



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE LA CONCENTRACIÓN
HORMONAL (E2 Y P4) Y LA CITOLOGÍA VAGINAL EN EL CICLO
ESTRAL DEL JERBO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

MARÍA NAYELI ORTEGA VILLEGAS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA PILAR DURÁN HERNÁNDEZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA MARCELA ARTEAGA SILVA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, UAM I

DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CDMX.

JUNIO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL FOTOPERIODO SOBRE LA CONCENTRACIÓN
HORMONAL (E2 Y P4) Y LA CITOLOGÍA VAGINAL EN EL CICLO
ESTRAL DEL JERBO**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

MARÍA NAYELI ORTEGA VILLEGAS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA PILAR DURÁN HERNÁNDEZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA MARCELA ARTEAGA SILVA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, UAM I

DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, CDMX.

JUNIO, 2018

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/551/2018

ASUNTO: Oficio de Jurado

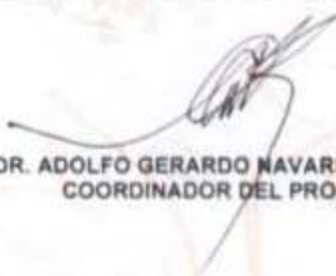
Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente.

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de abril de 2018 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno(a) **ORTEGA VILLEGAS MARÍA NAYELI** con número de cuenta **516011581** con la tesis titulada **"Efecto del fotoperiodo sobre la concentración hormonal (E2 y P4) y la citología vaginal en el ciclo estral del jerbo"**, realizada bajo la dirección del (la) **DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ**:

Presidente:	DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALA
Vocal:	DRA. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
Secretario:	DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
Suplente:	DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Suplente:	DRA. ELSA GUADALUPE ESCAMILLA CHIMAL

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 5 de junio de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por haberme dado la oportunidad de seguir con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 706408/585076 proporcionada.

Al apoyo económico PAEP para asistencia al 19th European congress of endocrinology.

A los miembros del comité tutor:

Dra. Pilar Durán

Dra. Marcela Arteaga Silva

Dr. René Cárdenas Vázquez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres María y Raúl, por ser un ejemplo para mí, por su apoyo incondicional, por respetar mis decisiones, por entenderme y apoyarme aun cuando tome malas decisiones. Gracias por transmitirme la curiosidad por saber, que ha sido parte importante en mi desarrollo profesional.

A Amalia y Luis, por haberme brindado más que hospedaje, por el apoyo incondicional durante esta etapa de mi vida. A Sebas y Mait por compartirme su hogar y a sus gatos, gracias Mait por alimentarme cuando a mí se me olvidaba.

A mi hermana Nectly, que compartía conmigo todo lo que en la vida significa estar en la maestría.

A mi hermano Raúl, por sacudirme, por las palabras frías que necesitaba para tomar una de las decisiones más difíciles de mi vida.

A todos los que compartieron noches de laboratorio conmigo, gracias por la compañía, por las porras y por despertarme cuando era necesario. Gracias Maggy y Dulce por los relevos que salvaron mi este trabajo.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, por todo lo que me enseñaron y apoyaron.

A la Dra. Pilar Durán por darme un espacio en su laboratorio, por el tiempo y las enseñanzas.

Al Biol. Martín por el apoyo técnico y personal, gracias por siempre estar ahí.

A Dany, por escuchar, por las porras y por el pacto de agua de coco, que nos seguirá el resto de nuestras vidas.

A mon Jan, por seguir siendo parte importante de mi vida.

Y finalmente a Victor Soto, por recordarme que la vida no se puede planear, que un segundo, la puede cambiar para siempre.

DEDICATORIA

A mis padres

*“Sólo hay un momento en el que puedes llegar a tiempo. Si no estás allí,
llegaste demasiado temprano o demasiado tarde.”*

J. Cruyff

INDICE

I. ANTECEDENTES.....	1
I.1. Ritmos biológicos	1
I.2. Regulación molecular del reloj circadiano.....	2
I.3. Fotoperiodo y fotoperiodismo	4
I.3.1 Fotoperiodismo reproductivo.....	5
I.5. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.....	6
I.5.1 Control del reloj molecular circadiano sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario	8
I.6.2. Ciclo estral	11
I.6.3. Ciclo estral y fotoperiodo.....	13
I.7. El Jerbo.....	14
I.7.1 Reproducción-ciclo estral.....	15
I.7.2 Fotoperiodismo reproductivo en Jerbo	15
I.7.3. Ritmos en jerbo.....	16
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
II. HIPÓTESIS	19
III. OBJETIVOS.....	19
III.1. General:	19
III.2. Específicos:.....	19
IV. MATERIAL Y MÉTODO.....	20
IV.1. Animales	20
IV.2. Monitoreo del ciclo estral	20
IV. 3. Medición de hormonas.....	21
IV.4. Análisis estadísticos.....	22
V. RESULTADOS	23
V.1 Determinación de la duración de fases estrales	23
V.2. Establecimiento de fases	29
V.3. Concentración plasmática de hormonas	32
VI. DISCUSION	35
VII. CONCLUSIONES.....	41
VIII. RESUMEN DE RESULTADOS.....	42
IX. ANEXOS	43
X. BIBLIOGRAFÍA.....	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización molecular del reloj en mamíferos.	3
Figura 2. Gráfica representando la longitud de la fotofase a lo largo del año en las diferentes latitudes Modificada de (Wilczek et al., 2010).	4
Figura 3. Representación de los eventos que ocurren durante el ciclo estral en roedores a nivel de hipotálamo, hipófisis y ovario, así como del desarrollo folicular y los cambios observados en el epitelio vaginal.	13
Figura 4. Representación de los tipos celulares encontrados en cada una de las fases del ciclo estral.	21
Figura 5. Gráfica en la que se muestra el porcentaje de ciclos de 3, 4, 5 y 6 o más días que en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10 y 16:8. N=24.	23
Figura 6. Gráfica en la que se compara la duración total del ciclo estral en hora en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10 y 16:8. * Presenta diferencias significativas, $H_3=3.11$, $p=0.37$. N=24.	26
Figura 7. Comparación de la duración de cada una de las fases del ciclo estral en horas, entre los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10 y 16:8. * Presenta diferencias significativas, $p < 0.05$ U de Mann Whitney. ° Valor atípico.	27
Figura 8. Representación gráfica del recambio de poblaciones celulares durante 15 días en la citología vaginal de Jerbo en ZT6 y ZT18.	28
Figura 9. Se muestra la comparación temporal del ZT de establecimiento para la fase de proestro del ciclo estral de jerbo en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10, 16:8.	29
Figura 10. Se muestra la comparación temporal del ZT de establecimiento para la fase de estro del ciclo estral de jerbo en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10, 16:8.	30
Figura 11. Se muestra la comparación temporal del ZT de establecimiento para la fase de metaestro del ciclo estral de jerbo en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10, 16:8.	31
Figura 12. Se muestra la comparación temporal del ZT de establecimiento para la fase de diestro del ciclo estral de jerbo en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10, 16:8.	32

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene.	24
Tabla 2. Comparación de la duración del ciclo estral de jerbo en horas (h), así como cada una de sus fases en diferentes fotoperiodos.	25
Tabla 3. Concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona en los ZT7 y ZT19 en las fases de acrofase y batifase para estradiol y progesterona de las jervas en los fotoperiodos 14:10, 8:16 y 16:8.....	33
Tabla 4. Resumen de resultados	42
Tabla 5. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene.....	43
Tabla 6. Valores de la prueba Kruskal Wallis que compara la concentración de estradiol y progesterona entre los diferentes fotoperiodos, fases y ZT.	45
Tabla 7. Valores de la prueba U de Mann Whitney que compara la concentración de estradiol entre las diferentes fases y ZT en un mismo fotoperiodo (Comparaciones intragrupo).	45
Tabla 8. Valores de la prueba U de Mann Withney que compara la concentración de progesterona entre las diferentes fases y ZT en un mismo fotoperiodo (Comparaciones intragrupo).	46
Tabla 9. Valores de la prueba U de Mann Whitney que compara la concentración de estradiol entre los fotoperiodos 8:16 y 16:8 con 14:10 en la misma fase y ZT (Comparaciones intergrupo).	48
Tabla 10. Valores de la prueba U de Mann Whitney que compara la concentración de estradiol entre los fotoperiodos 8:16 y 16:8 con 14:10 en la misma fase y ZT (Comparaciones intergrupo).	48

RESUMEN

El fotoperiodo, es uno de los mejores predictores de los cambios ambientales estacionales y es utilizado por los seres vivos para sincronizar su fisiología y comportamiento con estos.

El jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*), es un modelo de laboratorio no tradicional, cuyo estado reproductivo responde al fotoperiodo. Su ciclo estral ha sido descrito solamente bajo fotoperiodo L/O 12:12 y ha sido reportado como irregular. En el presente trabajo, los jerbos se expusieron a los fotoperiodos 12:12, 14:10, 8:16 (días cortos) y 16:8 (días largos) y se monitoreó el ciclo estral por medio de citología vaginal, cada cuatro horas por tres ciclos consecutivos; también se midieron las concentraciones plasmáticas de estradiol (E2) y progesterona (P4) por medio de la técnica ELISA en las fases del ciclo donde se ha reportado la acrofase y batifase de cada hormona en dos puntos temporales, uno durante la fase de luz y otro en la fase de oscuridad.

Nuestros resultados muestran que en los jerbos expuestos en fotoperiodo 14:10, el ciclo estral fue muy estable (4-5 días), mientras que en el resto de los fotoperiodos se mostró más inestable tanto en la duración total, como en cada una de sus fases. En el fotoperiodo de días cortos los días de diestro aumentaron, mientras que en días largos aumentaron los días tanto de diestro como de estro, esta última mostró diferencias en comparación con 14:10. Las fases de proestro y metaestro no mostraron diferencias bajo ninguna condición. También se observó un cambio de fase en el establecimiento del estro en los fotoperiodos tanto de días largos (ZT2), como en días cortos (ZT22), mientras que en 12:12 y 14:10 se mantuvo (ZT 6).

Con respecto a las hormonas se encontró un aumento de progesterona en la fase de diestro en el fotoperiodo de días cortos, lo que puede estar relacionado con el aumento de días de diestro y del ciclo bajo esta condición. En el caso del fotoperiodo de días largos se encontraron concentraciones de E2 y P4 normales, lo que sugiere una alteración a otro nivel que debe ser analizado en un futuro.

Palabras clave: Ciclo estral, fotoperiodo, estradiol, progesterona, *Meriones unguiculatus*.

ABSTRACT

One of the best predictors of environmental seasonal changes used by organisms to coordinate the timing of seasonally important changes in physiology and behaviour is the photoperiod.

The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*), is a non-traditional research model, in which reproductive state responds to photoperiod. Its estrous cycle has been described only under L/D 12:12 conditions and been reported as irregular. In this work, gerbils were exposed to 12:12, 14:10, 8:16 (short days) y 16:8 (long days) photoperiods and estrous cycle was monitored by vaginal smears every four hours in three consecutive cycles. Plasmatic estradiol (E2) and progesterone (P4) were measured by ELISA in the estral phases where the acrophase and batiphase of each one were expected, also in two different temporal points, one during light phase, and the other one during dark phase.

Under 14:10 photoperiod, estrous cycle showed high stability (4-5 days), meanwhile under the other photoperiod protocols the total and particular phase's length becomes instable or irregular. Under short days photoperiod, diestrous duration increases meanwhile under long days photoperiod diestrus and estrous increase. Estrous phase, when compared to 14:10 photoperiod show length differences. Proestrous and metaestrous did not show any differences under any lighting condition. It was noted that there was a phase shift on estrous settling, under short (ZT2) and long days photoperiods (ZT22), but was the same under 12:12 and 14:10 (ZT 6).

Regarding hormones, an increased level of progesterone at diestrous phase was found under short days photoperiod; this could be related to the increase of diestrous days and the total cycle under this lighting condition. Under long days photoperiod E2 and P4 levels were normal, this suggest an alteration in another level.

Keywords: Estrous cycle, photoperiod, estradiol, progesterone, *Meriones unguiculatus*

I. ANTECEDENTES

I.1. Ritmos biológicos

Los movimientos de rotación y translación de la Tierra, imponen fluctuaciones ambientales predecibles tanto diarias como anuales que han impactado en la evolución de los organismos, los cuales han desarrollado un mecanismo interno capaz de sincronizarse con estos cambios, anticiparlos y a partir de esto, exhibir una respuesta conductual, fisiológica o ambas, que sea la más adecuada en cierto punto temporal. Este mecanismo de reloj da origen a los ritmos biológicos, que pueden ser circadianos (que se repiten con un intervalo cercano a 24 horas), circanuales, (que se repiten aproximadamente cada 365 días), entre otros (Durán Hernández et al., 2013).

De acuerdo a esto, un ritmo biológico puede definirse como cualquier proceso dentro de un ser vivo que se repite a intervalos regulares de tiempo (Koukkari y Sothorn 2006). Los ritmos circadianos no son una respuesta directa al ambiente externo, sino que son generados por relojes endógenos que pueden mantenerse aun en la ausencia de señales ambientales. En los mamíferos, se ha definido que la estructura responsable del establecimiento de estos ritmos (también llamada “reloj maestro”) se encuentra en el Núcleo Supraquiasmático (NSQ). Este núcleo es una estructura bilateral ubicada en la zona ventral periventricular del hipotálamo anterior, dorsal al quiasma óptico y en proximidad al tercer ventrículo (Ralph *et al.*, 1990). En el ratón, cada lado está formado por un aproximado de 10,000 neuronas en dos subdivisiones anatómicas: una ventromedial diferenciada por su gran cantidad de neuronas productoras de polipeptido intestinal vasoactivo (VIP) y una dorsolateral con una mayoría de neuronas secretoras de arginina vasopresina (AVP) (Welsh *et al.*, 2010). Para sincronizarse con el ambiente externo, esta estructura debe reajustarse diariamente con la señal de luz; la cual, es percibida por las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles de la retina (ipRGC), cuyos axones liberan señales nerviosas a la parte ventromedial del NSQ,

principalmente glutamato, formando el tracto conocido como retino-hipotalámico (Hannibal, 2002).

La generación de los ritmos circadianos dentro del NSQ ocurre a nivel de sus células individuales, dentro de las cuales se desarrolla un asa de retroalimentación transcripcional que genera una oscilación de aproximadamente 24 horas, este mecanismo es conocido como reloj molecular y se da, como se mencionó anteriormente, sin la necesidad de la señal de luz por su naturaleza endógena. Estos osciladores circadianos celulares han sido descritos en prácticamente todos los tipos celulares los cuales son sincronizados directamente o no por el NSQ (Kenaway *et al.*, 2012).

Además de los ritmos circadianos, se ha descrito la importancia del NSQ en la generación de ritmos con periodos más prolongados; llamados infradianos, tales como el ciclo estral (Miller y Takahashi, 2014) y la reproducción estacional (Coomans *et al.*, 2015), que serán revisados más adelante.

I.2. Regulación molecular del reloj circadiano

Los genes reloj se refieren a aquellos cuyos productos proteínicos son necesarios para la generación y regulación de los ritmos (Fig. 1). El reloj molecular en los mamíferos se compone básicamente de tres genes *Period* (*Per 1*, *Per 2* y *Per 3*), dos genes Cryptochrome (*Cry1* y *Cry2*), el gen *Bmal1* y el gen *Clock* (Albrecht y Eichele, 2003). Estos genes funcionan en dos asas de retroalimentación en las cuales las proteínas CLOCK y BMAL1 forman un heterodímero que funciona como activador de los genes *Period* y *Cryptochrome* al unirse con la E-box de su secuencia promotora, cuyos productos proteínicos forman un complejo con varios polipeptidos adicionales, PER y CRY son fosforilados y posteriormente translocados al núcleo. Una vez que se alcanza una concentración crítica se unen al heterodímero formado por CLOCK-BMAL1, disminuyendo su capacidad para estimular su propia transcripción (Partch *et al.*, 2014). En una segunda asa, CLOCK y BMAL inhiben su propia transcripción al promover la síntesis del receptor nuclear huérfano REV-Erb, el cual se une al promotor de *Bmal1*, provocando que disminuyan los niveles del ARNm de *Bmal1*. Debido a esto cuando PER y CRY

inhiben su propia transcripción, inhiben también la de REV-Erb, en ausencia de REV-Erb, la proteína ROR se une al promotor de BMAL1 activando su transcripción (Fig. 1) Por lo tanto los niveles de BMAL1 aumentan durante la noche, favoreciendo así la formación de heterodímeros CLOCK-BMAL1 (Preitner *et al.*, 2002).

