y Albert de la Chapelle. (1995). Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor Gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*. 82, 959-968.
- Ajayi A. y Akhigbe R. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*. 6:5. doi: 10.1186/s40738-020-00074-3.
- Akasu T., Tsurusaki M. y Shoji S. (1996). Depletion of glucose causes presynaptic inhibition of neuronal transmission in the rat dorsolateral septal nucleus. *Synapse*. 24(2): 125-34.
- Albert D., Walsh M., Gorzalka B., Mendelson S. y Zalus C. (1986). Intermale social aggression: suppression by medial preoptic area lesions. *Physiology & behavior*. 38(2): 169-73.
- Amar A. y Weiss M. (2003). Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurgery Clinics of North America*. 14(1):11-23.

- **An J.**, Su Y., Radman T. y Bikson M. (2008). Effects of glucose and glutamine concentration in the formulation of the artificial cerebrospinal fluid (ACSF). *Brain Research*. 1218: 77-86.
- **Andersson H.**, Rehm S., Stanislaus D. y Wood C. (2013). Scientific and regulatory policy committee (SRPC) paper: assessment of circulating hormones in nonclinical toxicity studies III. female reproductive hormones. *Toxicologic Pathology* (6):921-34.
- **Angelopoulou E.**, Quignon C., Kriegsfeld L. y Simonneaux V. (2019). Functional implications of RFRP-3 in the central control of daily and seasonal rhythms in reproduction. *Frontiers in Endocrinology*. 10(183). doi: 10.3389/fendo.2019.00183.
- **Bakker J.**, Pierman S. y González-Martínez D. (2010). Effects of aromatase mutation (ArKO) on the sexual differentiation of kisspeptin neuronal numbers and their activation by same versus opposite sex urinary pheromones. *Hormones and behavior*. 57(4-5): 390-5.
- **Balsalobre Aurelio.** (2002). Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Research*. 309(1): 193-199.
- **Barraclough C.** y Gorski R. (1961). Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology*. 68:68-79.
- **Bartlewski P.**, Baby T. y Griffin J. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*. 124(3-4):259-68.
- **Belchetz P.**, Plant T., Nakai Y., Keogh E. y Knobil E. (1978). Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 202(4368): 631-633.
- **Bernardini R.**, Kamilaris T., Calogero A., Johnson E., Gomez M., Gold P., y Chrousos G. (1990). Interactions between tumor necrosis factor- $\alpha$ , hypothalamic corticotropin-releasing hormone, and adrenocorticotropin secretion in the rat. *Endocrinology*. 126(6): 2876–2881.
- **Berson D.**, Dunn F. y Takao M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 295(5557): 1070–1073.

- ✎ **Biran R.**, Martin D. y Tresco P. (2005). Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays. *Experimental Neurology*. 195(1): 115–126.
- ✎ **Bjorefeldt A.**, Andreasson U., Daborg J., Riebe I., Wasling P., Zetterberg H. y Hanse E. (2015). Human cerebrospinal fluid increases the excitability of pyramidal neurons in the in vitro brain slice. *The Journal of physiology*. 593(1): 231-43.
- ✎ **Blanchard R.** y Blanchard C. (1977). Aggressive behavior in the rat. *Behavioral Biology*, 21(2), 197–224.
- ✎ **Bola R.**, y Kiyatkin E. (2018). Inflow of oxygen and glucose in brain tissue induced by intravenous norepinephrine: relationships with central metabolic and peripheral vascular responses. *Journal of neurophysiology*. 119(2): 499–508.
- ✎ **Boscia F.**, Begum G., Pignataro G., Sirabella R., Cuomo O., Casamassa A., Sun D. y Annunziato L. (2016). Glial Na(+) -dependent ion transporters in pathophysiological conditions. *Glia*. 64(10):1677-97.
- ✎ **Boulant J.** (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 5:S157-61.
- ✎ **Breen K.** y Karsch F. (2006). New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Frontiers of Neuroendocrinology*. 27(2): 233-45.
- ✎ **Brown-Grant K.** y Raisman G. (1977). Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 198(1132): 279-96.
- ✎ **Canteras N.**, Simerly R. y Swanson LW. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *The Journal of comparative neurology*. 360(2):213-245.
- ✎ **Carrillo A.** y Sheridan P. (1980). Estrogen receptors in the medial basal hypothalamus of the rat following complete hypothalamic deafferentation. *Brain Research*. 186(1): 157-64.



- ✎ **Casillas F.**, Betancourt M., Juárez-Rojas L., Ducolomb Y., López A., Ávila-Quintero A., Zamora J., Ommati M. y Retana-Márquez S. (2021). Chronic stress detrimentally affects in vivo maturation in rat oocytes and oocyte viability at all phases of the estrous cycle. *Animals*. 11(9): 2478. <https://doi.org/10.3390/ani11092478>
- ✎ **Castañeyra-Ruíz L.**, González-Marrero I., Castañeyra-Ruíz A., González-Toledo J., Castañeyra-Ruíz M., Paz-Carmona H., Castañeyra-Perdomo A. y Carmona-Calero E. (2013). Luteinizing hormone-releasing hormone distribution in the anterior hypothalamus of the female rats, *ISRN anatomy*. 87021. DOI: [10.5402/2013/870721](https://doi.org/10.5402/2013/870721).
- ✎ **Castillo L.** (2022). Participación de los receptores dopaminérgicos D2 del área preóptica izquierda o derecha a las 9:00 horas del diestro-2 y proestro en la regulación de la ovulación. Tesis para obtener el grado de Licenciada en biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- ✎ **Chakraborty T.**, Hof P., Ng L. y Gore A. (2003). Stereologic analysis of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) expression in rat hypothalamus and its regulation by aging and estrogen. *The Journal of Comparative Neurology*. 466(3): 409–421.
- ✎ **Chappell P.**, Lee J. y Levine J. (2000). Stimulation of gonadotropin-releasing hormone surges by estrogen. II. Role of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate. *Endocrinology*. 141(4): 1486-92.
- ✎ **Chronwall B.** (1985). Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*, 6, 1–11.
- ✎ **Chrousos G.** (1995). The Hypothalamic–pituitary–adrenal axis and immune-mediated inflammation. *New England journal of medicine* 332(20): 1351–1363.
- ✎ **Chuon T.**, Feri M., Carlson C., Ondrejik S., Micevych P. y Sinchak K.(2022). Progesterone receptor-Src kinase signaling pathway mediates neuroprogesterone induction of the luteinizing hormone surge in female rats. *Journal of neuroendocrinology*. 34(1): e13071. doi: 10.1111/jne.13071.
- ✎ **Clarke I.**, Scott C., Pereira A. y Pompolo S. (2006). The role of noradrenaline in the generation of the preovulatory LH surge in the ewe. *Domestic Animal Endocrinology*. 30(4): 260–275.

