



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**  
**FACULTAD DE PSICOLOGÍA**  
**FES ZARAGOZA**

**PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA GABAÉRGICO DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO  
EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DEL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO Y  
LA OVULACIÓN**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**RAMOS PUGA DAVID ALFONSO**

**TUTOR: DRA. MORALES LEDESMA LETICIA**  
**ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN: FES ZARAGOZA**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**  
**Dra. María de la Luz Navarro Angulo**  
**Dr. Leonardo Rodríguez Sosa**  
**Facultad de Medicina, UNAM**

**Investigación realizada gracias al programa**  
**UNAM DGAPA-PAPIIT con clave IN 216519**

**CDMX, 3 de diciembre de 2021**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLÓGIA

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA GABAÉRGICO DEL  
NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO EN LA REGULACIÓN DE  
LA SÍNTESIS DEL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO Y LA  
OVULACIÓN

PRESENTA:

**Biol. David Alfonso Ramos Puga**

**TUTORA: Dra. Leticia Morales Ledesma**  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**  
Dra. María de la Luz Navarro Angulo  
Dr. Leonardo Rodríguez Sosa  
Facultad de Medicina, UNAM

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza  
Para obtener el Título de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

## Tabla de contenido

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABREVIATURAS</b>   | <b>IV</b> |
| <b>RESUMEN</b>  | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>   | <b>3</b>  |
| <b>ANTECEDENTES</b>   | <b>5</b>  |
| EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO (SCN)  | 5         |
| EL SCN EN LA REPRODUCCIÓN   | 10        |
| EL SCN Y EL SISTEMA COLINÉRGICO   | 17        |
| INTERACCIÓN DE LOS SISTEMAS COLINÉRGICOS, GABAÉRGICOS Y VIPÉRGICOS EN EL SCN    | 20        |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b>  | <b>25</b> |
| <b>HIPÓTESIS</b>  | <b>26</b> |
| <b>OBJETIVOS</b>  | <b>27</b> |
| <b>MATERIAL Y MÉTODO</b>  | <b>28</b> |
| ANIMALES  | 28        |
| MICROINYECCIÓN UNILATERAL DE GABA EN EL SCN IZQUIERDO O DERECHO                 | 28        |
| EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE GABA SOBRE LA OVULACIÓN           | 29        |
| EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MICROINYECCIÓN DE GABA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE LH | 30        |
| PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DEL CEREBRO   | 30        |
| Q RT-PCR EN TIEMPO REAL   | 31        |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO  | 32        |
| <b>RESULTADOS</b>   | <b>33</b> |
| OVULACIÓN   | 33        |
| EXPRESIÓN DE MRNA DE VIP  | 38        |
| CONCENTRACIÓN SÉRICA DE LH  | 39        |
| <b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>                                       | <b>40</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>   | <b>46</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>47</b> |

## Abreviaturas

**ACh.** Acetilcolina

**AChE.** Acetilcolinoesterasa

**AHA.** Área hipotalámica anterior

**ATR.** Atropina

**AVP.** Vasopresina

**AvPV.** Núcleo anteroventral periventricular

**CAT.** Colino-acetiltransferasa

**dSCN.** Núcleo supraquiasmático derecho

**E<sub>2</sub>.** Estradiol

**FSH.** Hormona estimulante del folículo

**GABA.** Ácido gama amino-butírico

**GLN.** Núcleo geniculado lateral

**GnRH.** Hormona liberadora de gonadotropinas

**iSCN.** Núcleo supraquiasmático izquierdo

**LH.** Hormona luteinizante

**LHRH.** Hormona liberadora de LH

**mAChR.** Receptor de acetilcolina muscarínico

**mRNA.** RNA mensajero

**mVIP.** RNA mensajero que codifica VIP

**nAChR.** Receptor de acetilcolina nicotínico

**NBM.** Núcleos basales magnocelulares

**NOS.** Nervio ovárico superior

**NPV.** Núcleo paraventricular

**P<sub>4</sub>.** Progesterona

**PEVN.** Área periventricular

**POA.** Área Preóptica

**RHT.** Tracto retino-hipotalámico

**RNA.** Ácido ribonucléico

**SCN.** Núcleo supraquiasmático

**TA.** Testigo absoluto

**TTLP.** Asa de retroalimentación de transcripción-traducción

**VIP.** Péptido intestinal vasoactivo

## Resumen

En los mamíferos, el Núcleo Supraquiasmático (SCN) es una estructura pareada, localizada en la base del hipotálamo, que regula los ciclos biológicos como la reproducción, sincronizando el momento de máxima fertilidad, y el momento de mayor motivación sexual.

Se ha descrito que el SCN se comunica con las neuronas GnRHérgicas localizadas en el área preóptica (POA) a través de sus proyecciones neuronales que transportan al péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la vasopresina (AVP). Esta comunicación regula la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la de la hormona luteinizante (LH) y la ovulación.

Estudios previos han mostrado que, durante la mañana del proestro, tanto la acetilcolina (ACh) como los receptores con los que ésta interactúa dentro del SCN son capaces de regular la secreción de GnRH y, por tanto la ovulación. Los autores plantean la posibilidad de que la ACh incrementa la liberación del ácido gamma-amino butírico (GABA) en el SCN y que éste inhibe la comunicación VIPérgica y AVPérgica con los núcleos GnRHérgicos, evitando la ovulación.

Por estos antecedentes, en el presente estudio nos planteamos emular la liberación de GABA en el SCN y evaluar su efecto sobre la síntesis RNA de VIP en el SCN y sobre la ovulación.

Para ello, utilizamos ratas hembras adultas de nuestra cepa (CII-ZV), con acceso a agua y alimento *ad libitum*, y al menos dos ciclos estrales regulares de 4 días. Estas ratas, durante la mañana del proestro, fueron microinyectadas con GABA o solución salina (que sirvió como vehículo, Vh) directamente en el SCN izquierdo (iSCN) o derecho (dSCN). Una hora posterior a la microinyección se cuantificó, mediante RT-PCR en tiempo real, la síntesis del RNA mensajero que codifica para VIP en el SCN; también se cuantificó,

durante la tarde del proestro, la contracción sérica de LH por medio de ELISA; y se evaluó, al siguiente estro vaginal, el porcentaje animales ovulantes y el número de ovocitos liberados.

Los datos obtenidos en el presente estudio muestran que el incremento de GABA en el SCN durante la mañana del proestro no modifica la síntesis del mVIP pero no se descarta la posibilidad de que afecte su liberación o la comunicación del SCN con los núcleos GnRHérgicos. La concentración sérica de LH tampoco fue afectada por GABA. Sin embargo, el número de ovocitos liberados disminuyó por la microinyección de GABA, dependiendo del SCN microinyectado, lo que nos lleva a suponer que puede existir una vía de comunicación nerviosa entre el SCN y los ovarios que regule la sensibilidad de los ovarios a las señales hormonales emitidas por el hipotálamo y la hipófisis.

## Introducción

El Núcleo Supraquiasmático (**SCN**) es una estructura pareada, localizada en la base del hipotálamo, que, en los mamíferos, regula los ciclos biológicos como la reproducción; en la que participa sincronizando el momento de máxima fertilidad, y el momento de mayor motivación sexual. Este núcleo también regula la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (**GnRH**), la de la hormona luteinizante (**LH**) y la ovulación. Se ha planteado que las neuronas GnRHérgicas localizadas en el área preóptica (**POA**) son reguladas por el SCN de manera directa a través de sus proyecciones neuronales que transportan al péptido intestinal vasoactivo (**VIP**) y la vasopresina (**AVP**).

El SCN tiene la capacidad de sincronizar estos eventos por la señalización que recibe de distintas áreas del organismo que le ayudan a censar el medio interno y externo. Una de las principales señales que regulan al SCN es la luz. Tanto la intensidad como la duración de las señales lumínicas externas pueden producir una alteración en la duración y presentación temporal de eventos como la actividad locomotora (retrasándola o adelantándola). En la búsqueda de la vía por la cual la luz altera la periodicidad del SCN, se observó que la aplicación de carbacól (un agonista colinérgico no específico) en este núcleo, tiene un efecto similar al producido por las señales lumínicas. Sin embargo, este efecto no se produce si se bloquean los receptores muscarínicos por medio del sulfato de atropina (**ATR**). Lo que permitió mostrar la participación del sistema colinérgico (y más específicamente de sus receptores muscarínicos) en la regulación de la actividad de las neuronas del SCN.

Posteriormente se mostró que el sistema colinérgico del SCN participa en la regulación de la ovulación. En la rata, la estimulación o el bloqueo de los receptores colinérgicos resulta en alteraciones de la respuesta ovulatoria. Se ha observado que, en ratas hembra, durante la mañana del proestro, el bloqueo farmacológico de los receptores muscarínicos del SCN por la administración de ATR, resulta en la disminución de la tasa de animales ovulantes hasta en un 89% con respecto al grupo control. Este efecto es explicado por

una disminución de LH, producida por la falta de GnRH, ya que, si a la rata tratada se le una dosis de hormona sintética estimulante de gonadotropinas (**LHRH**) la ovulación se restablece. En otro estudio, con en el mismo modelo animal, se observó que la estimulación de los receptores colinérgicos (nicotínicos y muscarínicos) por la microinyección de acetilcolina (**ACh**), en el SCN izquierdo, incrementa el número de ovocitos liberados, pero no sin modificar la tasa de animales ovulantes comparado con el grupo control; mientras que, si la microinyección se realiza en el SCN derecho la ovulación disminuye en un 64%. Estos resultados muestran la compleja interacción entre los distintos receptores colinérgicos del SCN que se comunican para dar una respuesta dependiendo de la señal dada al núcleo.

Se ha planteado que la falta de ovulación en ratas con el estímulo de ACh en el SCN se debe a que la señal colinérgica disminuye la síntesis de VIP, que a su vez evita la liberación de GnRH y, en consecuencia, no se presenta el pico de LH que hace posible la ovulación. Dado que se ha observado que la ACh produce la liberación del ácido gama amino-butírico (**GABA**) (el principal neurotransmisor dentro del SCN) y que es un neurotransmisor de tipo inhibitorio, se cree que éste podría estar mediando la disminución de VIP en el SCN.

Con base en estos antecedentes, en el presente estudio se analizó el efecto del GABA microinyectado en el SCN sobre la biosíntesis de VIP y la ovulación.

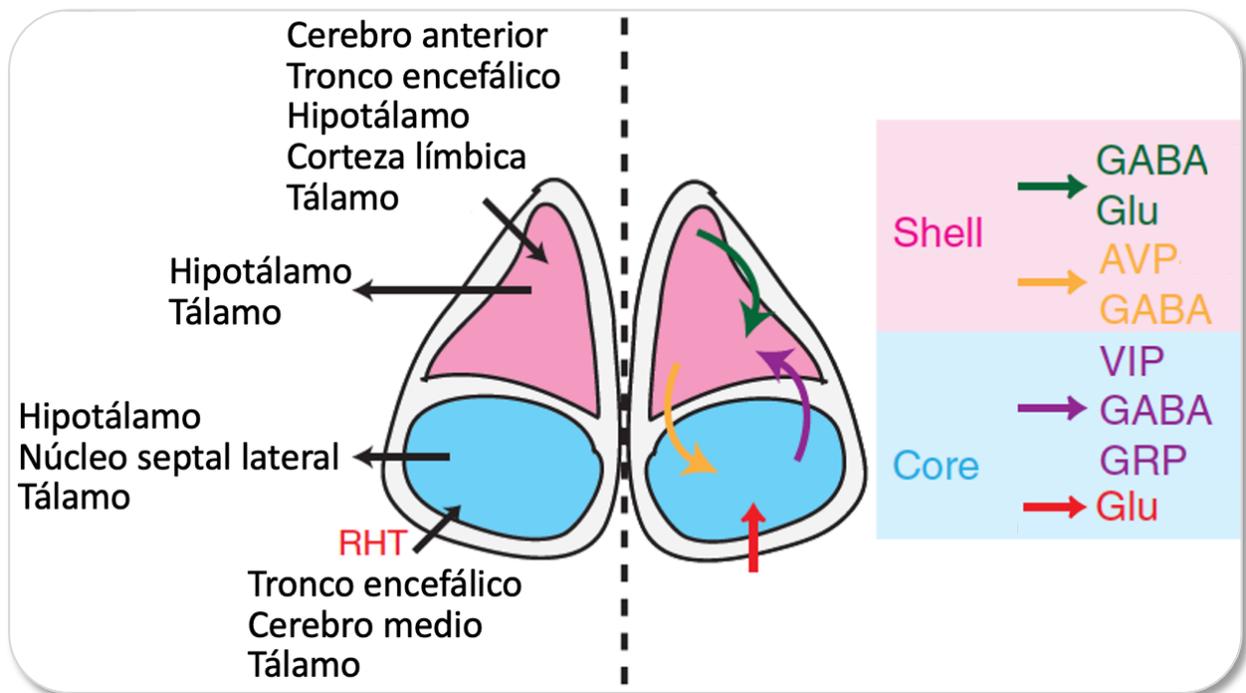
## Antecedentes

### El Núcleo Supraquiasmático (SCN)

El núcleo supraquiasmático (**SCN**) está localizado en la base del hipotálamo. Es una estructura bilateral (conformada por entre 8,000 a 10,000 neuronas por cada núcleo) que se encuentra a cada lado del tercer ventrículo e inmediatamente dorsal al quiasma óptico. En su conjunto, ambos núcleos conforman un reloj circadiano o “marcapasos maestro” que, en los mamíferos, controla los ritmos biológicos endógenos del organismo y es capaz de dirigir a otros relojes endógenos que existen en el individuo, sincronizándolos con las señales lumínicas que recibe del exterior y que llegan a él a través del tracto retino-hipotalámico (por sus siglas en inglés **RHT**) y del tracto genículo-hipotalámico (*van den Pol y Tsujimoto, 1985; Golombek y Rosenstein, 2010; Bedont y Blackshaw, 2015*). El SCN representa una adaptación biológica importante para los mamíferos ya que les permite anticipar y prepararse para cambios predecibles del ambiente, optimizar el momento para la obtención de alimento o el menor riesgo de ser depredado. En el caso de la reproducción, permite optimizar el momento de la ovulación, el apareamiento, el desarrollo embrionario y el parto; en resumen, el SCN genera un nicho temporal de sobrevivencia del individuo (*Kennaway y cols., 2012; Boden y cols., 2013; Patton y Hastings, 2018*).

Las neuronas que conforman el SCN expresan y liberan distintos neurotransmisores, pero en su mayoría sintetizan y co-liberan ácido gamma-amino butírico (**GABA**), por lo que se le considera el principal neurotransmisor dentro del SCN y uno de los principales reguladores de su temporalidad interna (*Liu y Reppert, 2000*). Además de GABA, las neuronas del SCN expresan mayormente otros dos neurotransmisores, el péptido intestinal vasoactivo (**VIP**) y la vasopresina (**AVP**); la distribución de estos dos neurotransmisores ha permitido la división anatómica del núcleo para su estudio (**Figura 1**). El VIP se expresa principalmente en la región ventrolateral del núcleo, denominada “core” (aproximadamente en el 25% de sus neuronas totales), mientras que la AVP se expresa principalmente en la región dorsomedial, denominada “shell” (aproximadamente

el 37% de las neuronas totales del núcleo). Se ha descrito que, además, el SCN sintetiza y libera, en menor medida, otros neurotransmisores (**Tabla 1**) como el péptido liberador de gastrina y calretinina (14% de las neuronas) o metaencefalina, somatostatina, calbidina, angiotensina II, sustancia P y neurotensina, presentes en una población de neuronas menor al 5% (*Inouye y Shibata, 1994; Moore y cols., 2002; Tonsfeldt y Chappell, 2012*).

