



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**RESPUESTA OVULATORIA A LA LESIÓN DEL NÚCLEO  
SUPRAQUIASMÁTICO A LAS 9:00 H EN CADA ETAPA DEL  
CICLO ESTRAL DE LA RATA ADULTA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**CARLOS CAMILO SILVA MÉNDEZ**

**DIRECTORA DE TESIS  
M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez**



MÉXICO, D.F. 2013

Financiado por: DGAPA-PAPITT IN218911-3 e IN215513-3

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
“ZARAGOZA”**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**RESPUESTA OVULATORIA A LA LESIÓN DEL NÚCLEO  
SUPRAQUIASMÁTICO A LAS 9:00 H EN CADA ETAPA DEL CICLO  
ESTRAL DE LA RATA ADULTA**

**Tesis presentada por: Carlos Camilo Silva Méndez**

**Directora de tesis: M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez**

**Realizada en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Unidad de  
Investigación en Biología de la Reproducción, Unidad Multidisciplinaria de  
Investigación Experimental Zaragoza, UNAM.**

**El presente estudio fue financiado por: DGAPA-PAPITT IN218911-3 e IN215513-3**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

### JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR P R E S E N T E.

Comunico a usted que el alumno **SILVA MÉNDEZ CARLOS CAMILO**, con número de cuenta **305158325**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **29** del mes de **mayo** de 2013 a las **12:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ

VOCAL M. EN IBSH ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

SECRETARIO M. en B. E. ENRIQUE MENDIETA MÁRQUEZ

SUPLENTE DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

SUPLENTE DRA. JUANA MONROY MORENO

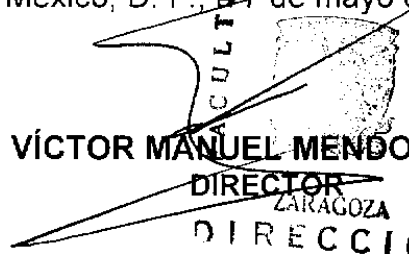
El título de la tesis que presenta es: **Respuesta ovulatoria a la lesión del núcleo supraquiasmático a las 9:00 h en cada etapa del ciclo estral de la rata adulta.**

Opción de titulación: tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABDARÁ EL ESPÍRITU”**  
 México, D. F., 7 de mayo de 2013.

**Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
 DIRECTOR  
 ZARAGOZA  
 DIRECCIÓN



RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## Índice

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	3
<b>Marco Teórico</b> .....	5
I. El núcleo Supraquiasmático y otros osciladores.....	6
II. Bases celulares y moleculares de las funciones rítmicas.....	15
III. Vías aferentes.....	19
IV. Vías eferentes.....	26
V. Cronobiología de la reproducción.....	30
VI. Control circadiano del pico preovulatorio de LH.....	38
VII. Expresión de genes reloj en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	44
<b>Justificación</b> .....	49
<b>Hipótesis</b> .....	51
<b>Objetivos</b> .....	52
<b>Métodos y materiales</b> .....	53
<b>Resultados</b> .....	61
<b>Análisis de resultados</b> .....	74
<b>Conclusiones</b> .....	87
<b>Bibliografía</b> .....	88

## Resumen

En la rata, la ovulación es inducida cada 4 días por la secreción preovulatoria de LH en la tarde del Proestro, la cual es resultado de la liberación previa de GnRH. La ocurrencia de este “pico de LH” depende de la integración de dos elementos que convergen en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario: el aumento en la concentración de estrógenos ováricos y una señal nerviosa circadiana. La naturaleza de esta última no es del todo clara, pero las evidencias permiten sugerir que los relojes intracelulares en cada peldaño de dicho eje están involucrados. El núcleo Supraquiasmático (SCN), localizado en el hipotálamo medio-basal, ocupa un lugar preponderante en el sistema circadiano. Participa en la regulación de la secreción de GnRH, pues la lesión bilateral resulta en aciclicidad y bloqueo de la ovulación espontánea, la cual puede ser restaurada administrando GnRH.

El objetivo del presente estudio fue analizar si ambos lados del SCN participan simétricamente en la regulación de la ovulación a las 9:00 h de cada día del ciclo estral de la rata adulta. Para ello, a las 9:00 h de los días del Estro, Diestro-1, Diestro-2 o Proestro; grupos de ratas cíclicas de la cepa CIIZ-V mantenidas bajo un fotoperiodo 14:10 (con luces encendidas a partir de las 5:00 h), con libre acceso al agua y al alimento, fueron distribuidas al azar en alguno de los siguientes experimentos: control, anestesia con barbitúricos, sección de las vías dorsales al núcleo Supraquiasmático izquierdo o derecho y, lesión unilateral del mismo. Los animales fueron sacrificados el día del estro esperado y en la autopsia se verificó la presencia de ovocitos en los oviductos.

La anestesia con barbitúricos no tiene ningún efecto sobre los parámetros evaluados. La lesión del SCN izquierdo en el día del Estro, induce ausencia de ovulación, mientras que la del derecho solo disminuye la tasa de animales ovulantes (SCN-I: 0/7, SCN-D: 3/7 vs. intacto: 7/7). Las operaciones simuladas tienen el mismo efecto, pero es la operación derecha quien induce la ausencia de la ovulación (Sham-I: 3/7, Sham-D: 1/7,  $p < 0.05$  vs. intacto: 7/7). En el día del diestro-1, ambos tratamientos tienen este efecto inhibitorio independientemente del hemisferio cerebral en que se realizan.

En dichas etapas también se producen alteraciones en la ciclicidad estral y disminución de la masa ovárica; por lo que podemos concluir que tanto el SCN como las vías nerviosas dorsales al mismo participan en la regulación del ciclo estral y por tanto de la ovulación. Además, que en la etapa del estro lo hacen de manera asimétrica, por lo que esta participación se modifica conforme avanza el ciclo estral.

Cuando los mismos tratamientos se realizaron en las etapas restantes del ciclo, los resultados fueron distintos. Las operaciones simuladas son ineficaces para inducir anomalías en la ovulación; denotando que en estas etapas los circuitos neuronales dorsales al SCN, no participan en la regulación de la ovulación. Las lesiones unilaterales inducen el bloqueo de la ovulación pero éste, a diferencia del observado en las etapas del diestro-1 y estro, no es acompañado por modificaciones en la ciclicidad estral.

Los resultados antes mencionados nos permiten sugerir que ambos lados del núcleo Supraquiasmático participan de manera estimulante en la regulación de la ovulación y la ciclicidad estral. Esta participación es asimétrica y depende de la etapa del ciclo estral. Así, tenemos que en las etapas del Estro y Diestro-1 se relaciona con los mecanismos neuroendocrinos que regulan la progresión del ciclo estral, mientras que en el Diestro-2 y Proestro participa en los eventos que desencadenan el rompimiento de la pared folicular en respuesta a la señalización preovulatoria hipotalámica e hipofisaria.

## Introducción

La existencia del SCN fue reportada en las primeras décadas del siglo XIX pero poco o nada se sabía sobre su función. Medio siglo después, algunos científicos comenzaron a reportar formalmente sus descubrimientos sobre los “relojes” biológicos y su importancia en los procesos vitales de las plantas y animales, relacionándolos con los antiguos reportes que se remontan a la época de los griegos, y estableciendo los primeros conceptos en el campo de la cronobiología (Gruart *et al.*, 2002). Estos grupos de investigadores recibieron poco crédito, se les pidió que demostraran uno de esos relojes biológicos. Los estudios pioneros en el estudio de los ritmos biológicos se enfrentaron con el concepto inamovible de la homeostasis y no fue hasta la publicación de los resultados de Jurgen Aschoff, realizados con humanos aislados en el interior de un bunker, y de aquellos de Colin Pittendrigh durante la segunda guerra mundial, que el tema cobro importancia (Daan, 2000; DeCoursey 2004a).

Las investigaciones que se desprendieron de la aceptación formal de la ritmicidad en varias funciones de los organismos derivaron en el descubrimiento del núcleo Supraquiasmático como oscilador central en el sistema circadiano de los mamíferos en 1972 (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). En las siguientes décadas se comprobaría que esta estructura tenía la función de organizar las funciones de los mamíferos en un sentido temporal, y que incluso en otros grupos de seres vivos existen sistemas homólogos. Por muchos años se pensó que todas las funciones rítmicas recaían sobre el núcleo Supraquiasmático y que éste representaba una evolución de los sistemas multioscillatorios de otros vertebrados. A finales del siglo XX comenzó a reportarse la existencia de sistemas oscilatorios en distintos tejidos, aun cuando estos eran aislados de las influencias difusibles y nerviosas provenientes del cerebro (Buijs *et al.*, 2003).

Después de que se identificaran los componentes moleculares y muchos de los mecanismos por medio de los cuales las neuronas del núcleo Supraquiasmático son capaces de coordinar funciones temporales, se observó que básicamente cada célula de un organismo está equipada con los mismos elementos, si bien son guiadas

en un sistema jerárquico por el núcleo Supraquiasmático (Buijs *et al.*, 2003). Estos descubrimientos permitieron el replanteamiento de muchas teorías sobre el control de algunos procesos que dependen de patrones específicos en la sucesión de los eventos. La reproducción, como un proceso altamente coordinado, ha sido objeto de numerosos estudios al respecto (Boden y Kennaway, 2006).

Se ha descrito el sustrato anatómico por el cual son mediadas las interacciones entre el sistema neuroendocrino y el circadiano y se han propuesto numerosas hipótesis basadas en el descubrimiento de los relojes a nivel del hipotálamo, la hipófisis y el ovario. Asimismo, se ha comprobado el efecto que tiene la disrupción de la maquinaria de estos relojes a nivel genético sobre procesos como el desarrollo folicular, la cópula, la preñez y la lactancia. Con todo ello, aún quedan muchas preguntas sin respuesta, en particular, poco se sabe sobre cómo las señales del oscilador central influyen al resto de los relojes en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y si estas señales son iguales en todo momento, no solo del día, sino del ciclo reproductivo; incluso si ambos lados del núcleo (como estructura pareada) están involucrados en los mismos procesos y si contribuyen de la misma manera.