- ✎ **Clarkson J.** y Herbison A. (2011). Dual phenotype kisspeptin-dopamine neurones of the rostral periventricular area of the third ventricle project to gonadotrophin-releasing hormone neurones. *Journal of Neuroendocrinology*. 23(4): 293–301.
- ✎ **Clarkson J.**, d'Anglemont de Tassigny X., Moreno A., Colledge W. y Herbison A. (2008). Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *Journal of Neuroscience*. 28(35): 8691-7.
- ✎ **Conn M.** y Crowley W. (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual review of medicine*. 45:391-405.
- ✎ **Contreras C.** (2022). Efecto del bloqueo unilateral de los receptores dopaminérgicos de la familia RDA-2 en el área preóptica durante estro o metaestro sobre la ovulación de la rata adulta. Tesis para obtener el grado de Licenciado en biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- ✎ **Coomans C.**, Ramkisoensing A. y Meijer J. (2015). The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Frontiers in Neuroendocrinology*: 37. 29–42.
- ✎ **Cox G.**, Cosgrove D., Haas M., Stiles W. y McIntosh D. (1997). MspI restriction fragment length polymorphism at the glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit locus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1354(1), 83–96.
- ✎ **Csabafi K.**, Jászberényi M., Bagosi Z., Lipták N. y Telegdy G. (2013). Effects of kisspeptin-13 on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thermoregulation, anxiety and locomotor activity in rats. *Behavioural brain research*. 241: 56-61.
- ✎ **Dada M.**, Campbell G., y Blake C. (1984). The localization of gonadotrophs in normal adult male and female rats. *Endocrinology*, 114(2): 397–406.
- ✎ **Daniel P.** (1976). Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. *Journal of clinical pathology*. 7: 1–7.
- ✎ **de Jong T.**, Beiderbeck D. y Neumann ID. (2014). Measuring virgin female aggression in the female intruder test (FIT): effects of oxytocin, estrous cycle, and anxiety. *PLoS One*. 9(3): e91701. doi: 10.1371/journal.pone.0091701.

- ✎ **de la Iglesia H.**, Meyer J. y Schwartz W. (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):7412-4.
- ✎ **de la Iglesia H.**, Blaustein J., y Bittman E. (2001). Oestrogen receptor- $\alpha$ -immunoreactive neurones project to the suprachiasmatic nucleus of the female syrian hamster. *Journal of Neuroendocrinology*. 11(7): 481–490.
- ✎ **DeBold J.** y Miczek KA. (1981). Sexual dimorphism in the hormonal control of aggressive behavior of rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 14(1): 89-93.
- ✎ **Dedes I.** (2012). Kisspeptins and the control of gonadotrophin secretion. *Systems biology in reproductive medicine*. 58(3): 121-8.
- ✎ **Deitmer J.**, Theparambil S., Ruminot I., Noor S. y Becker H. (2019). Energy dynamics in the brain: contributions of astrocytes to metabolism and pH homeostasis. *Frontiers in Neuroscience*. 13:1301. doi: 10.3389/fnins.2019.01301.
- ✎ **Delmas S.**, Porteous R., Bergin D. y Herbison A. (2018). Altered aspects of anxiety-related behavior in kisspeptin receptor-deleted male mice. *Scientific reports*. 8(1):2794. doi: 10.1038/s41598-018-21042-4.
- ✎ **Doi K.**, Kawano T., Morioka Y., Fujita Y. y Nishimura M. (2006). Various irrigation fluids affect postoperative brain edema and cellular damage during experimental neurosurgery in rats. *Surgical Neurology*. 66(6): 565-71.
- ✎ **Domínguez R.** y Smith, E. (1974). Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology*, 14(3-4): 212–223.
- ✎ **Domínguez R.**, Chavez R. y Cruz María E. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. Domínguez R (Ed). *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. Miguel Ángel Porrúa. Pp: 162-191
- ✎ **Domínguez R.**, Cruz-Morales E. (2011) The ovarian innervation participates in the regulation of ovarian functions. *Endocrinol Metabol Syndrome* S4:001. doi:10.4172/2161-1017.S4-001
- ✎ **Dorton A.** (2000). The pituitary gland: embryology, physiology and pathophysiology. *Neonatal network*. 19(2):9-17.

- ✎ **Dubois S.**, Acosta-Martínez M., DeJoseph M., Wolfe A., Radovick S., Boehm U., Urban J. y Levine J. (2015). Positive, but not negative feedback actions of estradiol in adult female mice require estrogen receptor  $\alpha$  in kisspeptin neurons. *Endocrinology*. 156(3): 1111-1120.
- ✎ **Ducret E.**, Gaidamaka G. y Herbison A. (2010). Electrical and morphological characteristics of anteroventral periventricular nucleus kisspeptin and other neurons in the female mouse. *Endocrinology*. 151(5): 2223-2232.
- ✎ **Duffy D.**, Ko C., Jo M., Brannstrom M. y Curry Jr. T. (2018). Ovulation: parallels with inflammatory processes. *Endocrine reviews*. 40(2), 369-416.
- ✎ **Edwards D.**, Nahai F., Wright P. (1993). Pathways linking the olfactory bulbs with the medial preoptic anterior hypothalamus are important for intermale aggression in mice. *Physiology & behavior*. 53(3): 611-5.
- ✎ **Enomoto R.**, Tatsuoka H., Komai T., Sugahara C., Takemura K., Yamauchi A., Nishimura M., Naito S., Matsuda T. y Lee E. (2004). Involvement of histone phosphorylation in apoptosis of human astrocytes after exposure to saline solution. *Neurochemistry International*. 44(6): 459-67.
- ✎ **Evans J.** y Tulloch S. (1995). Effects of administration of oxytocin in association with gonadotropin-releasing hormone on luteinizing hormone levels in rats in vivo. *Peptides*. 16(1): 145-50.
- ✎ **Everett J.** y Sawyer C. (1950). A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*. 47(3):198-218.
- ✎ **Findlay J.** (1993). An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biology of reproduction*. 48(1):15-23.
- ✎ **Findlay K.** y Drummond E. (1999). Regulation of the FSH receptor in the ovary. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 10(5): 183–188.
- ✎ **Flanagan A.** y Manilall A. (2017). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor structure and GnRH binding. *Frontiers of Endocrinology*. 24(8): 274.
- ✎ **Flores A.**, Gallegos A., Velasco J., Mendoza F., Montiel C., Everardo P., Cruz M. y Domínguez R. (2008). The acute effects of bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, testosterone and estradiol serum levels depend on the surgical approach

and the day of the estrous cycle when they are performed. *Reproductive biology and endocrinology*. RB&E. 6:48. doi: 10.1186/1477-7827-6-48.