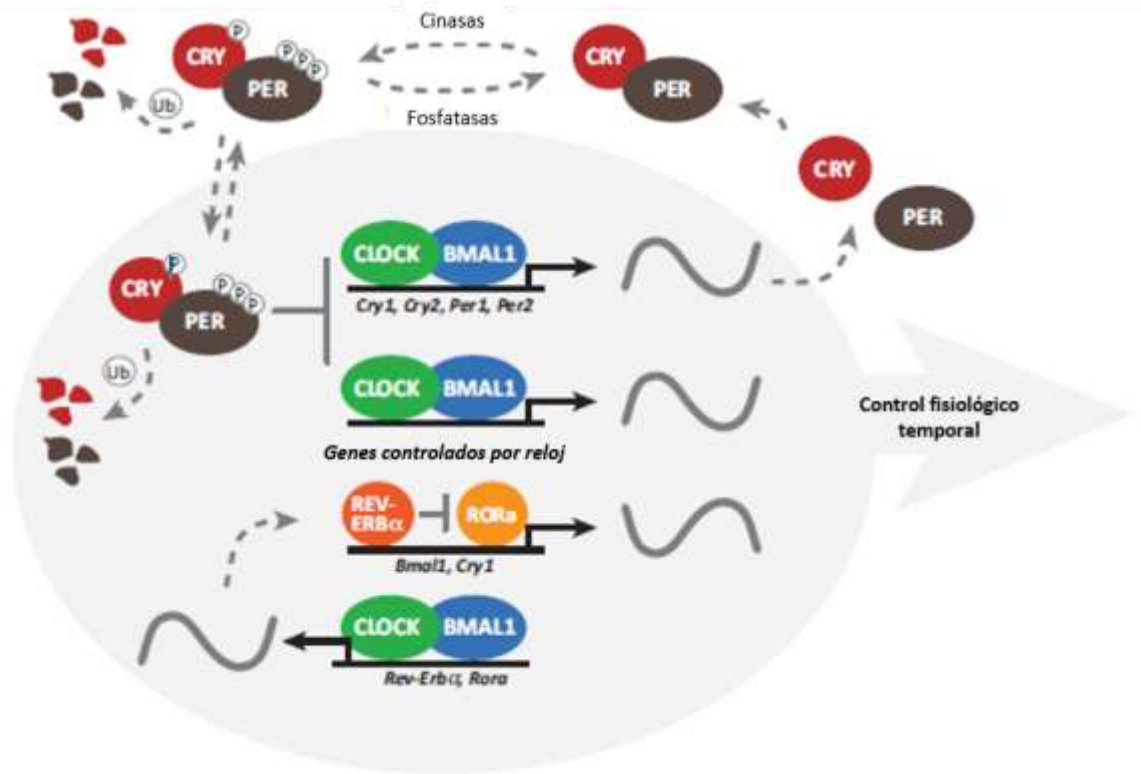


Figura 1. Organización molecular del reloj en mamíferos. Modificada de (Partch *et al.*, 2014). Las proteínas CLOCK y BMAL1 forman un heterodímero que se une al promotor de los genes *Per*, *Cry* y *Rev-Erb*, promoviendo su transcripción. Las proteínas PER y CRY forman un heterodímero que al ser fosforilado entra al núcleo, interactúa con el dímero CLOCK:BMAL1 e inhibe su propia transcripción. La proteína REV-Erb inhibe la transcripción de *Bmal1*. Algunos otros genes poseen la secuencia amplificadora al cual se une el heterodímero CLOCK:BMAL1, el cual promueve su transcripción y son llamados genes controlados por reloj.

Estas oscilaciones deben ser traducidas a señales que transmitan ritmicidad a todo el organismo y pueden ser neurales o humorales; por ejemplo, se sabe que la lesión del NSQ suprime el ritmo de actividad locomotora, así como el ciclo estral y las repuesta reproductiva al fotoperiodo y el trasplante de un NSQ intacto reestablece el ritmo de actividad locomotora (Silver *et al.*, 1996), pero no el ciclo estral (Meyer-Bernstein *et al.*, 1999) ni la respuesta reproductiva al fotoperiodo (Lehman *et al.*, 1987) lo que sugiere que se requieren factores humorales para la generación del ritmo de actividad y conexiones neurales para la ritmicidad estral y anual en respuesta al fotoperiodo.

Existen otros genes que poseen la E-box a la cual se une el heterodímero CLOCK:BMAL1 y por lo tanto tienen un patrón circadiano de transcripción, a estos se les llama genes controlados por reloj (Partch et al., 2014).

I.3. Fotoperiodo y fotoperiodismo

El fotoperiodo, se refiere a la proporción de luz-oscuridad en un día, la cual depende del movimiento de rotación de la tierra sobre su eje inclinado, el movimiento de translación de esta y la latitud (Fig. 2) (Silverthorn, 2007). Al ser una factor ambiental con variaciones considerables a lo largo del año en las latitudes templadas y boreales del planeta representa una señal a la cual la mayoría de los mamíferos responde cambiando su fisiología y comportamiento (Schwartz *et al.*, 2001), a esta respuesta se le llama fotoperiodismo. El fotoperiodo es considerado como la señal principal que sincroniza los eventos de reproducción, hibernación, migración, etc. para los organismos habitantes de zonas fuera de los trópicos, a través de un mecanismo mediado por la hormona pineal melatonina, la cual es secretada durante la fase oscura del día y constituye la señal endocrina que sincronizará las funciones biológicas, en especial la actividad reproductiva (Malpoux *et al.*, 2001, Vriend y Reiter, 2015).

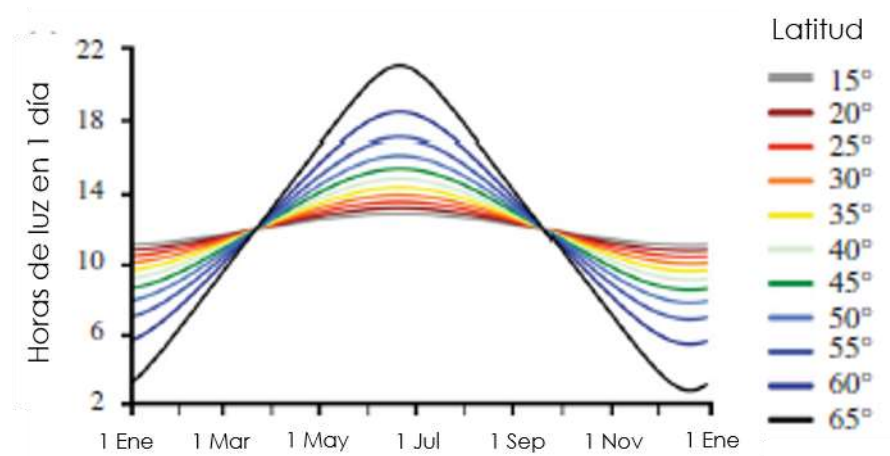


Figura 2. Gráfica representando la longitud de la fotofase a lo largo del año en las diferentes latitudes Modificada de (Wilczek et al., 2010).

A los animales que restringen la reproducción a un periodo particular del año se les denomina reproductores estacionales. Esta adaptación les permite tener a sus crías en un momento favorable del año. Los animales que se aparean en verano

(hámster, codorniz, medaka, etc.) son llamados reproductores de días largos, mientras que los que llevan a cabo este proceso en otoño-invierno (oveja, emú, salmón, etc.), son llamados reproductores de días cortos (Nakane y Yoshimura, 2014). Algunas señales como la disponibilidad de alimento, interacciones sociales y el clima pueden modular el impacto del fotoperiodo (Dardente *et al.*, 2016).

I.3.1 Fotoperiodismo reproductivo

En los mamíferos se considera a los ojos como el único órgano fotoreceptor y la señal luminosa recibida por estos se transmite al NSQ a través del tracto retino hipotalámico, este núcleo regula el ritmo circadiano de secreción de melatonina a través de una vía multisináptica que pasa por el núcleo paraventricular, posteriormente a las células columnares intermediolateral torácicas de la médula espinal, pasando por las neuronas simpáticas del ganglio cervical superior, que inerva a la glándula pineal (Johnston y Skene, 2015). Esta glándula, es estimulada por la ausencia de luz para secretar melatonina, cuyo perfil de secreción codifica la duración de la fase oscura del día (escotofase) (Reiter, 1980, Vriend y Reiter, 2015).

La melatonina controla la producción de la hormona estimulante de la tiroides o tirotropina (TSH), ésta incrementa por la exposición a días largos y es inhibida por los días cortos al actuar en las células del *Par tuberalis* que expresan receptores a melatonina y median cambios en la expresión de la subunidad β de TSH en un mecanismo independiente al eje hipotálamo-hipófisis-tiroides clásico (Dardente *et al.*, 2010). Esta TSH se une a sus receptores (TSHR) de los tanocitos del hipotálamo medio basal (HMB), los cuales activan la expresión de la TH deiodinasa DIO2 e inhiben la de la TH deiodinasa DIO3 (Dardente *et al.*, 2016), alterando así la disponibilidad de T4 y T3 en el hipotálamo.

T3 actúa mediante receptores nucleares de la hormona tiroidea sobre el hipotálamo medio basal (TR α 1, TR β 1 y TR β 2), los cuales forman heterodímeros con receptores retinoides X que se unen a elementos responsivos a DR4, los cuales están ampliamente distribuidos en el genoma, sin embargo en el hipotálamo se han detectado muy pocos genes sensibles a T3, entre los que sobresalen *Kiss* y *Rfrp*, estos genes codifican para los péptidos KISS1 y RFRP (también llamado hormona

inhibidora de gonadotropinas o GnIH) que parecen ser los blancos clave de TH mediando la reproducción estacional (Follett, 2015, Dardente *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, la luz es considerada como la señal sincronizadora predominante o Zeitgeber (palabra alemana que significa “dador de tiempo”) predominante para el NSQ. En condiciones experimentales para el estudio del fotoperiodismo, se utiliza el término Zeitgeber time (ZT), que se define como una unidad de tiempo basada en el periodo a partir de un Zeitgeber. Por convención el ZT0 es el encendido de las luces en un ciclo con alternancia de luz oscuridad, por lo que en un fotoperiodo de L/O 12:12, el ZT12 correspondería al apagado de las luces.

I.5. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

La parte ventrolateral del NSQ posee proyecciones hacia el área preoptica medial (mPOA). Esta área contiene una gran población de neuronas secretoras de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), las cuales, poseen terminales nerviosas en la eminencia media (EM), donde liberan GnRH de manera pulsátil que va hacia el sistema porta hipotálamo–hipofisario; esta hormona estimula a los gonadotropos ubicados en la hipófisis anterior o adenohipófisis, para sintetizar y liberar la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Christian y Moenter, 2010), también llamadas gonadotropinas hipofisarias. Éstas son secretadas al torrente sanguíneo, por donde viajan hasta el ovario, que es su principal tejido diana en la hembra. La FSH promueve la maduración de los folículos ováricos, estimulando la mitosis de las células de la granulosa y la formación de la teca y la consecuente síntesis de E2; mientras que la LH inducirá la ovulación y la formación del cuerpo lúteo y la secreción de P4 por este (Silverthorn, 2007).

Los estrógenos sintetizados por las células de la granulosa dentro de los folículos, constituyen una señal de regulación del eje a nivel de hipotálamo e hipófisis, inhibitoria en la primera parte del ciclo, pero estimuladora al llegar a su concentración máxima, durante la fase de proestro en roedores y al final de la fase folicular en humanos. Esta señal estimuladora es indispensable junto con la señal

temporal enviada por el NSQ para desencadenar el pico preovulatorio de GnRH-LH que inducirá la ovulación de manera cíclica (Christian *et al.*, 2005).

La acción de los estrógenos esta mediada principalmente por dos receptores nucleares, los receptores de estrógenos alfa (ER α) y beta (ER β), de los cuales solo el ER α es indispensable para que se dé la ovulación, esto fue comprobado gracias a los modelos *knockout* de ER α (α ERKO), que son infértiles (Lubahn *et al.*, 1993, Hamilton *et al.*, 2014), mientras que las hembras *knockout* de ER β (β ERKO) solo exhiben fertilidad reducida (Krege *et al.*, 1998, Hamilton *et al.*, 2014). Sin embargo, las poblaciones neuronales secretoras de GnRH no expresan prácticamente ningún ER α (Herbison y Theodosis, 1992), por lo que la acción de esta hormona esteroide requiere de otras áreas hipotalámicas que medien su acción.

La progesterona es otro esteroide gonadal de suma importancia para la implantación del embrión en caso de la fertilización del ovocito (Parkes y Bellerby, 1927, Peeraer *et al.*, 2016). Esta ejerce un efecto principalmente inhibitorio sobre la ovulación que fue descrito desde la década de los 20's y sobre el ciclo durante la gestación (Parkes y Bellerby, 1927). Dentro del ovario, ésta hormona es sintetizada principalmente por el cuerpo lúteo en la segunda parte del ciclo. A pesar de que actúa como una señal inhibitoria en la mayor parte del ciclo reproductivo a nivel de hipotálamo e hipófisis, también es capaz de estimular la ovulación (Everett, 1944).

Las kisspeptinas fueron reconocidas en el 2003 como un factor clave en la reproducción en humanos (de Roux *et al.*, 2003) y en ratón (Seminara *et al.*, 2003), que poco después fueron identificadas como un potente estimulador de la secreción de GnRH (Messenger *et al.*, 2005). Este péptido es secretado por neuronas presentes en dos áreas hipotalámicas: el núcleo arcuato (ARC) y el núcleo anteroventral periventricular (AVPV). Las neuronas kisspeptinérgicas del AVPV proyectan hacia los somas de las neuronas GnRHérgicas en POA, mientras que las presentes en el ARC proyectan a las fibras liberadoras de GnRH en la EM (Clarkson *et al.*, 2009). Las neuronas kisspeptinérgicas poseen una gran densidad de ER α (Smith *et al.*, 2006) por lo que son consideradas el mediador de la retroalimentación estrogénica tanto estimuladora como inhibitoria en el hipotálamo.

En los últimos años, otro péptido que ha llamado la atención por estar involucrado también en la regulación de la secreción preovulatoria de GnRH, es el llamado RFRP-3 u Hormona Inhibidora de Gonadotropinas (GnIH) debido a su acción inhibitoria sobre la secreción de GnRH en codorniz (Tsutsui *et al.*, 2000). Más adelante, este péptido demostró tener un ortólogo en otros vertebrados incluyendo mamíferos (Kriegsfeld *et al.*, 2005) y dentro de estos, el humano. Sin embargo, el efecto de este péptido en mamíferos ha mostrado diferencias en su acción entre especies e incluso sexuales, siendo por ejemplo que en el hámster sirio macho ejerce un efecto estimulador sobre la secreción de gonadotropinas (Ancel *et al.*, 2012), mientras que en la hembra de la misma especie es inhibitorio (Kriegsfeld *et al.*, 2005). A pesar de estas diferencias, en todos los modelos estacionales, la melatonina ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de RFRP-3 (Revel *et al.*, 2008), lo que apunta a las neuronas secretoras de este péptido, que se encuentran ubicadas en el hipotálamo medio basal (MBH), como un intermediario crítico entre la señalización fotoperiódica dependiente de melatonina y el eje reproductivo. El papel de este péptido no se limita a la regulación estacional del funcionamiento del eje reproductivo, se ha reportado que tiene variaciones en el ciclo estral, siendo que su batifase se da en el proestro, lo que coincide con el aumento de kisspeptina preovulatorio (Henningsen *et al.*, 2017), las neuronas secretoras de RFRP-3 poseen ER α y son inhibidas por esta hormona esteroide (Molnár *et al.*, 2011).

La integración de eventos del eje hipotálamo-hipófisis-ovario a lo largo del ciclo estral en roedores se ilustran en la figura 3.

I.5.1 Control del reloj molecular circadiano sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario

El papel de los ciclos circadianos sobre la reproducción ha sido estudiado ya por varias décadas, desde que Everett y Sawyer (1950) identificaron un componente circadiano en la liberación de LH, al observar que la administración de pentobarbital a ratas, antes de las 2 pm del día de proestro retrasa la ovulación justo 24 horas; mientras que su administración después de este “periodo crítico” no era efectivo. Más adelante se reportó que las lesiones al NSQ inducen estro continuo anovulatorio con alta receptividad sexual (Brown-Grant y Raisman, 1977). Y tras la

descripción del mecanismo de reloj molecular, las alteraciones de algunos de sus elementos, mostraron modificaciones reproductivas evidentes.

La presencia de los elementos de la maquinaria de reloj en el ovario de rata fue descrita por primera vez en el 2006 y además se observó que la expresión de *Per2* y *Bmal1* mostraba un patrón de expresión que cambia a lo largo del día, específicamente en las células de la granulosa y teca de los folículos antrales, así como en los cuerpos lúteos. *Per1* también presenta un patrón circadiano de expresión en células esteroideogénicas (Fahrenkrug *et al.*, 2006). Adicionalmente *Bmal1* cambia su expresión en relación con la fase del ciclo estral, aumentando ésta en el ZT18 del proestro (Karman y Tischkau, 2006). En ratas hipofisectomizadas antes de la maduración sexual, se reportaron oscilaciones de los genes reloj en ovario solo en aquellas que eran estimuladas con gonadotropina coriónica equina (eCG) y gonadotropina coriónica humana (hCG), las cuales no se observaron en las estimuladas únicamente con eCG, por lo que se ha propuesto a la LH como señal sincronizadora de la maquinaria de reloj molecular en el ovario. Sin embargo, en otros trabajos se ha observado que en células de la granulosa de rata (He *et al.*, 2007) y vaca (Shimizu *et al.*, 2011, Shimizu *et al.*, 2012) en cultivo, la FSH también induce la oscilación circadiana de *Per*. El papel de la FSH como señal sincronizadora también se ha observado *in vivo* (He *et al.*, 2007) y se ha propuesto que es dependiente de las conexiones gap entre las células (Chen *et al.*, 2013).

En ratones mutantes del gen *Clock* la fase de proestro disminuye, mientras que el estro se ve aumentado; presenta fallas en la generación del pico preovulatorio de LH, además de un alto índice de reabsorción de embriones (Miller *et al.*, 2004). En el modelo knock-out del gen *Bmal1* se reportan ciclos con un alargamiento del 49%, que presentan alteración importante en la esteroideogénesis. Muestran concentraciones reducidas de StAR y progesterona, sin cambios evidentes en el desarrollo folicular. Tanto el macho (Alvarez *et al.*, 2008) como la hembra (Ratajczak *et al.*, 2009) de este modelo son infértiles.

Los modelos mutantes de la parte negativa del asa de retroalimentación del reloj molecular también se ven afectados en el aspecto reproductivo. Los ratones jóvenes knock-out de *Per1* y *Per2* (3-6 meses) expresan ciclos estrales regulares y

fertilidad comparable al fenotipo silvestre, sin embargo estos modelos en mediana edad (7-9 meses) expresan ciclos irregulares, con un gran porcentaje de estacionamiento en la fase de estro y dentro de estos *Per2*^{-/-} exhibe un mayor porcentaje de irregularidad en comparación con *Per1*^{-/-}, dado que este efecto es comparable a ratonas viejas, se sugiere que las alteraciones reproductivas se deben a un envejecimiento prematuro (Pilorz y Steinlechner, 2008). Con respecto a *Cry1*^{-/-} y *Cry2*^{-/-} se reporta un 21% de irregularidad del ciclo estral en ratonas jóvenes (3.5 +/-1 mes), el cual no es significativo en comparación con genotipo silvestre; sin embargo, en ratonas de mediana edad (10 +/-1 mes) *Cry1*^{-/-} el 25% y en *Cry2*^{-/-} solo el 8% presentaron ciclos estrales regulares; es importante mencionar que la regularidad en estas ratonas aumentó a 75% y 77% respectivamente al ser colocadas bajo condiciones de luz oscuridad que recreaban su periodo endógeno del ritmo circadiano de actividad locomotriz (Takasu *et al.*, 2015), para resaltar la importancia del ciclo de luz oscuridad en la regulación del ciclo estral.