**Marco teórico**

**Abreviaturas**

3V	Tercer ventrículo	LS	Núcleo lateral septal
AHA	Área hipotalámica anterior	ME	Eminencia media
ARC	Núcleo arqueado	MUA	Múltiples registros simultáneos
AVP	Arginina-vasopresina	NPY	Neuropéptido Y
AVPR1A	Receptor a arginina-vasopresina tipo R1A	NTS	Núcleo del tracto solitario
AVPV	Área anteroventral periventricular	OC	Quiasma óptico
BNST	Núcleo basal de la estría terminal	OVL	Órgano vasculoso de la lámina terminal
ccg's	Genes controlados por el reloj	P	Proestro
CK1ε	Casein cinasa 1ε	PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa
D-1	Diestro-1	POA	Área preóptica
D-2	Diestro-2	PR	Receptor a progesterona
DBB	Banda diagonal de Broca	PRC	Curva de respuesta de fase
DD	Oscuridad constante	PT	Núcleo paratenial
DMH	Núcleo dorsomedial	PVN	Núcleo Paraventricular
E	Estro	PVT	Núcleo paraventricular talámico
eCG	Gonadotropina coriónica equina	RHT	Tracto retino-hipotalámico
ERα	Receptor a estrógenos tipo α	SCN	Núcleo Supraquiasmático
ERβ	Receptor a estrógenos tipo β	StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis
FRP	Periodo en libre corrimiento	SUA	Registro de unidades individuales
FSH	Hormona estimulante del folículo	T	Periodo del sincronizador
GABA	Ácido γ-aminobutírico	t (tau)	Periodo en libre corrimiento
GABAA	Receptor al ácido γ-aminobutírico tipo A	VIP	Péptido intestinal vasoactivo
GABAB	Receptor al ácido γ-aminobutírico tipo B	VIP2	Receptor al péptido intestinal vasoactivo tipo 2
GHT	Tracto geniculo-hipotalámico	VMDN	Núcleo motor dorsal del vago
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas	VMH	Núcleo ventromedial
hCG	Gonadotropina coriónica humana	VRC	Curva de respuesta de velocidad
IGL	Hojuela intergeniculada		
LD	Fotoperiodo con alternancia luz/oscuridad		
LH	Hormona luteinizante		
LL	Luz constante		

## 1. El núcleo Supraquiasmático y otros osciladores

Con el descubrimiento de la ritmicidad biológica y el progreso en el estudio de sus propiedades surgieron tres preguntas: ¿existe una estructura responsable de la generación de los ritmos en alguna región de los organismos?, si existe, ¿cómo se conecta con el exterior para mantenerse en sincronía con el medio? y finalmente, ¿cómo transmite la información temporal al resto del sistema? Durante el siglo pasado, distintos estudios mostraron que la estructura que genera los ritmos biológicos de la mosca *Drosophila melanogaster* está contenida dentro de la médula accesoria y en las neuronas ventrales laterales. En los vertebrados, con excepción de los mamíferos, la glándula pineal tiene gran importancia; es rítmica aún en cultivos mantenidos en condiciones constantes y su destrucción tiene efectos similares a la lesión del oscilador de los mamíferos, el cual, también en estos grupos es de gran importancia (Reffinetti, 2006i).

La respuesta para la primera pregunta, en el caso de los mamíferos, fue tomando forma a partir de los estudios de Robert Moore en busca de la ruta por la cual transita la información fótica hacia el hipotálamo. Culminaron con el descubrimiento del tracto retino-hipotalámico (RHT), vía secundaria que conecta de manera directa a la retina con el hipotálamo. El RHT culmina en un par de pequeñas estructuras conocidas en conjunto como núcleo Supraquiasmático (SCN) (Moore y Lenn, 1972). De existir un oscilador físico, este debía tener algún tipo de conexión directa con las estructuras foto-sensibles para responder de manera inmediata a los estímulos luminosos como se aprecia en el arrastre. Esta premisa colocó al SCN en la mira de los investigadores que buscaban al oscilador central de los mamíferos (Moore, 1999).

El SCN está formado por dos estructuras neuronales de forma ovoide, ubicadas en la base del hipotálamo anterior, laterales al tercer ventrículo (3V), del cual están separados por aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  (Van Den Pol, 1980) y dorsales al quiasma óptico (OC) en posición supra (Ángeles-Castellanos, 2007; DeCoursey, 2004c; Moore, 1999; Refinetti, 2006j). Están separadas una de la otra por la base del

3V y el dorso del tracto infundibular (Figura 3) (Moga y Moore, 1997). El SCN se diferencia claramente del tejido que le rodea porque sus neuronas están densamente agrupadas dentro de sus límites (Refinetti, 2006j; Van Den Pol, 1980), también son de las más pequeñas del sistema nervioso; similares a las de los bulbos olfatorios, hipocampo y cerebelo (DeCoursey, 2004c; Van Den Pol, 1991). En cada lado contiene entre 8000 y 10000 neuronas rodeadas de astrocitos (Ángeles-Castellanos, 2007; Van Den Pol, 1991). En conjunto ocupan un volumen de aproximadamente  $0.16 \text{ mm}^3$  y cada lado por separado mide en promedio  $425 \mu\text{m}$  de ancho,  $400 \mu\text{m}$  de alto y  $950 \mu\text{m}$  de largo; medidas que corresponden a ratas macho adultas y que varían con la edad y el género (Van Den Pol, 1991). En su análisis anatómico, Johnson y colaboradores (1988b) no encontraron diferencias entre el SCN de ratas albinas y pigmentadas.

Todas sus neuronas tienen varios nucléolos y un núcleo con múltiples invaginaciones. Sus árboles dendríticos son simples, con un promedio de tres dendritas que se bifurcan una o dos veces. Ambos lados están conectados por fibras que salen de uno de ellos y terminan en el otro (Leak *et al.*, 1999; Van Den Pol, 1980). Las neuronas tienen gran cantidad de aposiciones en sentido rostro-caudal, con múltiples uniones GAP entre ellas. Se piensa que en conjunto con las sinapsis clásicas y la comunicación de tipo epáptica, las uniones GAP representan los medios de comunicación dentro del núcleo (Van Den Pol, 1980; 1991).

El SCN es un núcleo heterogéneo con diferentes zonas (Figura 4) de acuerdo al tamaño de sus neuronas, cantidad de vías aferentes, dirección de proyecciones eferentes y contenido de neurotransmisores (Moore *et al.*, 2002; Van Den Pol, 1991). Principalmente se reconoce la porción dorsomedial, también conocida como *shell*, y la ventrolateral o *core* (Ángeles-Castellanos, 2007; Refinetti, 2006j). En la rata, las neuronas de la porción dorsomedial son bipolares y pequeñas, miden en promedio  $84 \pm 4 \mu\text{m}^2$ , presentan árboles dendríticos simples y están más dispersas; mientras que las de la región ventrolateral promedian  $102 \pm 5 \mu\text{m}^2$ , son multipolares con grandes árboles dendríticos y están más agrupadas. Este mayor tamaño en las neuronas de la porción ventrolateral se conserva en otros roedores como el hámster y el ratón (Moore

y Card, 1985; Van Den Pol, 1991). La porción ventrolateral contiene aproximadamente el 43% de todas las células del SCN, mientras que la dorsomedial el 57% (Moore *et al.*, 2002).

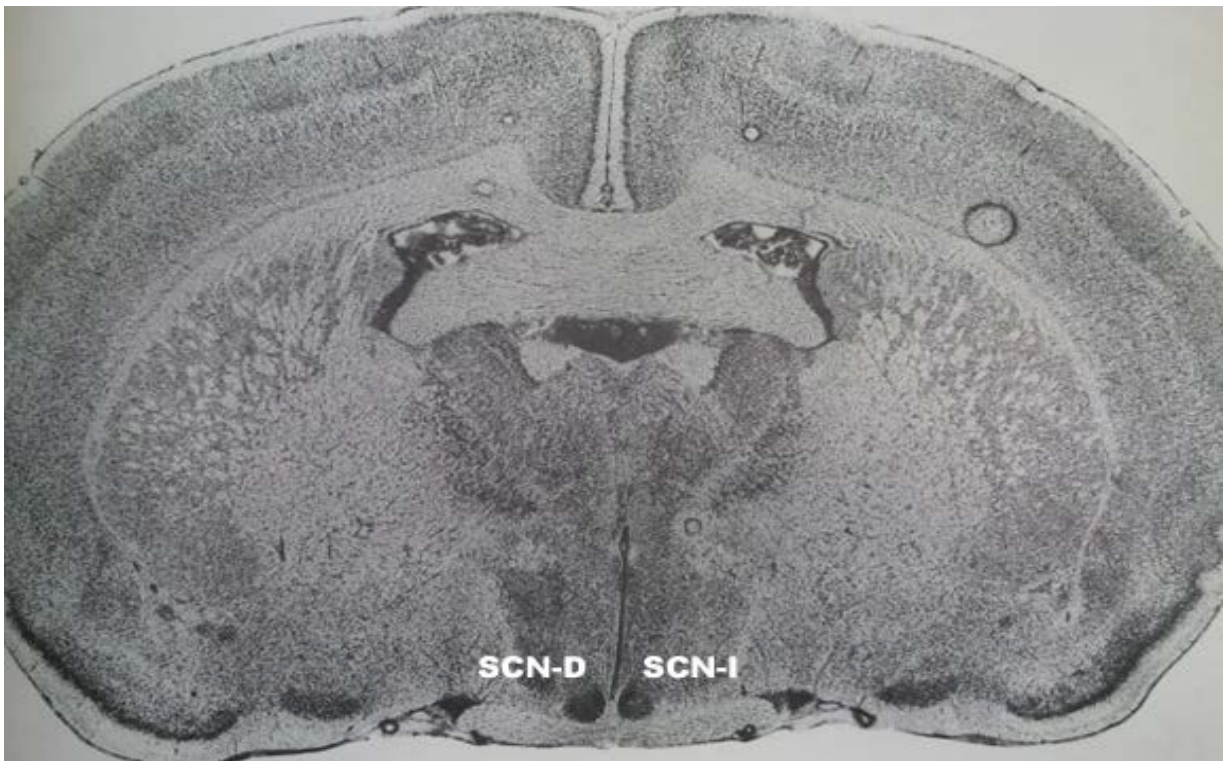


Figura 3. Corte coronal del cerebro de rata en el que se muestra la ubicación del SCN como un par de esferas en la base de la imagen (tomada y modificada de Paxinos y Watson, 2004).