- ✎ **Freedman M.**, Lucas R., Soni B., von Schantz M., Muñoz M., David-Gray Z., y Foster R. (1999). Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*. 284(5413):502-4.
- ✎ **Friedman A.** y Levinson A. (1955). Cerebrospinal fluid inorganic phosphorus in normal and pathologic conditions. *Archives of neurology and psychiatry*. 74(4): 424.
- ✎ **Gammie S.** y Nelson R. (1999). Maternal aggression is reduced in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Journal of Neuroscience*. 19(18): 8027-35.
- ✎ **Giordano A.**, Siegel H. y Rosenblatt, J. (1986). Intrasexual aggression during pregnancy and the estrous cycle in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Aggressive Behavior*. 12(3): 213–222.
- ✎ **Gottsch M.**, Cunningham M., Smith J., Popa S., Acohido B., Crowley W., Seminara S., Clifton D. y Steiner R. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 145(9): 4073-7.
- ✎ **Gray G.**, Söderstein P., Tallentire D. y Davidson J. (1978). Effects of lesions in various structures of the suprachiasmatic-preoptic region on LH regulation and sexual behavior in female rats. *Neuroendocrinology*. 25(3): 174-91.
- ✎ **Griffin J.**, Emery B., Huang I., Peterson C. y Carrell D. (2006). Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig and human). *Journal of experimental & clinical assisted reproduction*. 3:2.
- ✎ **Griffin J.**, Kaple M., Chow A. y Boulant J. (1996). Cellular mechanisms for neuronal thermosensitivity in the rat hypothalamus. *The journal of physiology*. 492(Pt 1): 231–242.
- ✎ **Gu G.**, Varoqueaux F. y Simerly R. (1999). Hormonal regulation of glutamate receptor gene expression in the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroscience*. 19(8): 3213-3222.
- ✎ **Gupta S.** (2018). The human egg's zona pellucida. *Current topics in developmental biology*. 130: 379-411.

- ✎ **Haller J.** (2018). The role of central and medial amygdala in normal and abnormal aggression: A review of classical approaches. *Neuroscience and biobehavioral review*. 85:34-43.
- ✎ **Han S., Gottsch M., Lee K., Popa S., Smith J., Jakawich S., Clifton D., Steiner R. y Herbison A.** (2005). Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *The Journal of Neuroscience*. 25(49): 11349-56.
- ✎ **Hardy DF.** (1972). Sexual behavior in continuously cycling rats. *Behaviour* 41(3): 288-297.
- ✎ **Herbison A., y Theodosis T.** (1992). Localization of oestrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat. *Neuroscience*. 50(2): 283–298.
- ✎ **Herbison A.** (2008). Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: The case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V). *Brain research reviews*. 277-287. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.05.006
- ✎ **Herbison A.** (2015). Physiology of the adult gonadotropin-releasing hormone neuronal network. En Plant TM, Zeleznik AJ (eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Vol. 1*. Academic Press. USA.
- ✎ **Herbison, A.** (2020). A simple model of estrous cycle negative and positive feedback regulation of GnRH secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 57, 100837. doi:10.1016/j.yfrne.2020.100837.
- ✎ **Higo S., Honda S., Iijima N. y Ozawa H.** (2016). Mapping of kisspeptin receptor mRNA in the whole rat brain and its co-localisation with oxytocin in the paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*. 28(4). doi: 10.1111/jne.12356.
- ✎ **Ho H., Olsson M., Westberg L., Melke J. y Eriksson E.** (2001). The serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces sex steroid-related aggression in female rats: an animal model of premenstrual irritability? *Neuropsychopharmacology*. 24(5): 502-10.

- ✎ **Holst J.**, Soldin O., Gul T. y Soldin S. (2004). Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory. *Clinics in laboratory medicine*. 24(1):105-18. doi: 10.1016/j.cll.2004.01.004.
- ✎ **Hong G.**, Payne S. y Jane Jr J. (2016). Anatomy, physiology, and laboratory evaluation of the pituitary gland. *Otolaryngologic clinics of North America*. 49(1):21-32.
- ✎ **Hu M.**, Li X., McCausland B., Li S., Gresham R., Kinsey-Jones J., Gardiner J., Sam A., Bloom S., Poston L., Lightman S., Murphy K. y O'Byrne K. (2015). Relative importance of the arcuate and anteroventral periventricular kisspeptin neurons in control of puberty and reproductive function in female rats. *Endocrinology*. 156(7): 2619-31.
- ✎ **Hummitzsch K.**, Irving-Rodgers H., Hatzirodos N., Bonner W., Sabatier, Reinhardt D., Sado Y., Ninomiya Y., Wilherm D. y Rodgers R. (2013). A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PloS one*. 8(2):e55578.
- ✎ **Hyde J.** y Sawyer, T. (1977). Estrous cycle fluctuations in aggressiveness of house mice. *Hormones and Behavior*. 9(3): 290–295.
- ✎ **Ibos K.**, Bodnár É., Bagoši Z., Bozsó Z., Tóth G., Szabó G. y Csabafi K. (2021). Kisspeptin-8 induces anxiety-like behavior and hypolocomotion by activating the hpa axis and increasing GABA release in the nucleus accumbens in rats. *Biomedicines*. 9(2):112. doi: 10.3390/biomedicines9020112.
- ✎ **Imura H.**, Fukata J., y Mori T. (1991). Cytokines and endocrine function: an interaction between the immune and neuroendocrine systems. *Clinical Endocrinology*. 35(2): 107–115.
- ✎ **Inouye S.**, Kawamura H.. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic “island” containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76(11), 5962-5966.
- ✎ **Jalalvand E.**, Robertson B., Tostivint H., Löw P., Wallén P. y Grillner S. (2018). Cerebrospinal fluid-contacting neurons sense pH changes and motion in the hypothalamus. *Journal of Neuroscience*. 38(35): 7713-7724.