El significado funcional del ovario como oscilador periférico no está muy claro, sin embargo, los elementos de la maquinaria de reloj han sido relacionadas con parte de la fisiología de éste. En el 2011 Shimizu, *et al.* usaron siRNA de *Clock* y *Per* para ver el efecto de estos genes sobre la síntesis de las enzimas esteroidogénicas StAR y P450aromatasa, el receptor de LH (LHR), progesterona (P4) y estradiol (E2), así como en la proliferación de las células de la granulosa, encontrando que la proliferación era menor en las células transfectadas tanto con *Clocks*iRNA como con *Per2*siRNA, las cuales también mostraron concentraciones disminuidas de LHR, por otro lado solo las células transfectadas con *Per2*siRNA mostraron concentraciones aumentadas de StAR y P con respecto al control y las que tenían siRNAClock mostraron concentraciones disminuidas de P450aromatasa y E. En un mutante de *Per2* también se ha reportado el aumento de StAR en la glándula adrenal (Wang *et al.*, 2014). Shimizu *et al.*, (2012) reportaron que la presencia de *Clock* es mayor en folículos inmaduros en comparación tanto con los folículos que ya desarrollaron antro y comienzan a responder a E2, como con los preovulatorios, mientras que *Per2* está expresado mayormente en los folículos preovulatorios y la expresión de *Bmal1* y *Cry1* no parece presentar cambios a lo

largo del desarrollo folicular, lo que ha llevado a proponer un papel de *Clock* en el reclutamiento folicular, el cual presenta un aumento significativo al ser estimulado con FSH. El receptor Rev-erba también ha mostrado ser parte de la regulación de la fisiología ovárica ya que la aplicación de un agonista de este aumenta significativamente la expresión de StAR, la cual es importante mencionar que es codificada por un gen controlado por reloj (Chen *et al.*, 2012); este receptor muestra un patrón de expresión circadiano en células de la granulosa (Chen *et al.*, 2013b), además de que en el ovario su expresión cambia a lo largo del ciclo estral (Boden *et al.*, 2010).

Se ha sugerido que la expresión circadiana de los genes reloj está involucrada en el reclutamiento folicular cíclico dependiente de gonadotropinas, ya que ésta expresión circadiana, parece estar solo en los folículos antrales y posteriores (He *et al.*, 2007), así como en las células intersticiales (Gräs *et al.*, 2012). Sin embargo, también se han encontrado un patrón de expresión circadiano de los genes de reloj en el estroma ovárico, ésta evidencia sugiere un papel de este mecanismo fuera de la función ovulatoria (Murphy *et al.*, 2015).

Se ha reportado también que en el NSQ, la expresión de los genes *Per1*, *Per2*, *Cry1*, Rev-erba y AVP, los cuales presentan E-box en su secuencia promotora, cambian su expresión en relación con el fotoperiodo, mientras que *Bmal1* y *Cry2* no presentan cambios con respecto a este (Johnston *et al.*, 2005).

También se ha estudiado el efecto de la melatonina pineal sobre la oscilación de estos genes en el ovario, encontrando que la pinealectomía no suprime su expresión diaria, pero si modifica la amplitud al menos en el ovocito y las células del cumulus de *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* y *Per2* (Coelho *et al.*, 2015).

I.6.2. Ciclo estral

El ciclo estral se refiere al ciclo reproductivo que expresan las hembras de la mayoría de los mamíferos, comprende una serie de eventos altamente regulados, que dan como resultado la liberación de un ovulo en condiciones para ser fecundado. Es regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, también llamado eje reproductivo.

Las hembras de roedor son poliestrales, presentan ovulación espontánea y muestran ciclos estrales regulares y sucesivos que varían en duración dependiendo de la especie y edad (Paccola *et al.*, 2013), la duración promedio del ciclo estral de rata es de 4-5 días en los que se distinguen 4 fases, con una duración promedio distinta cada una proestro (12 horas), estro (12 horas), metaestro (21 horas) y diestro (65 horas) que pueden ser monitoreadas por medio de citología vaginal, la cual puede tomarse como un indicador funcional del eje (Fig. 3) (Goldman *et al.*, 2007).

La fase de proestro se caracteriza por una predominancia de células epiteliales nucleadas, las cuales son redondas, visiblemente nucleadas y que se encuentran en racimos, ocasionalmente también pueden presentarse algunas células epiteliales cornificadas (Freeman, 2006). Es en esta fase en la cual los estrógenos llegan a su mayor concentración circulante y desencadenan el pico de GnRH-LH, es importante mencionar que el pico de LH depende del ciclo de luz oscuridad, siendo que se da al final de la tarde de esta fase del ciclo (Legan y Karsch, 1975).

En el estro, la célula dominante es la epitelial cornificada, la cual no muestra núcleo visible y presenta un citoplasma altamente granular con una forma irregular. Los estrógenos inducen la proliferación celular y su keratinización que da como resultado la observación de este tipo de células características de esta fase (Galand *et al.*, 1971). La receptividad sexual se da en la fase oscura de la del estro en rata (Paccola *et al.*, 2013).

Durante el metaestro (también llamado diestro 1), la disminución de estrógenos permite la infiltración de leucocitos, por lo que son estos los que dominan en la citología vaginal, sin embargo, aparecen con un número significativo de células epiteliales cornificadas y nucleadas. Los leucocitos son células pequeñas, con un citoplasma granular con un núcleo vesiculado (Freeman, 2006).

En el diestro (también llamado diestro 2) los leucocitos invaden totalmente la citología vaginal (Goldman *et al.*, 2007), el ciclo celular del epitelio vaginal se hace más lento, la proliferación celular es poca y los niveles de estradiol se encuentran en su mínimo (Galand *et al.*, 1971).

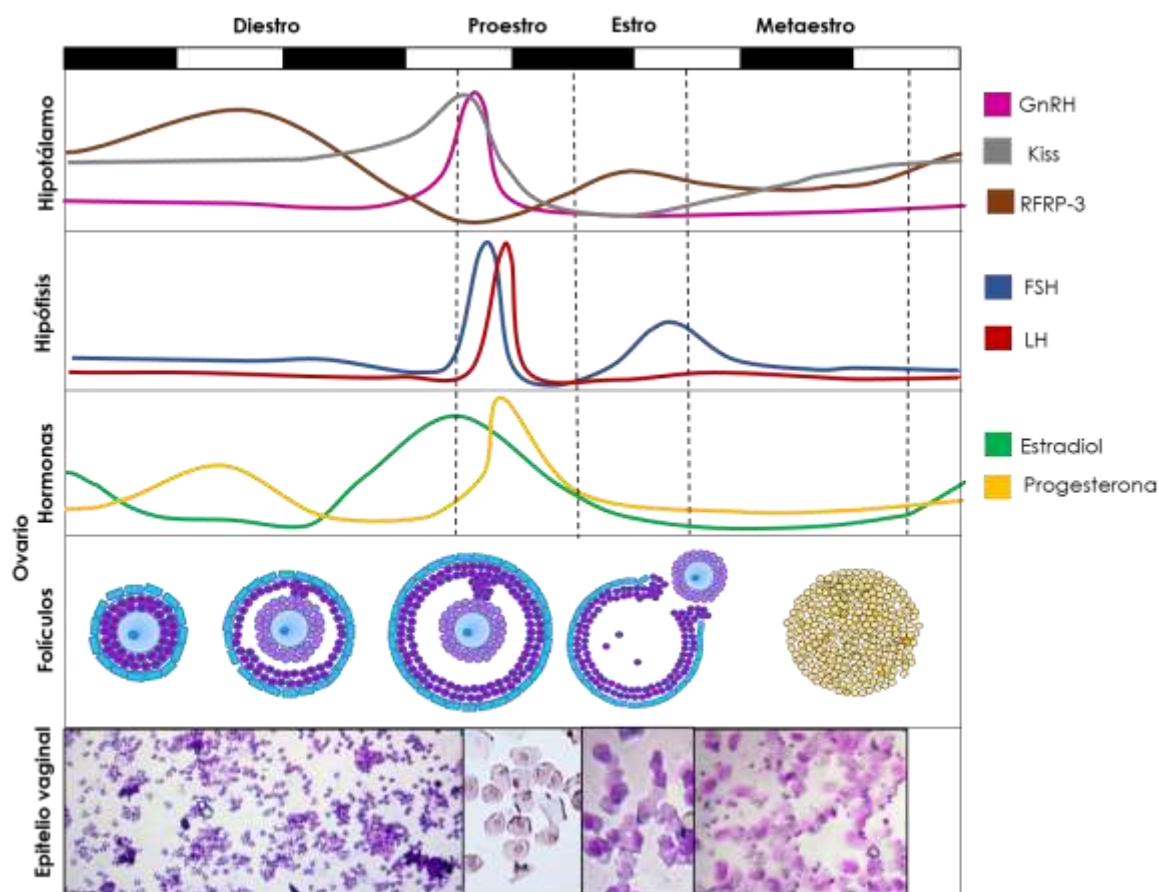


Figura 3. Representación de los eventos que ocurren durante el ciclo estral en roedores a nivel de hipotálamo, hipófisis y ovario, así como del desarrollo folicular y los cambios observados en el epitelio vaginal. GnRH=Hormona liberadora de gonadotropinas, LH=Hormona luteinizante, FSH=Hormóna foliculo estimulante. Integrado de Smith et al., 1975, Park et al., 1990, Caligiani, 2009, Salehi et al.,2013 y Pangas y Rajkovic, 2015

I.6.3. Ciclo estral y fotoperiodo

La respuesta fotoperiódica que experimenta el ciclo estral se ha limitado bastante a lo que ocurre en condiciones constantes de iluminación. En oscuridad constante se ha reportado que en la rata el ciclo continúa normalmente o resulta ligeramente alargado dependiendo de la edad a la que el individuo es colocado en las condiciones de oscuridad constante, siendo que si madura sexualmente bajo estas condiciones, seguirá ciclando normalmente y si las condiciones se imponen de manera posterior a la maduración sexual los ciclos se alargarán, por un aumento en los días de diestro y a largo plazo dejaran de ciclar mostrando un anestro vaginal (Hoffman, 1967). Por otro lado, la luz constante provoca un estro vaginal persistente

con anovulación (Schwartz, 1982) con diferencias entre especies y cepas, siendo que la rata desarrolla este estado con aproximadamente 15 días de exposición (Takahashi y Suzuki, 1969), el ratón con más de 120 días (Campbell et al., 1976) y en hámster requiere entre 6 y 14 meses de exposición para desarrollar este estado (Kent et al., 1968). De manera general la rata y el ratón son considerados roedores no fotoperiodicos (Schwartz, 1982), a diferencia del hámster; al ser este más responsivo al fotoperiodo se esperaría que fuera más sensible a los efectos disruptores de la luz constante; sin embargo, no parece ser el caso.

Por otro lado, los cambios del ciclo estral en otros fotoperiodos no han sido tan explorados. Se ha observado que en fotoperiodo 12:12 la mayoría de ratas (70%) expresan ciclos regulares de 4 días; al aumentar la cantidad de luz en un día dos horas, el porcentaje con ciclos de cuatro días disminuye y aumenta el de ratas regulares de 5 días e irregulares; al ser expuestas a fotoperiodo 16:8, el ciclo dominante es el de 5 días y en segundo lugar los ciclos irregulares (Hoffman, 1968); si la cantidad de luz se aumenta a 20 o 22 horas, el mayor porcentaje de ciclos se hace irregular, de más de seis días, aumentando los días de estro, por el contrario si las horas de luz disminuyen a menos de 12 horas, la tendencia dominante es la de ciclos regulares de cuatro días (Hoffman, 1970).

En humanos también se ha reportado irregularidad del ciclo reproductivo en mujeres que cambian turnos en su trabajo (Lawson et al., 2011, Attarchi et al., 2013) y en sobrecargos de vuelos transmeridionales (Suvanto et al., 1993) las cuales están expuestas a ciclos irregulares de luz oscuridad.

I.7. El Jerbo

El Jerbo (*Meriones unguiculus*) es un roedor originario del desierto noreste de China y Mongolia de la familia Cricetidae (Almeida et al., 2001). Debido a su naturaleza dócil en los últimos años ha sido utilizado en investigación biológica como un modelo de referencia en estudios de epilepsia e isquemia (Janvier labs, 2013) y conducta reproductiva, territorial y cuidado parental (Agren et al., 1989).

Es un roedor altamente social, que viven en grupos normalmente denominados como familias (Pietrewitz et al., 1982). El cuidado parental en este

modelo es llevado a cabo tanto por el macho como por la hembra y se ha reportado que el desarrollo de las crías es más rápido cuando los dos padres están a cargo en comparación a cuando el padre es aislado de las crías (Elwood y Broom, 1987).

I.7.1 Reproducción-ciclo estral

Se considera sexualmente maduro entre las 9 y 12 semanas (Norris y Adams, 1974). La apertura vaginal en la hembra se da entre el día 16 y 25 presentando un patrón bimodal en donde una parte de la población presenta la apertura vaginal antes de la apertura de ojos y otra parte después del periodo de lactancia, lo que se ha relacionado con diferentes estrategias reproductivas (Clark *et al.*, 1986). Entre los 30 y 40 días de edad, la hembra presenta un notable incremento del peso ovárico, después del cual no presenta cambios aparentes hasta la aparición de los primeros cuerpos luteos aproximadamente al día 90 (Norris y Adams, 1974).

La hembra presenta ciclos estrales que de manera general, son como el de los demás roedores, tiene una duración de 4 a 6 días (Barfield y Breeman, 1968, Nishino y Totsukawa, 1996) con 5 fases (Nishino y Totsukawa, 1996, Almeida *et al.*, 2001) que pueden ser identificadas por medio de la observación de los cambios del epitelio vaginal (Goldman *et al.*, 2007). Se ha reportado que el estro en esta especie tiene una duración de 12 a 15 horas y su periodo de receptividad empieza ligeramente más temprano que el de la mayoría de los roedores (Nishino y Totsukawa, 1996). Su gestación dura normalmente 24 días y sus camadas varían entre 2 y 10 crías, siendo poco habitual que haya más de 7. La hembra de esta especie puede quedar preñada inmediatamente después del parto, de ser así, la gestación se alarga hasta 48 días, manteniendo una relación lineal con el número de crías en lactancia (Norris y Adams, 1981).

Se considera un roedor monógamo. En vida libre se ha observado que dentro de los grupos sociales, la pareja dominante tiene preferencia reproductiva y las madres pueden retrasar la maduración sexual de sus hijas (Payman y Swanson, 1980, Agren *et al.*, 1989).

I.7.2 Fotoperiodismo reproductivo en Jerbo

Se ha reportado un ciclo circanual en la reproducción del jerbo en el cual se presentan dos picos, el mayor en mayo-junio y uno menor en agosto-septiembre

(revisado en (Clark et al., 1986), lo cual corresponde a meses con días largos. La exposición a hembras adultas a días cortos (L/O 8:16) provoca una disminución significativa en el peso de ovarios, oviductos y útero en comparación a hembras expuestas a fotoperiodo L/O 12:12 (Devries et al., 1989). En los machos se observa regresión gonadal en fotoperiodo corto y el fotoperiodo largo, promueve el desarrollo de testículos más grandes, así como la actividad de las vesículas seminales (Gündüz 2002). El fotoperiodo L/O 14:10 es en el que se ha reportado el mayor desarrollo gonadal para esta especie (Gündüz y Karakas 2001). También se ha reportado (He et al., 2016) que el desarrollo reproductivo de los jerbos prepuberales macho es influenciado por el fotoperiodo, por lo que se propone como un buen modelo para estudios de regulación ambiental de ciclicidad reproductiva estacional (Karakas y Gündüz, 2002). Se ha propuesto que la respuesta ante el fotoperiodo esta mediada por la melatonina que ejerce un efecto antigonadal en esta especie (Vaughan et al., 1976, Devries et al., 1989).

I.7.3. Ritmos en el jerbo

Hay mucha variabilidad sobre el patrón de ritmo de actividad locomotriz de *Meriones unguiculatus*, se han reportado patrones de actividad diurna, nocturna y crepuscular. Roper (1976) describió que su actividad correspondía a un solo pico el cual mostraba diferencias sexuales, las hembras mostraban más actividad por cada 24 horas en comparación con los machos, así como durante la fase oscura, mientras que los machos eran más activos en la fase luminosa. También menciona en su estudio una contribución por parte del ciclo estral en el patrón de actividad como se ha observado anteriormente en rata y hámster.

Por otro lado Pietrewitz, et al., (1982) reportaron que el jerbo presenta un ritmo crepuscular en su actividad locomotriz, de sueño, excavado, alimentación y acicalamiento que no presenta diferencias sexuales y sugieren que la diferencias encontradas en los diferente estudios al respecto se deben a las condiciones ambientales a las que los Jerbos están expuestas en cada protocolo. Juarez-Tapia (2015) también reporta un patrón de actividad bimodal en fotoperiodo 12:12 con un componente que responde al encendido de las luces en el cambio de fotoperiodo a

días largos. Weiner, *et al.*, (2006) también reportaron un patrón bimodal de actividad en fotoperiodo 14:10 que solo se presentaba en ausencia de rueda de actividad, en presencia de esta, la actividad era predominantemente nocturna.

La variabilidad del patrón diario de actividad que se ha reportado y su gran susceptibilidad a los cambios ambientales hacen del Jerbo un buen modelo para investigar los factores que determinan el ritmo de actividad de un animal (Weinert *et al.*, 2006).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En mamíferos, la regulación de la función reproductiva en la hembra exhibe una ritmicidad infradiana en parte modulada por el NSQ como estructura que forma parte del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y al mismo tiempo del sistema circadiano; el cual recibe la señal de luz-oscuridad, que a través de una regulación neuroendocrina la manda al resto del organismo. Esta cambia a lo largo del año en respuesta a los cambios en la proporción de luz y oscuridad generados por el movimiento de translación y rotación de la tierra en latitudes fuera de los trópicos.