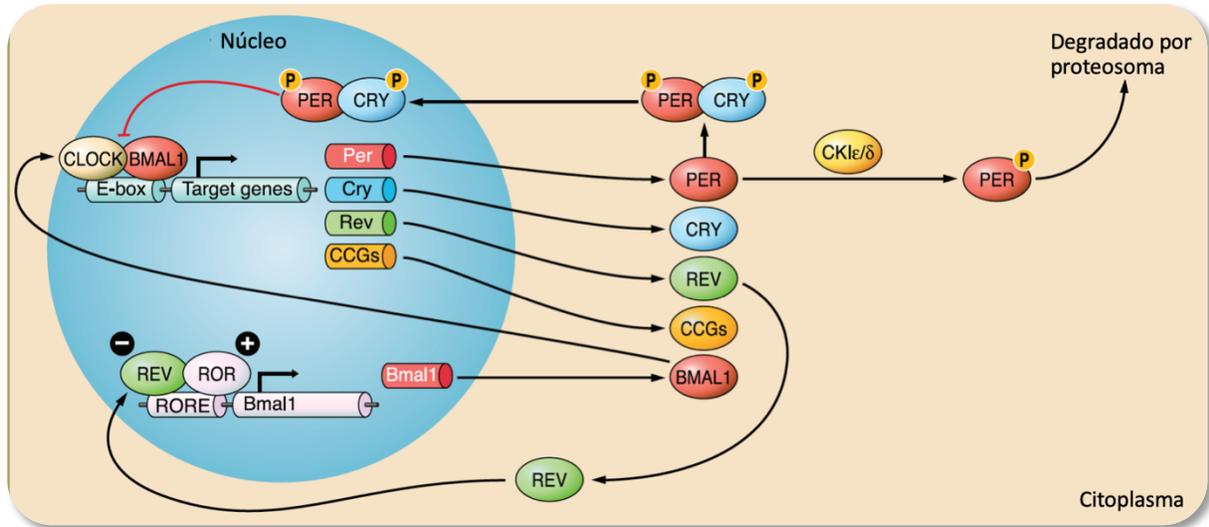


**Figura 1.** Representación esquemática del núcleo supraquiasmático (SCN) con su división anatómica en “core” y “shell”, los neurotransmisores que sintetiza y sus proyecciones (aferecias y eferencias) internas y a distintas regiones del cerebro. RHT. Tracto retino hipotalámico. Glu. Glutamato Tomada y modificada de Patton y Hastings, 2018

Tabla 1. Porcentaje y acción de los distintos neurotransmisores presentes en el SCN. GABA, ácido gama amino-butírico; Taurina; 5-HT, serotonina; NA, noradrenalina; DA, dopamina; Glu, glutamato; Gli, glicina. Tabla realizada con los datos de *Tonsfeldt y Chappell, 2012*

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

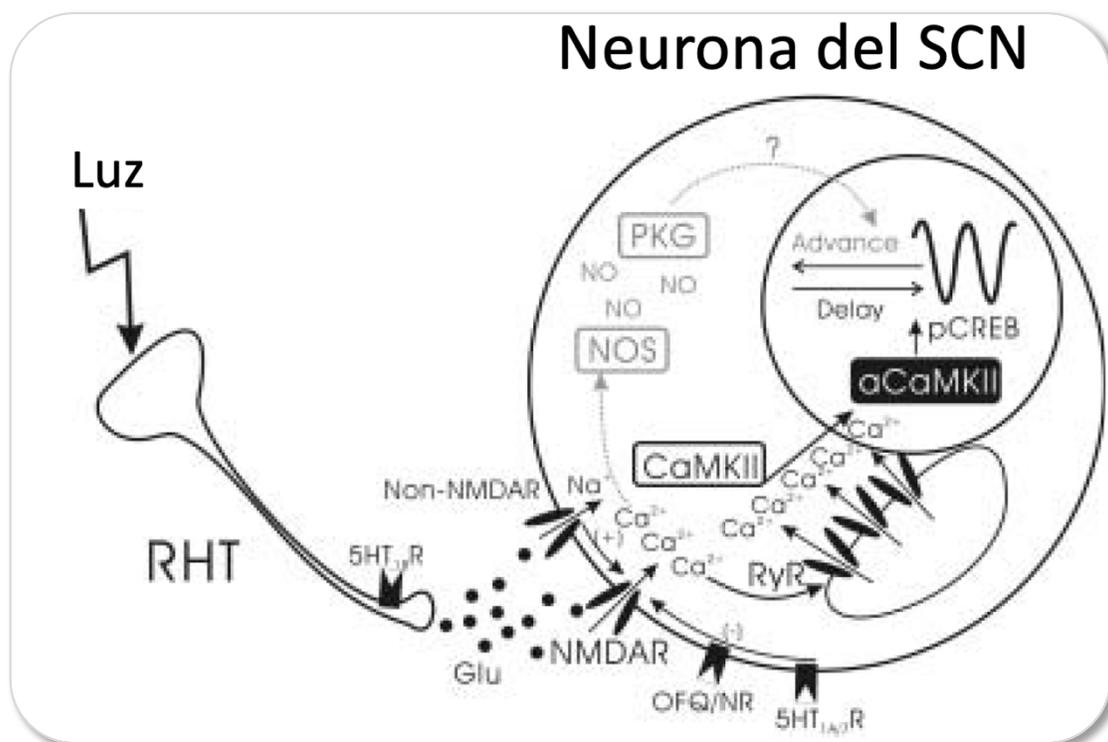
Al ser una estructura bilateral, la heterogeneidad del SCN no sólo es respecto a sus neurotransmisores, sino que, cada uno de los núcleos supraquiasmáticos y cada neurona que lo conforma es capaz de generar su propio ritmo temporal endógeno (*van den Pol y Tsujimoto, 1985; Welsh y cols., 1995*). Este ritmo es generado por medio de un asa de retroalimentación transcripcional-traduccional (**TTLP**), que comienza con la traducción de las proteínas Clock y Bmal1 que conforman un heterodímero protéico (**CLOCK:BMAL1**) que, al unirse a una región promotora E-box, dirige la expresión de los genes *per* y *cry* que, una vez traducidos, forman un heterodímero protéico (**PER:CRY**) que inhibe al complejo CLOCK:BMAL1. La inhibición de CLOCK:BMAL1 tiene como consecuencia la disminución en la expresión de *per* y *cry*, lo que permite que CLOCK:BMAL1 puedan ejercer nuevamente su actividad, reiniciando el ciclo. Este proceso se lleva a cabo en aproximadamente 24 horas (**Figura 2**). Estos factores de transcripción controlan a su vez cascadas de transcripción de genes que amplifican la señal circadiana de la TTLP y coordinan programas circadianos de expresión de genes que son específicos de células y tejidos (*Bedont y Blackshaw, 2015; Patton y Hastings, 2018*). Aunque cada neurona del núcleo genera su propia temporalidad, el SCN presenta un ritmo único que, se ha sugerido, es coordinado por el GABA y VIP (*Liu y Reppert, 2000; Boden y cols., 2013; Freeman y cols., 2013*).



**Figura 2.** Representación simplificada del asa de retroalimentación transcripcional-traduccional que da origen al reloj circadiano molecular. Los factores de transcripción Clock y Bmal1 interactúan y activan (por su unión a una región promotora) la expresión de *per* y *cry* que al traducirse y formar un heterodímero PER:CRY, inhiben a CLOCK:BMAL1. Figura tomada y modificada de Golombeck y Rosenstein, 2010

Además de generar su propio ritmo, el SCN requiere adaptarse a las condiciones internas en las que se encuentra el organismo y las condiciones del medio externo. Para ello, distintos núcleos neuronales se encargan de comunicar el estado interno del organismo al SCN, entre estos se encuentran los núcleos tuberomamilares, la hojuela intergeniculada, los núcleos del ráfê, el núcleo paraventricular, el núcleo arqueado y otras áreas hipotalámicas (*Inouye y Shibata, 1994; Aguilar-Roblero y cols., 2004; Ikeda, 2004; Golombeck y Rosenstein, 2010; Boden y cols., 2013*). Las señales externas al individuo se dividen en lumínicas y no-lumínicas. Las lumínicas llegan al SCN de manera directa a través del RHT y de manera indirecta por el tracto que comunica con el núcleo geniculado lateral (**GLN**). El RHT lleva la información de los ciclos de luz-oscuridad directamente de neuronas de la retina hacia la parte ventral del SCN. La parte terminal del RHT libera glutamato y polipéptido activador de la adenilato-ciclasa de la hipófisis (**PACAP**), que resulta en la activación de los receptores de membrana NMDA y no-NMDA (AMPA/Kainato), estos incrementan el influjo de  $Ca^{2+}$  al interior de la neurona, lo que

produce la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de almacenes internos de la neurona activando la proteína cinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina que, a su vez, producen la fosforilación de CREB que es un potente factor de transcripción de genes reloj como *per* (**Figura 3**). Además, se incrementa la actividad eléctrica de los retinoreceptores del SCN, se produce la activación *downstream* de la cascada de señalización interna de cinasas y la consecuente inducción de *per/cry* y otros genes de respuesta temprana. Estos eventos constituyen el primer paso para el mantenimiento y reajuste (de ser necesario) de fase de los TTLP del SCN (*Inouye y Shibata, 1994; Ikeda, 2004; Patton y Hastings, 2018*). El segundo paso, se da por las señales no-lumínicas, entre las que se encuentran el ejercicio, la temperatura del ambiente, la disponibilidad de alimento y ruidos ambientales (en el caso de los roedores la manipulación) entre otras, estas señales son mediadas por distintos núcleos del tálamo, el mesencéfalo y el tronco encefálico, siendo sus principales neurotransmisores el neuropéptido Y, la dopamina y la serotonina (*Aguilar-Roblero y cols., 2004; Patton y Hastings, 2018*).



**Figura 3. Esquema del proceso de señalización celular de la neurona del SCN para el cambio de fase circadiano causado por luz.** La luz captada por la retina estimula las neuronas del SCN por la liberación de glutamato (Glu) liberado por el tracto retino-hipotalámico (RHT) activando receptores NMDA y no-NMDA (AMPA/Kainato) que incrementan el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y su liberación desde almacenes internos que produce la activación de la proteína cinasa II que produce la fosforilación de CREB. Figura tomada y modificada de Ikeda, 2004

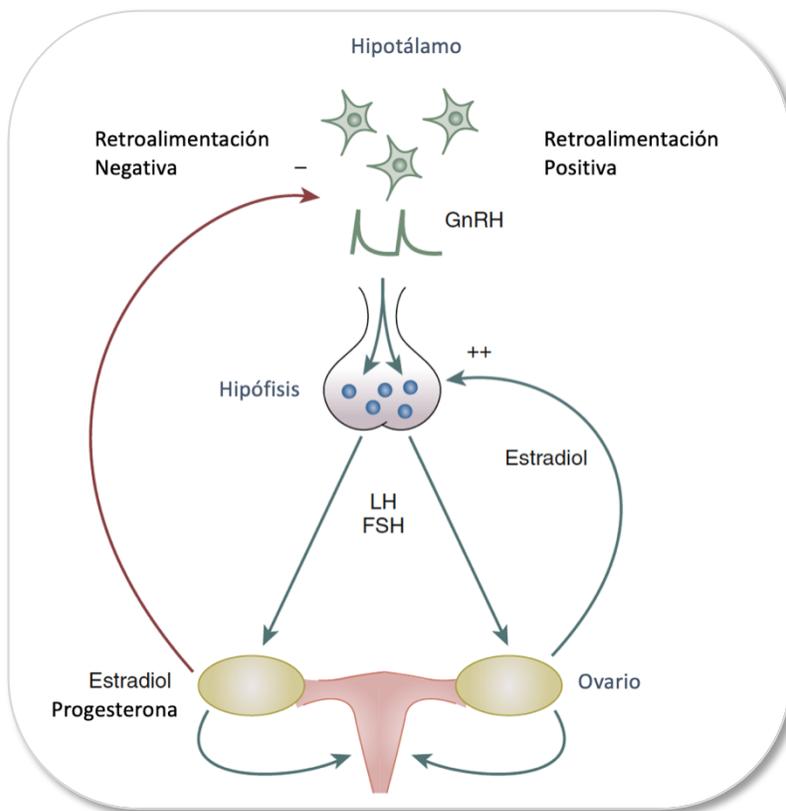
Se ha descrito que el SCN logra transmitir su señal temporal al resto del organismo tanto por señales humorales como por vías nerviosas. La vía humoral fue mostrada en hámsteres con lesión del SCN a los cuales se les implantaban tejido embrionario de SCN que reestablecían su actividad locomotora (pero no endócrina) con la ritmicidad del explante de SCN del donante. Respecto a la vía nerviosa se han descrito como las principales proyecciones hacia el hipotálamo adyacente, el área preóptica (**POA**), el área hipotalámica anterior (**AHA**), la zona subparaventricular, el área retroquiasmática, las áreas hipotalámicas tuberales y posteriores (incluyendo el núcleo dorsomedial) y algunas proyecciones al prosencéfalo, el hipotálamo medio, GLN y la sustancia gris periacueductal (*Moore y cols. 2002*).

### El SCN en la reproducción

El ciclo ovárico y la fertilidad son mantenidos por señales hormonales entre el cerebro, la hipófisis y los ovarios, que funcionan como un solo eje hipotálamo-hipófisis-ovario (*Levine, 2015*). La función reproductiva requiere la integración dinámica, funcional y temporal de las señales neurales y hormonales en este eje, que resulta en ciclos repetitivos de desarrollo folicular, ovulación y preparación del revestimiento endometrial del útero para la implantación del huevo y que ocurra la concepción (*Hall, 2010*). En la rata, este ciclo dura entre 4 y 5 días, en los que se dan las distintas fases del ciclo reproductivo: el estro, fase en la que ocurre la ovulación, es el único día en que la hembra es receptiva y permite la cópula; el metaestro y diestro, son el periodo de recuperación en el que cesan los cambios del tracto reproductivo acontecidos durante el estro; y el proestro, en el cual, ocurren cambios en las concentraciones de hormonas esteroideas que facilitan el “pico” preovulatorio de la Hormona Luteinizante (**LH**) que desencadenará la ovulación en la madrugada del estro (*van der Beek, 1996; Levine, 2015*).

El eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-gónada, depende de la liberación pulsátil de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (**GnRH**), desde el hipotálamo hacia el sistema portal hipofisario. Al llegar a la hipófisis, la GnRH estimula la síntesis y liberación (durante la tarde del proestro) de la LH y de la Hormona Estimulante del Folículo (**FSH**) por parte

de gonadotrofos. En el ovario, la LH y la FSH estimulan el desarrollo folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, además de coordinar la secreción de hormonas ováricas como estradiol ( $E_2$ ), progesterona ( $P_4$ ), inhibina A e inhibina B. Estas hormonas ováricas regulan el ciclo reproductivo creando dos asas de retroalimentación, una larga a nivel de hipotálamo y una corta a nivel de la hipófisis (**Figura 4**). Este eje reproductivo posee una retroalimentación que puede ser positiva o negativa dependiendo de la fase del ciclo y del momento del día. Durante la fase folicular del ciclo las hormonas ováricas tendrán un efecto positivo estimulando la secreción de GnRH; mientras que, durante la fase lútea ejercen su efecto negativo inhibiendo la secreción de GnRH manteniendo baja la concentración de LH durante la mayor parte del ciclo (*Williams, 2012; Hall, 2014; Levine, 2015*).