En términos de identidad química, en el SCN se encuentran células inmunoreactivas a sustancia P, somatostatina, encefalina, péptido liberador de la gastrina, neurotensina y calretinina (Moore *et al.*, 2002). La mayoría de las neuronas del SCN son también inmunoreactivas al ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), que actúa localmente al unirse a los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>, igualmente presentes en todas sus células (Albers *et al.*, 1991; Reghunandanan y Reghunandanan, 2006). Este neurotransmisor está asociado con la coordinación entre las neuronas del SCN, pero sobre todo con la sincronización entre sus dos porciones (Meijer *et al.*, 2007). En la Figura 4b se aprecia que la región dorsomedial contiene la mayor cantidad de células inmunoreactivas a arginina-vasopresina (AVP), mientras que la ventrolateral contiene un gran número de células inmunoreactivas al péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Refinetti, 2006j). También se ha reportado la presencia de células

inmunoreactivas a prokinetina, metencefalina, angiotensina II, calbindina, y galanina; supuestamente relacionados con la comunicación intranuclear en conjunto con la melatonina de origen pineal y el GABA; y algunos de ellos con la comunicación entre el SCN y sus efectores y aferentes (Reghunandan y Reghunandan, 2006).

Estudios con trazadores retrógrados muestran que las dos subregiones del núcleo están comunicadas por axones que parten de una de ellas y terminan en la otra (Leak *et al.*, 1999). Estos axones pueden ser simples o tener bifurcaciones que alcanzan estructuras fuera del SCN (Van Den Pol, 1991). Se originan principalmente en la región ventrolateral y pocas fibras parten en la dirección opuesta (Leak *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2002; Refinetti, 2006j). Todas estas conexiones dentro del núcleo resultan funcionalmente necesarias por el hecho de que genera ritmos circadianos con el mismo periodo, aun cuando se mantienen funcionando cuando se separa un lado del otro (Gillete, 1991), una subdivisión de la otra (Yamaguchi *et al.*, 2003) e incluso, unas neuronas de otras (Honma *et al.*, 1998; 2000; 2004), pero con periodos distintos en cada oscilador individual.

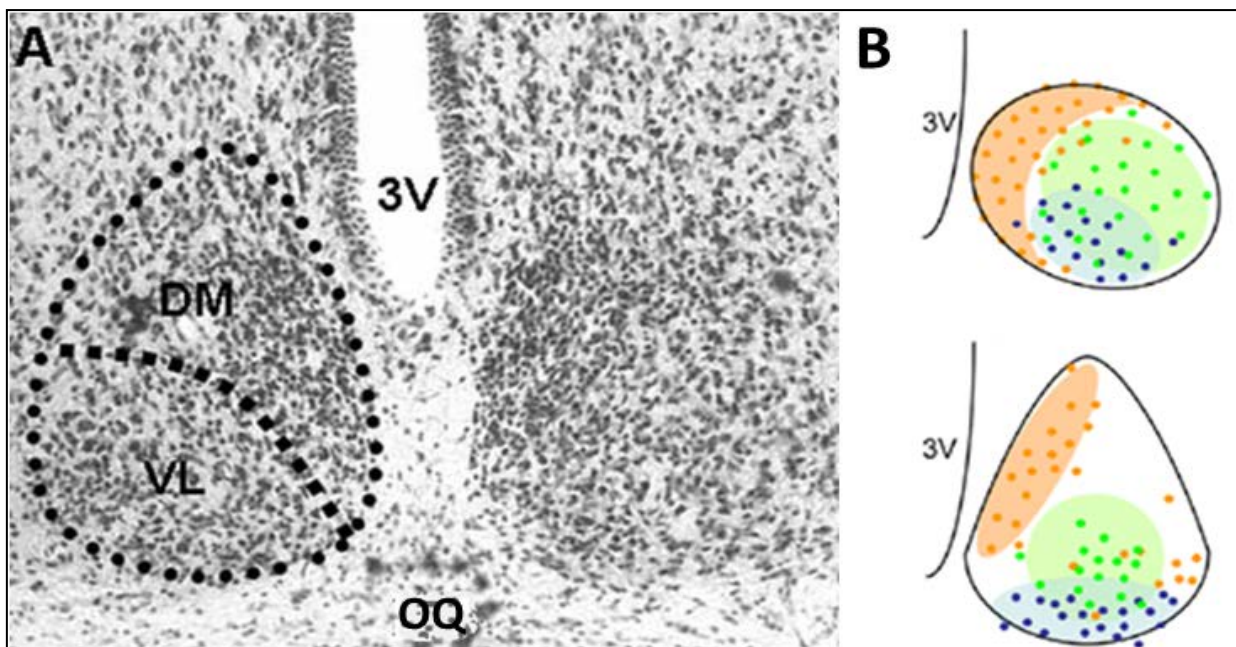


Figura 4. A, micrografía coronal de una porción del cerebro de ratón en la que se muestran las subdivisiones ventrolateral (VL) y dorsomedial (DM) del SCN (tomada y modificada de Ángeles-Castellanos *et al.*, 2007). B, representaciones gráficas del SCN de la rata (arriba) y del ratón (abajo) con las neuronas VIPérgicas denotadas con anaranjado, las AVPérgicas con azul y con verde poblaciones mixtas (tomada y modificada de Ángeles-Castellanos *et al.*, 2007; Atkins *et al.*, 2010).



El SCN de los roedores comienza a funcionar antes del nacimiento, aproximadamente en el día 19 del desarrollo embrionario; 3 días después de su formación (Reppert y Schwartz, 1984; Shibata y Moore, 1987). Básicamente se distinguen 3 etapas en el desarrollo del SCN como oscilador: la primera de ellas es la formación de sus neuronas a partir del primordio Supraquiasmático entre los días 14 y 17 del desarrollo embrionario (primero se forma el *shell* y después el *core*), la segunda es la maduración y el crecimiento de estas neuronas (aunque se ha mostrado que la maduración del SCN, en particular, concluye hasta la adultez), la tercera es la formación de sinapsis entre las neuronas y las vías aferentes y eferentes; estas etapas transcurren entre el día 19 del desarrollo embrionario y el 10 postnatal (Moore, 1991).

El primer ritmo que se desarrolla es el de la actividad neuronal; que hasta el primer día después del parto aún es muy inmaduro (Reppert y Schwartz, 1984; Shibata y Moore, 1987). El ritmo de N-acetil transferasa en la pineal comienza aproximadamente 4 días después del parto, mientras que el resto de los ritmos endocrinos y conductuales aparecen después de 21 días (Reppert y Schwartz, 1984). El resto de los ritmos se manifiestan gradualmente después del nacimiento conforme el SCN madura y genera conexiones con los sistemas eferentes y aferentes (Moore, 1991); antes de lo cual, es sincronizado por la madre mediante señales como el ritmo de melatonina o el flujo de nutrientes en la sangre después de la ingesta de alimentos (Reppert y Weaver, 1991).

Los estudios de lesión que evaluaron la actividad locomotora y la ingesta de agua en ratas albinas con lesión bilateral del SCN mostraron que ambos ritmos desaparecían si todo el núcleo era destruido. Los ritmos continúan cuando al menos un pequeño porcentaje del SCN sobrevivió a la lesión (Stephan y Sucker, 1972). Simultáneamente, Moore y Eichler (1972) mostraron que el ritmo circadiano en la secreción de corticosterona desaparece cuando se realiza la lesión bilateral del SCN en ratas albinas y la sección de algunas vías nerviosas rostrales y caudales al mismo. También reportaron la participación del RHT en la conducción de la información fótica desde la retina hasta el SCN. La lesión del núcleo da como resultado la abolición

permanente de ritmos como el de temperatura central, el contenido de melatonina en la glándula pineal, el ciclo estral, etc. (Meyer-Berstein *et al.*, 1999; Refinetti, 2006j).

En el análisis de sus resultados, Moore y Eichler (1972) mencionan que los datos obtenidos de experimentos con lesión del SCN no son concluyentes por la posibilidad de que sea solo una de las vías efectoras y no el oscilador primario, en cuyo caso su destrucción tendría el mismo efecto (Moore y Eichler, 1972). La segunda línea de investigación que apoya la teoría del SCN como oscilador primario mostró que posee ritmicidad autónoma en su actividad metabólica y eléctrica, característica que forzosamente debe cumplir un oscilador endógeno. Esta ritmicidad inherente al SCN tiene una periodicidad muy cercana a 24 horas, lo cual lo convirtió en el oscilador central del sistema circadiano (es probable que los osciladores responsables de la generación de ritmos con periodicidades distintas sean sistemas modulados por el mismo SCN) (Yamazaki *et al.*, 1998).