Se ha reportado que el jerbo es fotosensible y que presenta regresión gonadal en días cortos, esta respuesta a los cambios de fotoperiodo esta mediada en parte por la melatonina que cambia su patrón de síntesis de acuerdo con la duración de la escotofase y que actúa sobre el eje hipotálamo hipófisis gónada, en el caso del jerbo de manera antigonadotrópica.

El estradiol (E2) y la progesterona (P4) son hormonas esteroides gonadales las cuales son un elemento clave en la retroalimentación tanto estimulatoria como inhibitoria que el ovario ejerce sobre otros elementos del eje reproductivo y son los responsables de los cambios de la citología vaginal a lo largo del ciclo estral. A su vez su patrón de secreción está regulado por el hipotálamo y la hipófisis, los cuales como ya se mencionó se ven modificados con los cambios de fotoperiodo.

Entonces,

¿En el jerbo se verán modificadas las concentraciones de E2 y P4 y a su vez la citología vaginal al exponerlo en fotoperiodo de días cortos y largos?

II. HIPÓTESIS

Si el fotoperiodo afecta la concentración de estradiol y progesterona, las cuales forman parte importante de la regulación del ciclo estral, entonces, durante días largos o cortos, éstas se alterarán y perturbarán a su vez la expresión del ciclo estral, lo que se verá reflejado en la citología vaginal.

III. OBJETIVOS

III.1. General:

Evaluar el efecto del fotoperiodo sobre las concentraciones de estradiol, progesterona y la regularidad del ciclo estral en el jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*).

III.2. Específicos:

Determinar la duración de cada una de las fases estrales, así como su regularidad en jerbos sometidos a fotoperiodo de días cortos (LO8:16), largos (LO16:8) y de referencia (12:12 y 14:10).

Determinar el fotoperiodo bajo el cual el ciclo estral se presenta con mayor regularidad.

Determinar las concentraciones de estradiol y progesterona en plasma y relacionar las diferencias encontradas en la citología vaginal con estas.

IV. MATERIAL Y MÉTODO

IV.1. Animales

Se utilizaron 24 Jerbos (*Meriones unguiculatus*) hembras adultas de entre cuatro y cinco meses de edad obtenidas del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, alimentadas con Nutri-cubo (Purina). El agua y alimento estuvieron disponibles *ad libitum* durante todo el experimento.

Se dividieron en cuatro grupos, cada uno de los cuales fue expuesto a diferentes fotoperiodos: **1.** Fotoperiodo de días cortos con un patrón de luz oscuridad (L/O) 8:16 **2.** Fotoperiodo de días largos L/O, 16:8 y fotoperiodos de referencia **3.** L/O, 12:12 y **4.** L/O, 14:10. Los jerbos fueron mantenidos en cada condición de 15 a 20 días antes de comenzar el monitoreo del ciclo estral. En todos los fotoperiodos las luces se encendieron a las 6 am (ZT 0) y se apagaron a las 2 pm (ZT 8), 6 pm (ZT12), 8 pm (ZT14) y ZT16 10pm (ZT16) respectivamente.

IV.2. Monitoreo del ciclo estral

El ciclo estral se monitoreo diariamente por medio de frotis vaginales que fueron tomados con asa y teñidos con violeta de cresilo, cada cuatro horas en los ZT 2, 6, 10, 14, 18 y 22 hasta completar 3 ciclos completos de cada jerbo. Se determinaron ciclos completos cuando la presencia de proestro-estro-metaestro y diestro se encontraron presentes en dicha secuencia.

Se consideró establecida a la fase estral cuando la citología vaginal mostraba el 100% de células características (Fig. 3 y 4), es decir: cornificadas para el estro, nucleadas para el proestro y leucocitos para el diestro, se consideró establecido el metaestro cuando el número de leucocitos sobrepasó el 50%.

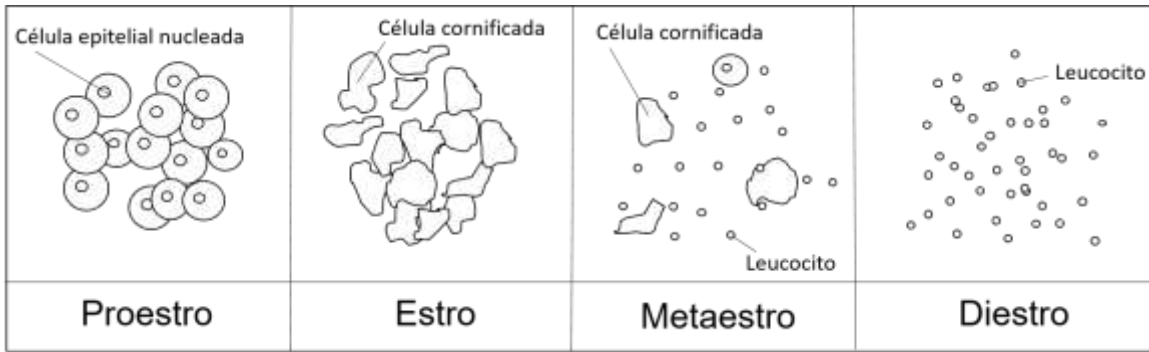


Figura 4. Representación de los tipos celulares encontrados en cada una de las fases del ciclo estral.

IV. 3. Medición de hormonas

Para la medición de hormonas, se sincronizó a tres animales con cada fotoperiodo por al menos dos semanas, se les tomó una muestra de sangre de máximo 0.2 mL por medio de una punción del seno retroorbital con capilares heparinizados en los ZT7 y ZT19 en las fases de estro y diestro para la medición de progesterona y de proestro y diestro para la de estradiol. Estas fases fueron elegidas por ser en donde se ha reportado que se encuentra el valor máximo y mínimo de cada hormona a lo largo del ciclo estral (Lv y Shi, 2010).

La muestra de sangre fue centrifugada a 10000rpm durante 10 minutos para separar el plasma, el cual se recolectó y se mantuvo a -40°C hasta la realización del análisis.

La cuantificación de hormonas fue realizada por medio de un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) competitivo de kits comerciales (DRG Instruments GmbH, Germany). Para estradiol se utilizó el kit EIA-2693 con una sensibilidad de 10.6 pg/mL a 2000 pg/mL y para progesterona el kit EIA-1561 con una sensibilidad de 0.045ng/mL a 40ng/mL. La variación intraensayo para ambos es menor al 10%, mientras que la variación interensayo para estradiol es menor al 15% y para progesterona menor al 10%.

En la ELISA competitiva, los pocillos están recubiertos con el anticuerpo policlonal dirigido a un sitio antigénico del E2 y P4 respectivamente.

Para la cuantificación de E2 se agregó la muestra de plasma al kit correspondiente y un conjugado de E2-peroxidasa de rábano picante que competirá con el E2 contenido en la muestra. Estos fueron incubados por 90 min y

posteriormente lavados para eliminar los antígenos que no reaccionaron. Se agregó Tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato y se dejó incubar por 30 minutos, tras los cuales se agregó ácido sulfúrico (H_2SO_4), para detener la reacción e inmediatamente se realizó la lectura de la absorbancia en un lector de placas a 450 nm. La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de E2 en la muestra.

Para la cuantificación de P4 se agregó la muestra de plasma al kit correspondiente y un conjugado de P4- peroxidasa de rábano picante que competirá con la P4 contenida en la muestra. Estos fueron incubados por 60 minutos y posteriormente lavados para eliminar los antígenos que no reaccionaron. Se agregó TMB como sustrato y se dejó incubar por 15 minutos, tras los cuales se agregó H_2SO_4 , para detener la reacción e inmediatamente se realizó la lectura de la absorbancia en un lector de placas 450 nm. La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de P4 en la muestra.

IV.4. Análisis estadísticos

Se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas de *Levene* y debido a la heterogeneidad de los datos una prueba de *Kruskall Wallis* y una *U de Mann Whitney* como *pos hoc* para comparar la duración del ciclo, así como de cada una de sus fases y una prueba de *Games-Howel* como post hoc para un nivel de alfa de 0.05.

Se realizó una prueba de *Kruskall Wallis* y una prueba de *U de Mann Whitney* como *pos hoc* para comparar las concentraciones de estradiol y progesterona en los diferentes ZT y fases del ciclo estral (intragrupos) y entre el mismo ZT en la misma fase entre los diferentes fotoperiodos (intergrupos).

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SPSS Statistics 22.

V. RESULTADOS

V.1 Determinación de la duración de fases estrales

Al monitorear la duración de los ciclos estrales de jerbo, fue evidente que estos eran más cortos y regulares en el fotoperiodo 14:10, en comparación con el resto (Fig. 5). En fotoperiodo 8:16, el 11.1% de los ciclos fueron de 3 días, mientras que para los fotoperiodos 12:12, 14:10 y 16:8 solo el 5.5% mostró esta duración. El 38% de los ciclos fueron de cuatro días en el fotoperiodo 8:16, mientras que en 12:12 solo el 11.1% presentó esa duración, en 14:10 el 33.3% y en 16:8 el 27.7%. Los ciclos de cinco días fueron los dominantes en el fotoperiodo 12:12 y 14:10 ya que el 44.4% y 61% respectivamente presentaron esta duración, mientras que en el fotoperiodo 8:16 representaron el 11.1% y en 16:8 el 16%. En fotoperiodo 16:8, el 50% de ciclos fueron de 6 o más días, mientras que en fotoperiodo 8:16 y 12:12 estos ciclos representaron el 38.8%.

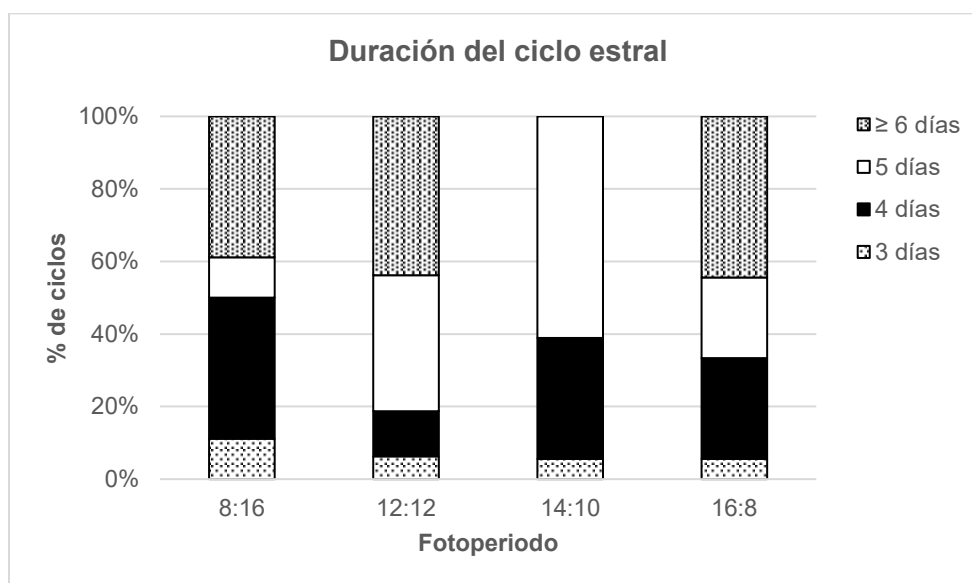


Figura 5. Gráfica en la que se muestra el porcentaje de ciclos de 3, 4, 5 y 6 o más días que en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10 y 16:8. N=24.

La prueba de homogeneidad de varianzas para cada fase (Tabla 1) mostró que estas no son homogéneas en la duración de las fases de estro ($p=0.000$), diestro ($p=0.009$) y en la total del ciclo estral ($p=0.00$). La variación de la duración

de las fases de proestro ($p=0.421$) y metaestro ($p=0.073$) no son estadísticamente significativas.

*Tabla 1. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene. *Presenta diferencias significativas, $p < 0.05$.*

	Estadístico de Levene	p
Proestro	0.9	0.421
Estro	8.3	0.000*
Metaestro	2.4	0.073
Diestro	4.2	0.009*
Ciclo estral	6.9	0.000*

La prueba de homogeneidad de varianzas entre cada fotoperiodo (Tabla 4 Anexos) mostró que existen diferencias en la homogeneidad de la varianza de la duración del ciclo estral entre el fotoperiodo L/O 14:10 y el resto de los fotoperiodos, 8:16 ($p=0.000$), 12:12 ($p=0.003$) y 16:8 ($p=0.000$).

Al igual que la duración total del ciclo, la varianza de la duración del estro no presenta homogeneidad entre el fotoperiodo 14:10 y el resto, 8:16 ($p=0.012$), 12:12 ($p=0.026$) y 16:8 ($p=0.000$). Adicionalmente el fotoperiodo 16:8 tampoco presentó homogeneidad con ningún otro, 8:16 ($p=0.006$) y 12:12 ($p=0.031$).

Las varianzas del metaestro fueron muy homogéneas en casi todos los fotoperiodos, solo se encontraron diferencias entre los fotoperiodos 14:10 y 16:8 ($p=0.007$).

Para el caso de diestro, al igual que en la duración total del ciclo las varianzas mostraron diferencias para todos los fotoperiodos en comparación con 14:10, 8:16 ($p=0.00$), 12:12 ($p=0.011$) y 16:8 ($p=0.003$).

En el proestro todas las fases y la duración total del ciclo mostraron homogeneidad de varianzas al compararse en todos los fotoperiodos.

En general, tanto en las fases como en la duración total del ciclo se observa mucha variación, se puede apreciar que las varianzas del fotoperiodo 14:10 difieren

a la de los otros fotoperiodos en todas las fases exceptuando el proestro, así como en la duración total, lo que refleja una menor variación de los datos en comparación con los demás fotoperiodos analizados.

*Tabla 2. Comparación de la duración del ciclo estral de jerbo en horas (h), así como cada una de sus fases en diferentes fotoperiodos. Se presenta media \pm desviación estándar y valores mínimo/máximo. *Presenta diferencias significativas a un nivel de alfa de 0.05.*

Fotoperiodo/ Fase	8:16	12:12	14:10	16:8	F	p
Proestro (h)	16 \pm 5	21 \pm 7	17 \pm 4	18 \pm 6	1.972	0.126
	12 - 28	12 - 36	12 - 24	12 - 32		
Estro (h)	18 \pm 7	21 \pm 8	16 \pm 3	28 \pm 13	6.385	0.001*
	12 - 32	12 - 44	12 - 24	12 - 52		
Metaestro (h)	28 \pm 9	29 \pm 7	26 \pm 5	30 \pm 10	0.891	0.450
	16 - 48	20 - 44	16 - 36	16 - 52		
Diestro (h)	60 \pm 32	61 \pm 27	47 \pm 14	53 \pm 28	0.753	0.524
	28 - 112	24 - 120	24 - 82	24 - 120		
Ciclo estral (h)	123 \pm 40	131 \pm 32	106 \pm 14	129 \pm 36	2.103	0.108
	80 - 196	76 - 188	72 - 130	80 - 212		

En fotoperiodo 12:12 el ciclo estral de jerbo mostró una duración promedio de 130.93 horas (5.5 días) con una variabilidad de entre 76 y 188 horas (3.2 y 7.8 días), el proestro mostró un promedio de 20.80 horas con un rango entre 12 y 36 horas, la fase de estro tuvo una duración promedio de 18.22 horas con un rango entre 12 y 32 horas, la fase de metaestro tuvo una duración promedio de 28.53 horas, con un rango entre 20 y 44 horas y el diestro mostró una duración promedio de 60.80 horas con una variación bastante notable de entre 24 y 120 horas (1y 5 días). Solo el 44% de los ciclos fueron de entre 4 y 5 días (Fig. 5).

Ciclo estral

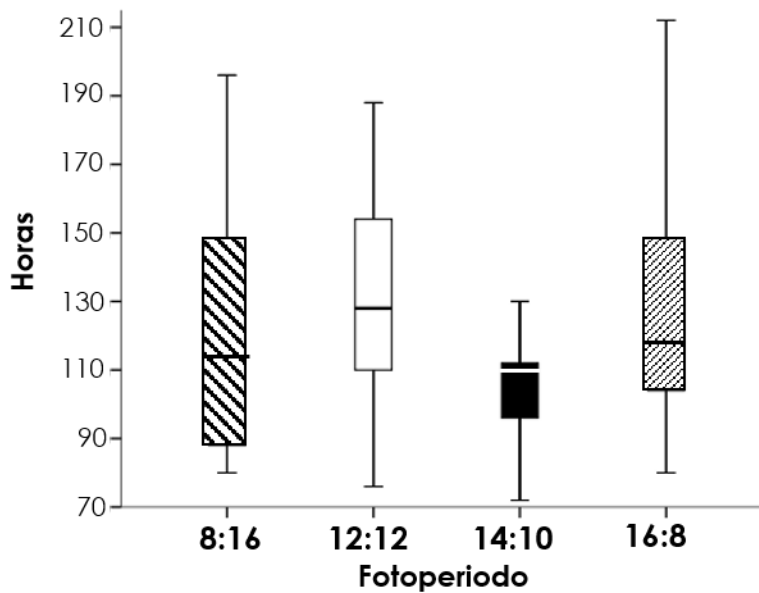


Figura 6. Gráfica en la que se compara la duración total del ciclo estral en hora en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10 y 16:8. * Presenta diferencias significativas, $H_3=3.11$, $p=0.37$. $N=24$

En fotoperiodo 14:10 los ciclos fueron más estables que en todos los demás fotoperiodos, lo cual se ve reflejado en una menor desviación estándar, tanto en la duración total del ciclo estral, que mostró un promedio de 106.33 con un rango entre 76 y 168 horas, como en cada una de sus fases (Tabla 2). El 94.5% de los ciclos en este fotoperiodo fueron de 4 y 5 días (Figura 5), siendo más abundantes los de 5 días, solo 1 animal presentó ciclos de 3 días, debido a un diestro muy corto (24 horas) en relación con los que se presentaron en el resto (entre 28 y 32 horas) y fue el único fotoperiodo en el que no se presentaron ciclos de 6 o más días. La fase de proestro duró en promedio de 17.33 horas, con un rango entre 12 y 24 horas, el promedio de duración de la fase de estro fue de 15.78 horas con un rango entre 12 y 24 horas y la fase de metaestro presentó un promedio de 26 horas con un rango entre 16 y 36 horas.