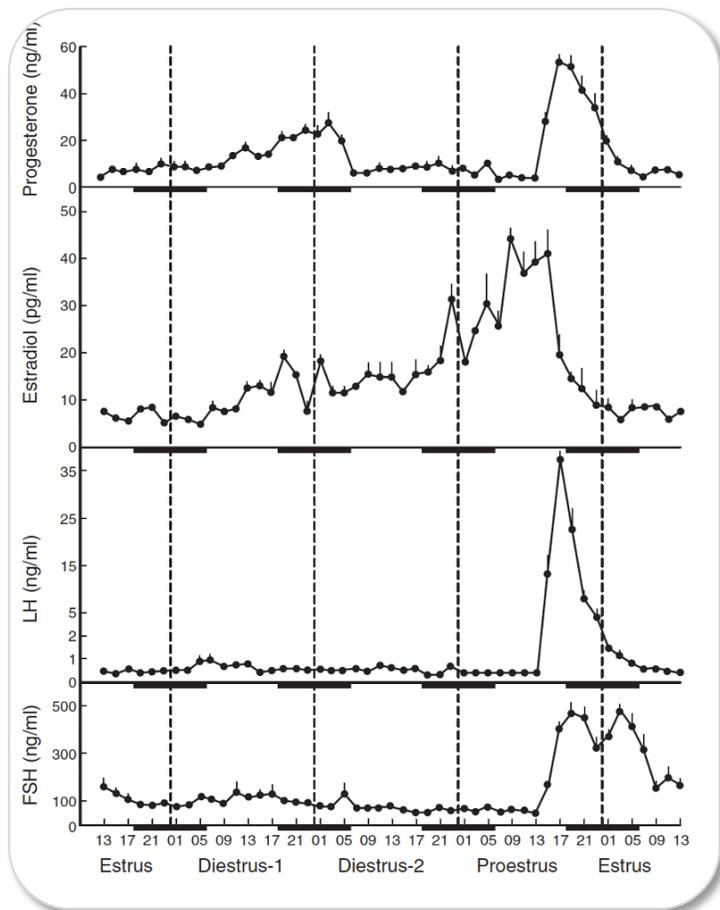
**Figura 4.**  
**Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-ovario** en el que se muestran las hormonas liberadas por los componentes de este eje. La relación entre cada una de las partes puede ser tanto positiva (+) como negativa (-) dependiendo del día del ciclo y del momento del día. GnRH. Hormona liberadora de gonadotropinas. FSH. Hormona estimulante del folículo. LH. Hormona luteinizante.  $E_2$ . Estradiol.  $P_4$ . Progesterona. Tomada de *Williams, 2012*.

La frecuencia y amplitud de la liberación de GnRH controlan diferencialmente la secreción de las gonadotropinas: la FSH es secretada preferencialmente por pulsos de baja frecuencia de GnRH; mientras que, los pulsos de alta frecuencia facilitan la secreción de

LH (*Stamatiades y Kaiser, 2017*). El E<sub>2</sub> es el principal controlador de esta pulsación (**Figura 5**), cuando la concentración de este esteroide baja, durante el día del estro, altera la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH inhibiendo la secreción de las gonadotropinas (LH y FSH). Durante la tarde del metaestro (o diestro-1) y la mañana del diestro el E<sub>2</sub> incrementa teniendo su pico máximo al medio día del proestro (aproximadamente a las 12:00h), lo que incrementa la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH y la respuesta de la hipófisis a esta neurohormona, lo que produce que, en la tarde del proestro (aproximadamente entre las 17 y 19h), se presente el “pico” preovulatorio de secreción de LH y FSH. (*van der Beek, 1996; Hall, 2014; Leviene, 2015*).

Otro controlador de la secreción de GnRH, de reciente importancia, es la kisspeptina (**Kiss1**) que ha sido implicada como modulador de la retroalimentación negativa ejercida por el E<sub>2</sub> en el núcleo arqueado (**ARC**) y la retroalimentación positiva ejercida en el núcleo anteroventral periventricular (**AvPV**). La P<sub>4</sub> ejerce su efecto a nivel de hipotálamo donde disminuye los pulsos de GnRH. Además, el aumento de P<sub>4</sub> durante la tarde del proestro facilita la acción positiva del E<sub>2</sub> al menos por dos vías: 1) al favorecer el pico de LH en el día del proestro y 2) bloqueándolo durante el resto del ciclo (*van der Beek, 1996; Hall, 2014; Levine, 2015*).

En años recientes ha tomado importancia también la hormona inhibidora de GnRH (**GnIH**), inicialmente descrita en codorniz y posteriormente en la mayoría de los mamíferos. Este neuropéptido, como lo indica su nombre, es el encargado de inhibir la secreción de GnRH y funciona como un mecanismo complementario del resto de señales neuroendócrinas que regulan la secreción del decapeptido. Los cuerpos celulares de las neuronas GnIH están localizados en el núcleo paraventricular (**PVN**) y en el área hipotalámica dorsomedial (**DMH**), y proyectan hacia la eminencia media y POA. Estudios actuales apuntan a la GnIH como la neurohormona clave en la inhibición de la reproducción a nivel de la función hipotalámico-hipofisiaria (*Hall, 2014; Son y cols. 2019*).



**Figura 5.** Representación del patrón de secreción hormonal durante el ciclo estral. Se muestra la secreción de las gonadotropinas: LH y FSH; y las hormonas esteroideas liberadas por el ovario: Estradiol y Progesterona. El incremento de E<sub>2</sub> durante el diestro y el proestro culmina con el pico preovulatorio de LH y FSH que permiten la ovulación en el día del estrus. Tomado y modificado de Leviene, 2015

Estudios realizados en roedores en la década de los 70's por Brown-Grant y Raisman, mostraron que, en la rata hembra, la lesión total del SCN producía la pérdida del pico preovulatorio de LH y un estrus persistente en la citología vaginal. Posteriormente se observó que la lesión del SCN también elimina el ritmo de liberación de gonadotropinas, prolactina y hormonas esteroideas; y modifica el comportamiento sexual. Resultados que los llevaron a sugerir que el SCN era esencial en la regulación neuroendocrina de los eventos reproductivos (*Brown-Grant y Raisman 1977; van der Beek, 1996; van der Beek, 1997; Golombeck y Rosentein, 2010*).

El SCN proyecta fibras nerviosas hacia núcleos secretores de GnRH (**Figura 6**), como POA, AvPV, AHA, el núcleo periventricular, el órgano vasculoso de la lámina terminal, la zona subparaventricular baja, el núcleo supraóptico, a la parte media de la banda

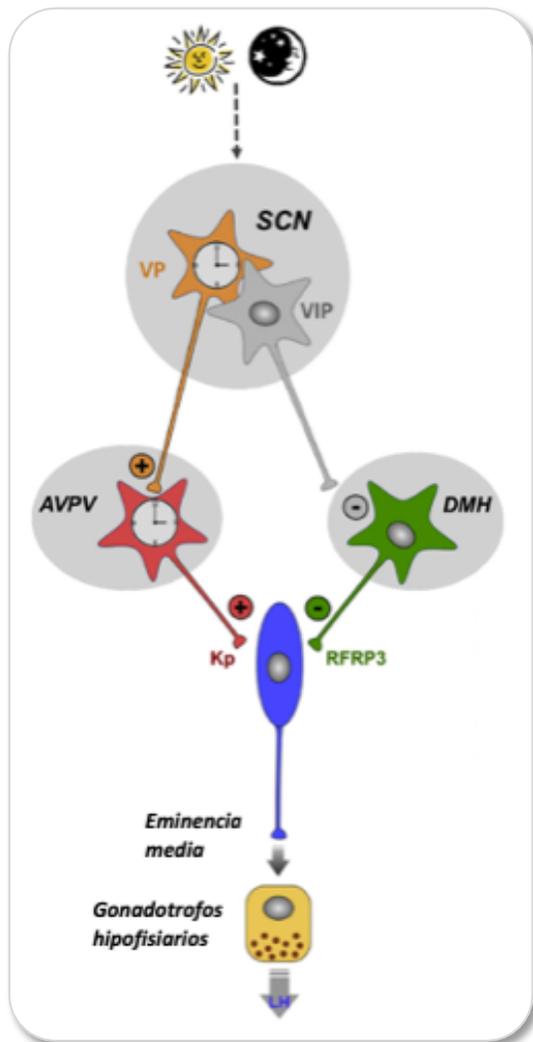
diagonal de Broca y el área preóptica medial (*Mahoney y cols. 2004; Mahoney y Smale, 2005; Williams y cols. 2011; Piet y cols. 2015*). Se ha observado que la interrupción en la comunicación del SCN con POA también evita el pico preovulatorio de LH e interrumpe el ciclo estral de la hembra (*Simonneaux y cols. 2017*). Además, estas áreas son consideradas vías nerviosas que regulan la secreción y el pico preovulatorio de FSH y LH que culmina con la ovulación. El SCN sincroniza las señales endócrinas y circadianas logrando un incremento en la liberación de GnRH por la terminal nerviosa estimulando el pico de LH y la ovulación (*Ma, Kelly y Rönnekleiv, 1990; Kennaway y cols., 2012*).

Una de las vías directas (monosináptica) del SCN que regula la actividad de las neuronas GnRHérgicas es la de VIP/AVP, que inervan directamente a las neuronas GnRH halladas en POA (*Van der Beek y cols., 1997; Robertson y cols., 2009; Piet y cols. 2015; Simonneaux y cols. 2017*). Se ha descrito que la destrucción bilateral del SCN produce la pérdida del 80% de las aposiciones de las fibras VIPérgicas en las neuronas GnRHérgicas y que cerca del 40% de estas neuronas presentan receptores a VIP (*Van der Beek y cols., 1997; Christian y Moenter, 2008*). Se ha observado que, en sistemas *in vivo*, cuando el SCN libera VIP se incrementa la liberación de GnRH, mientras que, su aplicación directa en cortes de cerebro excita la actividad eléctrica de las neuronas GnRHérgicas de manera dependiente del tiempo y la concentración de estrógenos (*Christian y Moenter, 2008; Boden y cols., 2013*). Por su parte, Loh y col (*2014*), mostraron que en el ratón *knockout* a VIP, la respuesta ovulatoria es menor, lo que indica que VIP es un componente esencial para la sincronización circadiana del sistema reproductivo.

Se ha sugerido una vía de regulación indirecta del SCN a las neuronas GnRH. Por medio de trazadores retrógrados se ha mostrado la conexión entre el SCN y el núcleo paraventricular (**NPV**) y el área Periventricular (**PEVN**). Estas áreas se encuentran rodeando al SCN y reciben fibras VIPérgicas y AVPérgicas (*van der Beek, 1996*). El AvPV podría ser el relevo en la retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario debido a que ha mostrado tener receptores a estrógenos y regular, a través de Kiss1, la liberación de GnRH y LH. Estudios en roedores han mostrado que la expresión de Kiss1 en AvPV

es mayor en la tarde del proestro que durante la mañana y que este incremento coincide con el pico de GnRH y que las neuronas Kiss1 son estimuladas por la vía AVP del SCN (*Robertson y cols., 2009; Boden y cols., 2013; Piet y cols. 2015; Simonneaux y cols. 2017*). Se ha descrito que el SCN tiene comunicación nerviosa con el ARC que ha sido relacionado con la regulación de la secreción de GnRH por medio de Kiss. Se ha mostrado que el incremento de E<sub>2</sub> produce, en el ARC, una disminución de la expresión de Kiss y por tanto una disminución GnRH, por lo que sea ha plantado al ARC como punto de regulación no sólo de las hormonas ováricas sino también del SCN (*Tonsfeldt y Champpell, 2012; Boden y cols., 2013*).

Otro relevo importante de regulación del SCN es su comunicación de tipo VIPérgica con el DMH que posee neuronas de Kiss o GnIH. La administración intracerebroventricular de VIP durante el estro, disminuye la actividad neuronal de las neuronas Kiss durante la tarde, pero no en la mañana, por lo que se plantea una señal regulatoria por parte de Kiss hacia las neuronas GnRH (*Sun y cols., 2012*). Por su parte, aún se desconoce la forma en que el SCN regula la señalización de GnIH, pero se ha descrito que estas neuronas tienen proyecciones axo-somáticas y axo-dendríticas en POA, y proyecciones a la eminencia media y la hipófisis anterior, donde la GnIH actúa inhibiendo la actividad eléctrica de las neuronas GnRHérgicas y la síntesis y la liberación GnRH. Además, se ha observado que existen fibras GnRHérgicas desde POA que llegan al SCN, lo que sugiere un asa de retroalimentación entre estos dos núcleos (*van der Beek, 1996; Boden y cols. 2013; Son y cols., 2016; Simonneaux y cols. 2017*).



**Figura 6.** Modelo de la red neuronal que controla el pico de LH. La actividad circadiana del SCN es regulada y desplazada en el tiempo con los ciclos de luz-oscuridad. El SCN proyecta fibras vasopresinérgicas (VP) hacia AVPV y fibras VIPérgicas hacia el DMH para regular la síntesis y secreción de GnRH que permitirá que se produzca el pico de LH durante la tarde del proestro para que se lleve a cabo la ovulación. Tomado y modificado de Simonneaux y cols. 2017

Con estos antecedentes se ha generado un modelo en el que el SCN recibe información lumínica del medio externo que llega a la retina y viaja a través del RHT a las neuronas retinosensibles del *core* en el SCN, el cual comunica la información del medio con el *shell* por medio de sus neurotransmisores (GABA, VIP, AVP). La región *shell* entonces, se comunica por la vía VIPérgica con neuronas GnRHérgicas encontradas principalmente en POA; mientras que la región del *core* se comunica con el AvPV y el ARC utilizando AVP como neurotransmisor. Tanto AvPV como el ARC se comunican con neuronas GnRHérgicas utilizando Kiss1. Tanto la vía directa como indirecta regulan la secreción de GnRH para dar lugar al pico preovulatorio de LH y que pueda producirse la ovulación (Boden y cols. 2013).

Se ha planteado que la activación de la ventana de tiempo del SCN que permite la ovulación requiere una alta concentración de E<sub>2</sub>; sin embargo, la retroalimentación positiva y negativa que ejerce el E<sub>2</sub> sobre los ciclos circadianos aún es poco entendida. Se sabe que el SCN expresa tanto el receptor a E<sub>2</sub> de alta (ER $\alpha$ ) como el de baja afinidad (ER $\beta$ ); y que el E<sub>2</sub> incrementa la tasa de disparo y la despolarización de las neuronas del SCN e incrementa la expresión de c-Fos y elementos de transcripción-traducción reguladores de los genes reloj. Por otra parte, el efecto ejercido por el E<sub>2</sub> podría no ser directamente (o no sólo directamente) en el SCN, sino a través de otros núcleos como los encontrados en el rafe dorsal, que han mostrado tener los receptores a E<sub>2</sub> $\beta$  y presentan muchas proyecciones serotoninérgicas al SCN. Otros candidatos son células de POA y AvPV, que también proyectan al SCN y, de hecho, han sido implicados en la regulación lumínica del SCN. Se ha observado que el E<sub>2</sub> en el AvPV incrementa la expresión de Kiss1 a través de la vía de elementos de respuesta dependientes de estrógenos (*Mitra y cols., 2003; Abizaid y cols., 2004; Fatehi y cols., 2008; Williams III y Kriegsfeld, 2012; Simonneaux y cols. 2017*).

#### El SCN y el sistema colinérgico

La búsqueda del mecanismo por el cual la luz regula la temporalidad del SCN llevó a la aplicación de Carbacól (un agonista colinérgico no selectivo) en este núcleo y se observó que este fármaco tenía un efecto similar al producido por la luz, lo que permitió sugerir al sistema colinérgico como mediador de los ciclos circadianos. (*Trachsel y cols., 1995; Bina y Rusak, 1996; Liu y Gillette, 1996*). La acetilcolina (**ACh**) es un neurotransmisor sintetizado en el citoplasma neuronal y es considerado uno de los principales neurotransmisores del sistema nervioso y en particular del hipotálamo. Este neurotransmisor tiene un patrón de secreción establecido, que es mayor durante la vigilia y la actividad motora y disminuye durante la fase de sueño (*González-García y cols., 2008; Davis y Sadik, 2006*). Además, existen evidencias de que este neurotransmisor tiene un papel regulatorio en el mantenimiento de los ritmos circadianos al regular los efectos de la luz sobre la actividad

motora del ratón, de la actividad de la enzima serotonina N-acetiltransferasa en la glándula pineal y la ciclicidad de la ovulación (*Kow y Pfaff, 1984*).