Si se realizan cortes seriados de entre 300 y 500  $\mu\text{m}$  en el plano coronal y se mantiene en cultivo aquel en el que se encuentra la mayor parte del SCN, se pueden evaluar sus propiedades por algunos días. Estos explantes son capaces de sostener ritmos circadianos en muchas de sus funciones e incluso conservar propiedades como el arrastre (Gillete, 1991; DeCoursey, 2004d). Al evaluar la tasa de descargas espontáneas de las neuronas del SCN, ya sea por el método de registro de unidades individuales (SUA) o por el de múltiples registros simultáneos (MUA), se aprecia claramente un ritmo circadiano con acrofase en el día subjetivo, sin importar si el tejido proviene de animales diurnos o nocturnos. Este patrón es raro, pues el resto del sistema nervioso central presenta mayor actividad durante la fase activa del animal (Gillete, 1991; Prosser, 1998; Shibata y Moore, 1987). Prosser (1998) afirma que existen diferencias en las acrofases de distintas cepas de ratas, aunque no parece haberlas entre individuos de distintos sexos ni entre neuronas de las subdivisiones del SCN (Shibata y Moore, 1987). Esto mismo se aprecia en cultivos más sencillos que solo contienen ambos SCN, el núcleo Paraventricular (PVN), el OC y el 3V (Gillete, 1991), o solo el SCN, OC Y 3V (Bos y Mirmiran, 1990). La misma autora reporta que al realizar cultivos en los que solo se encuentra un lado del SCN (izquierdo o derecho), la

ritmicidad se mantiene con los mismos parámetros. Esto aporta un dato curioso; cada lado del núcleo es autosuficiente y capaz de generar ritmicidad en ausencia de su par y del resto del hipotálamo (Gillete, 1991).

Las neuronas del SCN también muestran un ritmo circadiano en su actividad metabólica. Se le ha dado seguimiento a este ritmo después de administrar glucosa con un marcador radioactivo (2-desoxi-D-[1-<sup>14</sup>C] glucosa) a cultivos de rebanadas que contienen al SCN. Después de un tiempo de incubación, se puede obtener una imagen auto-radiográfica del tejido y es posible observar las regiones en las cuales se ha acumulado la mayor cantidad de glucosa radioactiva (Newman, 1991). Las neuronas necesitan energía para llevar a cabo sus funciones y esa energía se obtiene de la glucosa, por lo que su movilización a ciertas estructuras del tejido es un reflejo de la demanda energética y por tanto de la actividad de esa región específica (Schwartz, 1991; Schwartz *et al.*, 1980). Estos estudios muestran que el ritmo de actividad metabólica tiene características similares a las del ritmo de actividad eléctrica (Newman, 1991).

El registro de la actividad (eléctrica o metabólica) del SCN *in vitro* tampoco es concluyente por sí mismo, principalmente porque una rebanada de cerebro de 500 µm no puede albergar al núcleo en su totalidad (Gillete, 1991). Adicionalmente, estos sistemas representan una versión sobre-simplificada del micro-ambiente en el que se desenvuelve el SCN dentro de un animal entero, sin gran parte de la información neural y humoral que recibe. Han sido reportadas diferencias significativas entre los MUA de neuronas del SCN *in vivo* e *in vitro*, lo que muestra la mayor complejidad del modelo *in vivo* (Meijer *et al.*, 1997).

Numerosos estudios se han desarrollado para cubrir el tema de la ritmicidad autónoma del SCN en el animal entero, mediante la inserción estereotáxica de electrodos conectados a un receptor con cables flexibles que permiten la libertad de movimiento de los animales. Meijer y colaboradores (1996) muestran que el ritmo de actividad neuronal se presenta con una acrofase igual a la del modelo *in vitro* en la rata, ya sea por MUA o SUA. Un experimento semejante mostró que el hámster conserva el



mismo patrón de actividad diurna en antifase al periodo de actividad nocturna y que el ritmo no desaparece al realizar el experimento en DD, lo que prueba que se genera endógenamente. Este estudio además reporta una coincidencia de fase casi perfecta entre la actividad del SCN y del núcleo basal de la estría terminal (BNST), lo que indica que ambas estructuras están relacionadas funcionalmente (Yamazaki *et al.*, 1998).

Schwartz (1991) reporta la actividad metabólica *in vivo* usando el método de la glucosa radioactiva y encuentra una amplitud menor que la reportada *in vitro* (Newman, 1991), aunque la acrofase del ritmo se mantiene similar en animales diurnos, nocturnos y crepusculares (Schwartz *et al.*, 1983). En la rata este ritmo es endógeno y responde a los estímulos luminosos de la misma manera que lo hace el de actividad locomotora (Schwartz *et al.*, 1980). También se ha mostrado la expresión rítmica *in vivo* de algunos genes como C-fos y JunB en la zona dorsomedial del SCN. La acrofase de este ritmo también ocurre durante el día. Otros genes como FosB y NGFI-A no se expresan rítmicamente, pero pueden ser inducidos en la porción ventrolateral con luz, y la sensibilidad a ésta sigue un ritmo circadiano con acrofase por la noche. Estos genes están relacionados con la activación de otros, por lo que es probable que participen en vías de autorregulación y arrastre del SCN (Guido *et al.*, 1999).

Finalmente, los estudios de trasplante corroboraron que el oscilador se localiza en el SCN, ya que la destrucción de éste suprime los ritmos endógenos de los animales tratados, y si a estos animales se les trasplanta el SCN de animales intactos se restauran los ritmos eliminados, pero con las características del donador. Normalmente es posible trasplantar tejido nervioso solo cuando se encuentra en la neurogénesis, que en la rata inicia en el día 14 del desarrollo embrionario y en el hámster a partir del día 9. Esta etapa concluye pocos días después del nacimiento, aunque se han reportado trasplantes exitosos de tejido proveniente de animales sacrificados en el día 10 postnatal (Kaufman y Menaker, 1993). Una vez que se termina el seguimiento de los ritmos restaurados, los animales son sacrificados y los cerebros seccionados coronalmente para corroborar la lesión del SCN, así como la presencia y ubicación del injerto mediante técnicas de inmunohistoquímica, ya sea para VIP, que se encuentra en el SCN pero no en el tejido adyacente (Kaufman y Menaker, 1993; Meyer-Bernstein *et*

*al.*, 1999), o para proteínas específicas de una especie, en el caso de los heterotrasplantes (Sollar *et al.*, 1995).

Los trasplantes que restauran la ritmicidad en la actividad locomotora se caracterizan por la presencia de células inmunoreactivas a AVP y VIP, además de ser inervados por fibras glutamatérgicas del RHT y establecer conexiones nerviosas con el cerebro huésped. La integridad estructural parece no ser determinante (Lehman *et al.*, 1991). Los homotrasplantes como el que realizan Meyer-Bernstein y colaboradores (1999) no son un buen indicador de que el tejido trasplantado contiene al oscilador, pues las características que se pueden evaluar son similares entre el donante y el receptor, ya que pertenecen a la misma especie; y la pérdida inicial de ritmicidad podría deberse a una disrupción pasajera ocasionada por la cirugía, así como su posterior restauración al fin de la misma, y no al trasplante *per se* (Reffinetti, 2006i; Sollar *et al.*, 1995). Para eliminar esta incertidumbre se han realizado los heterotrasplantes; en los cuales el donante y el receptor pertenecen a diferentes especies y por tanto poseen distintos periodos. En un estudio en el cual se injertó tejido del SCN de rata en ardillas se evidenció que éstas restauran su ritmo de actividad locomotora con el periodo característico de la rata. Sin embargo, el número de trasplantes exitosos es muy bajo (Saitoh *et al.*, 1991).

El trasplante de tejido de rata o ratón al hámster devuelve la ritmicidad exitosamente, pero en el caso del tejido de rata, los ritmos no se restauran con el periodo esperado, por lo que los autores sugieren que no todos los sistemas circadianos de los mamíferos son iguales en sus conexiones oscilador-efectores (Sollar *et al.*, 1995). Estudios en los que el receptor es un hámster normal y el donador presenta la mutación homocigótica *tau* y viceversa han tenido mucho más éxito en mostrar que el oscilador realmente está en el SCN (Kaufman y Menaker, 1993; Vogelbaum y Menaker, 1992; Vogelbaum *et al.*, 1993). Estos estudios incluso han podido crear "quimeras temporales" a partir de animales con lesiones parciales del SCN que reciben injertos de donadores *tau*. Los animales expresan su propio periodo en el ritmo de actividad locomotora, intercalado con días en los que se expresa el periodo del donador, lo que muestra que el SCN contiene el programa temporal y que

los efectores pueden acoplarse a más de un programa (Vogelbaum y Menaker, 1992; Vogelbaum *et al.*, 1993). Adicionalmente, estos experimentos muestran que características de los ritmos son generadas en el núcleo, y sin lugar a dudas, por lo menos el periodo, está codificado dentro del SCN (Ralph, 1991).

Todos los experimentos mencionados anteriormente analizan el ritmo de actividad locomotora y dan por sentado que los ritmos se restauran después del trasplante. Cuando Meyer-Bernstein y colaboradores (1999) registraron el ritmo de secreción de corticosterona, melatonina, hormona luteinizante (LH) y el ciclo estral de hámsters sirios, reportaron que ninguno de estos ritmos endocrinos reaparece después del trasplante, aun cuando se restablece exitosamente el ritmo de actividad locomotora. Estos resultados apuntan a la suposición de que los ritmos endocrinos dependen de conexiones nerviosas entre el SCN y los efectores, y que por otro lado, los ritmos conductuales se transmiten por factores difusibles. Otra posibilidad es que ambos tipos de ritmos dependen de conexiones nerviosas, humorales o ambas pero que estas difieran cualitativa o cuantitativamente (Lehman *et al.*, 1991; Sollar *et al.*, 1995).