Con respecto al fotoperiodo de días cortos (8:16) el ciclo estral del jerbo mostró una duración total promedio de 122.67 horas en un rango de entre 80 y 196 horas (3.33 y 8.16 días), la fase de proestro presentó una duración promedio de

16.22 en un rango de 12 y 28 horas, la duración promedio del estro fue de 18.22 con un rango de entre 12 y 32 horas, el metaestro mostró una duración promedio de 27.78 horas en un rango de entre 16 y 48 horas y para el diestro, el promedio fue de 122.67 horas con un rango entre 80 y 196 horas. Es importante mencionar que se observó en casi todos los jerbos un ciclo con un diestro especialmente largo, a pesar de que uno o dos fueran de duración “promedio”, lo que refiere a la irregularidad presentada en todos los individuos bajo este fotoperiodo.

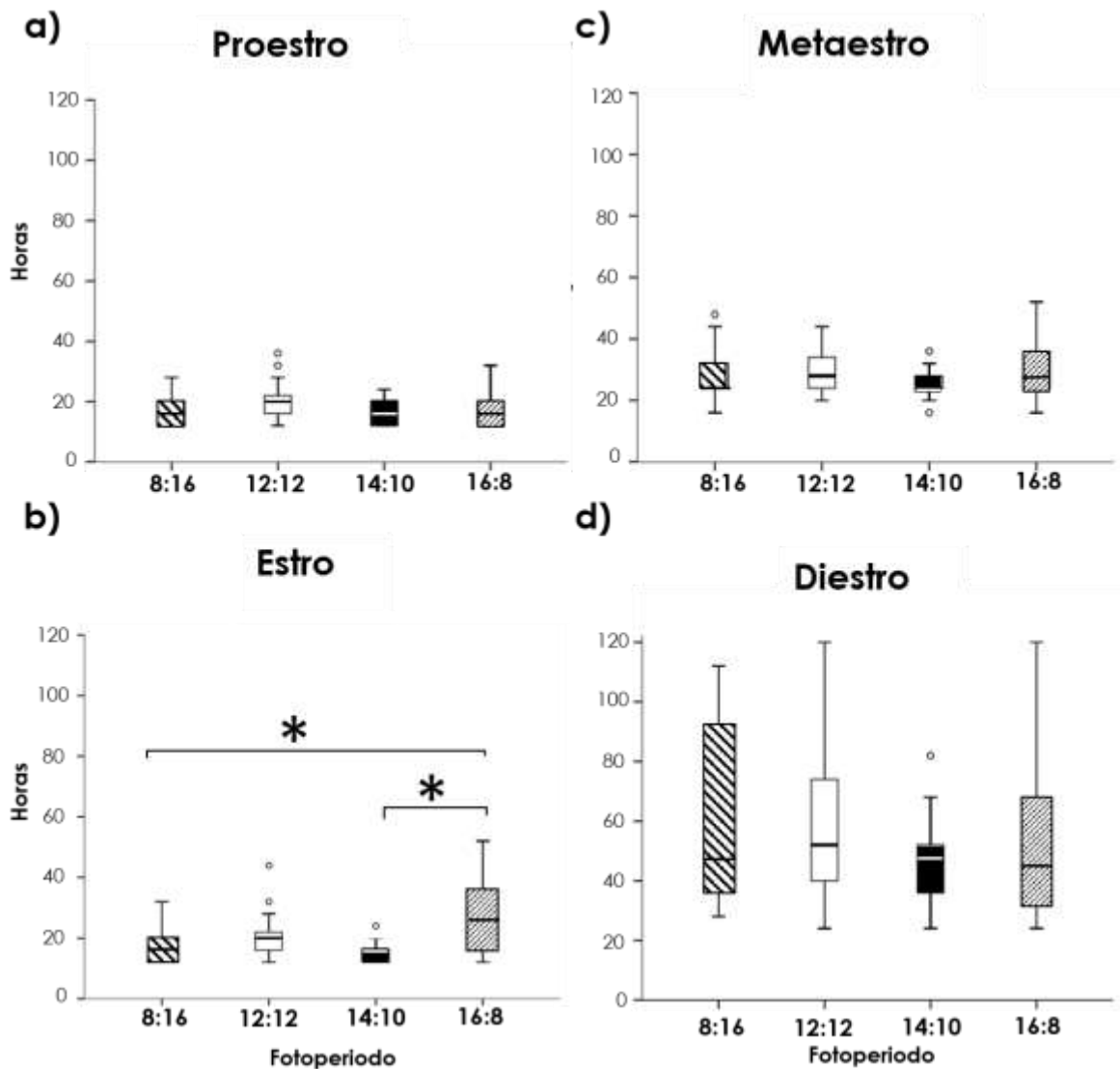


Figura 7. Comparación de la duración de cada una de las fases del ciclo estral en horas, entre los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10 y 16:8. * Presenta diferencias significativas, $p < 0.05$ U de Mann Whitney. ° Valor atípico.

En el fotoperiodo de días largos (16:8) el promedio de la duración total del ciclo fue de 128.67 horas (5.36 días) en un rango de entre 80 y 212 horas (3.33 y 8.83 días), para la fase de proestro el promedio fue de 17.56 horas con un rango entre 12 y 32 horas, el estro mostró una duración promedio de 17.56 horas en un rango de entre 12 y 52 horas, el metaestro tuvo un promedio de 30.44 en un rango de entre 16 y 52 horas, el cual es muy parecido al presentado por el estro y finalmente el diestro ostro un promedio de 53.11 horas con un rango entre 24 y 120 horas (1 y 5 días). En este fotoperiodo fue en el único en el cual se presentó un ciclo de casi 9 días en el cual tanto la fase de estro y diestro mostraron un alargamiento.

En la figura 7 se representa la duración de las fases en cada uno de los fotoperiodos analizados, el proestro ($H_3=5.28$, $p=0.15$) (a), metaestro ($H_3=1.69$, $p=0.63$) (c) y diestro ($H_3=0.89$, $p=0.82$) (d), así como la duración total del ciclo ($H_3=2.103$, $p=0.108$) (Figura 7), no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos fotoperiodos, sin embargo, la fase de estro ($H_3=10.16$, $p=0.02$) si presentó diferencias significativas entre los fotoperiodos 16:8 y 14:10 y 8:16 y 16:8 (b).

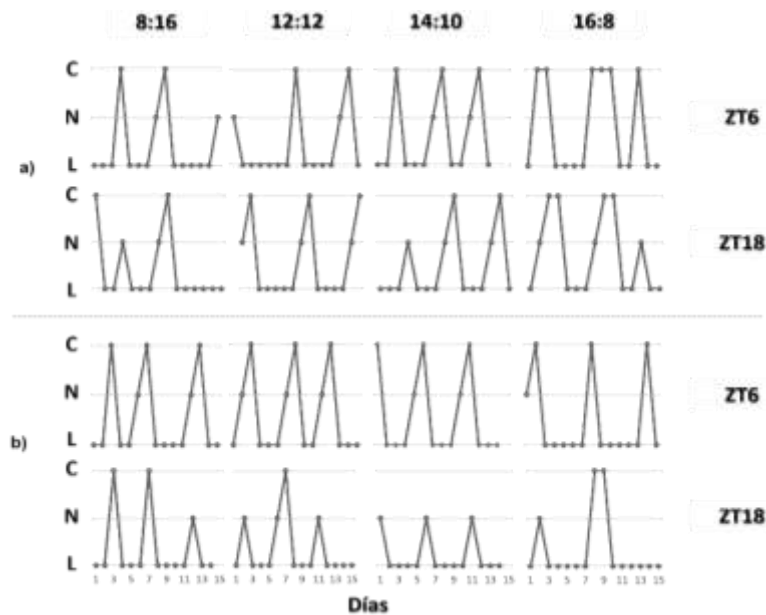


Figura 8. Representación gráfica del recambio de poblaciones celulares durante 15 días en la citología vaginal de Jerbo en ZT6 y ZT18. Cada gráfica representa a un individuo. Se presentan dos gráficas por individuo y dos individuos por fotoperiodo (a y b). C=Células cornificadas, N=Células epiteliales nucleadas, L=Leucocitos. Las fases metaestro y diestro se encuentran agrupadas en L, al ser la población de células dominantes en ambas fases.

En la figura 4 se representan las poblaciones celulares que dominan la citología vaginal en cada una de las fases, donde se puede apreciar la diferencia que existe en la irregularidad presente en los ciclos bajo los diferentes fotoperiodos, en donde tanto en 16:8, como en 8:16 y 12:12 las fases donde dominan los leucocitos (metaestro y diestro) se ven alargadas, sin embargo, solo en fotoperiodo 16:8 se observa, de manera adicional, un aumento en la duración de la fase de estro.

V.2. Establecimiento de fases

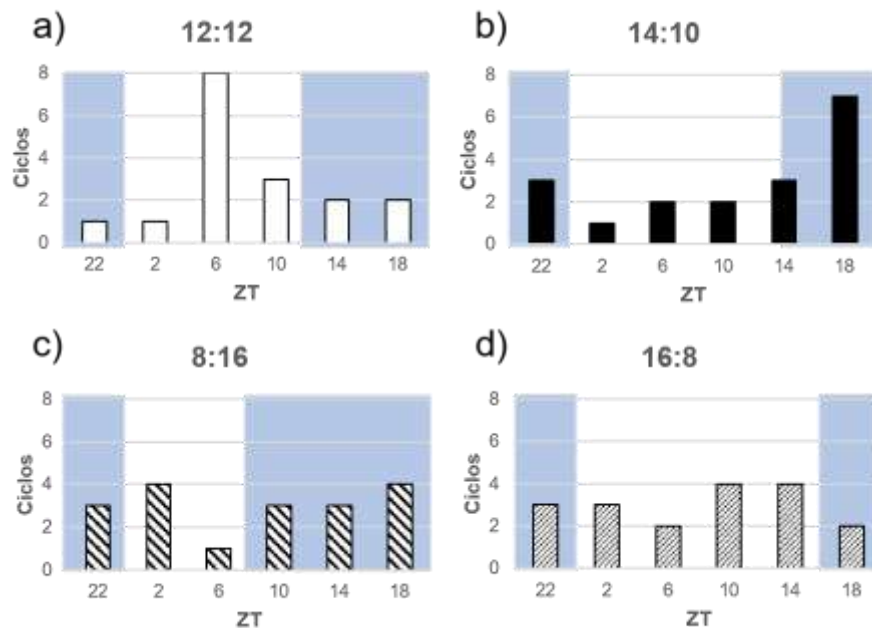


Figura 9. Se muestra la comparación temporal del ZT de establecimiento para la fase de proestro del ciclo estral de jerbo en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10, 16:8. Encendido de las luces en ZT0. La parte sombreada representa la fase de oscuridad, mientras que la blanca representa la fase de luz. N=24

En la figura 9 se puede observar la frecuencia de ZT de establecimiento de la fase del proestro, en la cual el ZT 6 es el más común con el fotoperiodo 12:12 (a), lo que corresponde a la mitad de la fotofase, mientras que para el fotoperiodo 14:10 este pareciera cambiar al ZT18 lo cual corresponde a cuatro horas después del apagado de las luces (b). Tanto en fotoperiodo corto, como en fotoperiodo largo hay una mayor variación en la hora de establecimiento de esta fase (c y d

respectivamente), sin embargo, en fotoperiodo corto parecería mostrar dos momentos de mayor incidencia, uno en ZT 2 y otro en ZT 18, mientras que en el fotoperiodo largo se presenta uno entre ZT10 y ZT14.

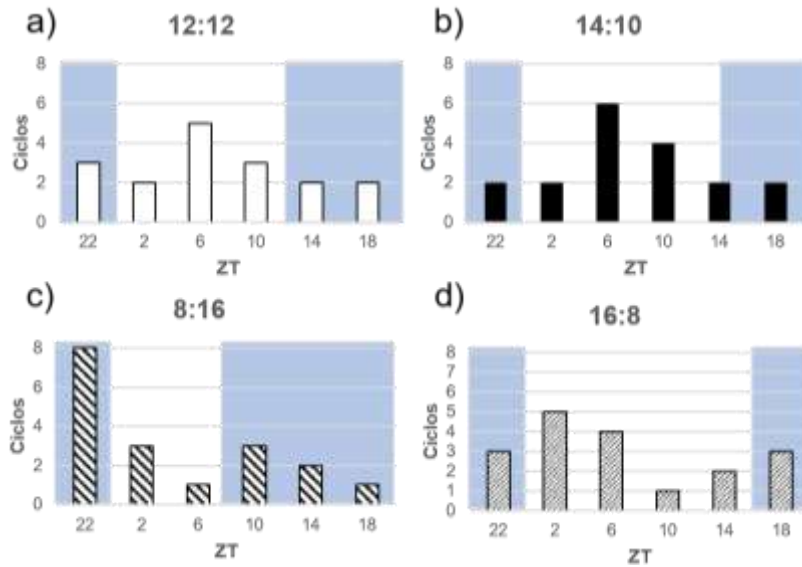


Figura 10. Se muestra la comparación temporal del ZT de establecimiento para la fase de estro del ciclo estral de jerbo en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10, 16:8. Encendido de las luces en ZT0. La parte sombreada representa la fase de oscuridad, mientras que la blanca representa la fase de luz. N=24.

En la figura 10 se puede observar la frecuencia de ZT de establecimiento de la fase del estro en los cuatro fotoperiodos, en la cual los fotoperiodos 12:12 y 14:10 (a y b) presentan un patrón bastante similar en el cual el ZT6 es el que presenta mayor frecuencia. En fotoperiodo corto se presenta el mayor número de ciclos con la fase establecida en ZT 22 (c) y en fotoperiodo largo el pico se da en ZT2 (d).

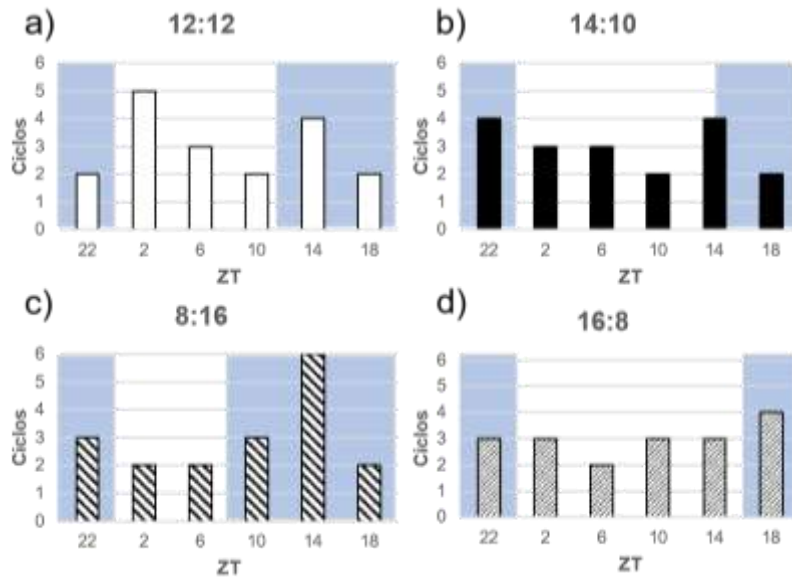


Figura 11. Se muestra la comparación temporal del ZT de establecimiento para la fase de metaestro del ciclo estral de jerbo en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10, 16:8. Encendido de las luces en ZT0. La parte sombreada representa la fase de oscuridad, mientras que la blanca representa la fase de luz. N=24.

En la fase de metaestro (Figura 11) en fotoperiodo 12:12 la mayoría de los ciclos se establecieron esta fase en el ZT 2 y muestra otro aumento de frecuencia de establecimiento en ZT14 que comparte con el fotoperiodo 14:10 y que en este último fotoperiodo es el ZT con mayor incidencia. En el fotoperiodo corto la mayoría de ciclos comenzaron esta fase en ZT14. En el fotoperiodo largo hay una mayor variación en el momento de inicio de la fase de metaestro, aunque pareciera haber un pequeño aumento de establecimiento en el ZT 18.

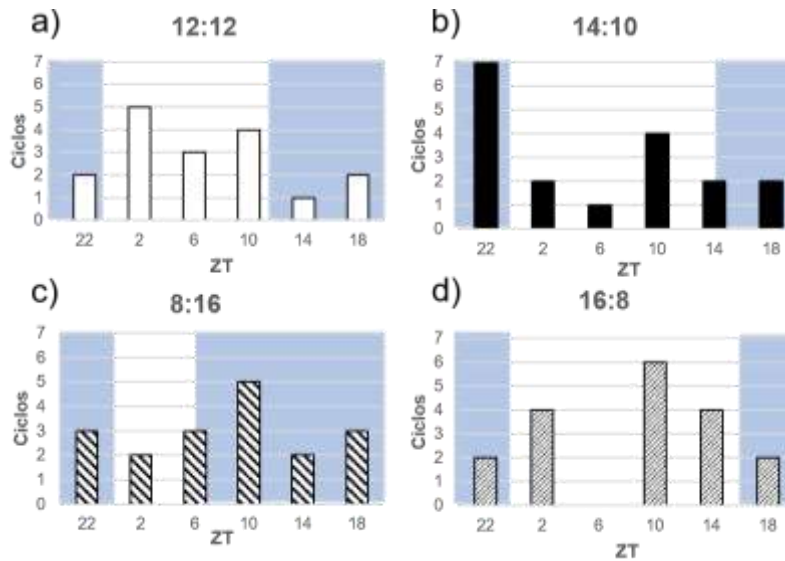


Figura 12. Se muestra la comparación temporal del ZT de establecimiento para la fase de diestro del ciclo estral de jerbo en los fotoperiodos 8:16, 12:12, 14:10, 16:8. Encendido de las luces en ZT0. La parte sombreada representa la fase de oscuridad, mientras que la blanca representa la fase de luz. N=24

En el diestro (Figura 12) se encontró que el fotoperiodo 12:12 muestra una mayor frecuencia del establecimiento de esta fase en el ZT2 (a), mientras que en el fotoperiodo 14:10 este se muestra en ZT22 (b). Tanto para el fotoperiodo corto como para el largo la mayor frecuencia de establecimiento coincide en el ZT10 (c y d respectivamente), sin embargo, el fotoperiodo largo presenta otro aumento de la frecuencia en el ZT2 y no se presentó ningún diestro que se estableciera en el ZT6.