Se ha descrito que el SCN posee toda la maquinaria que permite al sistema colinérgico ejercer su función, desde las enzimas que permiten su síntesis, la colino-acetiltransfera (**CAT**) y su degradación, acetilcolinesterasa (**AChE**); también, las vesículas transportadoras de este neurotransmisor (**VAcHT**), con una distribución semejante a la de la CAT; así como los receptores con los que interactúa la ACh, los receptores muscarínicos (**mAChR**), de naturaleza metabotrópica y los receptores nicotínicos (**nAChR**), de naturaleza ionotrópica (*van der Zee y cols., 1991; Bina y cols. 1993; Castillo-Ruiz y Nunes, 2007; Abbott y cols. 2013*). Se ha reportado que la aplicación de Carbacól (un agonista colinérgico) en el SCN, inhibe al 55% de las neuronas del núcleo, excita al 21% y el 24% restante permanecen sin respuesta, esta proporción es similar a la producida por agonistas muscarínicos, pero no nicotínicos (*Yang y cols., 2010*).

El SCN recibe proyecciones colinérgicas directamente desde distintos núcleos del tallo cerebral como el núcleo tegmental pedúnculo pontino, el tegmento mesopontino, el tegmental laterodorsal y el núcleo parabigeminal (*Trachsel y cols., 1995; Yang y cols., 2010*); y proyecciones de la base del prosencéfalo anterior desde la sustancia innominada y los núcleos basales magnocelulares (**NBM**), y del *septum* medial y la banda diagonal de Broca (*Bina y cols., 1993*). Por su parte, los circuitos colinérgicos extra supraquiasmáticos llevan información indirectamente al SCN (*Trachsel y cols., 1995; Yang y cols., 2010*).

Se ha observado que la disminución de la señal colinérgica en el SCN está relacionada con la expresión tanto de VIP como de AVP en este núcleo. La destrucción del NBM (una de las principales fuentes colinérgicas que inervan al SCN) con ácido araquidónico, reduce la entrada colinérgica al SCN y disminuye la expresión tanto de VIP (en un 33%) como de AVP (en un 23%). Esta disminución está correlacionada con el daño infringido

a las aferencias colinérgicas que llegan al SCN (*Madeira y cols. 2004*) y daría pauta a una regulación de la reproducción por la interacción ACh y VIP.

Estudios previos han mostrado la participación tanto de los mAChR como de los nAChR del SCN en los procesos reproductivos. La estimulación unilateral de los nAChR por la microinyección de nicotina en el SCN izquierdo (**iSCN**) o derecho (**dSCN**), resultó en un mayor número de ovocitos liberados, así como un mayor número de folículos sanos, por lo que los autores sugirieron que en la mañana o en la tarde (9:00h o 19:00h) del proestro, el sistema nicotínico del SCN estimula las vías neuroendocrinas que regulan la ovulación (*Vieyra y cols. 2019*).

En el caso de los mAChR han sido asociados principalmente a la regulación de los desplazamientos de fase del reloj circadiano del SCN. Estudios previos han reportado que la aplicación de carbacól en el SCN (tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*) produce desfases (adelanto o retraso) de la actividad motora o eléctrica de las neuronas, dependiendo del momento del día en que se realice el estímulo colinérgico. Estos cambios de fase no se presentan al bloquear los receptores muscarínicos (M1-M5) con ATR (antagonista competitivo de los receptores muscarínicos). Mientras que parece ser que los receptores muscarínicos M1 y M4 tienen una mayor participación ya que al estimularlos específicamente con McN-A-343 se presenta un efecto similar al producido por el Carbacól (*Liu y cols., 1996; Basu y cols. 2016*). Estos antecedentes, llevaron a plantear que los receptores muscarínicos podrían estar implicados también en la regulación de la ventana de tiempo del SCN que permite la ovulación, por lo que en nuestro laboratorio se bloquearon los receptores muscarínicos del SCN por la microinyección intracerebral de ATR, en la mañana del proestro en el iSCN o dSCN, lo que resultó en el bloqueo del pico preovulatorio de LH y de la ovulación, esta respuesta se restablece por la sustitución de GnRH con LHRH sintética. Estos resultados sugieren que existe una señal colinérgica estimulante que se originan en el SCN y que regula la secreción de GnRH, la de gonadotropinas y por tanto la ovulación (*Vieyra y cols. 2016*).

Interacción de los sistemas colinérgicos, GABAérgicos y VIPérgicos en el SCN

GABA es uno de los principales neurotransmisores presentes en el SCN y se encuentra presente en el 90% de las neuronas del supraquiasmático; se ha descrito que al menos el 93% de la comunicación entre las neuronas del SCN dependen de este neurotransmisor (*Freeman y cols., 2013; McNeill y cols., 2018*). En general, GABA es considerado como el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central, pero, a pesar de ello, su estudio ha sido complicado por su papel en tantos y tan diversos circuitos neuronales en los que participa (*Albers y cols., 2017*). Las proyecciones GABAérgicas del sistema nervioso central pueden dividirse en proyecciones de largo alcance, comprendiendo a la corteza cerebelosa, al globo pálido, la sustancia nigra y el núcleo reticular del tálamo; y de corto alcance, en forma de interneuronas de axón corto, que interactúan localmente en neuronas próximas (*Flórez y Pazos, 2008*).

En el SCN, GABA puede modular la capacidad del núcleo para hacer los cambios de fase en respuesta a las señales lumínicas y no-lumínicas (*McNeill y cols., 2018*). Aunque, GABA es considerado clásicamente como un neurotransmisor de tipo inhibitorio se ha reportado que este neurotransmisor puede tener efectos de tipo excitatorio, por ejemplo, cuando regula los canales a cloro que determinan si la neurona se hiperpolariza o se despolariza. También se ha reportado que, dependiendo de la hora del día, GABA podría tener un efecto excitatorio o inhibitorio, incrementando la tasa de disparo neuronal durante el día y disminuyéndola durante la noche y que este cambio puede darse en cuestión de horas (*Wagner y cols., 1997; Choi y cols., 2008; Freeman y cols., 2013; McNeill y cols., 2018*).

La enzima glutamato descarboxilasa (**GAD**) ha sido descrita en la mayoría de las neuronas del SCN y es la encargada de la síntesis de GABA a partir del ácido glutámico, este es el paso limitante en la síntesis de este neurotransmisor (*Choi y cols., 2008*). Por su parte, la GABA-transaminasa (**GABA-T**) es la encargada del metabolismo de GABA y da como resultado el semialdehído succínico y la regeneración del ácido glutámico a partir del ácido  $\alpha$ -cetoglutarico. En el SCN se encuentran dos isoformas de la GAD

(**GAD65** y **GAD67**) con una expresión diferencial a lo largo del núcleo; así como la GABA-T y las vesículas transportadoras de GABA. Todos estos elementos muestran un ritmo circadiano dentro del SCN, teniendo una mayor expresión en determinados momentos del ciclo de luz-oscuridad (*Flórez y Pazos, 2008; Albers y cols., 2017; Ono y cols., 2018*).

La liberación de GABA por parte de la neurona es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y una vez liberado es recapturado por la membrana celular por medio de dos transportadores de alta y baja afinidad o interactúa con sus receptores de la membrana postsináptica (*Flórez y Pazos, 2008*). Una vez en la hendidura sináptica, GABA puede producir una señal prolongada que puede extenderse hasta por 5 minutos. Este tipo de comunicación es llamado volumen de transmisión y es ejercido principalmente por los astrocitos que liberan GABA (*Albers y cols., 2017*). La acción de GABA, fundamentalmente inhibitoria, tiene lugar a distintos niveles morfológicos de la neurona, tal que, puede producir inhibición presináptica y postsináptica, inhibición local (recurrente) y lateral, así como fenómenos de desinhibición cuando existen varias neuronas inhibitorias en serie (*Flórez y Pazos, 2008*).

Los receptores sobre los que actúa GABA son de tres tipos: el  $\text{GABA}_A$ , que es un magnocomplejo que está asociado a canales de  $\text{Cl}^-$  y permite la interacción alostérica con distintos fármacos; el  $\text{GABA}_B$ , que es un heterodímero asociado a proteínas G que inhiben, por la adenil-ciclasa y por segundos mensajeros, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y facilitan la entrada de  $\text{K}^+$ ; y finalmente, el  $\text{GABA}_C$ , semejante al  $\text{GABA}_A$  y asociado a la conductancia de  $\text{Cl}^-$ . Tanto  $\text{GABA}_A$  como  $\text{GABA}_C$  son los más abundantes en el sistema nervioso, aunque el tipo A predomina en las regiones cerebrales (*Flórez y Pazos, 2008; Albers y cols., 2017*). En el SCN se ha descrito la presencia de los receptores  $\text{GABA}_A$  y  $\text{GABA}_B$ , sin embargo, muchas neuronas del SCN parecen expresar únicamente receptores  $\text{GABA}_A$ , otras sólo  $\text{GABA}_B$  y otras neuronas expresan ambos receptores. Los receptores  $\text{GABA}_A$  tienen una mayor distribución en la parte ventral del SCN que va disminuyendo conforme nos dirigimos hacia la parte dorsal del núcleo y se ha asociado principalmente a la parte dendrítica de las neuronas del SCN. Por el contrario, los receptores  $\text{GABA}_B$

están más posicionados en la parte dorsal y disminuyen hacia la parte ventral del SCN (*Choi y cols., 2008; Albers y cols., 2017*). Se ha sugerido que la señalización por parte de los receptores GABA<sub>A</sub> es la responsable de mantener la diferencia de fase de las distintas subpoblaciones neuronales dentro del SCN para codificar en conjunto el fotoperíodo. Mientras que la señalización de los receptores GABA<sub>B</sub>, aunque menos estudiada, se ha descrito que, en modelos *in vivo*, atenúa la respuesta circadiana a señales lúminicas y regula la liberación pre-sináptica de GABA por medio de la regulación de los canales de Ca<sup>2+</sup> (*Patton y Hastings, 2018*).

Se ha descrito que GABA podría co-liberarse con otros aminoácidos como glicina o el glutamato, aunque sigue siendo rara este tipo de co-liberación de neurotransmisores. Sin embargo, sí existe evidencia anatómica de la co-localización de GABA con neuropéptidos (*Albers y cols., 2017*). En el SCN, GABA está co-localizado tanto en neuronas VIPérgicas como AVPérgicas, sin embargo, algunos estudios apuntan a que se co-localiza con mayor frecuencia en neuronas VIPérgicas, un 70% contra un 35% de co-localización de las neuronas AVPérgicas (*Albers y cols., 2017*).

Por su parte, otro de los principales neurotransmisores presentes en el SCN y que ha sido fundamental en el estudio del SCN es el VIP, un péptido de 28 aminoácidos (aa) que, deriva de un aminoácido precursor de 170 residuos de aa, el PreproVIP (*Gabbay-Benziv y cols., 2012*). Se encuentra en mayor concentración en la corteza cerebral, en particular en interneuronas distribuidas homogéneamente por toda la corteza. También se encuentra distribuido en el hipocampo, el núcleo central de la amígdala, el hipotálamo, el núcleo basal de la estría terminal y la sustancia gris periacueductal. Se ha hecho especial énfasis en fibras VIPérgicas que terminan en la eminencia media donde tienen un papel como elemento regulador de la secreción hipofisaria (*Flórez y Pazos, 2008*).

Al igual que GABA, la liberación de VIP es dependiente de Ca<sup>2+</sup> pero el VIP actúa sobre dos tipos de receptores acoplados a proteínas G, el VPAC 1 y VPAC 2 (*Flórez y Pazos, 2008; Gabbay-Benziv y cols., 2012*). El VIP se ha propuesto como el principal candidato

para transmitir las señales de la luz del medio externo integradas en el SCN hacia los blancos eferentes de este núcleo. Existe evidencia anatómica de una comunicación VIPérgica entre el SCN y las neuronas GnRHérgicas que se encargaría de regular la expresión de c-Fos en estas últimas. Se ha observado que, las neuronas GnRHérgicas sobre las que VIP actúa, incrementan la actividad de c-Fos durante la tarde del proestro previo al pico pre-ovulatorio de LH; efecto que no se presenta al bloquear la vía VIPérgica con antagonistas antisentido de VIP (*Son y cols., 2016; van der Beek y cols., 1994*). Además, se ha observado que la aplicación de VIP incrementa la actividad eléctrica de las neuronas GnRHérgicas cerca del momento del pico de LH, mientras que la aplicación de VIP o sus antagonistas en POA alteran el pico pre-ovulatorio de LH (*Christian y Moenter, 2008; Christian y Moenter, 2010*).

Es evidente que estos sistemas de comunicación tanto de GABA como de VIP mantienen una estrecha y compleja relación dentro del SCN para dar lugar a eventos orgánicos en la ventana de tiempo más adecuada para el organismo.

Barbacka-Surowiak y cols. (*2003*), reportaron que, en el SCN, concentraciones bajas de GABA previas al pico preovulatorio de LH son necesarias en la cascada de señalización que precede a la ovulación. GABA estaría actuando a través de sus canales a cloro acoplados a la membrana y su efecto sería dependiente de su concentración dando a mayor concentración un mayor efecto (*Wagner y cols., 1997*).

Se ha descrito que la ACh es capaz de actuar como regulador de GABA ya que la activación los nAChR desencadena la liberación de GABA, incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática a  $Ca^{2+}$  y permite su unión a las vesículas transportadoras de GABA lo que facilitaría la liberación sináptica de este neurotransmisor (*Czarnecki y cols., 2014; Elgueta y cols., 2015*). Por otra parte, la estimulación de los mAChR en el SCN en la mañana del proestro con ACh o Carbacól (agonista de los receptores muscarínicos), resulta en la disminución de la tasa ovulatoria, lo que permitió sugerir que la ACh induce la liberación de GABA mediante la estimulación de los receptores colinérgicos en el SCN,

que a su vez inhibe la actividad de las neuronas VIPérgicas y AVPérgicas lo que bloquea la señal emitida por el SCN hacia las neuronas GnRHérgicas y por tanto la ovulación.

*(Salinas, 2017; Vieyra y cols., 2019)*

## Justificación

En la rata hembra, durante la mañana del proestro, el SCN se comunica por medio de VIP con las neuronas GnRH para que se lleve a cabo la ovulación. Esta comunicación es mediada por el sistema colinérgico que a su vez estaría regulando la secreción de GABA en el SCN. Sin embargo, aún se desconoce la manera en que GABA regula la ovulación y cómo modifica la comunicación VIPérgica con las neuronas GnRH; por lo que, en el presente estudio, analizamos el efecto de la microinyección de GABA directamente en el iSCN o dSCN sobre la respuesta ovulatoria y la síntesis de VIP.

## Hipótesis

Dado que el GABA es uno de los neurotransmisores del sistema de neurotransmisión inhibitorios del SCN, entonces, la microinyección de GABA en el SCN en la mañana del proestro, resultará en la disminución de la síntesis de VIP y por tanto de la respuesta ovulatoria, efecto que dependerá del SCN microinyectado.

## Objetivos

### **General**

Analizar la participación del sistema GABAérgico del SCN sobre la síntesis de VIP y la respuesta ovulatoria.