- ✎ **Jamieson B.**, Bouwer G., Campbell R. y Piet R. (2021). Estrous cycle plasticity in the central clock output to kisspeptin neurons: implications for the preovulatory surge. *Endocrinology*. 162(6): bqab071. doi: 10.1210/endocr/bqab071.
- ✎ **Jamnongjit M.** y Hammes S. (2006). Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell cycle*. 5(11):1178-83. doi: 10.4161/cc.5.11.2803.
- ✎ **Jayasena C.**, Comninou A., Stefanopoulou E., Buckley A., Narayanaswamy S., Izzi-Engbeaya C., Abbara A., Ratnasabapathy R., Mogford J., Ng N., Sarang Z., Ghatei A., Bloom R., Hunter S. y Dhillon W. (2015). Neurokinin B administration induces hot flushes in women. *Science Report*. 16;5:8466. doi: 10.1038/srep08466.
- ✎ **Hilliard J.** (1973). Corpus luteum function in guinea pigs, hamsters, rats, mice and rabbits. *Biology of reproduction*. (8): 203-221.
- ✎ **Joly-Amado A.**, Cansell C., Denis R., Delbes A., Castel J., Martinez S., y Luquet S. (2014). The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 28(5): 725–737.
- ✎ **Kalantaridou S.**, Makrigiannakis A., Zoumakis E. y Chrousos G. (2004). Stress and the female reproductive system. *Journal of reproductive immunology*. 62(1-2): 61-8.
- ✎ **Kalsbeek A.**, Palm I., La Fleur S., Scheer F., Perreau-Lenz S., Ruiters M., Kreier F., Cailotto C. y Buijs R. (2006). SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *Journal of Biological Rhythms*, 21(6): 458–469.
- ✎ **Kalsbeek A.**, Perreau-Lenz S. y Buijs RM. (2006). A network of (autonomic) clock outputs. *Chronobiology international*. 23(3): 521-535.
- ✎ **Kendall S.**, Samuelson L., Saunders T., Wood R., y Camper S. (1995). Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone  $\alpha$ -subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. *Genes and development*. 9(16): 2007-2019.
- ✎ **Kirby E.**, Geraghty A., Ubuka T., Bentley G. y Kaufman D. (2009). Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(27): 11324-11329.



- ✎ **Kirchner** A., Velísková J. y Velíšek L. (2006). Differential effects of low glucose concentrations on seizures and epileptiform activity in vivo and in vitro. *The European journal of neuroscience*. 23(6): 1512-1522.
- ✎ **Kirilov** M., Clarkson J., Liu X., Roa J., Campos P., Porteous R., Schütz G. y Herbison A. (2013). Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron. *Nature communications*. 4:2492.
- ✎ **Klsbeek** A., Tecler-Mesbah R. y Pevet P. (1993). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Comparative Neurology*. 332(3): 293-314.
- ✎ **Ko** C. y Takahashi J. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics*. 15(2), 271-277.
- ✎ **Kotani** M., Detheux M., Vandenberghe A., Communi D., Vanderwinden J., Le Poul E., Brézillon S., Tyldesley R., Suarez-Huerta N., Vandeput F., Blanpain C., Schiffmann S., Vassart G. y Parmentier M. (2001). The metastasis suppressor gene *KiSS-1* encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *The Journal of biological chemistry*. 276(37): 34631-34636.
- ✎ **Kozai** T., Jaquins-Gerstl A., Vazquez A., Michael A., Cui X. (2015). Brain tissue responses to neural implants impact signal sensitivity and intervention strategies. *ACS chemical neuroscience*. 6(1): 48-67.
- ✎ **Kozai** T., Vazquez A., Weaver C., Kim S. y Cui XT. (2012). In vivo two-photon microscopy reveals immediate microglial reaction to implantation of microelectrode through extension of processes. *Journal of neural engineering*. 9(6):066001. doi: 10.1088/1741-2560/9/6/066001.
- ✎ **Kumar** A., Banerjee A., Singh D., Thakur G., Kasarpalkar N., Gavali S., Gadkar S., Madan T., Mahale S., Balasinar N. y Sachdeva G. (2018). Estradiol: a steroid with multiple facets. *Hormone and metabolic research*. 50(05): 359-374.
- ✎ **Kumar** T., Wang Y., Lu N. y Matzuk M. (1997). Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature publishing group*. (15)2, 201-204.

- ✎ **Kumar P** y Sait S. (2011). Luteinizing hormone and its dilemma in ovulation induction. *Journal of human reproductive sciences*. 4(1): 2-7.
- ✎ **Kurusu S.**, Suzuki K., Kazumi T., Taniguchi K., Yonezawua T. y Kawaminami M. (2009). Structural regression of the rat corpus luteum of pregnancy: relationship with functional regression, apoptotic cell death, and the suckling stimulus. *Zoological science*. (10):729-34.
- ✎ **Langub M.**, Maley B. y Watson R. (1994). Estrous cycle-associated axosomatic synaptic plasticity upon estrogen receptive neurons in the rat preoptic area. *Brain Research*. 641(2): 303–310.
- ✎ **Le W.**, Berghorn K., Rassnick S. y Hoffman G. (1999). Periventricular preoptic area neurons coactivated with luteinizing hormone (LH)-releasing hormone (LHRH) neurons at the time of the LH surge are LHRH afferents. *Endocrinology*. 140(1): 510-9.
- ✎ **Lee D.**, Nguyen T., O'Neill G., Cheng R., Liu Y., Howard A., Coulombe N., Tan C., Tang-Nguyen A., George S. y O'Dowd B. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS letters*. 446(1): 103-7.
- ✎ **Lee J.**, Miele M., Hicks D., Phillips K., Trent J., Weissman B. y Welch D. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute*. 88(23):1731-7.
- ✎ **Levine J.** (2015). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En Knobil and Neill's *Physiology of reproduction* Vol 2. Academic Press. USA.
- ✎ **Liddelow S.**, Dziegielewska K., Ek C., Habgood M., Bauer H., Bauer H., Lindsay H., Wakefield M., Strazielle N., Kratzer I., Møllgård K., Ghersi-Egea J. y Saunders N. (2013). Mechanisms that determine the internal environment of the developing brain: a transcriptomic, functional and ultrastructural approach. *PLoS One*. 8(7):e65629. doi: 10.1371/journal.pone.0065629.
- ✎ **Lin Y.**, Li X., Shao B., Hu M., Goundry A., Jeyaram A., Lightman S. y O'Byrne KT. (2012). The role of GABAergic signalling in stress-induced suppression of gonadotrophin-releasing hormone pulse generator frequency in female rats. *Journal of Neuroendocrinology*. (3): 477-88.

- ✎ **Lin X.**, Lass G., Kong L., Wang H., Li X., Huang H. y O'Byrne KT. (2021). Optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates a luteinizing hormone surge-like secretion in an estradiol-dependent manner. *Frontiers in Endocrinology*. 12:775233. doi: 10.3389/fendo.2021.775233.
- ✎ **Liu X.**, Porteous R., d'Anglemont de Tassigny X., Colledge W., Millar R., Petersen S. y Herbison A. (2011). Frequency-dependent recruitment of fast amino acid and slow neuropeptide neurotransmitter release controls gonadotropin-releasing hormone neuron excitability. *Journal of Neuroscience*. 31(7): 2421-2430.
- ✎ **Liu X** y Herbison A. (2011). Estrous cycle- and sex-dependent changes in pre- and postsynaptic GABAB control of GnRH neuron excitability. *Endocrinology*. 152(12): 4856-64.
- ✎ **Liu X.** y Herbison A. (2013). Dopamine regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in male and female mice. *Endocrinology*. 154(1): 340-50.
- ✎ **Lonstein J.** y Gammie S. (2002). Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 26(8): 869–888.
- ✎ **Lovick T.** (2012). Estrous cycle and stress: influence of progesterone on the female brain. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 45(4): 314–320.
- ✎ **Ma Y.**, Kelly M. y Rönnekleiv O. (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): 2654-64.
- ✎ **Maeda K.**, y Tsukamura H. (2006). The Impact of stress on reproduction: are glucocorticoids inhibitory or protective to gonadotropin secretion? *Endocrinology*. 147(3): 1085–1086.
- ✎ **Maggi R.**, Cariboni A., Marelli M., Moretti R., André V., Marzagalli M. y Limonta P. (2016). GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Human reproduction update*. 22(3): 358-81.