V.3. Concentración plasmática de hormonas

Debido a la destacada regularidad de los ciclos en fotoperiodo 14:10, el análisis de las concentraciones hormonales ya no se llevó a cabo en fotoperiodo 12:12 y el fotoperiodo 14:10 se tomó como grupo control. Por lo tanto, se hicieron comparaciones intergrupos; donde se comparó misma fase y ZT de los fotoperiodos de días largos y cortos contra misma fase y ZT del fotoperiodo control y comparaciones intragrupos donde se compararon en un mismo fotoperiodo entre ZT y fase del ciclo. Las concentraciones obtenidas, se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 3. Concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona en los ZT7 y ZT19 en las fases de acrofase y batifase para estradiol y progesterona de las jervas en los fotoperiodos 14:10, 8:16 y 16:8.

Hormona	Fase del ciclo estral	Proestro		Estro		Diestro	
	Fotoperiodo/ZT	7	19	7	19	7	19
E2 (pg/ml)	14:10	22 ± 6	45 ± 41	-	-	21 ± 5	18 ± 4
	8:16	31 ± 9	19 ± 10	-	-	28 ± 16	17 ± 14
	16:08	18 ± 2	16 ± 4	-	-	16 ± 4	12 ± 3 ^c
P (ng/ml)	14:10	-	-	9 ± 4 ^{a,b,c}	2 ± 1 ^{a,c}	23 ± 6 ^{a,b,c}	2 ± 1 ^{a,c}
	8:16	-	-	6 ± 3 ^b	2 ± 1 ^c	50 ± 3 ^{a,b,c}	0.46 ± 0.29 ^a
	16:08	-	-	11 ± 4 ^{b,c}	6 ± 2	5 ± 3 ^{a,b}	4 ± 2 ^c

Se muestra media ± desviación estándar. * = Diferencias significativas con respecto a misma fase y ZT del fotoperiodo 14:10, $p < 0.05$ (intergrupos). a = Diferencias significativas con respecto a misma fase y diferente ZT del mismo fotoperiodo, $p < 0.05$ (intragrupos). b = Diferencias significativas con respecto a diferente fase y mismo ZT del mismo fotoperiodo, $p < 0.05$ (intragrupos). c = Diferencias significativas con respecto a diferente fase y diferente ZT del mismo fotoperiodo, $p < 0.05$ (intragrupos). - = no se llevó a cabo el análisis.

Como se muestra en la tabla 3, las concentraciones plasmáticas de estradiol, solo fueron diferentes en el fotoperiodo 16:8, siendo significativamente mayores en el ZT7 de proestro contra ZT19 de diestro ($p=0.004$), lo cual no difiere con lo esperado en un grupo control. Es importante mencionar que, aunque en fotoperiodo 14:10 se encontraron concentraciones elevadas de estradiol durante el proestro (como es de esperarse durante esta fase), estas mostraron una gran desviación estándar. Para el fotoperiodo 8:16, las concentraciones más altas también se encontraron en proestro, sin mostrar diferencias con la fase de diestro.

Con respecto a la progesterona, las concentraciones plasmáticas en los fotoperiodos 8:16 y 16:8 mostraron diferencias con respecto al control en el ZT7 de la fase de diestro, siendo que en 8:16, estas son significativamente mayores ($p=0.021$) y en 16:8 ($p=0.014$) menores. En las comparaciones intragrupos se encontró que en 14:10, en ZT7, las concentraciones son significativamente mayores que en ZT19 de estro ($p=0.032$) y diestro ($p=0.012$), pero, significativamente menores que en ZT7 de diestro ($p=0.000$); en ZT19 de estro las concentraciones

son menores significativamente con respecto a las de ZT7 de diestro ($p=0.000$) y en ZT 7 de diestro son mayores a ZT19 de la misma fase ($p=0.000$). En fotoperiodo 8:16 se encontraron diferencias solo en el ZT7 de la fase de diestro, la cual fue significativamente mayor con respecto todos los ZT y fases analizadas: ZT7 estro ($p=0.011$), ZT19 estro ($p=0.011$) y ZT19 diestro ($p=0.021$). En fotoperiodo 16:8, las concentraciones en ZT7 de estro fueron significativamente mayores a las de ZT 7 ($p=0.027$) y 19 de diestro ($p=0.001$), lo cual no es diferente a lo esperado en el grupo control.

VI. DISCUSION

De acuerdo a lo reportado en la bibliografía, el jerbo ha sido catalogado como un modelo con ciclo estral irregular y poco apropiado para estudios de reproducción por presentar ciclos estrales de entre 4 y 7 días con gran variabilidad (Barfield y Beeman, 1968, Nakane y Yoshimura, 2014), estos estudios fueron realizados en fotoperiodo 12:12 y coincide con lo encontrado en el presente trabajo bajo este fotoperiodo; sin embargo en el fotoperiodo 14:10, el cual es utilizado en una gran cantidad de los estudios de reproducción en diferentes modelos desde la descripción del periodo crítico de secreción de LH (Everett y Sawyer, 1950), los ciclos fueron regulares y de duración de entre 4 y 5 días.

En todos los fotoperiodos, los jerbos mostraron al menos un ciclo de 3 días lo que se considera corto dentro de la normalidad para los roedores pero que han sido descritos también en diferente proporción en varias especies de roedores, en las que se incluye la rata, el ratón y *Meriones tristrami* que pertenece al mismo género que el jerbo de Mongolia (Dewsbury *et al.*, 1977).

El que los ciclos reproductivos se alarguen, así como el que sean irregulares disminuye la probabilidad de lograr la fertilización en cada ciclo (fecundabilidad) (Fugo y Butcher, 1971, Jensen *et al.*, 1999). A pesar de que la tasa de ovulación no cambia, la tasa de implantación disminuye (Fugo y Butcher, 1971) y aumenta el porcentaje de anormalidades en el desarrollo (Fugo y Butcher, 1966, Butcher y Fugo, 1969). El que el jerbo sea regular en fotoperiodo 14:10, mientras que no lo sea en los otros fotoperiodos sugiere que este es un factor asociado al pico reproductivo circanual de esta especie en condiciones naturales.

A diferencia de otros roedores con reproducción estacional como el hámster que entran en anestro durante días cortos y dejan de reproducirse totalmente; en vida silvestre, el jerbo es capaz de reproducirse todo el año. Sin embargo, el número de crías que produce aumenta notablemente en dos épocas del año, el mayor se presenta en los meses de mayo y junio y aumenta una vez más pero con menor intensidad en los meses de agosto y septiembre (Clark *et al.*, 1986)). Estos meses corresponden a los meses con fotoperiodo de días largos. Como ya se mencionó, se ha reportado que tanto las hembras (Devries *et al.*, 1989) como los machos

(Gündüz 2002) de jerbo muestran fotoperiodismo reproductivo. El fotoperiodo L/O 14:10 es en el que se ha reportado el mayor desarrollo gonadal para esta especie (Gündüz y Karakas 2001) y coincide con la mayor regularidad de los ciclos estrales encontrados en el presente estudio.

Es importante notar que a pesar de que los ciclos se hacen irregulares bajo fotoperiodos tanto de días largos como de días cortos, los resultados muestran que esta irregularidad se debe al aumento en la duración de fases diferente. Mientras que para los fotoperiodos 12:12, 8:16 y 16:8 la duración de la fase de diestro aumenta considerablemente con respecto a 14:10, solamente en 16:8 se tiene un aumento significativo de la fase de estro. Exceptuando lo encontrado en 12:12, que es donde la rata Sprague Dawley presenta el mayor número de ciclos regulares, los resultados coinciden con lo descrito por Hoffman (1970) en la rata, ya que al aumentar las horas de luz aumentan los días del estro hasta generarse un estro persistente en luz constante; mientras que en el otro extremo los animales expuestos a oscuridad constante después de su maduración sexual, expresan un ciclo cada vez más largo, con un aumento de días de diestro hasta que eventualmente dejan de ciclar, mostrando un diestro vaginal (Hoffman, 1967).

Debido a la corta duración de algunas de las fases del ciclo estral que son menores a 24 horas (Goldman *et al.*, 2007), es de suma importancia monitorear el ciclo estral a la misma hora del día para tener resultados significativos, ésto es evidente al comparar los resultados del presente estudio en dos diferentes puntos temporales.

Las hormonas esteroides ováricas juegan un papel fundamental en la regulación de los eventos reproductivos, están involucradas en la regulación del desarrollo folicular y en el caso de los estrógenos, funcionan como una señal de la maduración folicular en el hipotálamico y son los responsables de estimular la secreción preovulatoria de GnRH/LH. Se ha descrito que en ciclos estrales irregulares, largos o ambos el patrón de estradiol a lo largo del ciclo presenta un adelanto de fase, acompañado de un retraso de fase en la ovulación, en comparación con ciclos regulares y cortos, por lo tanto, el estradiol permanece más tiempo en altas concentraciones (Page y Buthcher, 1982), esto nos sugiere una

desincronización en los eventos que regulan la fisiología reproductiva en la hembra que en este caso está desencadenada por el fotoperiodo.

Dentro de los factores que se relacionan con la disminución de fecundabilidad en los ciclos irregulares se ha propuesto la sobremaduración del ovocito (Fugo y Butcher, 1966), Esta nos refiere desincronización entre los eventos que ocurren a lo largo del eje, ya que sugiere que los eventos que ocurren a todo lo largo del eje reproductivo que de manera normal tienen que estar sincronizados entre sí, no lo están.

Por otro lado, los estudios sobre los efectos de la iluminación constante sobre el ciclo estral reportan la generación de un estro persistente debido a un aumento de estradiol sobre el umbral de cornificación vaginal, sin llegar al umbral hipotalámico que desencadena la ovulación (Takeo *et al.*, 1986), además de que disminuye el número de receptores a estradiol en el hipotálamo (Illei-Donhoffer *et al.*, 1974) y por lo tanto la sensibilidad a esta hormona sobre esta estructura.

Debido a lo anteriormente mencionado se esperaba que la concentración de E2 aumentara en fotoperiodo de días largos; inesperadamente, las concentraciones de esta hormona fueron similares al grupo control y a lo anteriormente reportado en fotoperiodo 14:10 (Lv y Shi, 2010), aunque debe mencionarse que en este trabajo solo se utilizó un punto temporal por día a diferencia del nuestro, por lo que es necesario continuar este tipo de mediciones, sobre todo en modelos no tradicionales. Debido a que solo se tomaron las muestras el primer día de cada fase no es posible saber si aumentó el periodo de secreción de E2, aunque el aumento de días de estro lo sugiere. Es importante recordar que el ciclo estral fue monitoreado a través de citología vaginal y a pesar de que ésta se considera un indicador del estado endocrino del individuo (Goldman *et al.*, 2007), ésta es regulada principalmente por los estrógenos que inducen a la proliferación y queratinización de las células del epitelio vaginal (Buchanan *et al.*, 1998) y la progesterona que modula esta respuesta. Ya que las concentraciones de estradiol no parecen estar alteradas, se sugiere que puede haber un aumento en la sensibilidad del epitelio vaginal a la queratinización por el estradiol, ocasionando el aumento de días de estro bajo este fotoperiodo. A pesar de que en el epitelio vaginal la modificación de

la sensibilidad a estrógenos no ha sido descrita, en hipotálamo se ha reportado una disminución en ésta, en diferentes especies, que presentan reproducción estacional o no (Illei-Donhoffer *et al.*, 1974).

En el fotoperiodo de días cortos, en el ZT7, la progesterona estaba elevada, en comparación con ZT19, con ZT7 y 19 de la fase de estro y con el mismo ZT y fase del fotoperiodo 14:10 y con lo anteriormente reportado (Lv y Shi, 2010). Este aumento en la concentración de progesterona ejerce un efecto inhibitorio sobre el hipotálamo, que puede alargar el ciclo estral mostrando un diestro vaginal. Por otro lado, se ha reportado que la concentración de melatonina en el ovario es mayor a las concentraciones séricas tanto en humanos (Ronnberg *et al.*, 1990), como en ratas, lo que sugiere un papel importante en la regulación de la fisiología ovárica (Tamura *et al.*, 2009). Entre los efectos que esta hormona ejerce en el ovario, es importante notar el que se ha reportado sobre la esteroidogénesis, ya que ejerce un efecto estimulante sobre la secreción de progesterona e inhibitorio sobre la de estradiol (Soares *et al.*, 2003).

En fotoperiodo de días cortos el periodo de secreción de melatonina es mayor que en 12:12, 14:10 y 16:8, en el hipotálamo del jerbo, ésta ejerce un papel inhibitorio ya que se ha reportado un efecto antigonadotrópico por esta hormona en esta especie (Devries *et al.*, 1989), sin inhibir el ciclo estral por completo, ya que esta especie se reproduce todo el año, pero muestra una disminución considerable en condiciones de días cortos (Clark *et al.*, 1986). La presencia de la melatonina por un periodo mayor sobre el ovario, puede estar estimulando el aumento de progesterona sérica encontrado en el presente estudio y, por lo tanto, al aumento de días de diestro. Resultados similares se han encontrado en ratas y ratones suplementados con melatonina, en donde el ciclo se alarga con una disminución de la fase de estro (Chu *et al.*, 1964, Bondi *et al.*, 2014, Negro-Lima *et al.*, 2015).

De acuerdo a Hoffman (1968), la longitud del ciclo estral está dada en función de dos factores: 1) La tasa de maduración de los folículos y 2) El umbral al cual los estrógenos generan el pico preovulatorio de LH, por lo que uno o ambos factores podrían estar siendo modificados por el fotoperiodo, generando irregularidad y alargamiento del ciclo tanto en fotoperiodos de días cortos como largos.

En rata se ha reportado que el fotoperiodo no cambia el periodo crítico de sensibilidad para generar el pico de LH descrito por Everett en 1950, tanto en fotoperiodo 14:10, como en 12:12 y 16:8, este se da alrededor de dos horas después de la mitad de la fotofase, independientemente del fotoperiodo (Hoffmann, 1969), esta ventana temporal está dada por el NSQ el cual al recibir la señal estrogénica suficiente, de manera directa o indirecta, estimula la liberación de GnRH-LH (Simonneaux *et al.*, 2017). Se ha descrito también que el pico de LH está relacionado con el inicio de actividad locomotriz (Moline *et al.*, 1981).

En el jerbo se ha reportado que el estro conductual inicia ligeramente más temprano que en la rata (Barfield y Breeman, 1968) y la ovulación se produce entre las 9 pm del día de proestro y la 1am del día de estro (Marston y Chang, 1966). El momento en el que se produce la fase de estro es de suma importancia debido a que es durante esta que se dará la receptividad de la hembra y la ovulación, para aumentar la probabilidad de que se lleve a cabo la cópula y con esta la fertilización, esta fase debe sincronizarse con la fase de actividad de la especie, por lo que, en la rata, que es un animal nocturno, su fase de receptividad se da en la noche.

En el presente estudio, se consideró como establecimiento de estro vaginal el primer ZT que mostrara en su totalidad células cornificadas. El establecimiento de esta fase en los fotoperiodos 12:12 y 14:10 se dio mayoritariamente en el ZT6 lo que corresponde para el fotoperiodo 12:12 a la mitad de la fotofase. En el fotoperiodo de días largos el establecimiento del estro se da con mayor frecuencia en ZT2 que se acerca más al encendido de las luces y en fotoperiodo de día corto la mayoría de las fases de estro se establecieron en el ZT22, el cual es dos horas antes del encendido de las luces. De acuerdo a Juárez-Tapia *et al.* (2015) el jerbo en fotoperiodo 12:12 exhibe actividad crepuscular, por lo que presenta dos acrofases de actividad en 24 horas, una cerca del encendido de las luces y otra cerca del apagado de estas, sin embargo, el que está cercano al encendido de las luces es más robusto y podría explicar los resultados encontrados en el presente estudio indicando así una sincronización de la actividad locomotriz con la fase de estro vaginal. De acuerdo a lo reportado por Juárez-Tapia, *et al.*, (2015) en fotoperiodo 16:8 este patrón crepuscular se vuelve más claro, pero con mayor

actividad en el pico cercano al apagado de las luces; sin embargo, el estro que están presentando los jerbos en este fotoperiodo parece corresponder al pico del encendido de las luces. Con respecto al fotoperiodo de días cortos los componentes que conforman la actividad bimodal del jerbo parecen estar distribuidos a lo largo del día, mostrando el pico cercano al apagado de las luces ligeramente marcado, esto podría en parte ser una de las razones por la cual el éxito reproductivo del jerbo disminuye en días cortos, reflejando parte de la desincronización de los eventos reproductivos que podrían estar siendo alterados por el fotoperiodo. En fotoperiodo 14:10 la actividad del jerbo también ha sido reportada como crepuscular, con un pico más evidente cercano al encendido de las luces (Weinert *et al.*, 2006) que podría indicar actividad cuando la jerbo esta en estro, de acuerdo a lo encontrado en el presente estudio.

En fotoperiodo 12:12, 14:10 y 16:8 parece probable que el ciclo de actividad locomotriz coincide, al menos en uno de sus picos con el estro, por lo que en caso de haber copula habría más probabilidades de haber fertilización si la ovulación ocurre entre el ZT2 y el ZT15 como fue reportado por Marston y Chang (1966), aunque desconocemos si esto está siendo modificado por el fotoperiodo.

Tanto los cambios en el establecimiento del estro, como la irregularidad del ciclo que están respondiendo al fotoperiodo nos sugiere una desincronización entre los eventos fisiológicos que podrían estar regulando el índice reproductivo que el jerbo de Mongolia expresa a lo largo del año. Para que el óptimo funcionamiento del eje reproductivo ocurra en el momento del año con condiciones óptimas para el desarrollo de las crías, este debe sincronizarse con las señales ambientales, por lo que el fotoperiodo está generando una desincronización al cambiar el patrón de secreción de melatonina o en la expresión de los genes reloj en cualquier parte del eje reproductivo y por una vía que no he quedado clara hasta ahora.

VII. CONCLUSIONES

El ciclo estral del jerbo es más regular en el fotoperiodo 14:10, ya que varía menos, en la duración total y en la de cada una de sus fases en comparación con el que se expresa en los otros fotoperiodos.