## **2. Bases celulares y moleculares de las funciones rítmicas**

Con la certeza de la naturaleza del SCN como oscilador endógeno, surgió la duda de cómo produce la ritmicidad. ¿Es una propiedad emergente de todo el SCN al actuar como tejido? o por otro lado, ¿existen subunidades encargadas de la función rítmica (Gillete, 1991)? Las neuronas individuales del SCN de los roedores tienen ritmicidad propia (Herzog *et al.*, 2004; Honma *et al.*, 1998; 2000; 2004; Yamaguchi *et al.*, 2003; DeCoursey, 2004d); oscilan en su actividad eléctrica y en la expresión de muchos genes con periodos que van desde 20 hasta 28 horas. El promedio de las neuronas analizadas es muy similar al de la actividad locomotora (aproximadamente 24 horas), por lo que los investigadores proponen que el periodo característico de cada especie es producto de la sincronización de osciladores celulares individuales (Honma *et al.*, 1998; Welsh *et al.*, 1995).

En un estudio posterior, el mismo grupo reportó la presencia de neuronas adyacentes que presentan ritmos de actividad sincronizados con periodos idénticos. Al aplicar tetradotoxina al medio de cultivo, que bloquea la transmisión de potenciales de acción, estas células continúan oscilando individualmente, desacoplándose eventualmente (Honma *et al.*, 2000). Este hallazgo permite especular sobre la participación de los contactos sinápticos dependientes de Na<sup>+</sup> en la sincronización al interior del SCN. Es posible que las neuronas se acoplen por medio de interacciones sinápticas o por las uniones GAP en sus aposiciones (Honma *et al.*, 2004), las cuales han sido extensamente reportadas (Van Den Pol, 1991). Sin embargo, se ha reportado que las células del SCN no se acoplan al mantenerse *in vitro*, si bien corroboran algunos de los resultados previos, los autores no encontraron evidencia de sincronización incluso en células con claras aposiciones (Welsh *et al.*, 1995).

Algunos modelos matemáticos han determinado que es necesario un mecanismo de sincronización entre las neuronas, pues de lo contrario el periodo presentaría mucha variación entre un ciclo y otro (Bouskila y Dudek, 1995). Esta precisión día a día parece estar determinada por las interacciones neuronales antes mencionadas. Herzog y colaboradores (2004) mostraron que las neuronas dispersas del SCN presentan mayor desviación con cada ciclo que los cultivos de explantes y estos, a su vez, que el animal entero. Honma y colaboradores (2004) realizaron un experimento muy similar en el que además de corroborar sus resultados encontraron que entre más difiere el periodo de una neurona de 24.0 horas más difícil resulta su sincronización con otras. Evidencia adicional sobre la ritmicidad individual surge de los estudios en los que una suspensión de células disociadas de SCN fue trasplantada en el 3V de ratas con lesión bilateral del SCN, restaurando el ritmo de actividad locomotora de manera semejante al trasplante de tejido íntegro (Lehman *et al.*, 1991). Otras evidencias permiten suponer que muchas neuronas del SCN no son rítmicas y que adquieren esta propiedad al sincronizarse con el resto por medio de sinapsis dependientes de Na<sup>+</sup> (Mirmiran *et al.*, 1995; Welsh *et al.*, 1995).

¿Cómo es que cada neurona del SCN es capaz de oscilar individualmente? La respuesta a esta pregunta es uno de los grandes avances de la cronobiología y recién comenzó a dilucidarse en la última década del siglo XX. Dentro de todas las células existe un programa temporal que está procesándose en todo momento. Este programa es similar en todos los organismos que habitan la tierra, escrito en los términos de un bucle de retroalimentación con elementos estimulantes e inhibitorios (Figura 5) (Dunlap, 2004; Refinetti, 2006j). Dunlap define al sistema circadiano de cada célula como el ciclo de un conjunto de causas y efectos dentro de los límites de una célula, la progresión de los cuales puede ser influenciada por factores externos a la misma (Dunlap, 1999).

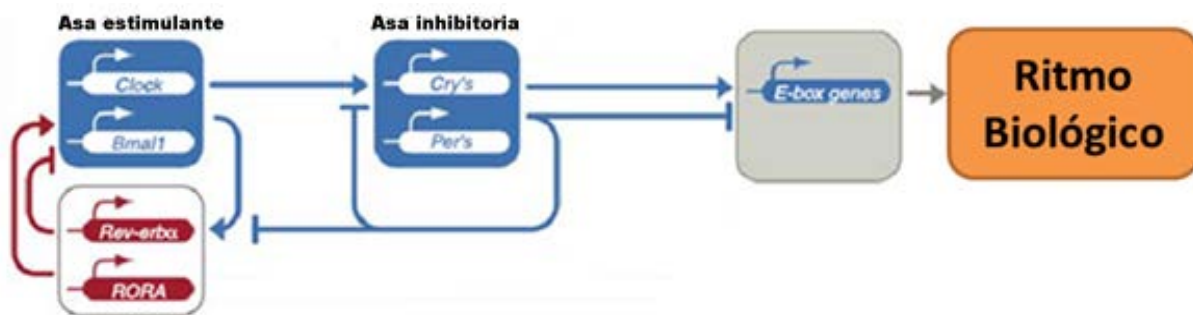


Figura 5. Representación de las interacciones genéticas responsables de la ritmicidad biológica, para detalles refiérase al texto (tomada y modificada de Hastings *et al.*, 2007).

Poco después de la publicación de los artículos de Moore y Eichler (1972) y Stephan y Zucker (1972), se descubrieron algunas mutaciones genéticas en *Drosophila melanogaster* que eran responsables de periodos más cortos o más largos en el ritmo de emergencia larval. En los siguientes años no solo se descubrió el resto de la maquinaria molecular en la mosca, sino también sus ortólogos en mamíferos (Young, 2000). La primera mutación reportada que afecta al sistema circadiano en mamíferos es la *tau*, que es responsable de anomalías en el periodo. Los mutantes homocigóticos presentan FRP's de 20 horas mientras que los heterocigóticos de 22 horas (Refinetti, 2006e).

En mamíferos, los genes *Bmal1*, también conocido como *Mop3* y *ARNTL* y *Clock* (*Brain and muscle ARNT-like protein* y *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*, respectivamente (Boden y Kennaway, 2006), son transcritos en moléculas de ARNm

que son procesadas en la síntesis de las proteínas CLOCK y BMAL1. Ambas proteínas se unen en el citoplasma formando el heterodímero CLOCK:BMAL1, que es traslocado hacia el núcleo donde se une a regiones específicas (E-box) en los promotores de los genes *Rev-erba*, *Per* (*Period*) y *Cry* (*Cryptochrome*). Esta unión inicia la transcripción y sus respectivas proteínas son igualmente sintetizadas y liberadas en el citoplasma, en donde PER es fosforilada por la casein cinasa 1 $\epsilon$  (CK1 $\epsilon$ ), lo que posibilita su unión con CRY y la formación del heterodímero PER:CRY (Dunlap, 2004), posteriormente es translocado al núcleo, donde inhibe la síntesis de sus componentes al actuar sobre CLOCK:BMAL1 (Refinetti, 2006j). Para este momento, REV-ERB $\alpha$  se ha unido al gen *Bmal1* iniciando la inhibición complementaria de su transcripción (Dunlap, 2004).

La maquinaria molecular de los mamíferos se compone de una familia de genes *Period* (*Per1*, *Per2* y *Per3*) y otra de genes *Cryptochrome* (*Cry1* y *Cry2*) como elementos inhibitorios del bucle; *Rev-erba* actúa como elemento negativo complementario. En el asa estimulante actúan *Clock* y *Bmal1*. En un animal nocturno, como el ratón, la síntesis de PER y CRY y su efecto supresor es un proceso que dura desde la media noche hasta el medio día; las otras 12 horas son aquellas en las que se sintetizan CLOCK y BMAL1 y se activa la transcripción de los elementos negativos del bucle (Dunlap, 2004). En otras palabras, los ritmos biológicos son el producto de osciladores individuales a nivel celular y dentro de las células, el “reloj” se compone de genes (reloj) que codifican proteínas que posteriormente inhiben su propia transcripción, generando fluctuaciones en su concentración y en la de su propio ARNm. Estas variaciones reflejan las fases del ciclo diario (24 horas) y la misma célula responde a ellas con cambios en la expresión de otros genes o ccg's (*clock controlled genes*) (Morse y Sassone-Corsi, 2002). Los ccg's son activados por los genes reloj (presentan sitios de unión adecuados en sus promotores), pero que a su vez no forman parte del mecanismo central, por lo que su ausencia no interfiere con el reloj en sí (Dunlap, 1999).

El descubrimiento de los genes reloj permitió a su vez un cambio en el modelo propuesto inicialmente para los mamíferos, en el que el SCN era el oscilador encargado de generar y controlar la ritmicidad para todo el organismo. Aún en los

primeros años del siglo XXI se consideraba que el sistema circadiano tenía algunas vías aferentes, un solo oscilador y muchas vías eferentes, a diferencia del sistema multioscilar de otros vertebrados (DeCoursey, 2004c). Actualmente se considera que el SCN tiene un papel jerárquico como oscilador central, pero no único. Los mismos elementos que oscilan en él también lo hacen en algunos tejidos dentro y fuera del sistema nervioso, pero con retrasos que van de 3 a 9 horas, lo que sugiere que es el SCN el encargado de aportar la fase para cada uno de ellos.

En el SCN aproximadamente un 10% de los genes expresados lo hacen de manera rítmica, mientras que en tejidos periféricos solo lo hacen unos cuantos, entre los que se encuentran los genes reloj y algunos que codifican para enzimas limitantes en los procesos locales (ccg's) (Morse y Sassone-Corsi, 2002; Panda y Hogenesh, 2004). Este modelo se ajusta a las predicciones matemáticas que realizó Pittendrigh a partir de algunos fenómenos como el de desincronización interna, según el cual, existe un oscilador central que establece los parámetros bajo los cuales han de operar otros osciladores (esclavos) que están jerárquicamente por debajo de él (Pittendrigh, 1981). En este sentido, el SCN adopta el papel de sincronizador más que de generador absoluto de ritmicidad. Actualmente se ha mostrado que la mayoría de los tejidos y órganos del cuerpo presentan oscilaciones en muchas funciones, y que la pérdida de ritmicidad aparente después de las lesiones del SCN se debe más a una desincronización gradual que a la pérdida de la función rítmica en todo el organismo. Un claro ejemplo es el protocolo de *restricted feeding*, en el cual el alimento se restringe a una hora distinta de la fase activa, disociando el reloj en el hígado de aquél en el SCN (Ball, 2007; Panda y Hogenesch 2004).