- ✎ **Marcus G.** (1974). Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biology of reproduction*. 10(4): 447-52.
- ✎ **Mariani G.** y Bellver J. (2018). Proteomics and metabolomics studies and clinical outcomes en Horcajadas J y Gosálvez J. *Reproductomics*. 1st Ed. pp, 147-170.
- ✎ **Mayer C.**, Acosta-Martinez M., Dubois S., Wolfe A., Radovick S., Boehm U. y Levine J. (2010). Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(52): 22693-22698.
- ✎ **McGee E.** y Hush A. (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.
- ✎ **Melchior L.**, Ho H., Olsson M., Annerbrink K., Hedner J. y Eriksson E. (2004). Association between estrus cycle-related aggression and tidal volume variability in female Wistar rats. *Psychoneuroendocrinology*. 29(8): 1097-100.
- ✎ **Mergenthaler P.**, Lindauer U., Dienel G., y Meisel A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences*. 36(10). 587–597.
- ✎ **Micevych P.** y Sinchak K. (2011). The neurosteroid progesterone underlies estrogen positive feedback of the LH surge. *Frontiers of Endocrinology*. 2;2:90. doi: 10.3389/fendo.2011.00090.
- ✎ **Miller W.** (2017). Steroidogenesis: unanswered questions. *Trends in endocrinology and metabolism*. 28(11):771-793.
- ✎ **Millington W.** (2007). The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutrition and Metabolism*. 4:18.
- ✎ **Mills E.**, Yang L., Abbara A., Dhillo W. y Comninou A. (2022). Current perspectives on kisspeptins role in behaviour. *Frontiers in Endocrinology*. 13:928143. doi: 10.3389/fendo.2022.928143.

- ✎ **Miyajima M.**, Shimoji K., Watanabe M., Nakajima M., Ogino I. y Arai H. (2012). Role of artificial cerebrospinal fluid as perfusate in neuroendoscopic surgery: a basic investigation. *Acta Neurochirurgica Supplement*. 113: 103-107.
- ✎ **Moga M.** y Moore R. (1997). Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *The journal of comparative neurology*. 389: 508-534.
- ✎ **Moore R.** y Card P. (1985). Visual pathways and the entrainment of circadian rhythms. *Annals of the New York academy of sciences*. 453: 123-133.
- ✎ **Moore R.** y Eichler B. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain research*. 42 (1), 201-206.
- ✎ **Mori K.**, Yamamoto T., Miyazaki M., Hara Y., Koike N., y Nakao Y. (2013). Potential risk of artificial cerebrospinal fluid solution without magnesium ion for cerebral irrigation and perfusion in neurosurgical practice. *Neurologia medico-chirurgica*. 53(9): 596–600.
- ✎ **Munley K.**, Rendon N. y Demas G. (2018). Neural androgen synthesis and aggression: insights from a seasonally breeding rodent. *Frontiers in Endocrinology*, 9. doi:10.3389/fendo.2018.00136.
- ✎ **Naitoh Y.**, Fukata J., Tominaga T., Nakai Y., Tamai S., Mori K. y Imura H. (1988). Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 155(3): 1459-63.
- ✎ **Narayan E.**, y Parisella S. (2017). Influences of the stress endocrine system on the reproductive endocrine axis in sheep (*Ovis aries*). *Italian Journal of Animal Science*. 16(4): 640–651.
- ✎ **Navarro V.**, Castellano J., Fernández-Fernández R., Tovar S., Roa J., Mayen A., Nogueiras R., Vazquez M., Barreiro M., Magni P., Aguilar E., Dieguez C., Pinilla L. y Tena-Sempere M. (2005). Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology*. 146(1):156-63.
- ✎ **Nedresky D.**, Singh G. Physiology, luteinizing hormone. 2022 Sep 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30969514.

- **Nequin L.**, Alvarez J. y Campbell C. (1975). Alterations in steroid and gonadotropin release resulting from surgical stress during the morning of proestrus in 5-day cyclic rats. *Endocrinology*. 97(3): 718–724.
- **Neuman-Lee L.**, Greives T., Hopkins G. y French S. (2017). The role of the kisspeptin system in regulation of the reproductive endocrine axis and territorial behavior in male side-blotched lizards (*Uta stansburiana*). *Hormones and Behavior*. 89:48-54.
- **Nguyen T.**, Lee S., Hatzirodos N., Hummitzsch K., Sullivan T., Rodgers R., e Irving-Rodgers H. (2012). Spatial differences within the membrana granulosa in the expression of focimatrix and steroidogenic capacity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 363(1-2), 62–73.
- **Nolta N.**, Christensen M., Crane P., Skousen J. y Tresco, P. (2015). BBB leakage, astrogliosis, and tissue loss correlate with silicon microelectrode array recording performance. *Biomaterials* 53: 753–762.
- **Novaira H.**, Sonko M., Hoffman G., Koo Y., Ko C., Wolfe A. y Radovick S. (2014). Disrupted kisspeptin signaling in GnRH neurons leads to hypogonadotrophic hypogonadism. *Mol Endocrinology*. 28(2): 225-38.
- **Oktem O.** y Oktay K. (2008). The ovary, anatomy and function throughout human life en Bulletti C, Guller S, De Ziegler D y Lockwood C. *Assessment of Human Reproductive Function*. Ed 1, Vol, 1127, pp. 1-9. *Annals of the New York academy of sciences*.
- **Oliveira V.** y Bakker J. (2022). Neuroendocrine regulation of female aggression. *Frontiers in Endocrinology*. 13: 957114. doi: 10.3389/fendo.2022.957114.
- **Olvera-Juárez E.**, Silva CC., Flores A., Arrieta-Cruz I., Mendoza-Garcés L., Martínez-Coria H., López-Valdés H., Cárdenas M., Domínguez R., Gutiérrez-Juárez R. y Cruz M. (2020). The content of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), kisspeptin, and estrogen receptors (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ) in the anteromedial hypothalamus displays daily variations throughout the rat estrous cycle. *Cell Tissue Research*. 381(3): 451-460.
- **Orisaka M.**, Miyazaki Y., Shirafuji A., Tamamura C., Tsuyoshi H., Tsang B., y Yoshida Y. (2021). The role of pituitary gonadotropins and intraovarian regulators in

follicle development: A mini-review. *Reproductive Medicine and Biology*, 20(2), 169–175.