En los fotoperiodos largo y corto los ciclos son muy variables, es decir, irregulares y con una tendencia a ser más largos en comparación con el fotoperiodo control.

La fase de estró vaginal dura más en el fotoperiodo 16:8, pero no está relacionado con un aumento en la concentración plasmática de estradiol.

La fase de diestro dura más en los fotoperiodos 8:16 y 16:8. En 8:16 parece estar relacionada con un aumento en la concentración de progesterona en la fase de diestro.

La hora de establecimiento del estró vaginal presenta un patrón que se mantiene en los fotoperiodos 12:12 y 14:10 (ZT 6), que se acerca más al momento en que se encienden las luces (ZT2) al alargar las horas de luz, mientras que, al reducirlas, pasa a la fase de oscuridad (ZT22).

El fotoperiodo parece estar generando una desincronización de los eventos que regulan la expresión del ciclo estral.

VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

Fotoperiodo/Parámetro		Resultados obtenidos				
		12:12	14:10	8:16	16:8	
Duración del ciclo (días)		5±1	4±0.5	5±1.5	5±1.5	
Regularidad del ciclo		++	+++	-	-	
Citología vaginal (En comparación con 14:10)		=		D(↑)	E(↑), D(↑)	
Establecimiento de fases (ZT de máxima frecuencia)	P	ZT6	ZT18	=	=	
	E	ZT6	ZT6	ZT22	ZT2	
	M	ZT2	ZT14	ZT14	ZT18	
	D	ZT2	ZT22	ZT10	ZT10	
Concentraciones plasmáticas de E2 (En comparación con el mismo ZT y fase de 14:10)	P	ZT7		=	=	
		ZT19		=	=	
	D	ZT7		=	=	
		ZT19		=	=	
Concentraciones plasmáticas de P4 (En comparación con el mismo ZT y fase de 14:10)	E	ZT7		=	=	
		ZT19		=	=	
	D	ZT7		=	↑	↓
		ZT19		=	=	=

Tabla 4. Se muestra el resumen de los resultados encontrados en el presente estudio. +++=muy regular ++=regular - = irregular. P=Proestro. E=Estro. M=Metaestro. D=Diestro. ↑=Aumento. ↓=disminución.

IX. ANEXOS

Tabla 5. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene. *Presenta diferencias significativas, $p < 0.05$

Variable dependiente	Fotoperiodo (I)	Fotoperiodo (J)	Estadístico de Levene	p
Ciclo estral	8:16	12:12	1.969	0.170
		14:10	24.505	0.000*
		16:8	0.381	0.541
	12:12	8:16	1.969	0.170
		14:10	10.153	0.003*
		16:8	0.610	0.441
	14:10	8:16	24.505	0.000*
		12:12	10.153	0.003*
		16:8	16.533	0.000*
	16:8	8:16	0.381	0.541
		12:12	0.610	0.441
		14:10	16.533	0.000*
Proestro	8:16	12:12	1.575	0.218
		14:10	0.099	0.755
		16:8	1.444	0.238
	12:12	8:16	1.575	0.218
		14:10	1.300	0.262
		16:8	0.039	0.845
	14:10	8:16	0.099	0.755
		12:12	1.300	0.262
		16:8	1.171	0.287
	16:8	8:16	1.444	0.238
		12:12	0.039	0.845
		14:10	1.171	0.287
Estro	8:16	12:12	0.122	0.729
		14:10	7.045	0.012*
		16:8	8.587	0.006*
	12:12	8:16	0.122	0.729
		14:10	5.415	0.026*
		16:8	5.063	0.031*

Variable dependiente	Fotoperiodo (I)	Fotoperiodo (J)	Estadístico de Levene	p
Estro	14:10	8:16	7.045	0.012*
		12:12	5.415	0.026*
		16:8	25.607	0.000*
	16:8	8:16	8.587	0.006*
		12:12	5.063	0.031*
		14:10	25.607	0.000*
Metaastro	8:16	12:12	0.373	0.546
		14:10	3.697	0.063
		16:8	0.594	0.446
	12:12	8:16	0.373	0.546
		14:10	1.633	0.210
		16:8	2.002	0.166
	14:10	8:16	3.697	0.063
		12:12	1.633	0.210
		16:8	8.327	0.007*
	16:8	8:16	0.594	0.446
		12:12	2.002	0.166
		14:10	8.327	0.007*
Diestro	8:16	12:12	0.440	0.512
		14:10	16.189	0.000*
		16:8	0.559	0.460
	12:12	8:16	0.440	0.512
		14:10	7.275	0.011*
		16:8	0.000	1.000
	14:10	8:16	16.189	0.000*
		12:12	7.275	0.011*
		16:8	10.138	0.003*
	16:8	8:16	0.559	0.460
		12:12	0.000	1.000
		14:10	10.138	0.003*

Tabla 6. Valores de la prueba Kruskal Wallis que compara la concentración de estradiol y progesterona entre los diferentes fotoperiodos, fases y ZT. *Presenta diferencias significativas, $p < 0.05$.

	X²	P
Estradiol	24.918	0.009*
Progesterona	50.95	0.000*

Tabla 7. Valores de la prueba U de Mann Whitney que compara la concentración de estradiol entre las diferentes fases y ZT en un mismo fotoperiodo (Comparaciones intragrupo). *Presenta diferencias significativas, $p < 0.05$.

Variable dependiente	Fotoperiodo	Fase/ZT (I)	Fase/ZT (J)	p
Estradiol	8:16	Proestro/7	Proestro/19	0.109
			Diestro/7	0.631
			Diestro/19	0.150
		Proestro/19	Proestro/7	0.109
			Diestro/7	0.262
			Diestro/19	0.631
		Diestro/7	Proestro/7	0.631
			Proestro/19	0.262
			Diestro/19	0.109
		Diestro/19	Proestro/7	0.150
			Proestro/19	0.631
			Diestro/7	0.109
	14:10	Proestro/7	Proestro/19	0.123
			Diestro/7	0.754
			Diestro/19	0.201
		Proestro/19	Proestro/7	0.123
			Diestro/7	0.697
			Diestro/19	0.241
Diestro/7	Proestro/7	0.754		

Variable dependiente	Fotoperiodo	Fase/ZT (I)	Fase/ZT (J)	p
Estradiol	14:10	Diestro/7	Proestro/19	0.697
			Diestro/19	0.465
		Diestro/19	Proestro/7	0.201
			Proestro/19	0.241
			Diestro/7	0.465
		16:8	Proestro/7	Proestro/19
	Diestro/7			0.286
	Diestro/19			0.004*
	Proestro/19		Proestro/7	0.687
			Diestro/7	1.000
			Diestro/19	0.054
	Diestro/7		Proestro/7	0.286
			Proestro/19	1.000
			Diestro/19	0.087
	Diestro/19		Proestro/7	0.004*
			Proestro/19	0.054
			Diestro/7	0.087

Tabla 8. Valores de la prueba U de Mann Withney que compara la concentración de progesterona entre las diferentes fases y ZT en un mismo fotoperiodo (Comparaciones intragrupo). *Presenta diferencias significativas, $p < 0.05$.

Variable dependiente	Fotoperiodo	Fase/ZT (I)	Fase/ZT (J)	p
Progesterona	8:16	Estro/7	Estro/19	1.000
			Diestro/7	0.011*
			Diestro/19	0.270
		Estro/19	Estro/7	1.000
			Diestro/7	0.011*
			Diestro/19	0.270
		Diestro/7	Estro/7	0.011*
			Estro/19	0.011*

Variable dependiente	Fotoperiodo	Fase/ZT (I)	Fase/ZT (J)	p	
Progesterona		Diestro/7	Diestro/19	0.021*	
		Diestro/19	Estro/7	1.000	
			Estro/19	1.000	
			Diestro/7	0.021*	
		14:10	Estro/7	Estro/19	0.032*
				Diestro/7	0.000*
				Diestro/19	0.012*
			Estro/19	Estro/7	0.032*
				Diestro/7	0.000*
	Diestro/19			0.475	
	Diestro/7		Estro/7	0.000*	
			Estro/19	0.000*	
			Diestro/19	0.000*	
	Diestro/19		Estro/7	0.012*	
			Estro/19	0.475	
			Diestro/7	0.000*	
	16:8		Estro/7	Estro/19	0.149
				Diestro/7	0.027*
				Diestro/19	0.001*
		Estro/19	Estro/7	0.149	
			Diestro/7	0.361	
			Diestro/19	1.000	
		Diestro/7	Estro/7	0.027*	
			Estro/19	0.361	
			Diestro/19	0.584	
		Diestro/19	Estro/7	0.001*	
			Estro/19	1.000	
			Diestro/7	0.584	

Tabla 9. Valores de la prueba U de Mann Whitney que compara la concentración de estradiol entre los fotoperiodos 8:16 y 16:8 con 14:10 en la misma fase y ZT (Comparaciones intergrupo). *Presenta diferencias significativas, $p < 0.05$.

Variable dependiente	Fotoperiodo (I)	Fase/ZT	Fotoperiodo (J)	p
Estradiol	14:10	Proestro/7	8:16	0.520
			16:8	0.100
		Proestro/19	8:16	0.300
			16:8	0.122
		Diestro/7	8:16	0.855
			16:8	0.221
		Diestro/19	8:16	0.865
			16:8	1.000

Tabla 10. Valores de la prueba U de Mann Whitney que compara la concentración de estradiol entre los fotoperiodos 8:16 y 16:8 con 14:10 en la misma fase y ZT (Comparaciones intergrupo). *Presenta diferencias significativas, $p < 0.05$.

Variable dependiente	Fotoperiodo (I)	Fase/ZT	Fotoperiodo (J)	P
Progesterona	14:10	Estro/7	8:16	0.109
			16:8	0.262
		Estro/19	8:16	0.475
			16:8	1.000
		Diestro/7	8:16	0.021*
			16:8	0.014*
		Diestro/19	8:16	1.000
			16:8	1.000

X. BIBLIOGRAFÍA

- AGREN, G., ZHOU, Q. & ZHONG, W. 1989. Ecology and social behaviour of Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*, at Xilinhot, Inner Mongolia, China. *Animal Behavior*, 37, 11-27.
- ALBRECHT, U. & EICHELE, G. 2003. The mammalian circadian clock. *Current Opinions in Genetics and Development*, 13, 271-277.
- ALMEIDA, C. C. D., PINNEIRO, P. F., SEGATELLI, T. M. & MARTINEZ, M. 2001. Estrous cycle, anatomy and histology of the uterine tube of the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Revista chilena de anatomía*, 19.
- ALVAREZ, J. D., HANSEN, A., ORD, T., BEBAS, P., CHAPPELL, P. E., GIEBULTOWICZ, J. M., WILLIAMS, C., MOSS, S. & SEHGAL, A. 2008. The circadian clock protein BMAL1 is necessary for fertility and proper testosterone production in mice. *Journal of Biological Rhythms*, 23, 26-36.
- ANCEL, C., BENTSEN, A. H., SÉBERT, M. E., TENA-SEMPERE, M., MIKKELSEN, J. D. & SIMONNEAUX, V. 2012. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology*, 153, 1352–1363.
- ATTARCHI, M., DARKHI, H., KASHANIAN, M., KHODARAHMIAN, M., DOLATI, M., GHAFFARI, M., MIRZAMOHAMMADI, E. & MOHA, S. 2013. Characteristics of Menstrual Cycle in Shift Workers. *Global Journal of Health Science*, 3, 163-172.
- BARFIELD, M. A. & BEEMAN, E. A. 1968. The oestrus cycle in the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17, 247-251.
- BODEN, M. J., VARCOE, T. J., VOULTSIOS, A. & KENNAWAY, D. J. 2010. Reproductive biology of female Bmal1 null mice. *Reproduction*, 139, 1077–1090.
- BONDI, C. D., ALONSO-GONZALEZ, C., CLAFSHENKEL, W. P., KOTLARCZYK, M. P., DODDA, B. R., SANCHEZ-BARCELO, E., DAVIS, V. L. & WITTENDER, P. A. 2014. The effect of estradiol, progesterone, and melatonin on estrous cycling and ovarian aromatase expression in intact female mice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 174, 80–85.
- BROWN-GRANT, K. & RAISMAN, G. 1977. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proceedings B*, 198.
- BUCHANAN, D. L., KURITA, T., TAYLOR, J. A., LUBAHN, D. B., CUNHA, G. R. & COOKE, P. S. 1998. Role of Stromal and Epithelial Estrogen Receptors in Vaginal Epithelial Proliferation, Stratification, and Cornification. *Endocrinology*, 139, 4345 - 4352.
- BUTCHER, R. L. & FUGO, N. W. 1969. Overripeness and the mammalian ova. III. Fetal development at midgestation and at term. *Fertility and Sterility*, 20, 223-231.

- CALIGIONI, C. S. 2009. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*, Appendix 4, Appendix 4I.
- CAMPBELL, C. S., RYAN, K. D. & SCHWARTZ, N. B. 1976. Estrous cycles in the mouse: Relative influence of continuous light and the presence of a male. *Biology of Reproduction*, 14, 292-299.
- CLARK, M. M., SPENCER, C. A. & BENNETT, G. G. 1986. Reproductive life history correlates of early and late sexual maturation in female Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Animal Behaviour*, 34, 551-560.
- CLARKSON, J., D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X., COLLEDGE, W. H., CARATY, A. & HERBISON, A. E. 2009. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 21, 673–682.
- COELHO, L. A., PERES, R., AMARAL, F. G., REITER, R. J. & CIPOLLA-NETO, J. 2015. Daily differential expression of melatonin-related genes and clock genes in rat cumulus–oocyte complex: changes after pinealectomy. *Journal of Pineal Research*, 58, 490-499.
- COOMANS, C. P., RAMKISOENSING, A. & MEIJER, J. H. 2015. The suprachiasmatic nuclei as a seasonal clock. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37, 29-42.
- CHEN, H., CHU, G., ZHA, L., YAMAUCHI, N., HASHIMOTO, S. & HATTORI, M. 2012. Rev-erba regulates circadian rhythms and StAR expression in rat granulosa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420, 374-379.
- CHEN, H., ZHAO, L., CHU, G., KI, G., HASHIMOTO, S. & HATTORI, M. 2013. FSH induces the development of circadian clockwork in rat granulosa cells via a gap junction protein Cx43-dependent pathway. *Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 67, E566–E575,.
- CHEN, H., ZHAO, L., KUMAZAWA, M., YAMAUCHI, N., SHIGEYOSHI, Y., HASHIMOTO, S. & HATTORI, M. 2013b. Downregulation of core clock gene *Bmal1* attenuates expression of progesterone and prostaglandin biosynthesis-related genes in rat luteinizing granulosa cells. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 304, C1131–C1140.
- CHRISTIAN, C. A., MOBLEY, J. L. & MOENTER, S. M. 2005. Diurnal and estradiol-dependent changes in gonadotropin-releasing hormone neuron firing activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 15682-15687.
- CHRISTIAN, C. A. & MOENTER, S. M. 2010. The neurobiology of preovulatory and estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surges. *Endocrine Reviews*, 31, 544–577.
- CHU, E. W., WURTMAN, R. J. & AXELROD, J. 1964. An inhibitory effect of melatonin on the estrous phase of the estrous cycle of the rodent. *Endocrinology* 75, 238-242.
- DARDENTE, H., LOMET, D., ROBERT, V., DECOURT, C., BELTRAMO, M. & PELLICER-RUBIO, M. T. 2016. Seasonal breeding in mammals: From basic science to applications and back. *Theriogenology*, 86, 324–332.

- DARDENTE, H., WYSE, C. A., BIRNIE, M. J., DUPRE, S. M., LOUDON, A. S., L., LINCOLN, G. A. & HAZLERIGG, D. G. 2010. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Current Biology* 20, 2193–2198.
- DE ROUX, N., GENIN, E., CAREL, J. C., MATSUDA, F., CHAUSSAIN, J. L. & MILGROM, E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 10972–10976.
- DEVRIES, M. J., FERREIRA AND J. DAVI, S. A. & GLASS, J. D. 1989. Evidence that short photoperiod-induced gonadal regression in the mongolian gerbil is mediated by the action of melatonin in the medial hypothalamus. *Brain Research*, 494, 241 - 246.
- DEWSBURY, D. A., ESTEP, D. Q. & LANIER, D. L. 1977. Estrous cycles of nine species of murid rodents. *Journal of Mammalogy*, 58, 89 - 92.
- DURÁN HERNÁNDEZ, P., MIÑANA SOLIS, M. C. & FUENTES CANO, M. A. 2013. Ritmos biológicos, cronobiología y corteza prefrontal. *En: HERNÁNDEZ GONZALEZ, M., CHACÓN GUTIERREZ, L., A., B. B. J. & GUEVARA PEREZ, M. A. (eds.) Corteza prefrontal: cognición y conducta.* Ciudad de México.
- ELWOOD, R. W. & BROOM, D. M. 1987. The influence of litter size and parental behaviour on the development of mongolian gerbil pups. *Animal Behaviour*, 26, 438 - 454.
- EVERETT, J. W. 1944. Evidence in the normal albino rat that progesterone facilitates ovulation and corpus-luteum formation *Endocrinology*, 34, 136-137.
- EVERETT, J. W. & SAWYER, C. H. 1950. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*, 47, 198-218.
- FAHRENKRUG, J., GEORG, B., HANNIBAL, J., HINDERSSON, P. & GRÄS, S. 2006. Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology*, 147, 3769–3776.
- FOLLETT, B. K. 2015. "Seasonal changes in the neuroendocrine system": Some reflections. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 37, 3 - 12.
- FREEMAN, M. E. 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Florida: Elsevier. pp. 2327-2388
- FUGO, N. W. & BUTCHER, R. L. 1966. Overripeness and the mammalian ova. I. Overripeness and early embryonic development. *Fertility and Sterility*, 17, 804-814.
- FUGO, N. W. & BUTCHER, R. L. 1971. Effects of prolonged estrous cycles on reproduction in aged rats. *Fertility and Sterility*, 22, 98-101.
- GALAND, P., LEROY, F. & CHRÉTIEN, J. 1971. Effect of oestradiol on cell proliferation and histological changes in the uterus and vagina of mice. *Journal of Endocrinology*, 49, 243-252.
- GOLDMAN, J. M., MURR, A. S. & COOPER, R. L. 2007. The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research*, 80, 84-97.