### **Particulares**

- Analizar el efecto de la microinyección de GABA en el SCN en la mañana del proestro, sobre la ovulación espontánea y la concentración de LH en plasma.
- Analizar el efecto de la microinyección de GABA en el SCN en la mañana del proestro, sobre la concentración relativa del mVIP en el núcleo.

## Material y Método

### Animales

Se utilizaron ratas hembra adultas de 3 meses de edad (90 días), vírgenes, de nuestra cepa CII-ZV, con peso de entre 230 a 260g. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de luz (encendidas de 05:00h a 19:00h) y temperatura ( $22\pm 2$  °C), con libre acceso al agua y alimento. Se siguieron las normas de la ley de protección animal para el uso de animales de experimentación (NOM-062-ZOO-1999) y el protocolo fue aprobado por el comité de ética de Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM UNAM; FESZ/DEPUCI/236/14. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales a utilizar y su sufrimiento. Se monitoreó el ciclo estral por la toma y examinación de frotis vaginal diario. Sólo aquellas ratas que presentaron al menos 2 ciclos estrales regulares y consecutivos de 4 días de duración fueron usadas para el experimento.

Un grupo de animales sin tratamiento (grupo control, TA) fue sacrificado después de dos ciclos estrales consecutivos para evaluar el número de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados, la concentración de LH y la cuantificación de mVIP en SCN.

### Microinyección unilateral de GABA en el SCN izquierdo o derecho

Entre las 09.00h y 10.00h del proestro, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina ( $40\text{mg Kg}^{-1}/5\text{mg Kg}^{-1}$ ), y para asegurar la efectividad de la anestesia, se pellizó la cola del animal (*Goodchild y cols. 2015*). Una vez verificado el efecto de la anestesia, fueron colocadas en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) colocando la barra de los incisivos en -0.5 (5 mm por debajo de las barras que se colocan en las orejas). La piel de la cabeza fue seccionada y con la ayuda de una disolución 1:1 de agua oxigenada se removió el periostio que cubre al cráneo. Una vez limpio el cráneo, se localizó el punto Bregma para obtener las coordenadas iniciales y calcular la localización del SCN, posteriormente se perforó el cráneo con un torno dental de 1 mm. Las coordenadas que se utilizaron para la localización del SCN son las descritas

por Paxinos y Watson (2004), las cuales se modificaron de acuerdo con la cepa de animales de este estudio (núcleo supraquiasmático izquierdo, iSCN: -0.3mm AP, +0.3mm ML y -9.1 mm DV; núcleo supraquiasmático derecho, dSCN: -0.3 mmAP, -0.3mm ML y -9.1mm DV) basados en estudios previos (Vieyra y cols., 2016; Vieyra y cols., 2019). Una vez calculadas las coordenadas el sistema de microinyección se conectó a una jeringa Hamilton de 25  $\mu$ l a través de un tubo de teflón (0.65mm OD  $\times$  0.12 mm ID; Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN, USA). La jeringa se montó en una bomba de microinyección (CMA/100; BAS, Stockholm, Sweden) y se microinyectó en el iSCN ( $n=8$ ) o en el dSCN ( $n=8$ ), GABA en una concentración de 100 $\mu$ M (con referencia a Choi y cols., 2008) o 10mM disueltos en 0.3 $\mu$ L de solución salina, que sirvió como vehículo (Vh). El volumen total del fármaco fue microinyectado en un minuto y la cánula permaneció en su sitio un minuto adicional para evitar el reflujo. Finalmente se suturó la herida.

Al terminar el procedimiento a los animales se les administró como analgésico 0.2 mg K<sup>-1</sup> de Meloxicam vía intraperitoneal (Meloxinn, InnoPharma S.A. de C.V.; Sagarpa Q-0666-063) y se les colocaron gotas de hipromelosa en los ojos para evitar su desecamiento. Los animales fueron mantenidos en una caja equipada con una manta térmica y una vez recuperados fueron devueltos al bioterio hasta el momento de su sacrificio.

#### Evaluación del efecto de la microinyección de GABA sobre la ovulación

Para evaluar los efectos de la microinyección de GABA en el SCN sobre la ovulación, grupos de animales fueron sacrificados a las 09.00 h del estro vaginal. Los oviductos fueron diseccionados y el número de ovocitos liberados contados con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon, modelo C-PS). El cerebro fue diseccionado en hielo y congelado para verificar la trayectoria de la aguja de microinyección hacia el iSCN o dSCN.

Evaluación del efecto de la microinyección de GABA sobre la concentración de LH. Otro grupo de animales fue sacrificado 8 horas posteriores a la microinyección de GABA (17:00 h del proestro, momento en el cual en nuestra cepa de animales ocurre el “pico” preovulatorio de LH (*Vieyra y cols., 2016*)) en los núcleos supraquiasmáticos izquierdo o derecho. Posterior a la eutanasia se colectó la sangre troncal de cada animal de la cual se extrajo el suero que fue inmediatamente congelado hasta el momento de la cuantificación de LH por ELISA. En estos grupos de animales los cerebros también fueron extraídos para verificar la trayectoria de la microinyección en el iSCN o dSCN.

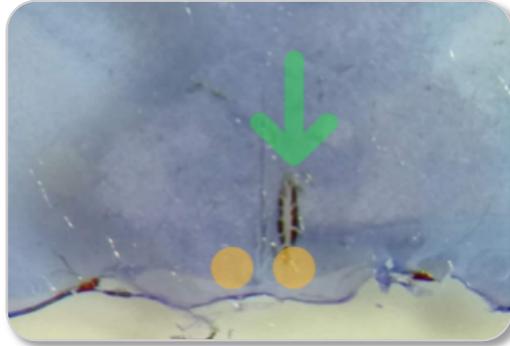


**Figura 7.** Grupos experimentales y flujo de trabajo. Todos los grupos tuvieron un grupo testigo absoluto (TA) al que únicamente se sacrificó en el día y hora que el grupo experimental correspondiente. En todos los animales microinyectados se verificó la trayectoria de la aguja de microinyección en el iSCN o dSCN

#### Procesamiento histológico del Cerebro

Los cerebros congelados de las ratas con microinyección de Vh o GABA fueron seccionados en cortes seriados de 60µm en un criostato (CM1520 – Criostato, Nussloch, Alemania). Los cortes se colocaron en un portaobjetos y se tiñeron con violeta de cresilo

1%. Sólo fueron tomados en cuenta aquellos animales en los que la trayectoria de la microinyección se visualizó en la región del SCN (**Figura 8**).



**Figura 8.** Comprobación de la trayectoria de la microinyección. SCN. Círculos amarillos; la flecha verde señala la trayectoria de la aguja de microinyección

#### q RT-PCR en tiempo real

El RNA total del SCN, de aquellos cerebros en los que se comprobó la trayectoria, fue aislado por el método de extracción de columna con base de sílica gel (RNeasy Kit, QIAGEN S.p.S., Milán, Italia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza e integridad del RNA fueron examinados con un espectrofotómetro y electroforesis, respectivamente. El RNA (1µg) fue sometido a transcripción reversa para la formación de una cDNA por oligo dT, 1µL oligo dT, 1µL de dNTP Mix 8µL de amortiguador y 1µL de inhibidor de ARNasa y agua para un volumen total de 40µL. La mezcla fue incubada a 42 °C durante 50 minutos, 70 °C durante 15 minutos y almacenada a -20 °C hasta su uso. Todos los *primers* fueron diseñados usando PrimerQuest. Las secuencias de los *primers* son:

#### **VIP (NM\_053991.1)**

**For** 5'AGATAACTACACCCGCCTTAGA,

**Rev** 5'CACTGCTCCTCTTCCCATTTAG;

#### **CYCA (NM\_005113.4)**

**For** 5'AGCACTGGGGAGAAAGGATT,

**Rev** 5'AGCCACTCAGTCTTGGCAGT;

### ***Gapdh* (NM\_017008.4)**

**For** 5'TGGTGAAGGTCGGTGTGAACGG,

**Rev** 5'TCACAAGAGAAGGC AGCCCCTGGT.

Todos los *primers* fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (IDT). La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó generando una curva estándar. Los estándares fueron generados por un *pool* de cantidades iguales de cDNA sintético y diluyendo el pool a 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 y 1:810. Cada una de las diluciones fue realizada por triplicado, 5µL de cada muestra se adicionó a 15µL de SYBR Green qPCR Master Mix (QIAGEN) que contenía 100nM de cada *primer* y fue ciclado en el termociclador (StepOne) con el siguiente programa de corrida: 95 °C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y un paso de alineación/extensión de 60 °C durante 60 segundos. La curva de disociación se generó a un incremento de 0.1 °C entre 65 °C y 95 °C después de 40 ciclos. La fluorescencia umbral (*Threshold*) se generó a partir de la curva estándar con un crecimiento exponencial de 2 ( $R^2 > 0.98$ ). El gen de interés (VIP) de cada muestra fue normalizado por *Gapdh* y *Cyca* para cada muestra.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico del grupo de animales sacrificados para evaluar la ovulación fue realizado usando GraphPad Prisma 8. La tasa ovulatoria (es decir, el número de animales ovulantes/el número de animales tratados) se analizó usando la prueba exacta de Fisher. Los datos obtenidos del número de ovocitos liberados y las concentraciones séricas de LH se analizaron usando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey. Valores de *p* menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

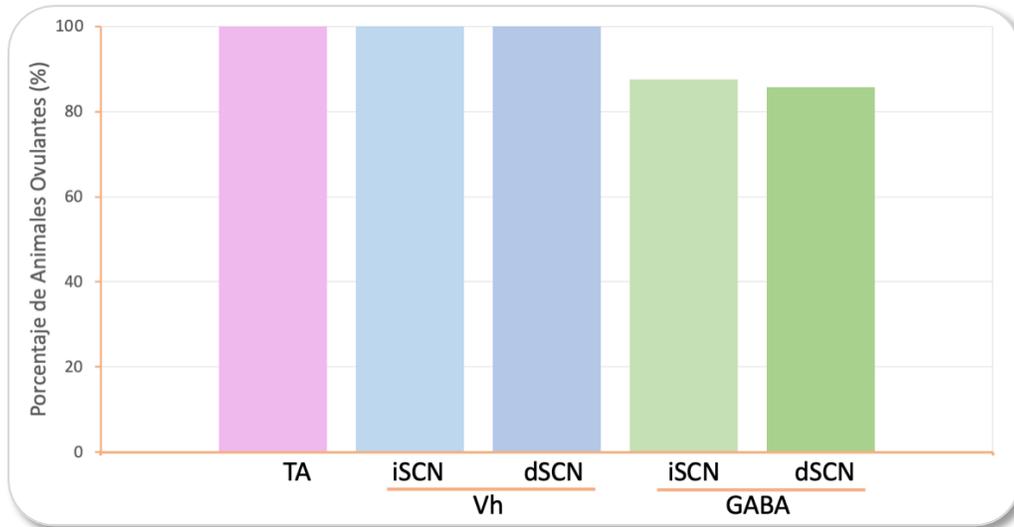
## Resultados

### Ovulación

Para evaluar el efecto de GABA sobre la ovulación se comenzó utilizando una concentración inicial de 100 $\mu$ M basada en estudios previos realizados *in vitro* (Choi y cols., 2008). Sin embargo, esta dosis inicial no modificó ninguno de los parámetros aquí evaluados (datos no mostrados).

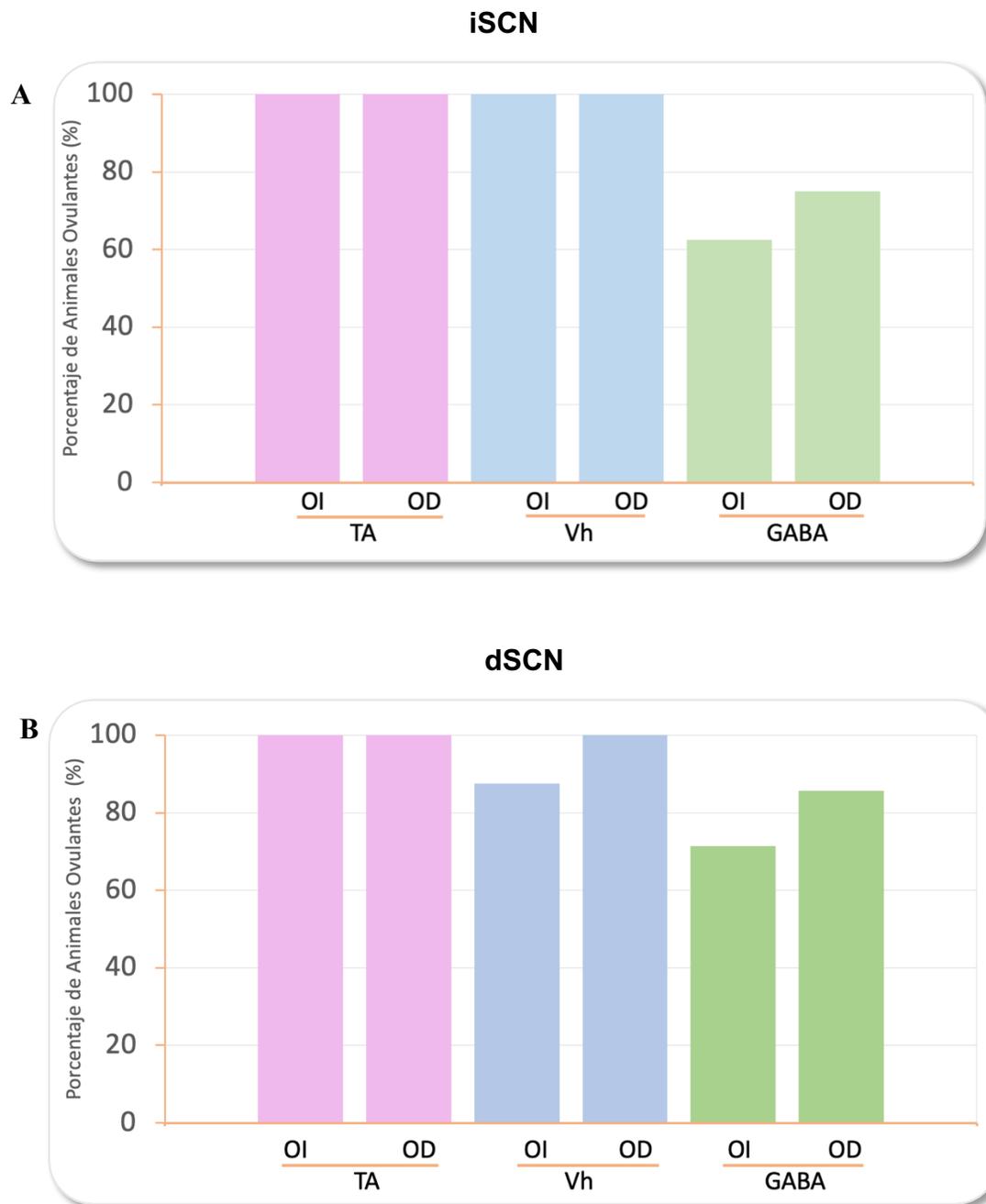
Como limitante del estudio no se logró la realización de una curva dosis respuesta, pero se procedió a incrementar la concentración de GABA a 10mM concentración a la cual estudios previos han mostrado que la mayoría de los receptores GABA están activos. En lo subsecuente, todos los resultados mencionados como GABA son los referentes a la concentración de 10mM.

La microinyección de GABA en el SCN durante la mañana del proestro no modificó el porcentaje de animales ovulantes, independientemente del núcleo microinyectado. Sin embargo, se observa (**Figura 9**) una tendencia a la disminución del porcentaje de animales ovulantes (iSCN, 7/8; dSCN, 7/8).