- **Ortmann O.**, Weiss J. y Diedrich K. (2002). Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action. *Reproductive biomedicine online*. 1:1-7.
- **Ottem E.**, Godwin J., Krishnan S. y Petersen S. (2004). Dual-phenotype GABA/glutamate neurons in adult preoptic area: sexual dimorphism and function. *Journal of Neuroscience*. 24(37): 8097-105.
- **Oyola M.** y Handa R. (2017) Hypothalamic–pituitary–adrenal and hypothalamic–pituitary–gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity, *Stress*, 20(5):476-494.
- **Ozawa H.** (2021). Kisspeptin neurons as an integration center of reproductive regulation: Observation of reproductive function based on a new concept of reproductive regulatory nervous system. *Reproductive medicine and biology*. 21(1): e12419. doi: 10.1002/rmb2.12419.
- **Palmon A.**, Aroya B., Tel-Or S., Burstein Y., Fridkin M. y Koch Y. (1994). The gene for the neuropeptide gonadotropin-releasing hormone is expressed in the mammary gland of lactating rats.
- **Paul S.** y Purdy R. (1992). Neuroactive steroids. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 6(6): 2311-22. PMID: 1347506.
- **Paxinos G.** y Watson C. (2014). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 7a edición. Academic
- **Perlstein R.**, Whitnall M., Abrams J., Mougey E. y Neta R. (1993). Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. *Endocrinology*. 132(3): 946–952.
- **Peters H.** (1969), The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta endocrinológica*. 6(11), 98-116.

- **Phelps C.**, Krieg R. y Sawyer C. (1976). Spontaneous and electrochemically stimulated changes in plasma LH in the female rat following hypothalamic deafferentation. *Brain Research*. 101(2): 239-249.
- **Phoophitphong D.**, Srisuwatanasagul S. y Tummaruk P. (2017). Immunohistochemical Localization of Luteinizing Hormone Receptor in the Cyclic Gilt Ovary. *Anatomia, histologia, embryologia*. (1): 94-100.
- **Picut C.**, Dixon D., Simons M., Stump D., Parker G., Remick A. (2015). Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxic Pathology*. 43(3): 343–353.
- **Pierce B.**, Stackpole C., Breen K., Clarke I., Karsch F., Rivalland E., Turner A., Caddy D., Wagenmaker E., Oakley A. y Tilbrook A. (2009). Estradiol enables cortisol to act directly upon the pituitary to suppress pituitary responsiveness to GnRH in sheep. *Neuroendocrinology*. 89(1): 86-97.
- **Pierce J.**, y Parsons T. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*. 50(1), 465–495.
- **Piet R.**, Boehm U. y Herbison A. (2013). Estrous cycle plasticity in the hyperpolarization-activated current ih is mediated by circulating 17 $\beta$ -estradiol in preoptic area kisspeptin neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 33(26): 10828–10839.
- **Piet R.**, Dunckley H., Lee K. y Herbison A. (2016). Vasoactive intestinal peptide excites GnRH neurons in male and female mice. *Endocrinology*. 157(9): 3621-3630.
- **Piet R.**, Kalil B., McLennan T., Porteous R., Czieselsky K. y Herbison AE. (2018). Dominant neuropeptide cotransmission in kisspeptin-GABA regulation of GnRH neuron firing driving ovulation. *Journal of Neuroscience*. 38(28): 6310-6322.
- **Piggins H.** (2003). The roles of vasoactive intestinal polypeptide in the mammalian circadian clock. *Journal of Endocrinology*, 177(1), 7–15.
- **Ping L.**, Mahesh V., Bhat G. y Brann D. (1997). Regulation of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by AMPA receptors. Evidence for a physiological role of AMPA receptors in the steroid-induced luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology*. 66(4): 246-253.



- ✎ **Putteeraj M.**, Soga T., Ubuka T., Parhar S. (2016). A "timed" Kiss is essential for reproduction: lessons from mammalian studies. *Frontiers of Endocrinology*. 7:121. doi: 10.3389/fendo.2016.00121.
- ✎ **Qiu J.**, Nestor C., Zhang C., Padilla S., Palmiter R., Kelly M. y Rønnekleiv O. (2016). High-frequency stimulation-induced peptide release synchronizes arcuate kisspeptin neurons and excites GnRH neurons. *Elife*. 5:e16246. doi: 10.7554/eLife.16246.
- ✎ **Quadros P.**, Pfau J., Goldstein A., De Vries G. y Wagner C. (2002). Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology*. 143(10): 3727-39.
- ✎ **Rajkovic A.**, Pangas S. y Matzuk M. (2006). Follicular development: mouse, sheep and, human models. Plant T, Pfaff D, Challis J, Kretser D, Richards J, Wassarman P, (Eds.). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Elsevier. Londres Inglaterra. Pp, 383-423.
- ✎ **Reghunandan V.**, Reghunandan R. (2006), Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Circadian Rhythms*. 4(2).
- ✎ **Reiser G.** Löffler F., Hamprecht B. (1983). Tetrodotoxin-sensitive ion channels characterized in glial and neuronal cells from rat brain. *Brain Research*. 261(2): 335-40.
- ✎ **Roa J.**, Herbison A. (2012). Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology*. 153(11): 5587-99.
- ✎ **Robker R.**, Hennebold J. y Russell D. (2018). Coordination of ovulation and oocyte maturation: a good egg at the right time. *Endocrinology*. 159(9): 3209-3218.
- ✎ **Rodgers R.** e Irving-Rodgers H. (2010). Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Journal of reproduction and fertility*. 139(2): 309-318.
- ✎ **Romero I.** (2022). La participación de los receptores dopaminérgicos de la familia RDA-2 del área preóptica en la regulación de la ovulación de la rata adulta. Tesis para obtener el grado de Licenciada en biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