- GRÄS , S., GEORG , B., JØRGENSEN , H. L. & FAHRENKRUG, J. 2012. Expression of the clock genes *Per1* and *Bmal1* during follicle development in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation and hypophysectomy. *Cell Tissue Research*, 350, 539–548.
- GÜNDÜZ , B. 2002. Effects of photoperiod and temperature on growth and reproductive organ mass in adult male mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*. *Turkish Journal of Biology*, 26, 77-82.
- GÜNDÜZ, B. & KARAKAS , A. 2001. Photoperiodic control of testis activity in mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *The Sciences*, 1, 121 - 124.
- HAMILTON, K. J., ARAO, Y. & KORACH, K. S. 2014. Estrogen hormone physiology: Reproductive findings from estrogen receptor mutant mice. *Reproductive Biology*, 14, 3–8.
- HANNIBAL, J. 2002. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Research* 309, 73-88.
- HE, C., MA, T., SHI, J., ZHANG, Z., WANG, J., ZHU, K., LI, Y., YANG, M., SONG, Y. & LIU, G. 2016. Melatonin and its receptor MT1 are involved in the downstream reaction to luteinizing hormone and participate in the regulation of luteinization in different species. *J Pineal Res*, 61, 279-90.
- HE , P., HIRATA , M., YAMAUCHI, N., HASHIMOTO , S. & HATTORI, M. 2007. Gonadotropic regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 302, 111-118.
- HENNINGSEN, J. B., ANCEL, C., MIKKELSEN, J. D., GAUER, F. & SIMONNEAUX, V. 2017. Roles of RFRP-3 in the daily and seasonal regulation of reproductive activity in female syrian hamsters. *Endocrinology*, 158, 652–663.
- HERBISON, A. E. & THEODOSIS, D. 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, 283-298.
- HOFFMAN, J. C. 1967. Effects of light deprivation on the rat estrous cycle. *Neuroendocrinology*, 2, 1-10.
- HOFFMAN, J. C. 1968. Effect of photoperiod on estrous cycle length in the rat. *Endocrinology* 83, 1355-1358.
- HOFFMAN, J. C. 1970. Light and reproduction in the rat: Effects of photoperiod length on albino rats from two different breeders. *Biology of Reproduction*, 2, 255-261.
- HOFFMANN, J. C. 1969. Light and reproduction in the rat: effect of lighting schedule on ovulation blockade. *Biology of Reproduction*, 1, 185-188.
- ILLEI-DONHOFFER, A., FLERKÓ, B. & MESS, B. 1974. Reduction of estradiol-binding capacity of neural target tissues in light-sterilized rats. *Neuroendocrinology*, 14, 187-194.
- JANVIER LABS. 2013. Jerbil (*Meriones unguiculatus*). USA: janvierlabs.com
- JENSEN, T. K., SCHEIKE, T., KEIDING, N., SCHAUMBURG, I. & GRANDJEAN, P. 1999. Fecundability in relation to body mass and menstrual cycle patterns. *Epidemiology*, 10, 422-428.
- JOHNSTON, J. D., EBLING, F. J. P. & HAZLERIGG, G. 2005. Photoperiod regulates multiple gene expression in the suprachiasmatic nuclei and pars

- tuberalis of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*). *European Journal of Neuroscience*, 21, 2967–2974.
- JOHNSTON, J. D. & SKENE, S. J. 2015. Regulation of mammalian neuroendocrine physiology and rhythms by melatonin. *Journal of Endocrinology*, 226, T187 - T198.
- JUÁREZ-TAPIA, C. R., TORRES-MENDOZA, D., DURÁN, P. & MIRANDA-ANAYA, M. 2015. Short-day photoperiod disrupts daily activity and facilitates anxiety–depressive behaviours in gerbil *Meriones unguiculatus*. *Biological Rhythm Research*, 46, 919-927.
- KARAKAS, A. & GÜNDÜZ, B. 2002. Effect of different photoperiods on gonadal maintenance and development in mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Zoological Science*, 19, 233 - 239.
- KARMAN, B. N. & TISCHKAU, S. A. 2006. Circadian clock gene expression in the ovary: effects of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, 75, 624-632.
- KENAWAY, D. J., BODEN, M. J. & VARCOE, T. J. 2012. Circadian rhythms and fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349, 56 - 61.
- KENT, G. C., RIDGWAY, P. M. & STROBEL, E. F. 1968. Continual light and constant estrus in hamsters. *Endocrinology*, 82, 699-703.
- KOUKKARI, W. L. & SOTHERN, R. 2006. *Introducing Biological Rhythms*, USA, Springer.
- KREGE, J. H., HODGIN, J. B., COUSE, J. F., ENMARKS, E., WARNER, M., MAHLER, J. F., SAR, M., KOR, K. S., GUSTAFSSON, J.-A. & SMITHIES, O. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor b. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 15677–15682.
- KRIEGSFELD, L. J., MEI, D. F., BENTLEY, G. E., UBUKA, T., MASON, A. O., INOUE, K., UKENA, K., TSUTSUI, K. & SILVER, R. 2005. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 2410–2415.
- LAWSON, C. C., WHELAN, E. A., LIVIDOTI HIBERT, E. N., SPIEGELMAN, D., SCHERNHAMMER, E. S. & RICH-EDWARDS, J. W. 2011. Rotating shift work and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology*, 22, 305-312.
- LEGAN, S. J. & KARSCH, F. J. 1975. A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology*, 96, 57-62.
- LEHMAN, M. N., SILVER, R., GLADSTONE, W. R., KAHN, R. M., GIBSON, M. & BITTMAN, E. L. 1987. Circadian rhythmicity restores by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience*, 7, 1626-1638.
- LUBAHN, D. B., MOYER, J. S., GOLDING, T. S., COUSE, J. F., KORACH, K. S. & SMITHIES, O. 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 11162-11166.
- LV, X. H. & SHI, D. Z. 2010. Variation of serum estradiol and progesterone levels during consecutive reproductive states in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Experimental Animals*, 59, 231-237.

- MALPAUX, B., MIGAUD, M., TRICOIRE, H. & CHEMINEAU, P. 2001. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 336-347.
- MARSTON, J. H. & CHANG, M. C. 1966. The morphology and timing of fertilization and early cleavage in the Mongolian gerbil and Deer mouse. *Journal of Embryology & Experimental Morphology*, 15, 169-191.
- MESSAGER, S., CHATZIDAKI, E. E., MA, D., HENDRICK, A. G., ZAHN, D., DIXON, J., THRESHE, R. R., MALINGE, I., LOMET, D., CARLTON, M. B. L., COLLEDGE, W. H., CARATY, A. & APARICIO, S. A. J. R. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1761–1766.
- MEYER-BERNSTEIN, E. L., JETTON, A. E., MATSUMOTO, S., MARKUNSI, J. F., LEHMAN, M. N. & BITTMAN, E. L. 1999. Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology*, 140, 207-218.
- MILLER, B. H., OLSON, S. L., TUREK, F. W., LEVINE, J. E. & HORTON, T. H. 2004. Circadian Clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Current Biology*, 14, 1367–1373.
- MILLER, B. H. & TAKAHASHI, J. S. 2014. Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 1-8.
- MOLINE, M. L., ALBERS, H. E., TODD, R. B. & MOORE-EDE, M. C. 1981. Light-dark entrainment of proestrous LH surges and circadian locomotor activity in female hamster. *Hormones and Behavior* 15, 451-458.
- MOLNÁR, C. S., KALLÓ, I., LIPOSITS, Z. & HRABOVSKY, E. 2011. Estradiol down-regulates RF-Amide-Related Peptide (RFRP) expression in the mouse hypothalamus. *Endocrinology*, 152, 1684–1690.
- MURPHY, B. A., BLAKE, C. M., BROWN, J. A., MARTIN, A. M., FORDE, N., SWEENEY, L. M. & EVANS, A. C. O. 2015. Evidence of a molecular clock in the ovine ovary and the influence of photoperiod. *Theriogenology*, 84, 208–216.
- NAKANE, Y. & YOSHIMURA, T. 2014. Universality and diversity in the signal transduction pathway that regulates seasonal reproduction in vertebrates. *Frontiers in Neurosciences*, 8, 1 - 7.
- NEGRO-LIMA, G., MAGANHIN, C. C., SANTOS SIMO, R., PINHEIRO-BARACAT, M. C., RODRIGUES DA SILVA SASSO, G., PORTUGAL-FUCHS, L. F., SIMOES, M. D. J., CHADA BARACAT, E. & SOARES, J. M. 2015. Steroidogenesis-related gene expression in the rat ovary exposed to melatonin supplementation. *Clinics*, 70, 144-151.
- NISHINO, N. & TOTSUKAWA, K. 1996. Study on the estrous cycle in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Experimental Animals*, 45, 283-288.
- NORRIS, M. L. & ADAMS, C. E. 1974. Sexual Development in the Mongolian Gerbil, *Meriones unguiculatus*, with Particular Reference to the Ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 76, 245 - 248.

- NORRIS, M. L. & ADAMS, C. E. 1981. Mating Post Partum and Length of Gestation in the Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Laboratory Animals*, 15, 189 - 191.
- PACCOLA, C. C., RESENDE, G. C., STUMPP, T., MIRAGLIA, S. M. & CIPRIANO, I. 2013. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal reproduction*, 10, 677-683.
- PAGE, R. D. & BUTCHER, R. L. 1982. Follicular and plasma patterns of steroids in young and old rats during normal and prolonged estrous cycles. *Biology of Reproduction*, 27, 383-392
- PANGAS, S. A. & RAJKOVIC, A. 2015. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. In: PLANT, T. M. & ZELEZNIK, A. J. (eds.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 4th ed. USA: Elsevier.
- PARK, O. K., GUGNEJA, S. & MAYO, K. E. 1990. Gonadotropin-releasing hormone gene expression during the rat estrous cycle: effects of pentobarbital and ovarian steroids. *Endocrinology*, 127, 365-72.
- PARKES, A. S. & BELLERBY, C. W. 1927. Studies on the internal secretions of the ovary. V. The oestrus-inhibiting function of the corpus luteum. *Journal of Physiology*, 64, 233-245.
- PARTCH, C. L., GREEN, C. B. & TAKAHASHI, J. S. 2014. Molecular architecture of the mammalian clock. *Trends in Cell Biology*, 24, 90-99.
- PAYMAN, B. C. & SWANSON, H. H. 1980. Social Influence on Sexual Maturation and Breeding in the Female Mongolian Gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Animal Behaviour*, 28, 528 - 535.
- PEERAER, K., D'HOOGHE, T., LAURENT, P., PELCKMANS, S., DELVIGNE, A., LAENEN, A., WELKENHUYSEN, M., WYNS, C. & DE NEUBOURG, D. 2016. Impact of luteal phase support with vaginal progesterone on the clinical pregnancy rate in intrauterine insemination cycles stimulated with gonadotropins: a randomized multicenter study. *Fertility and Sterility*, 106, 1490–1495.
- PIETREWITZ, A., HOFF, M. & HIGGINS, S. 1982. Activity Rhythms in the Mongolian Gerbil under Natural Light Conditions. *Physiology & Behavior*, 29, 377-380.
- PILORZ, V. & STEINLECHNER, S. 2008. Low Reproductive Success in *Per1* and *Per2* Mutant Mouse Females Due to Accelerated Ageing? *Reproduction* 135, 559 - 568.
- PREITNER, N., DAMIOLA, F., LOPEZ-MOLINA, L., ZAKANY, J., DUBOULE, D., ALBRECHT, U. & SCHIBLER, U. 2002. The Orphan Nuclear Receptor REV-ERBa Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator. *Cell*, 110, 251–260.
- RALPH, M. R., FOSTER, R. G., DAVIES, F. C. & MENAKER, M. 1990. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247, 975-978.
- RATAJCZAK, C. K., BOEHLE, K. L. & MUGLIA, L. J. 2009. Impaired steroidogenesis and implantation failure in *Bmal1*^{-/-} mice. *Endocrinology*, 150, 1879–1885.
- REITER, R. J. 1980. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocrine Reviews*, 2, 109 - 131.

- REVEL, F. G., SABOUREAU, M., PÉVET, P., SIMONNEAUX, V. & MIKKELSEN, J. D. 2008. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven. *Endocrinology*, 149, 902–912.
- RONNBERG, L., KAUPPILA, A., LEPPALUOTO, J., MARTIKAINEN, H. & VAKKURI, O. 1990. Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 71, 493-496.
- ROPER, T. J. 1976. Sex differences in circadian wheel running rhythms in Mongolian gerbil. *Physiology & Behavior*, 17, 549-551.
- SALEHI, M. S., JAFARZADEH SHIRAZI, M. R., ZAMIRI, M. J., PAZHOORI, F., NAMAVAR, M. R., NIAZI, A., RAMEZANI, A., TANIDEH, N., TAMADON, A. & ZAREI, A. 2013. Hypothalamic Expression of KiSS1 and RFamide-related Peptide-3 mRNAs during The Estrous Cycle of Rats. *Int J Fertil Steril*, 6, 304-9.
- SCHWARTZ, S. M. 1982. Effects of constant bright illumination on reproductive processes in the female rat. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 6, 391-406.
- SCHWARTZ, W. J., DE LA IGLESIA, H. O., ZLOMANCZUK, P. & ILLNEROVÁ, H. 2001. Encoding Le Quattro Stagioni within the Mammalian Brain: Photoperiodic Orchestration through the Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Biological Rhythms*, 302-311.
- SEMINARA, S. B., MESSENGER, S., CHATZIDAKI, E. E., THRESHER, R., ACIERNO, J. S., SHAGOURY, J. K., BO-ABBAS, Y., KUOHUNG, W., SCHIWINOF, K. M., HENDRICK, A. G., ZAHNN, D., DIXON, J., KAISER, U. B., SLAUGENHAUPT, S. A., GUSELLA, J. F., O'RAHILLY, S., CARLTON, M. B. L., CROWLEY, W. F., APARICIO, S. A. J. R. & COLLEDGE, W. H. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *The New England Journal of Medicine*, 349, 1614 1627.
- SHIMIZU, T., HIRAI, Y., MURAYAMA, C., MIYAMOTO, A., MIYAZAKI, H. & MIYAZAKI, K. 2012. Expressions of the circadian genes Per2, Bmal1, Clock and Cry1 during the different stages of follicular development and their regulation by FSH in bovine granulosa cells from small follicles. *Livestock Science*, 145, 292–297.
- SHIMIZU, T., SHIMIZU, T., HIRAI, Y. & MURAYAMA, C. 2011. Circadian Clock genes Per2 and clock regulate steroid production, cell proliferation, and luteinizing hormone receptor transcription in ovarian granulosa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412, 132-135.
- SILVER, R., LESAUTER, J., TRESKO, P. A. & LEHMAN, M. N. 1996. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature*, 382, 810-813.
- SILVERTHORN 2007. *Fisiología Humana: Un enfoque integrado*, España, Editorial Medica Panamericana.
- SIMONNEAUX, V., BAHOUAGNE, T. & ANGELOPOULOU, E. 2017. Daily rhythms count for female fertility. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 5, 505-519.

- SMITH, J. T., CUNNINGHAM, M. J., RISSMAN, E. F., CLIFTON, D. K. & STEINER, R. A. 2006. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146, 3686–3692.
- SMITH, M. S., FREEMAN, M. E. & NEILL, J. D. 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, 219-26.
- SOARES, J. M., SIMÕES, M. J., OSHIMA, C. T. F., MORA, O. A. & DE LIMA, G. R. 2003. Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression. *Gynecological Endocrinology*, 17, 115–123.
- SUVANTO, S., HARM, M., ILMARINEN, J. & PARTINEN, M. 1993. Effects of 10 h time zone changes of female flight attendants` circadian rhythms of body temperature, alertness, and visual search. *Ergonomics*, 36, 613-625.
- TAKAHASHI, M. & SUZUKI, Y. 1969. The dependency of the rat estrous cycle on the daily alternation of light and dark. *Endocrinologia Japonica*, 16, 87-102.
- TAKASU, N. N., NAKAMURA, T. J., TOKUDA, I. T., TODO, T., BLOCK, G. D. & NAKAMURA, W. 2015. Recovery from Age-Related Infertility under Environmental Light - Dark Cycles Adjusted to the Intrinsic Circadian Period. *Cell Reports*, 12, 1 - 7.
- TAKEO, J., KOHNO, J. & HOKANO, M. 1986. Ultrastructural evidence for estradiol synthesis in the ovary of persistent estrous rats exposed to continuous illumination. *Acta Anatomica*, 127, 161-170.
- TAMURA, H., TAKASAKI, A., MIWA, I., TANIGUCHI, K., MAEKAWA, R. & ASADA, H. 2009. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 44, 280-287.
- TSUTSUI, K., SAIGONG, E., UKENA, K., TERANISHI, H., FUJISAWA, Y., KIKUCHI, M., ISHII, S. & SHARP, P. J. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 275, 661-667.
- VAUGHAN, M. I., VAUGHAN, G. M., BLASK, D. E. & REITER, R. J. 1976. Influence of Melatonin, Constant Light, or Blinding on Reproductive System of Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Experientia*, 32, 1941 - 1942.
- VRIEND, J. & REITER, R. J. 2015. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. *Journal of Pineal Research*, 58, 1 - 11.
- WANG, J., LUO, Y. L., WANG, K. L., WANG, Y., ZH, X. & SUN, Z. 2014. Clock-controlled StAR's expression and corticosterone production contribute to the endotoxemia immune response. *Chronobiology International*, 1-10.
- WEINERT, D., WEINANDY, R. & GATTERMANN, R. 2006. Photic and non-photic effects on the daily activity pattern of Mongolian gerbils. *Physiology & Behavior*, 90, 325 - 333.
- WELSH, D. K., TAKAHASHI, J. S. & KAY, S. A. 2010. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual Reviews of Physiology*, 72, 551-577.
- WILCZEK, A. M., BURGHARDT, L. T., COBB, A. R., COOPER, M. D., WELCH, S. M. & SCHMITT, J. 2010. Genetic and physiological bases for phenological

responses to current and predicted climates. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 365, 3129–3147.