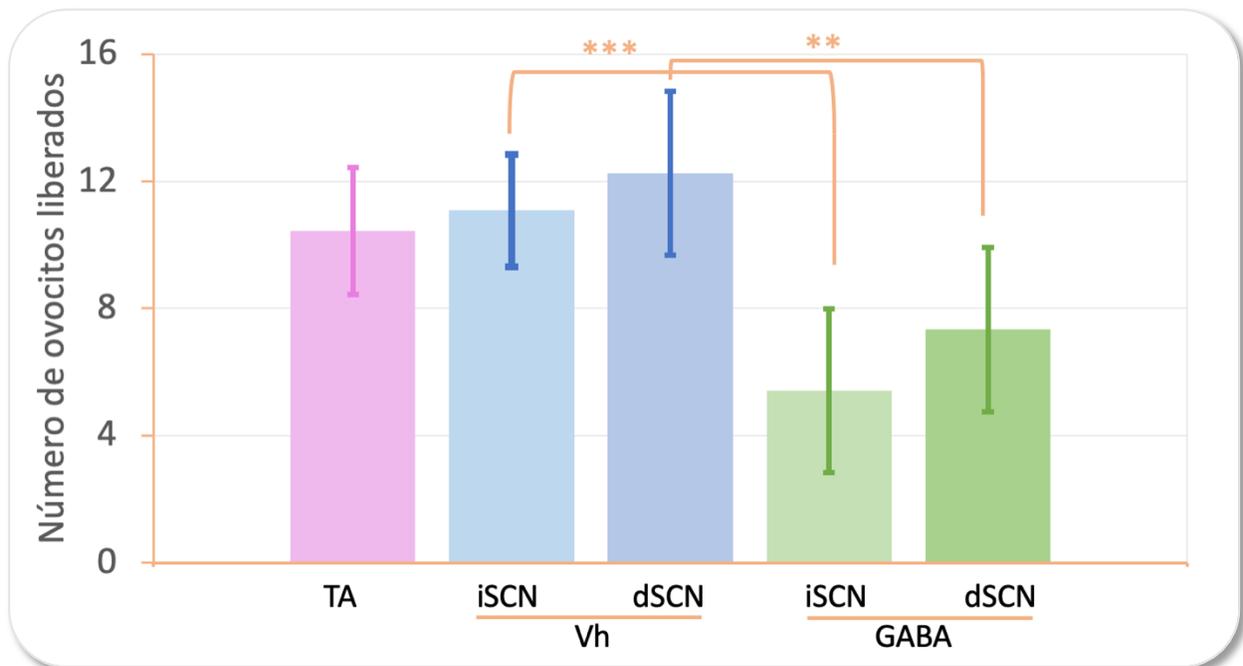
**Figura 9. Porcentaje de animales ovulantes** del grupo testigo absoluto (TA) o tratados en el día del proestro en el SCN izquierdo (iSCN) o derecho (dSCN), con vehículo (Vh) o GABA. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal.

Al analizar el porcentaje de animales ovulantes observamos que el porcentaje de animales ovulantes total no reflejaba correctamente lo presentado al evaluar la ovulación; por lo que decidimos hacer la representación del porcentaje de animales ovulantes, pero representando la ovulación individual de cada ovario (**Figura 10**). Con la microinyección de GABA en el iSCN (**A**) se observa que el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) presentan una tendencia a la disminución más marcada a la observada al evaluar la ovulación total (OI, 5/8; OD, 6/8); efectos similares se observaron (**B**) con la microinyección de GABA en el dSCN (OI, 5/8; OD, 7/8). Independientemente del lado de la microinyección de GABA en el SCN, la respuesta ovulatoria del ovario izquierdo es menor, sin llegar a ser estadísticamente significativa



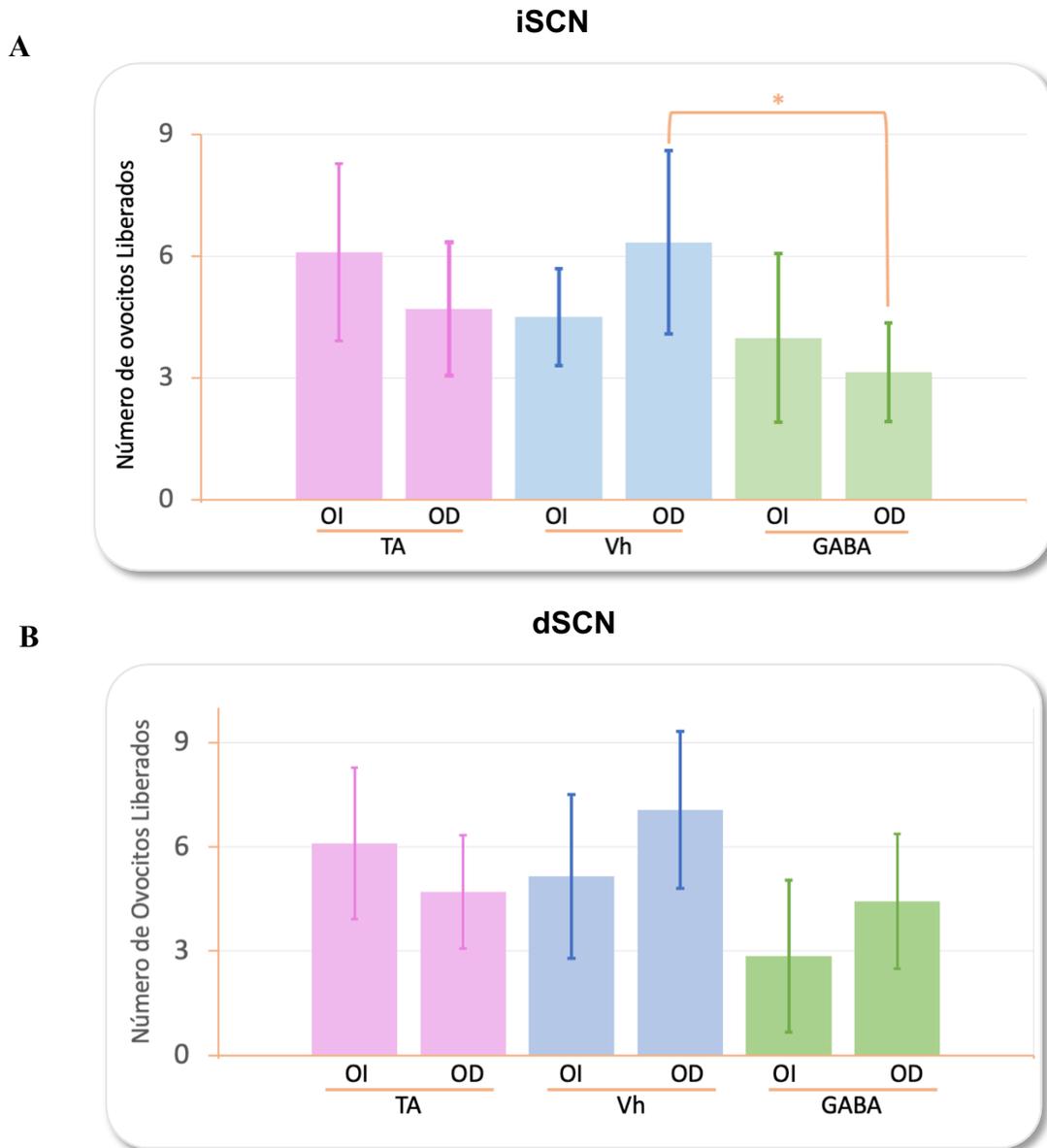
**Figura 10. Porcentaje de ovulación por ovario de animales A) testigo absoluto (TA) o animales microinyectados con vehículo (Vh) o GABA en el SCN izquierdo (iSCN). B) TA o animales microinyectados con Vh o GABA en el SCN derecho (dSCN). Todos los animales fueron tratados en el día del proestro y sacrificados al estro vaginal. OI, ovario izquierdo; OD, ovario derecho.**

Después de analizar la proporción de animales ovulantes, procedimos a analizar si la microinyección de GABA en el SCN afectaba la ovulación de aquellos animales que habían logrado ovular a pesar de la microinyección de GABA. Al realizar la cuantificación del número de ovocitos liberados, se observó que en los grupos tratados con GABA se presenta una disminución significativa de los ovocitos liberados al compararse con su respectivo grupo Vh ( $F(4, 32) = 9.7878; p < 0.001$ ). Este efecto es independiente de si se realiza la microinyección en el SCN izquierdo o derecho, aunque se observa un mayor efecto al realizar la microinyección en el iSCN (**Figura 11**).



**Figura 11.** Media  $\pm$  DS del número de ovocitos liberados de animales testigo absoluto (TA) o tratadas en el día del proestro con vehículo (Vh) en el SCN izquierdo (Vh iSCN) o derecho (Vh dSCN) o tratadas con GABA en el núcleo izquierdo (GABA iSCN) o derecho (GABA dSCN). Todos los animales fueron sacrificados al estro vaginal. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

Cuando analizamos el número de ovocitos liberados por ovario, observamos que al realizar la microinyección de GABA en el iSCN, el ovario contralateral (derecho) es el que presenta una menor ovulación. Efectos similares se observan al realizar la microinyección de GABA en el dSCN, siendo sólo estadísticamente significativo cuando se realiza en el iSCN (**Figura 12**).

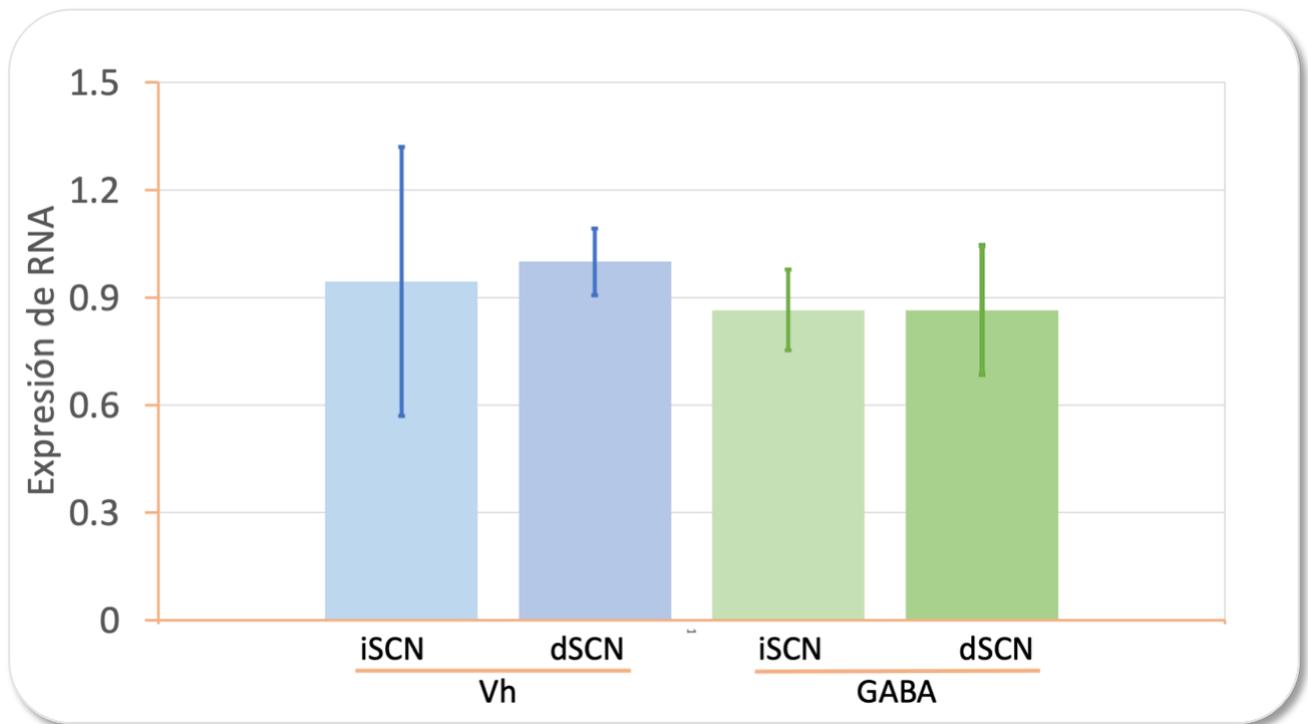


**Figura 12.** Media  $\pm$  DS del número de ovocitos liberados A) ratas testigo absoluto (TA) o con solución salina (Vh) en el SCN izquierdo (Vh iSCN) o GABA, (GABA iSCN). B) microinyectadas con solución salina en el SCN derecho (Vh dSCN) o GABA (GABA dSCN) a las 09:00 h del proestro y sacrificadas al estro vaginal. \* $p < 0.05$ . ANOVA seguida de Tukey. **OI**, ovario izquierdo; **OD**, ovario derecho.

### Expresión de mRNA de VIP

Dado que sólo observamos diferencias significativas en la ovulación al realizar la microinyección de GABA en la concentración de 10mM fue la que se usó para evaluar la expresión de mRNA de VIP en el SCN (**Figura 13**). Debido a la dificultad que representa la microinyección en el SCN y la extracción precisa de este núcleo, se consideró que cada muestra era limitada y por tanto se procedió al análisis de los resultados obtenidos en la corrida con una eficiencia de amplificación relativamente baja ( $R^2=0.75$ ).

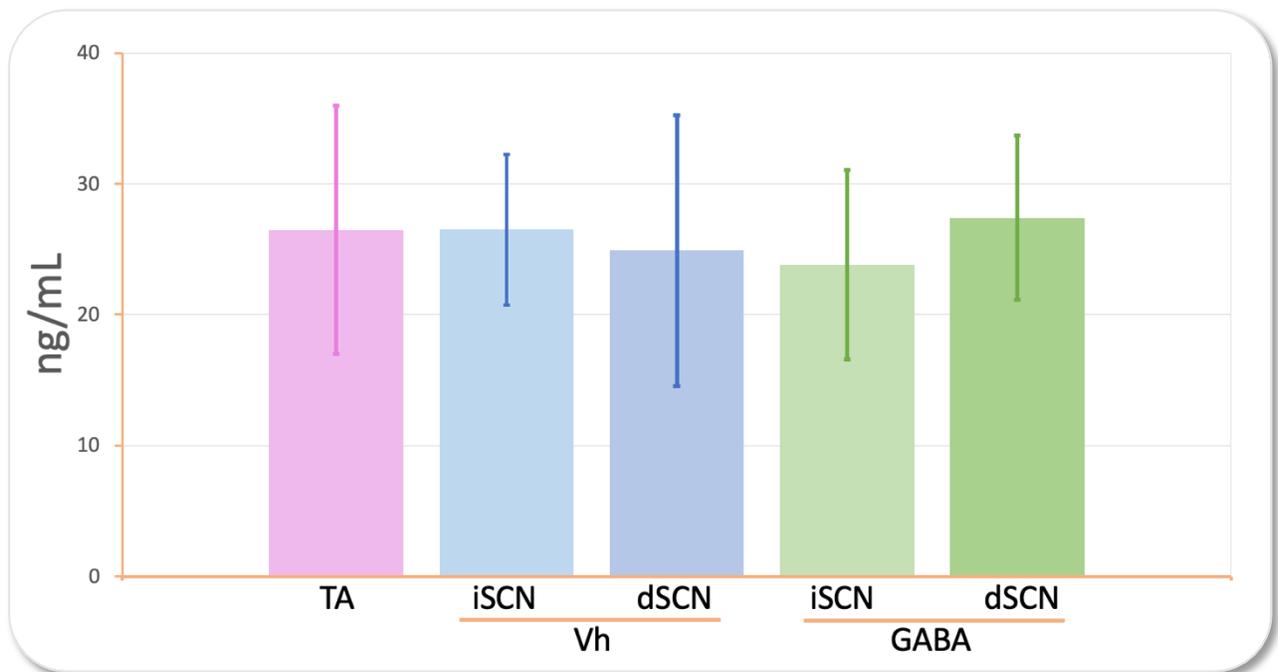
La **Figura 13**, muestra el número de veces que se incrementa o disminuye el mRNA de VIP del SCN con respecto al grupo TA. Como se mencionó en materiales y método esta gráfica está normalizada con respecto al TA. No se observan diferencias significativas en la expresión del mRNA de VIP del SCN en ninguno de los tratamientos.