- ✎ **Romijn H.**, Sluiter A., Pool C., Wortel J. y Buijs R. (1997). Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between avp-, somatostatin-, vip/phi-, grp- and vip/phi/grp-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*. 9(12): 2613–2623.
- ✎ **Rosbash M.** (1995). Molecular control of circadian rhythms. *Current Opinion in Genetics & Development*. 5(5): 662–668.
- ✎ **Sarraj M.** y Dummond A. (2012). Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. *Reproduction*. 143(2): 151-63.
- ✎ **Schally A.**, Arimura A., Baba Y., Nair R., Matsuo H., Redding T., Debeljuk L. (1971). Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochemical and biophysical research communications*. 43(2): 393-9.
- ✎ **Schweinfurth M.** (2020). The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Elife*. 9:e54020. doi: 10.7554/eLife.54020.
- ✎ **Sengupta A.**, Chakrabarti N., Sridaran R. (2008). Presence of immunoreactive gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its receptor (GnRHR) in rat ovary during pregnancy. *Molecular reproduction and development*. 75(6): 1031–1044.
- ✎ **Sharon A.**, Jankowski M., Shmoel N., Erez H. y Spira M. (2021). Inflammatory foreign body response induced by neuro-implants in rat cortices depleted of resident microglia by a csf1r inhibitor and its implications. *Frontiers of neuroscience*. 15:646914. doi: 10.3389/fnins.2021.646914.
- ✎ **Shen X.**, Liu Y., Li X., Long H., Wang L., Lyu Q., Kuang Y. y O'Byrne KT. (2022). Optogenetic stimulation of Kiss1<sup>ARC</sup> terminals in the AVPV induces surge-like luteinizing hormone secretion *via* glutamate release in mice. *Frontiers in endocrinology*. 13:1036235. doi: 10.3389/fendo.2022.1036235.
- ✎ **Silva C.** (2021). Participación del núcleo supraquiasmático en la regulación de la ovulación en días diferentes al proestro. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- ✎ **Silva C.**, Bolaños-Hurtado M., Juárez-Tapia C., Flores A., Arrieta-Cruz I., Cruz M. y Domínguez R. (2020a). Unraveling the role of discrete areas of the rat brain in the

regulation of ovulation through reversible inactivation by tetrodotoxin microinjections. *Journal of visualized experiments*. (163). doi: 10.3791/61493.8

- ✎ **Silva C.**, Cortés G., Javier C., Flores A. y Domínguez R. (2020b) A neural circadian signal essential for ovulation is generated in the suprachiasmatic nucleus during each stage of the oestrous cycle. *Experimental Physiology*. (2): 258-269.
- ✎ **Silva C.** y Domínguez R. (2019). Clock control of mammalian reproductive cycles: Looking beyond the pre-ovulatory surge of gonadotropins. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 21(1): 149-163.
- ✎ **Silver R.**, LeSauter J., Tresco P. y Lehman M. (1996). A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature*. 382(6594): 810–813.
- ✎ **Simerly R.** (2014) Organization of the hypothalamus. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system*, 4th edn. Academic, San Diego, 267-294.
- ✎ **Simerly R.** y Swanson L. (1988). Projections of the medial pre optic nucleus a phaselous vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *The journal of comparative neurology*. 270(2): 209-42.
- ✎ **Simerly R.**, Chang C., Muramatsu M. y Swanson L. (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*. 294(1): 76-95.
- ✎ **Simerly R.**, Gorsky R. y Swanson W. (1986). Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: An immunohistochemical study in the rat. *The journal of comparative neurology*. 246(3): 343-363.
- ✎ **Simerly R.**, Swanson L. y Gorski R. (1984). Demonstration of a sexual dimorphism in the distribution of serotonin-immunoreactive fibers in the medial preoptic nucleus of the rat. *The journal of comparative neurology*. 225(2): 151-66.
- ✎ **Simerly R.**, Zee M., Pendleton J., Lubahn D. y Korach K. (1997). Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (25): 14077-82.

- ✎ **Simonian S.**, Spratt D. y Herbison A. (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): 346-58.
- ✎ **Sinchak K.**, Mohr M. y Micevych P. (2020). Hypothalamic astrocyte development and physiology for neuroprogesterone induction of the luteinizing hormone surge. *Frontiers in endocrinology*. 11:420. doi: 10.3389/fendo.2020.00420.
- ✎ **Smarr B.**, Morris E. y de la Iglesia H. (2012). The dorsomedial suprachiasmatic nucleus times circadian expression of *Kiss1* and the luteinizing hormone surge. *Endocrinology*. 153(6): 2839–2850.
- ✎ **Smith J.**, Clifton D. y Steiner R. (2006). Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction*. 131(4): 623-630.
- ✎ **Smith J.**, Cunningham M., Rissman E., Clifton D. y Steiner R. (2005). Regulation of *Kiss1* gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 146(9): 3686-92.
- ✎ **Smith J.**, Popa S., Clifton D., Hoffman G. y Steiner R. (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.**, Freeman M., y Neill J. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 96(1): 219–226.
- ✎ **Smith M.**, Jiennes L. y Wise P. (2000). Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. *Endocrinology*. (11): 4317-20.
- ✎ **Smith P.**, Wilhelm D. y Rodgers R. (2014) Development of mammalian ovary. *Journal of neuroendocrinology*. 221(3): R145-61.
- ✎ **Sterkers O.**, Saumon G., Tran Ba Huy P. y Amiel C. (1982). K, Cl, and H<sub>2</sub>O entry in endolymph, perilymph, and cerebrospinal fluid of the rat. *The American journal of physiology*. 243(2): F173-80. doi: 10.1152/ajprenal.1982.243.2.F173.

- ✎ **Stevenson H.**, Bartram S., Charalambides M., Murthy S., Petitt T., Pradeep A., Vineall O., Abaraonye I., Lancaster A., Koysombat K., Patel B. y Abbara A. (2022). Kisspeptin-neuron control of LH pulsatility and ovulation. *Frontiers of endocrinology*. 13:951938.
- ✎ **Stincic T.**, Qiu J., Connors A., Kelly M. y Rønnekleiv O. (2021). Arcuate and preoptic kisspeptin neurons exhibit differential projections to hypothalamic nuclei and exert opposite postsynaptic effects on hypothalamic paraventricular and dorsomedial nuclei in the female mouse. *eNeuro*. 8(4): ENEURO.0093-21.2021. doi: 10.1523/ENEURO.0093-21.2021.
- ✎ **Sun L.**, Kosugi Y., Kawakami E., Piao Y., Hashimoto T. y Oyanagi K. (2009). Magnesium concentration in the cerebrospinal fluid of mice and its response to changes in serum magnesium concentration. *Magnesium Research*. 22(4): 266-72.
- ✎ **Takahashi A.**, y Miczek, K. A. (2014). Neurogenetics of aggressive behavior: studies in rodents. *Current topics in behavioral neurosciences*. 17. 3–44. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2013\\_263](https://doi.org/10.1007/7854_2013_263)
- ✎ **Takeo T.**, Chiba Y., Sakuma Y. (1993.) Suppression of the lordosis reflex of female rats by efferents of the medial preoptic area. *Physiological Behavior*. 53(5): 831-8.
- ✎ **Taraborrelli S.** (2015). Physiology, production and action of progesterone. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 94(161): 8-16. doi: 10.1111/aogs.12771.
- ✎ **Themmen A.** y Huhtaniemi I. (2000). Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrinology Reviews*. (5): 551-83.
- ✎ **Toufexis D.**, Rivarola M., Lara H. y Viau V. (2014). Stress and the Reproductive Axis. *Journal of neuroendocrinology*. 26(9): 573–586.
- ✎ **Tremblay C.**, Berret E., Henry M., Nehmé B., Nadeau L., Mougnot D. (2011). Neuronal sodium leak channel is responsible for the detection of sodium in the rat median preoptic nucleus. *Journal of Neurophysiology*. 105(2): 650-60.
- ✎ **Tsuneoka Y.** (2018). Molecular neuroanatomy of the mouse medial preoptic area with reference to parental behavior. *Anatomical science international*. 94(1): 39-52.