### 3. Vías aferentes

Si bien la ritmicidad biológica no depende de las vías aferentes que llegan al SCN, solo tiene utilidad adaptativa si puede sincronizarse con el medio externo (DeCoursey, 2004c; Buijs *et al.*, 2003). Respondiendo a la segunda pregunta que se planteó en la sección en que se habló del SCN, éste último está "en contacto" con el exterior a través



de muchas vías aferentes, de las cuales solo las que participan en el arrastre que utiliza al fotoperiodo como *zeitgeber* han sido descritas a detalle (Refinetti, 2006i). Al igual que el resto del sistema nervioso, el SCN se comunica por corrientes eléctricas, y para que la luz pueda ejercer su efecto primero debe ser transformada en un proceso conocido como foto-transducción. En este proceso, la radiación electromagnética (luz) produce alteraciones estructurales en los foto-pigmentos, que conllevan a cambios en la polaridad de algunas estructuras nerviosas especializadas conocidas como foto-receptores. En los mamíferos los foto-receptores se encuentran únicamente en la retina, mientras que en otros grupos de vertebrados existen en estructuras adicionales como la glándula pineal en las aves, el ojo parietal de los reptiles, el órgano parapineal en peces y algunos foto-receptores en el interior del cerebro de todos los anteriores (Buijs *et al.*, 2003; Refinetti, 2006i).

Los mamíferos poseen dos tipos de foto-receptores destinados a la foto-transducción, los bastones asociados a la visión nocturna en blanco y negro y los conos a la visión de día, a colores (Fox, 2008). Estos hacen conexiones directas con las células bipolares, que a su vez se conectan con las células ganglionares. Los axones de estas últimas se extienden caudalmente formando los nervios ópticos, que se entrecruzan en el OC y parten contralateralmente hacia los núcleos geniculados laterales del tálamo, del cual parten, a su vez, fibras que llevan la información fótica a la corteza visual en el lóbulo occipital (Do y Yao, 2010; Refinetti, 2006j). Estos foto-receptores no parecen estar involucrados en el proceso de arrastre, como mostró un experimento en el cual se utilizaron ratones alterados genéticamente que presentan una degeneración temprana de conos y bastones y, aun así, poseen sistemas circadianos funcionales. Este estudio además muestra que la enucleación es capaz de suprimir toda respuesta a la luz produciendo ritmos en libre corrimiento, por lo que los receptores necesarios para el arrastre, si bien no son conos ni bastones, si están presentes en el ojo (Freedman *et al.*, 1999; DeCoursey, 2004d).

Se ha mostrado la existencia de una pequeña subpoblación (aproximadamente de un 2% en la rata [Do y Yao, 2010]), de células ganglionares tipo III o W (Meijer, 1991) que proyectan directamente al SCN; con la particularidad de que a diferencia del



resto de las células de este tipo, son fotosensibles y se despolarizan en presencia de luz (Berson *et al.*, 2002; Do y Yao, 2010). Es probable que utilicen melanopsina como foto-pigmento, ya que se ha mostrado su presencia en las mismas células que son inmunopositivas a los neurotransmisores de la vía retino-hipotalámica (Hannibal, 2002). Adicionalmente existen evidencias de que solo las células ganglionares que contienen esta opsina son fotosensibles (Cermakian y Sassone-Corsi, 2002). A pesar de ello, también se ha mostrado que animales transgénicos deficientes de melanopsina tienen sistemas circadianos funcionales con respuesta atenuada, por lo que es posible que existan otros foto-pigmentos involucrados (Menaker, 2003). Se ha especulado sobre la participación de las proteínas codificadas por los genes Cry, que tienen un papel fundamental en la foto-recepción de *Drosophila melanogaster* (Cermakian y Sassone-Corsi, 2002).

Los axones no mielinizados de las células ganglionares tipo W forman el RHT (Figura 6), vía secundaria e independiente a la que se mencionó para la generación de imágenes, que inerva directamente al SCN de manera monosináptica (Moore y Lenn, 1972). A diferencia del nervio óptico, el RHT de la rata se bifurca antes del entrecruzamiento a nivel del OC y aproximadamente 60% de sus fibras parten en dirección contralateral, mientras que solo un 40% inervan al SCN ipsilateral (Card y Moore, 1991; Johnson *et al.*, 1988b; Moore y Card, 1985; Stephan *et al.*, 1982). Esta vía hace contacto con el SCN en su porción ventrolateral más rostral y continúa infiltrándose hasta inervar densamente la región medial y caudal (Johnson *et al.*, 1988a; Moga y Moore, 1997), y adicionalmente inerva estructuras fuera del SCN. En la rata se han detectado fibras que parten hacia el área preóptica (POA), retroquiasmática y hacia el hipotálamo lateral. Al parecer no existe ninguna diferencia entre ratas albinas y pigmentadas en sus conexiones retino-hipotalámicas. Por otro lado, en el hámster existe una proyección adicional que parte hacia el tálamo (Card y Moore, 1991; Johnson *et al.*, 1988b), por lo que si bien el RHT es una característica bien conservada entre los mamíferos, existen diferencias significativas entre especies (Card y Moore, 1991). Stephan y colaboradores (1982) reportan asimetrías funcionales entre el RHT izquierdo y derecho de la rata en su participación en el arrastre y realizan la

comparación con el hámster, que al igual que el ratón, no presenta asimetrías funcionales ni anatómicas (Card y Moore, 1991; Hannibal, 2002). La destrucción del RHT es suficiente para eliminar las respuestas a la luz, por lo que es considerado como la principal vía de ingreso para la información fótica. Evidencias adicionales surgen de los estudios que demuestran que la destrucción del resto de las vías aferentes principales induce ligeros cambios sin alterar la sincronización ni la generación misma de los ritmos en condiciones de laboratorio (Card y Moore, 1991; Donaldson y Stephan, 1982; Hannibal, 2002; Johnson *et al.*, 1988a).

Los neurotransmisores utilizados por el RHT son el glutamato y el péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP). Ambos se encuentran en las células ganglionares que dan origen al RHT y también en las terminales nerviosas que hacen contacto con el SCN. Son liberados de sus terminales en respuesta a la luz e *in vitro* inducen cambios en la actividad del SCN, muy similares a los que ejerce la luz en el animal entero. Adicionalmente, se ha detectado la presencia de los receptores para cada uno de ellos en las células de la porción ventrolateral del SCN (Albers *et al.*, 1991; Hannibal, 2002; Meijer, 1991; Moga y Moore 1996; Refinetti, 2006j). Otros neurotransmisores que tienen efectos similares en el SCN, pero que aún no han sido del todo estudiados son el óxido nítrico, la histamina, neuromedina s, acetilcolina, neurtensina y péptido liberador de la gastrina (Reghunandanan y Reghunandanan, 2006). Las células ganglionares que originan al RHT parecen ser foto-receptivas desde antes del nacimiento y su conexión con el SCN funciona desde entonces (Do y Yao, 2010).

No toda la información llega al SCN a través del RHT; se han descrito dos vías que suponen entradas indirectas y que modulan la acción de dicha información en las neuronas del SCN que son activadas por la luz (Meijer, 1991); aproximadamente 32% en la rata, 35% en el hámster y poco más de 10% en los roedores diurnos (Meijer y Schwartz, 2003). La primera de ellas es una vía altamente conservada en los mamíferos, que se desprende de las fibras que llegan con el nervio óptico a los núcleos geniculados laterales del tálamo. Cada uno de ellos está formado por una porción dorsal y otra ventral, entre las cuales se distingue una delgada lámina de neuronas

conocida como la hojuela intergeniculada (IGL) (Figura 7), que representa una entidad anatómica y funcional distinta al resto del complejo. Mientras que la IGL está altamente asociada al sistema circadiano, el resto del complejo se asocia a la integración de imágenes (Moore *et al.*, 2000). Las neuronas de la IGL son inmunoreactivas al neuropéptido Y (NPY) (Albers *et al.*, 1991) y proyectan fibras hacia 3 zonas principales: 1) el SCN, 2) estructuras hipotalámicas inervadas por fibras del SCN, y 3) estructuras relacionadas con la visión (Moore *et al.*, 2000). Las fibras que llegan a la región ventrolateral del SCN colocalizan con las terminaciones del RHT y son denominadas en conjunto, tracto geniculo-hipotalámico (GHT) (Albers *et al.*, 1991; Card y Moore, 1991; Moga y Moore 1997). Esta vía parece potenciar el efecto de la luz en el SCN (Meijer, 1991).