**Figura 13. Expresión de mRNA de VIP en el SCN.** La gráfica fue normalizada con respecto al grupo control (TA) y representa el número de veces que incrementa o disminuye con respecto a éste. ANOVA

### Concentración sérica de LH

Debido a la disminución en el número de ovocitos liberados a causa de la microinyección de GABA en el SCN supusimos que el incremento de GABA en el SCN podría estar interviniendo en la señalización que produce el pico de la LH, por lo que procedimos a su cuantificación sérica por medio de ELISA (**Figura 14**). La microinyección de GABA en ninguno de los SCN produce un cambio en la concentración sérica de LH comparado con el grupo Vh.



**Figura 14. Concentración sérica de LH**, evaluada a las 17 h del día del proestro. La concentración (media±DE) de LH (ng/mL) de los animales testigo (TA) o microinyectados con vehículo (Vh) o GABA en el SCN izquierdo (iSCN) o derecho (dSNC) a las 9h del día del proestro y sacrificadas a las 17h del mismo día. ANOVA.

## Análisis y discusión de resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten sugerir que, durante la mañana de proestro, la liberación de GABA dentro del SCN regula de manera inhibitoria los procesos que culminan con la ovulación; donde, las señales VIPérgicas, que se originan en este núcleo y que llega a neuronas GnRHérgicas, no participan en la regulación de la liberación del ovocito.

Una de las limitantes del presente estudio es la falta de antecedentes de la utilización de GABA en el SCN en estudios *in vivo*, por lo que la dosis inicial (100µM) que utilizamos está basada en estudios previos realizados *in vitro* (Choi y col., 2008). Además, no fue posible realizar una curva dosis-respuesta para la microinyección de GABA en el SCN, sin embargo, estudios previos sugieren que los distintos receptores de GABA se activan a distintas concentraciones del neurotransmisor, siendo los receptores GABA<sub>A</sub> fásicos los activados a concentraciones mayores a 1mM (Albers y col, 2017), mientras que en estudios *in vivo*, utilizando muscimol (agonista selectivo de receptores GABA<sub>A</sub>) se observa que una concentración de 10mM produce efectos más notorios en el retraso de la actividad locomotora (Novak y Albers, 2003).

En el presente estudio, iniciamos microinyectando GABA en el SCN en una concentración baja de 100µM, la cual, no modificó ninguno de los parámetros evaluados. Sin embargo, al incrementar la concentración a 10mM, observamos una tendencia a la disminución en el porcentaje de animales ovulantes, lo que sugiere que los efectos de la microinyección de GABA en el SCN sobre la ovulación, dependen de la concentración del fármaco. Este efecto dependiente de la concentración de GABA sobre las neuronas del SCN, ya ha sido descrito con anterioridad por distintos grupos de trabajo. Wagner y cols. (1997), observaron que la tasa de disparo neuronal del SCN disminuye de manera proporcional al incremento de la concentración de GABA.

Reforzando esta idea, Shinohara y cols. (2000), observaron que al aplicar muscimol (agonista GABAérgico de receptores GABA<sub>A</sub>) en rebanadas de cerebro que contenían al SCN, se inhibía la despolarización de las neuronas del SCN, efecto que dependía de la concentración del agonista. Mientras que este mismo fármaco en estudios *in vivo* produce un retraso mayor en la presentación de la actividad locomotora conforme se incrementa la concentración (Novak y Albers, 2003). Más recientemente, el grupo de Hummer (2015), evaluaron la actividad locomotora de animales mantenidos en oscuridad constante y observaron que el muscimol produce retrasos de fase en la actividad locomotora y que, conforme se incrementa la concentración del fármaco el retraso en la presentación de la actividad locomotora es mayor, por lo que concluyen que los efectos de la activación del receptor de GABA<sub>A</sub> es dependiente de la concentración. Con estos antecedentes es probable que, en nuestro estudio, si se incrementa más la concentración de GABA en el SCN, observemos una mayor disminución en la ovulación presentada por los animales microinyectados con GABA.

Por otra parte, aunque observamos una tendencia a la disminución del porcentaje de animales ovulantes microinyectados con GABA en el SCN izquierdo o derecho, ésta no fue estadísticamente significativa al compararlo con los animales tratados con Vh. Esto puede explicarse porque únicamente tratamos uno de los SCN, mientras que el otro SCN, al permanecer intacto, podría estar compensando la alteración del SCN tratado y emitiendo una señal “normal” a las neuronas GnRHérgicas, evitando que observemos un efecto. Aunque ambos núcleos supraquiasmáticos se sincronizan para emitir un solo ritmo y una ventana de tiempo para los eventos reproductivos, cada uno de ellos puede actuar de manera independiente e, incluso, una fracción de ellos puede generar su propio ritmo, permitiendo que en caso de alguna alteración del SCN no se pierda su funcionalidad temporal (Liu y Reppert, 2000). Además de esta independencia, se ha descrito que la comunicación del SCN con las neuronas GnRHérgicas es monosináptica y mayormente ipsilateral (van der Beek y cols., 1997; Kriegsfeld y cols., 2004), por lo que el efecto producido por la alteración de sólo uno de los núcleos supraquiasmáticos posiblemente modificó las señales provenientes del SCN que regulan la secreción de GnRH y por tanto de LH del mismo lado al que se realiza la microinyección de GABA.

En el presente estudio, observamos que la estimulación de los receptores de GABA en el SCN, afecta la respuesta ovárica de distinta manera, ya que en los animales tratados con GABA, el ovario izquierdo liberó un número de ovocitos semejante a un animal con vehículo o sin tratamiento, mientras que, el ovario derecho liberó una menor cantidad de ovocitos (**Figura 12**), y dado que, en el animal tratado con GABA ambos ovarios están expuestos a las mismas señales hormonales, esta respuesta lateralizada implica que debe existir una regulación no sólo hormonal sino también de otro tipo entre el SCN y los ovarios, que podría ser de tipo nerviosa. Estudios previos describen que el SCN puede transmitir su temporalidad al resto del organismo a través de la comunicación que sostiene a través del PEVN con los núcleos que dan origen al nervio vago (*Buijs y cols., 2014*). Tóth y cols. (*2007; 2008*) y Gerendai y cols. (*2009*), plantearon que el nervio vago podría ser una vía nerviosa que regula la función ovárica y que comunica a los ovarios con distintos núcleos cerebrales; estos grupos de trabajo inyectaron trazadores retrógrados en el ovario, izquierdo o derecho, y observaron que las neuronas que inervan los ovarios se localizaban en dos los núcleos de los que se origina el nervio vago (núcleo del tracto solitario y núcleo motor dorsal del vago). Otros grupos de trabajo han mostrado que el nervio vago participa en la regulación de las funciones ováricas. Se ha observado que la vagotomía reduce la respuesta de los ovarios a las gonadotropinas (*Cruz y cols., 1986*), reduce el número de ovocitos liberados (*Nakamura y cols., 1992*) e inhibe la hipertrofia compensatoria del ovario (*Burden y Lawrens, 1977*). En nuestro grupo de trabajo, García (*2016*), observó que, en la rata hembra, durante la mañana del proestro, la microinyección de ATR en el SCN, izquierdo o derecho, produce un bloqueo de la ovulación, efecto que no se observa al seccionar el nervio vago derecho. En conjunto, nuestros resultados podrían indicar que, en la mañana del proestro, el SCN emite una señal nerviosa a través del nervio vago que regula de manera diferencial la ovulación.

El número de ovocitos liberados en las ratas ovulantes no se vio modificado por la microinyección en el SCN de GABA a la concentración de 100µM, mientras que, al incrementar la concentración del fármaco a 10mM, el número de ovocitos liberados disminuyó significativamente, independientemente del SCN microinyectado. Esto nos

lleva a suponer que, aunque ninguna de las dos concentraciones de GABA que utilizamos fue suficiente para bloquear la ovulación total en los animales tratados, sí actúa sobre la respuesta de los folículos ováricos a las gonadotropinas, de manera que éstos no responden de manera normal a las señales hormonales, lo que se traduce en una cuota ovulatoria menor.

Al realizar la microinyección de GABA en el SCN también observamos que el ovario contralateral al núcleo tratado presenta una menor cuota ovulatoria. Con anterioridad se ha planteado que esta respuesta diferencial de los ovarios ante los mismos estímulos es regulada por inervación ovárica proveniente del nervio ovárico superior (**NOS**) (*Domínguez y cols., 2003; Ramírez y cols., 2017*) y el nervio vago (*Gerendai y cols., 2009; Buijs y cols., 2014; Loh y cols., 2014*), por lo que, sugerimos que posiblemente esta comunicación contralateral entre los ovarios y el SCN se dé vía nervio vago, el cual, ante el incremento de GABA en el SCN, emite una señal de tipo inhibitoria que evita la liberación del ovocito. En conjunto, estos resultados nos llevan a plantear que conforme se incrementa la concentración de GABA, el efecto en la no-liberación del ovocito es progresivo. Además, sugerimos que esta regulación por parte de GABA podría darse a dos niveles: a través de la comunicación neural del SCN con los ovarios o, de manera no excluyente, por la regulación de las neuronas GnRHérgicas por parte del SCN.

Se ha planteado que el VIP forma parte de la vía de comunicación entre el SCN y las neuronas GnRH, ya que existe evidencia de la aposición de neuronas VIPérgicas del SCN hacia núcleos GnRHérgicos (*van der Beek y cols., 1997; Mahoney & Smale, 2005*), y la infusión en el SCN de oligonucleótidos antisentido para VIP reduce la concentración plasmática de LH (*Harny y cols., 1996*). Estos antecedentes, nos llevaron a analizar la posibilidad de que la microinyección de GABA en el SCN modificara la síntesis del VIP y con ello los pulsos GnRHérgicos, lo que conllevaría a una menor cuota ovulatoria, razón por la cual se evaluó la síntesis del mRNA de VIP en el SCN.

La estimulación del sistema GABAérgico del SCN, no modificó la concentración del RNA mensajero de VIP, por lo que sugerimos que en la mañana del proestro, la síntesis de

VIP no se modifica por la presencia de GABA en el SCN, sin embargo, debido a las limitaciones del RT-PCR, únicamente estamos midiendo la concentración del mRNA, pero no su traducción o la liberación del neurotransmisor, no podemos descartar la participación del VIP en los mecanismos que regulan la ovulación (*Bustin, 2002; Dheda y cols., 2004*).

Una explicación que puede darse a nuestros resultados es que existan reguladores epigenéticos, mediados por GABA, que impidan la traducción a proteína de VIP y por tanto su función reguladora sobre la GnRH. Se ha descrito que, en el SCN, tanto GABA como el muscimol, son capaces de modificar la cantidad de mRNA de *per1* y *per2* (*Buijs y cols., 1994; Ehlen y cols., 2008*) que, a su vez, modulan elementos de respuesta sobre el material genético de las neuronas del SCN que regulan tanto la expresión como la síntesis de los genes reloj y genes funcionales de este núcleo (*Golombeck y Rosenstein, 2010*).

Otra posible explicación sería que la microinyección de GABA en el SCN esté impidiendo la liberación VIP. GABA puede reducir el influjo de  $Ca^{2+}$  al interior de las neuronas del SCN (*Irwin & Allen, 2009*); este influjo de  $Ca^{2+}$  es necesario para la liberación de neurotransmisores vesiculares como el VIP.

Otra característica que debemos considerar de los circuitos neuronales del SCN, es que poseen una temporalidad desconocida, lo que nos lleva a sugerir que, quizá, podríamos no estar midiendo la expresión del mRNA de VIP en el momento adecuado (*Dheda y cols., 2004; Xu y cols., 2012*). El pico de expresión del mensajero de VIP podría presentarse antes o después del momento en el que realizamos su cuantificación, por lo que son necesarios más estudios donde se realice la cuantificación del mRNA de VIP a distintas horas del día. Por último, debemos considerar que el SCN es un núcleo pequeño (aproximadamente  $300\mu\text{m}$  de radio), cuyo aislamiento para la extracción de su RNA total es complicado y, por tanto, la eficiencia en las curvas de amplificación en el RT-PCR, no es tan alta como se podría esperar, lo que dificulta la precisión de la cuantificación del

mRNA de VIP que sólo representa un porcentaje menor del RNA total (*Bustin, 2002; Zhao y Rusell, 2005*).

Dado que observamos la disminución de la cuota ovulatoria en respuesta a la microinyección con GABA, decidimos analizar si esta respuesta fue dada por una alteración de la concentración de LH. En el presente estudio, no encontramos cambios en la concentración de LH en los animales microinyectados con GABA. Ya que la microinyección se realizó de manera unilateral, es posible que al mantenerse un núcleo intacto se pueda dar una respuesta compensatoria por este núcleo, que resulte en la secreción de pulsos normales de GnRH y por ende de la liberación normal de LH.

En conclusión, el incremento de GABA en uno de los SCN no modifica la síntesis del mRNA de VIP ni la concentración sérica de LH, sin embargo, sí disminuye el número de ovocitos liberados. Por lo que sugerimos que la regulación de la ovulación se da a través de una vía nerviosa entre el SCN y los ovarios. No podemos descartar que GABA regula la secreción de GnRH, y por tanto la ovulación, a través de AVP. Se ha descrito que la AVP que libera el SCN llega a distintos núcleos hipotalámicos como POA, AvPV y ARC en los que puede regular tanto la secreción de Kiss1 como de GnRH y que podría ser a través de este neurotransmisor que se establezca el ritmo circadiano de la reproducción (*Mieda, 2019*), pero se requiere de más estudios para analizar esta posibilidad.