- ✎ **Uenoyama Y.**, Inoue N., Nakamura S. y Tsukamura H. (2021). Kisspeptin neurons and estrogen–estrogen receptor  $\alpha$  signaling: unraveling the mystery of steroid feedback system regulating mammalian reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(17): 9229.
- ✎ **Uenoyama Y.**, Tsukamura H. y Maeda K. (2009). Kisspeptin/Metastatin: a key molecule controlling two modes of gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone release in female rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 21(4): 299–304.
- ✎ **van den Pol A.** (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *The Journal of Comparative Neurology*. 191(4): 661–702.
- ✎ **van der Beek E.**, Horvath T., Wiegant V., Van den Hurk R. y Buijs R. (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): 569-79.
- ✎ **van der Beek E.**, van Oudheusden H., Buijs R., van der Donk H., van den Hurk R. y Wiegant V. (1994). Preferential induction of c-fos immunoreactivity in vasoactive intestinal polypeptide-innervated gonadotropin-releasing hormone neurons during a steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology*. 134(6): 2636-44.
- ✎ **van der Beek E.**, Wiegant V., van der Donk H., van den hunk R., Buijs R. (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 Duuren E.**, van der Plasse G., van der Blom R., Joosten RN., Mulder A., Pennartz C. y Feenstra M. (2007). Pharmacological manipulation of neuronal ensemble activity by reverse microdialysis in freely moving rats: a comparative study of the effects of tetrodotoxin, lidocaine, and muscimol. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 323(1): 61-9.
- ✎ **Vígh B.**, Manzano e Silva M., Frank C., Vincze C., Czirok S., Szabó A., Lukáts A. y Szél A. (2004). The system of cerebrospinal fluid-contacting neurons. Its supposed

role in the nonsynaptic signal transmission of the brain. *Histology and histopathology*. 19(2): 607-28.

- ✎ **Wakabayashi** Y., Nakada T., Murata K., Ohkura S., Mogi K., Navarro V., Clifton D., Mori Y., Tsukamura H., Maeda K., Steiner R. y Okamura H. (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *The Journal of Neuroscience*. 30(8): 3124-32.
- ✎ **Wang** L., Burger L., Greenwald-Yarnell M., Myers MG Jr. y Moenter S. (2018). Glutamatergic transmission to hypothalamic kisspeptin neurons is differentially regulated by estradiol through estrogen receptor  $\alpha$  in adult female mice. *Journal of Neuroscience*. 38(5): 1061-1072.
- ✎ **Wang** L., DeFazio R. y Moenter S. (2016). Excitability and burst generation of AVPV kisspeptin neurons are regulated by the estrous cycle via multiple conductances modulated by estradiol action. *eNeuro*. 3(3): ENEURO.0094-16.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0094-16.2016.
- ✎ **Watanabe** Y., Ikegami K., Ishigaki R., Ieda N., Uenoyama Y., Maeda K., Tsukamura H. y Inoue N. (2017). Enhancement of the luteinising hormone surge by male olfactory signals is associated with anteroventral periventricular Kiss1 cell activation in female rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 29(8). doi: 10.1111/jne.12505.
- ✎ **Weber** D. (1987). Functional differences between small and large luteal cells of the late- pregnant vs. nonpregnant cow. *Biology of Reproduction*. 37(3): 685–697.
- ✎ **Wei** Y., Li W., Meng X., Zhang L., Shen M. y Liu H. (2019). Corticosterone injection impairs follicular development, ovulation and steroidogenesis capacity in mice ovary. *Animals (Basel)*. 9(12):1047. doi: 10.3390/ani9121047.
- ✎ **Weidner** N., Dabbs D. y Peterson M. (2009). Ovaries en Weidner N, Suster S, Cote R y Weiss L. *Modern Surgical Pathology*. 2nd Ed. pp. 1356-1408.
- ✎ **Wellman** S., Li L., Yaxiaer Y., McNamara I. y Kozai T. (2019). Revealing spatial and temporal patterns of cell death, glial proliferation, and blood-brain barrier dysfunction around implanted intracortical neural interfaces. *Front Neurosci*. 13:493. doi: 10.3389/fnins.2019.00493.

- ✎ **Wiegand S.** y Teresawa E. (1982). Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology*. (6): 395-404.
- ✎ **Wiegand S.**, Teresawa E., Brdison W. y Goy R. (1980). Effects of discrete lesions of preoptic and suprachiasmatic structures in the female rat. *Neuroendocrinology*. 31(2): 147-57.
- ✎ **Wildt L.**, Häusler A., Marshall G., Hutchison J., Plant T., Belchetz P. y Knobil E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*. 109(2): 376-85.
- ✎ **Williams C.**, Nishihara M., Thalabard J., Grosser P., Hotchkiss J., y Knobil E. (1990). Corticotropin-Releasing factor and gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology*. 52(2): 133–137.
- ✎ **Williams W.** 3rd y Kriegsfeld L. (2012). Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology*. 3:60.
- ✎ **Wood G.**, Fata J., Watson K. y Khokha R. (2007). Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction*. 133(5): 1035-44.
- ✎ **Yeo S.** y Herbison A. (2011). Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology*. 152(6): 2387–2399.
- ✎ **Yip S.**, Boehm U., Herbison A. y Campbell R. (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): 2582-94.
- ✎ **Zhang C.**, Tonsfeldt K., Qiu J., Bosch M., Kobayashi K., Steiner R., Kelly M. y Rønnekleiv O. (2013). Molecular mechanisms that drive estradiol-dependent burst firing of Kiss1 neurons in the rostral periventricular preoptic area. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 305(11): E1384-97. doi: 10.1152/ajpendo.00406.2013.



- ✎ **Zhu Z.**, Zhao X., Huang F., Wang F., y Wang W. (2019). Vasopressin regulates hypothalamic GnRH synthesis: Histomorphological evidence in hypothalamus and biological effects in GT1-7 cells. *Life Sciences*. doi:10.1016/j.lfs.2019.04.055.
- ✎ **Zhuravin I.** y Bures J. Extent of the tetrodotoxin induced blockade examined by pupillary paralysis elicited by intracerebral injection of the drug. *Experimental Brain Research*. 83(3):687-90.