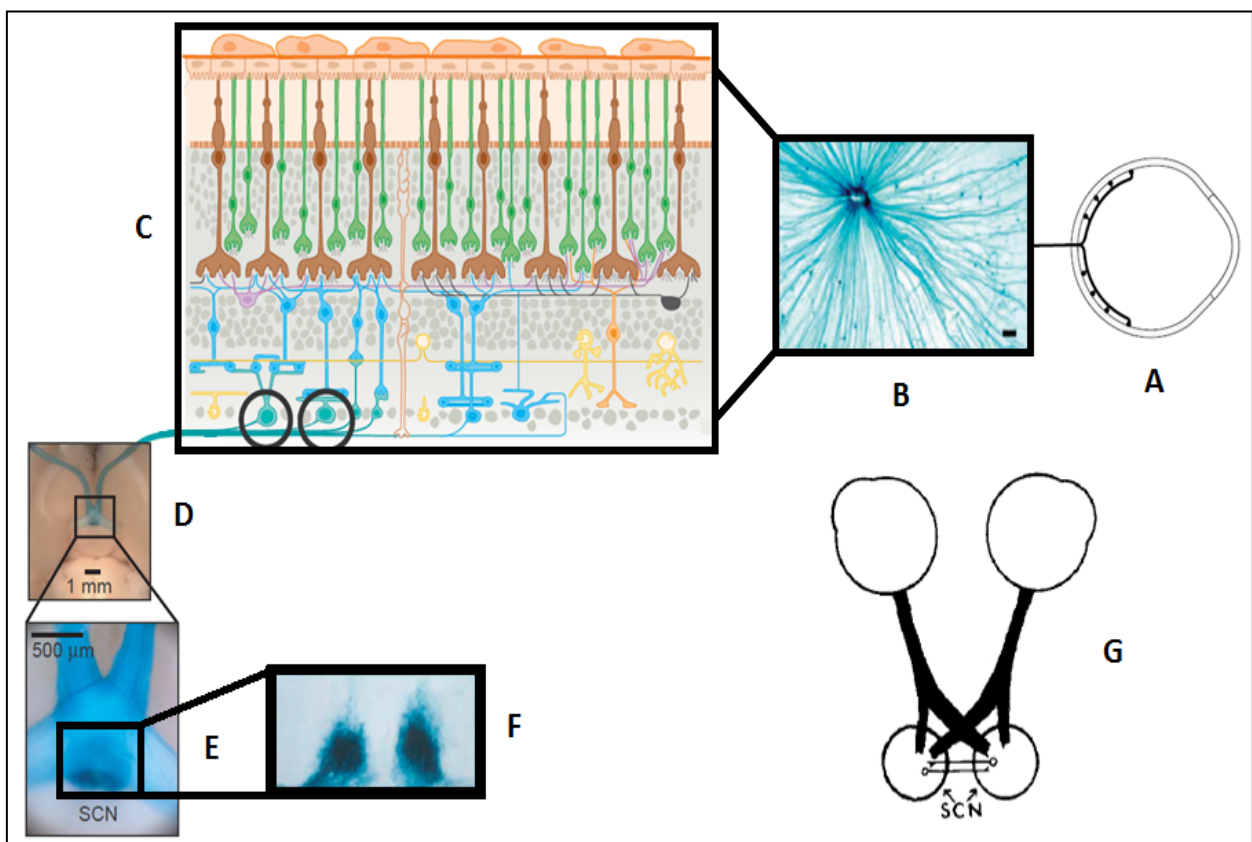


Figura 6. Las fibras que originan al RHT parten de la retina (A y B), específicamente de las células ganglionares productoras de melanopsina (círculos negros en C), y viajan junto con el nervio óptico (D), disociándose antes del OC (G) e inervan al SCN (E y F) [tomadas y modificadas de: Do y Yao, 2010 (A, B, D y F), Donaldson y Stephan, 1982 (G) y Menaker, 2003 (C)].

La segunda vía parte de las células de la porción media del rafé que envían una proyección hacia el SCN ventrolateral; que es responsable del alto contenido de serotonina en el núcleo (Moga y Moore, 1997; Pickard y Rea, 1997; Refinetti, 2006j). Las lesiones del núcleo del rafé o de la IGL no impiden la re-sincronización después de un cambio en el fotoperiodo, ni inducen cambios considerables en los ritmos generados por el SCN, por lo que solo son consideradas como vías accesorias para el ajuste fino (Albers *et al.*, 1991). La estimulación eléctrica del rafé o la administración de serotonina, inhiben la respuesta del sistema circadiano de animales nocturnos a pulsos de luz, mientras que potencian los mismos en animales diurnos (Challet, 2007; Challet y Pevet, 2003; Pickard y Rea, 1997). En contraste, la estimulación del RHT y del GHT induce la liberación de sus neurotransmisores que a su vez cambian la fase de actividad en las neuronas del SCN (Challet, 2007; Challet y Pevet, 2003; Refinetti, 2006j).

En la naturaleza, el reinicio diario que experimenta el sistema durante la sincronización con el medio externo es el resultado de la integración de muchas señales ambientales y homeostáticas además del fotoperiodo (Challet, 2007; Challet y Pévet, 2003). Poco se sabe sobre el mecanismo de acción de cada una y las vías que participan, pero se piensa que la información alcanza al SCN a través de las conexiones que tiene con el resto del sistema nervioso central. Anthony van den Pol (1991) describe al SCN como una estructura altamente inervada por fibras que penetran en ella desde todas las direcciones. Se han detectado vías aferentes al SCN desde el tálamo, el sistema límbico y el hipotálamo. De especial interés para el presente estudio son las proyecciones que parten desde las regiones que contienen neuronas productoras de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), el área hipotalámica anterior (AHA), el POA y el núcleo arqueado (ARC) (Moga y Moore, 1997). También recibe información de tipo estimulador desde los núcleos ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH), lateral septal y PVN del hipotálamo (Moga y Moore, 1996).

A nivel celular, el arrastre ocurre por un mecanismo que aún no es del todo claro. Al parecer, la presencia de luz es detectada en las células ganglionares tipo W. Hay modificaciones estructurales en la melanopsina que inducen un cambio en la

polaridad de la neurona generando un potencial de acción que viaja por el RHT y provoca la liberación de glutamato y PACAP en las terminales que hacen contacto con el SCN. Ambos neurotransmisores se unen a sus receptores, alteran la concentración intracelular de  $\text{Ca}^+$ , posiblemente por la liberación de los iones contenidos en los depósitos del retículo endoplasmático. Dentro de las células hay quinasas que se activan con estos iones como MAPK, PKA, PKC, CAMK, que al activarse inician una cascada de fosforilaciones. Una de las últimas proteínas en ser fosforiladas es CREB, el cual se une a los elementos que responden a AMPc en el promotor de los genes *Per* y estimulan su transcripción (Dunlap, 2004; Meijer y Schwartz, 2003; Morse y Sassone-Corsi, 2002; Roennenberg *et al.*, 2003). En presencia de luz durante la noche subjetiva, CREB puede ser fosforilado en aproximadamente 10 minutos (Dunlap, 2004). De manera sobre simplificada, podemos entender al arrastre por fotoperiodo como una progresión de los siguientes pasos: 1) percepción de la luz y liberación de glutamato y PACAP, 2) aumento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^+$ , 3) activación de quinasas y fosforilación de CREB y 4) transcripción de los genes con elementos de respuesta a AMPc (Meijer y Schwartz, 2003).

La respuesta de las neuronas del SCN a los estímulos provocados por la fototransducción de las células ganglionares sigue un ritmo circadiano con acrofase por la noche (Dunlap, 2004). En este momento se logran cambios de fase más amplios con una menor exposición a luces de menor intensidad, lo cual representa el sustrato fisiológico para las PRC's (Meijer *et al.*, 1996). Las células ganglionares tienen un umbral de respuesta de 0.1 a 1000 lux, por lo que pueden distinguir perfectamente entre el día y la noche, pero no entre un día nublado y uno soleado (Meijer *et al.*, 2007). Aún se desconoce mucho sobre la sincronización del SCN con el medio externo. Pittendrigh y Daan propusieron un modelo que es consistente con la información presentada anteriormente y que además se ajusta a la descripción que brindan las PRC's. Según su interpretación, el sistema circadiano se compone de dos osciladores mutuamente acoplados, uno sincronizado con el amanecer, y acelerado por la luz (M), y otro sincronizado con el ocaso y desacelerado por la luz (E) (Pittendrigh y Daan,

1976a, c). Si estos dos osciladores son ambos lados del SCN, o ambas subdivisiones, es una pregunta aun sin respuesta.

#### 4. Vías eferentes

La coordinación temporal de los eventos en un sistema vivo es altamente compleja. Cada ritmo refleja el patrón que sigue una función determinada y éste no es el mismo para todas, dado que los requerimientos homeostáticos del organismo y el estado del medio externo, no son los mismos en todo momento (Refinetti, 2006g). Si uno observa las acrofases de todos los ritmos que pueden ser medidos en un ser vivo, inmediatamente notará que ocurren en momentos distintos del día (Figura 4 en: Pittendrigh, 1993). Para coordinar cada una de estas funciones, teniendo en cuenta que si bien muchos tejidos son considerados osciladores, estos no son fotosensibles y necesitan una vía de acoplamiento para sincronizarse con el exterior (Cermakian y Sassone-Corsi, 2002). El sistema circadiano posee muchas vías de salida que llevan la información al resto del organismo (McWatters et al., 1999). Esta sección aborda estas vías a fin de responder la última pregunta planteada en la sección del SCN.

Se conocen muchas de las proyecciones que envía el SCN hacia otras regiones del sistema nervioso central, pero poco se sabe de su función en los sistemas efectores y de los ritmos que influyen. La primera vía eferente que fue dilucidada a fondo es la que influye en el ritmo de síntesis y secreción de melatonina. El SCN envía proyecciones dorsales hacia el PVN, del que parten fibras que atraviesan el encéfalo hacia las células de la columna intermediolateral de la médula espinal. Estas células inervan neuronas preganglionares que, a su vez, proyectan hacia el ganglio cervical superior. Las células postganglionares noradrenérgicas de éste inervan directamente a los pinealocitos (Zucker et al., 1991; Illnerová, 1991).

El SCN se comunica con el resto del sistema nervioso central con proyecciones nerviosas principalmente ipsilaterales (Leak y Moore, 2001; Watts, 1991) y por la liberación de factores difusibles (Morse y Sassone-Corsi, 2002). La mayoría de sus fibras terminan en el mismo lado del SCN y aquellas que no, pueden ser agrupadas



según la dirección en la que parten, teniendo entonces (DeCoursey, 2004c): 1) fibras que parten hacia el SCN contralateral cruzando la línea media, 2) fibras que parten rostralmente y que inervan, principalmente, el POA ventral y medial, el área anteroventral periventricular (AVPV) y el núcleo preóptico anterodorsal, 3) fibras que parten dorsocaudalmente a la zona subparaventricular, ventral al PVN, continúan su trayecto e inervan los núcleos hipotalámicos VMH y DMH, 4) fibras que parten ventrocaudalmente y hacen contacto con las neuronas del ARC, del núcleo talámico paratenial (PT) y con las del BNST; y 5) fibras que parten hacia la IGL y el núcleo lateral septal en el tálamo (Watts, 1991). Como se puede inferir, el SCN inerva recíprocamente a la mayoría de las estructuras que a su vez lo inervan a él.