## Conclusiones

- El incremento de GABA en el SCN ejerce un efecto inhibitorio sobre la respuesta ovulatoria
- La regulación ejercida por GABA sobre el SCN no modifica la síntesis del mRNA de VIP
- El incremento de GABA en el SCN, durante la mañana del proestro, no modifica la concentración sérica de LH

## Bibliografía

- Abbott, S. M., Arnold, J. M., Chang, Q., Miao, H., Ota, N., . . . Gillette, M. U. (2013). Signals from the Brainstem Sleep/Wake Centers Regulate. *Plos One*, 8, 1-11.
- Aguilar-Roblero, R., Guadarrama, P., Mercado, C., & Chavez, J. L. (2004). El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. *Ritmos circadianos en roedores*, 321-330.
- Albers HE, Walton JC, Gamble KL, McNeill IV JK, Hummer DL. (2017) The dynamics of GABA signaling: Revelations from the circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, (44) 35-82
- Arai, Y., Ishii, H., Kobayashi, M., & Ozawa, H. (2017). Subunit profiling and functional characteristics of acetylcholine receptors in GT1-7 cells. *Journal of Physiological Sciences*, 313-323.
- Barbacka-Surowiak, G., Surowiak, J., & Stoklosowa, S. (2003). The involvement of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. *Reproductive Biology*, 99-130.
- Basu, P., Wensel, A. L., McKibbin, R., Lefebvre, N., & Antle, M. C. (2016). Activation of M1/4 receptors phase advances the hamster circadian clock during the day. *Neuroscience letters*, 621, 22–27.
- Bedont, J. L., & Blackshaw, S. (2015). Constructing the suprachiasmatic nucleus: a watchmaker's perspective on the central clockworks. *Front. Syst. Neurosci.* 9:74.
- Bina, K. G., & Rusak, B. (1996). Muscarinic receptors mediate carbachol-induced phase shifts of circadian activity rhythms in Syrian hamsters. *Brain Research*, 202-211.
- Bina, K. G., Rusak, B., & Semba, K. (1993). Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *The journal of comparative neurology*, 295-307.
- Boden, M. J., Varcoe, T. J., & Kennaway, D. J. (2013). Circadian regulation of reproduction: From gamete to offspring. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 387-397.
- Brown-Grant, K., & Raisman, G. (1977). Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proc. R. Soc. Lond*, 279-296
- Buijs, R. M., Hou, Y. X., Shinn, S., & Renaud, L. P. (1994). Ultrastructural evidence for intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus. *The Journal of comparative neurology*, 340(3), 381–391.
- Buijs, F. N., Cazarez, F., Basualdo, M. C., Scheer, F. A., Perusquía, M., Centurion, D., & Buijs, R. M. (2014). The suprachiasmatic nucleus is part of a neural feedback circuit adapting blood pressure response. *Neuroscience*, 266, 197–207
- Burden, H. W., & Lawrence, I. E., Jr (1977). The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology*, 23(6), 368–378. <https://doi.org/10.1159/000122685>
- Castillo-Ruiz A, Nunez AA. (2007) Cholinergic projections to the suprachiasmatic nucleus and lower subparaventricular zone of diurnal and nocturnal rodents. *Brain Res.* 2;1151:91-101
- Choi HJ, Lee CJ, Kim YS, Jung SH, Kim JS, Kim DY, Son EJ, Han HC, Hong SK, Colwell CS, y Kim YI (2008) Excitatory Actions of GABA in the Suprachiasmatic Nucleus. *The Journal of Neuroscience* 28(21):5450 –5459

- Christian, C. A., & Moenter, S. M. (2008). Vasoactive Intestinal Polypeptide can excite Gonadotropin-Releasing Hormone neurons in a manner dependent on Estradiol and Gated by time of day. *Endocrinology*, 3130-3136.
- Christian, C. A., & Moenter, S. M. (2010). The Neurobiology of Preovulatory and Estradiol-Induced Gonadotropin-Releasing Hormone Surges. *Endocrine Reviews* 31: 544–577.
- Cruz, M. E., Chávez, R., & Domínguez, R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 38(2), 167–171.
- Czarnecki, A., Le Corronc, H., Rigato, C., Le Bras, B., Couraud, F., Scain, A. L., . . . Legendre, P. (2014). Acetylcholine controls GABA-, glutamate-, and glycine- dependent giant depolarizing potentials that govern spontaneous motoneuron activity at the onset of synaptogenesis in the mouse embryonic spinal cord. *The Journal of Neuroscience*, 6389-6404.
- Davis B, Sadik K. (2006) Circadian cholinergic rhythms: implications for cholinesterase inhibitor therapy. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 21(2):120-9
- Domínguez R, Morales L, Cruz ME. (2003) Ovarian asymmetry. *Annu Rev Biomed Sci* 5, 95-104
- Ehlen, J. C., Novak, C. M., Karom, M. C., Gamble, K. L., & Albers, H. E. (2008). Interactions of GABA A receptor activation and light on period mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of biological rhythms*, 23(1), 16–25.
- Elgueta, C., Vielma, A. H., Palacios, A. G., & Schmachtenberg, O. (2015). Acetylcholine induces GABA release on rod bipolar cells through heteromeric nicotinic receptors expressed in A17 amacrine cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 1-11.
- Flórez J y Pazos A. (2008). Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En *Farmacología Humana* de Jesús Flores, 495-522
- Freeman Jr GM, Krock RM, Aton SJ, Thaben P, y Herzog ED (2013) GABA networks destabilize genetic oscillations in the circadian pacemaker. *Neuron*. 78(5): 799–806
- Gabbay-Benziv R, Ao A, Fisch B, Zhang L, Oron G, et al. (2012) Vasoactive Intestinal Peptide and Its Receptors in Human Ovarian Cortical Follicles. *PLoS ONE* 7(5): e37015. doi:10.1371/journal.pone.0037015
- García, J. C. (2016). La información vagal regula la actividad ovárica en animales con bloqueo del sistema colinérgico del núcleo supraquiasmático. *Tesis de Licenciatura. FES Zaragoza. UNAM.*
- Gerendai, I., Toth, I. E., & Boldogkői, Z. (2009). Recent findings on the organization of central nervous system structures involved in the innervation of endocrine glands and other organs; observations obtained by the transneuronal viral double-labeling technique. *Endocrinology*, 179-188.
- Golombek, D. A., & Rosenstein, R. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiology Rev*, 1063-1102.
- Gómez, R., Lima, I., Simón, C., & Pellicer, A. (2004). Administration of low-dose LH induces ovulation and prevents vascular hyperpermeability and vascular endothelial growth factor expression in superovulated rats. *Reproduction (Cambridge, England)*, 127(4), 483–489.
- Goodchild, C. S., Serrano, J. M., Kolosov, A., & Boyd, B. J. (2015). Alphaxalone reformulated: A water-soluble intravenous anesthetic preparation in sulfobutyl-ether-β-cyclodextrin. *Anesthesia & analgesia*, 1025-1031.
- Hall, J. E. (2010). The Female reproductive System: Infertility and contraception. En Harrison, *Endocrinology* (págs. 186-200). Mexico: Mc Graw Hill.

- Hall, J. E. (2014). Neuroendocrine control of the cycle. En Yen, & Jaffe, *Reproductive Endocrinology* (págs. 141-160). Philadelphia: Elsevier.
- Harney, J. P., Scarbrough, K., Rosewell, K. L., & Wise, P. M. (1996). In vivo antisense antagonism of vasoactive intestinal peptide in the suprachiasmatic nuclei causes aging-like changes in the estradiol-induced luteinizing hormone and prolactin surges. *Endocrinology*, 137(9), 3696–3701.  
<https://doi.org/10.1210/endo.137.9.8756535>
- Hummer, D. L., Ehlen, J. C., Larkin, T. E., 2nd, McNeill, J. K., 4th, Pamplin, J. R., 2nd, Walker, C. A., Walker, P. V., 2nd, Dhanraj, D. R., & Albers, H. E. (2015). Sustained activation of GABAA receptors in the suprachiasmatic nucleus mediates light-induced phase delays of the circadian clock: a novel function of ionotropic receptors. *The European journal of neuroscience*, 42(2), 1830–1838. <https://doi.org/10.1111/ejn.12918>
- Ikeda, M. (2004). Calcium dynamics and circadian rhythms in suprachiasmatic nucleus neurons. *The Neuroscientist*, 315-324.
- Inouye, S.-I. T., & Shibata, S. (1994). Neurochemical organization of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience research*, 109-130.
- Irwin RP, Allen CN. GABAergic signaling induces divergent neuronal Ca<sup>2+</sup> responses in the suprachiasmatic nucleus network. *Eur J Neurosci*. 2009 Oct;30(8):1462-75.
- Kennaway, D. J., Boden, M. J., & Varcoe, T. J. (2012). Circadian rhythms and fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 56-61.
- Kriegsfeld, L. J., Leak, R. K., Yackulic, C. B., Lesauter, J., and Silver, R. (2004). Organization of suprachiasmatic nucleus projections in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*): an anterograde and retrograde analysis. *J. Comp. Neurol.* 468, 361–379.
- Kow, L. M., & Pfaff, D. W. (1984). Suprachiasmatic neurons in tissue slices from ovariectomized rats: electrophysiological and neuropharmacological characterization and the effects of estrogen treatment. *Brain Research*, 275-286.
- Levine, J. E. (2015). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En Knobil, & Neill, *Physiology of Reproduction* (págs. 1199-1257). Elsevier.
- Liu, C., & Gillette, M. U. (1996). Cholinergic regulation of the suprachiasmatic nucleus circadian rhythm via a muscarinic mechanism at night. *The Journal of Neuroscience*, 744-751.
- Liu, C., & Reppert, S. M. (2000). GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, 123-128.
- Loh, D. H.-W., Kuljis, D. A., Azuma, L., Wu, Y., Truong, D., Wang, H.-B., & Colwell, C. S. (2014). Disrupted reproduction, estrous cycle, and circadian rhythms in female vasoactive intestinal peptide deficient mice. *J Biol Rhythms*, 355-369.
- Ma, Y. J., Kelly, M. J., & Rönnekleiv, O. K. (1990). Pro-Gonadotropin-Releasing Hormone (ProGnRH) and GnRH content in the Preoptic Area and the Basal Hypothalamus of Anterior Medial Preoptic Nucleus/Suprachiasmatic Nucleus-lesioned persistent estrous rats. *Endocrinology*, 2654-2664.
- Madeira, M. D., Pereira, P. A., Silva, S. M., Cadete-Leite, A., & Paula-Barbosa, M. M. (2004). Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 889-901.
- Mahoney, M. M., & Smale, L. (2005). Arginine vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide fibers make appositions with gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor cells in the diurnal rodent *Arvicanthis niloticus*. *Brain Research*, 156-164.

- Mahoney, M. M., Sisk, C., Ross, H. E., & Smale, L. (2004). Circadian regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone neurons and the preovulatory surge in Luteinizing Hormone in the diurnal rodent, *Arvicanthis nolticus*, and in a nocturnal rodent, *rattus norvegicus*. *Biology of Reproduction*, 1049-1054.
- Mitra, S. W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H. A., Hayashi, S., Pfaff, D. W., Ogawa, S., Rohrer, S. P., Schaeffer, J. M., McEwen, B. S., & Alves, S. E. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, 144(5), 2055–2067.
- McNeill IV JK, Walton JC y Albers HE. (2018) Functional significance of the excitatory effects of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol. Rhythms*. 33 (4): 376–387
- Moore, R. Y., Speh, J. C., & Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Research*, 89-98.
- Nakamura, Y., Kato, H., & Terranova, P. F. (1992). Abdominal vagotomy decreased the number of ova shed and serum progesterone levels on estrus in the cyclic hamster. *Endocrinologia japonica*, 39(1), 141–145. <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.39.141>
- Novak, C. M., & Albers, H. E. (2004). Novel phase-shifting effects of GABA<sub>A</sub> receptor activation in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal rodent. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 286(5), R820–R825. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00575.2003>
- Ono D., Honma K., Yanagawa Y., Yamanaka A., Honma S. (2018) Role of GABA in the regulation of the central circadian clock of the suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Physiological Sciences* 68:333–343
- Patton AP & Hastings MH (2018) The suprachiasmatic nucleus. *Current Biology* 28, R803–R825.
- Piet, R., Fraissenon, A., Boehm, U., & Herbison, A. E. (2015). Estrogen permits Vasopressin signaling in Preoptic Kisspeptin neurons in the female mouse. *The Journal of Neuroscience*, 6881-6892.
- Robertson, J. L., Clifton, D. K., de la Iglesia, H. O., Steiner, R. A., & Kauffman, A. S. (2009). Circadian regulation of Kiss1 neurons: Implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 3664-3671.
- Shinohara, K., Hiruma, H., Funabashi, T., & Kimura, F. (2000). GABAergic modulation of gap junction communication in slice cultures of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 96(3), 591–596. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(99\)00556-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(99)00556-4)
- Simonneaux, V., Bahougne, T., & Angelopoulou, E. (2017). Daily rhythms count for female fertility. *Best Practice & Research*, 505-519.
- Son YL, Ubuka T, Soga T, Yamamoto K, Bentley GE, y Tsutsui K, (2016) Inhibitory action of gonadotropin-inhibitory hormone on the signaling pathways induced by kisspeptin and vasoactive intestinal polypeptide in GnRH neuronal cell line, GT1-7 *FASEB J*. 30, 2198–2210
- Son YL, Ubuka T and Tsutsui K (2019) Molecular Mechanisms of Gonadotropin-Inhibitory Hormone (GnIH) Actions in Target Cells and Regulation of GnIH Expression. *Front. Endocrinol.* 10:110.
- Stamatiades GA, Kaiser UB (2017) Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 5;463:131-141.
- Sun, Y., Shu, J., Kyei, K., & Neal-Perry, G. S. (2012). Intracerebroventricular infusion of vasoactive intestinal Peptide rescues the luteinizing hormone surge in middle-aged female rats. *Frontiers in endocrinology*, 3, 24

- Tonsfeldt, K. J., & Chappell, P. E. (2012). Clocks on top: The role of the circadian clock in the hypothalamic and pituitary regulation of endocrine physiology. *Molecular and cellular endocrinology*, 3-12.
- Tóth, I. E., Wiesel, O., Boldogkoi, Z., Bálint, K., Tapaszi, Z., & Gerendai, I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. *Microscopy research and technique*, 70(8), 710–718. <https://doi.org/10.1002/jemt.20456>
- Tóth, I. E., Banczerowski, P., Boldogkoi, Z., Tóth, J. S., Szabó, A., Halász, B., & Gerendai, I. (2008). Cerebral neurons involved in the innervation of both the adrenal gland and the ovary: a double viral tracing study. *Brain research bulletin*, 77(5), 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.08.022>
- Trachsel, L., Heller, H. C., & Miller, J. D. (1995). Nicotine phase-advances the circadian neuronal activity rhythm in rat suprachiasmatic nuclei explants. *Neuroscience*, 797-803.
- van den Pol, A. N., & Tsujimoto, K. L. (1985). Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience*, 1049-1086.
- van der Beek EM, van Oudheusden HJ, Buijs RM, van der Donk HA, van den Hurk R, Wiegant VM. (1994) Preferential induction of c-fos immunoreactivity in vasoactive intestinal polypeptide-innervated gonadotropin-releasing hormone neurons during a steroid-induced luteinizing hormone surge in the female rat. *Endocrinology*. 134(6):2636-44.
- van der Beek, E. M. (1996). Circadian control of reproduction in the female rat. *Progress in Brain Research*, 295-320.
- van der Beek, E. M., Horvath, T. L., Wiegant, V. M., van den Hurk, R., & Buijs, R. M. (1997). Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the Gonadotropin-Releasing Hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *The Journal of Comparative Neurology*, 569-579.
- van der Zee, E. A., Streefland, C., Strosberg, A. D., Schröder, H., & Luiten, P. G. (1991). Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors in cholinceptive neurons of the suprachiasmatic region in young and aged rats. *Brain Research*, 348-352.
- Vieyra, E., Ramírez, D. A., Lagunas, N., Cárdenas, M., Chavira, R., Damián-Matsumura, P., . . . Morales-Ledesma, L. (2016). Unilaterally blocking the muscarinic receptors in the suprachiasmatic nucleus in proestrus rats prevents pre-ovulatory LH secretion and ovulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1-11.
- Vieyra, E., Ramírez, D. A., Linares, R., Rosas, G., Domínguez, R., & Morales-Ledesma, L. (2019). Stimulation of nicotinic receptors in the suprachiasmatic nucleus results in a higher number of growing follicles and ova shed. *Experimental Physiology*, 1-11.
- Wagner, S., Castel, M., Gainer, H., & Yarom, Y. (1997). GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature*, 598-603.
- Welsh, D. K., Logothetis, D. E., Meister, M., & Reppert, S. M. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phase circadian firing rhythms. *Neuron*, 697-706.
- Williams, W. P., Jarjarian, S. G., Mikkelsen, J. D., & Kriegsfeld, L. J. (2011). Circadian control of Kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 595-606.
- Williams WP 3rd, Kriegsfeld LJ (2012) Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 21;3:60.

- Wiegand, S. J., & Teresawa, E. (1982). Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in female rat. *Neuroendocrinology*, 395-404.
- Yang, J.-J., Wang, Y.-T., Cheng, P.-C., Kuo, Y.-J., & Huang, R.-C. (2010). Cholinergic modulation of neural excitability in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal Neurophysiology*, 1397-1409.