Las proyecciones que envía el SCN están organizadas topográficamente al igual que las terminales de las vías aferentes que lo inervan. Las fibras que parten hacia el SCN contralateral viajan de *core* a *core* y de *shell* a *Shell* (Leak y Moore, 2001; Moore et al., 2002). La porción ventrolateral inerva a la dorsomedial y a regiones muy cercanas al SCN, como los núcleos talámicos, paraventricular (PVT), PT y lateral septal (LS), así como el área ventral tuberal. La porción dorsomedial inerva muchas más estructuras, incluidas POA, DMH y PVN en el hipotálamo, BNST, la zona inserta, PT, LS y PVT (Leak y Moore, 2001).

Buijs (1996) propuso que en tejidos periféricos el control de los ritmos biológicos está determinado por las proyecciones, directas e indirectas, que envía el SCN a las estructuras en el sistema nervioso central que están relacionadas directamente con las funciones analizadas. Por ejemplo, la síntesis y secreción de GnRH, así como el comportamiento sexual, por el POA, la función cardiovascular por el DMH, la regulación de la temperatura corporal y la secreción de corticosterona por el PVN; y con estructuras que inervan a otras que participan en la regulación del consumo de agua y alimento como el núcleo del tracto solitario (NTS), y con estructuras relacionadas con la motivación (hipocampo y amígdala medial) (Buijs, 1996; Buijs et al., 2003). Adicionalmente, se ha reportado la existencia de fibras que parten hacia estructuras en el hipotálamo posterior, las cuales reciben y envían información hacia

las zonas responsables de la consolidación de la vigilia, lo que podría suponer una vía eferente de control para el ritmo de sueño/vigilia (Abrahamson *et al.*, 2000).

Además de sus conexiones con las estructuras periventriculares relacionadas con los ejes neuroendocrinos, el SCN tiene influencia en órganos y sistemas a través de sus conexiones con el sistema nervioso autónomo, que se desprenden indirectamente de las fibras que hacen relevo en el PVN. Por un lado, parten fibras hacia el núcleo motor dorsal del vago (VMDN) y otras estructuras relacionadas con la neurotransmisión parasimpática, y por el otro, parten fibras que alcanzan a la columna intermediolateral, relacionada con impulsos simpáticos (Buijs *et al.*, 2003). Estudios con trazadores han determinado que básicamente todos los órganos del cuerpo están conectados con el SCN (Panda y Hogenesch, 2004). No obstante, los cortes caudales, laterales y dorsales al SCN, que destruyen las proyecciones enviadas en esos sentidos, no parecen eliminar el ritmo de actividad locomotora ni el de ingesta de agua, lo que sugiere un control más complejo por lo menos para estos dos ritmos, posiblemente varias vías sinápticas que regulan la misma función o un factor difusible (Brown y Nunez, 1986).

Estudios similares en los que se aísla al SCN mediante cortes caudales, rostrales, laterales, ventrales y dorsales; muestran que muchos ritmos desaparecen, pero no el de actividad locomotora ni el de secreción de corticosterona. También los estudios de trasplante detallan este resultado; trasplantes encapsulados en membranas semipermeables, que permiten el intercambio de sustancias pero no el crecimiento de proyecciones nerviosas, restauran el ritmo de actividad locomotora, lo que nos sugiere un factor humoral como control de algunos ritmos (LeSauter y Silver, 1998). Los ritmos endocrinos, como se mencionó anteriormente dependen de conexiones nerviosas específicas, por lo que los trasplantes son incapaces de restaurar su pérdida (Lehman *et al.*, 1991; Meyer-Bernstein *et al.*, 1999).

Después de ser sincronizado, ¿Cómo afecta la información que envía el SCN a los demás tejidos? A grandes rasgos, abre o no las “ventanas” temporales en las que se puede estimular o inhibir la actividad de la maquinaria celular que afecta



determinada función. El sistema circadiano es una red de control temporal que se extiende por todo el organismo y que regula que cada evento ocurra en el momento óptimo actuando, por ejemplo, a nivel genético. Los ccg's son activados por los genes reloj y su expresión deriva en ciclos de abundancia de algunas proteínas, que a su vez activan otros genes convirtiéndolos en ccg's, o directamente afectan las funciones de las células (Loros *et al.*, 2004). El SCN ejerce activamente controles estimulantes e inhibitorios; por ejemplo, promueve activamente la vigilia y el sueño en momentos opuestos del ciclo, al igual que las inhibe activamente en antifase. En resumen, la información que sale del SCN alcanza sus células blanco por una de las siguientes vías: factores humorales que se unen directamente a sus receptores en las células diana, conexiones nerviosas multisinápticas que alcanzan regiones en el sistema nervioso central o en la periferia, conexiones nerviosas monosinápticas que hacen contacto generalmente en las neuronas asociadas con los sistemas endocrinos. Un ejemplo es el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, en el cual se aprecian dos sistemas juntos. El SCN regula la secreción de la hormona adrenocorticotrópica por medio de conexiones monosinápticas con el PVN y a la vez regula la sensibilidad de la misma adrenal a través de conexiones multisinápticas utilizando el sistema nervioso autónomo (Kalsbeek *et al.*, 2006). Este tipo de mecanismo dual podría intervenir también en la regulación de otros órganos y ejes como el que se forma entre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas.

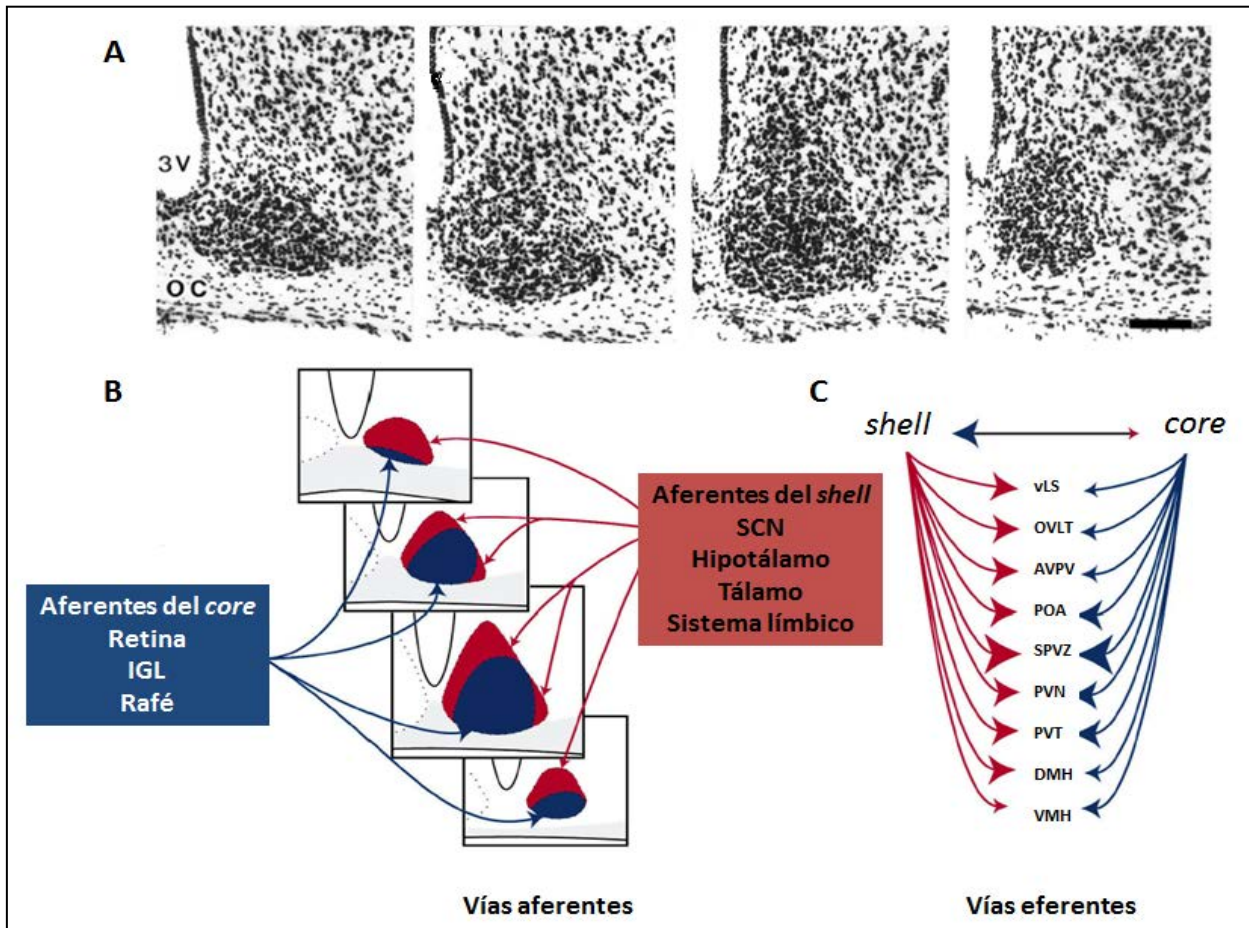


Figura 7. Resumen de las vías aferentes y eferentes al SCN. A, de izquierda a derecha, fotomicrografías del SCN del ratón en sentido rostrocaudal. B, representación de los mismos cortes denotando ambas subdivisiones del SCN y las vías aferentes que inervan a cada una. C, Proyecciones eferentes que parten de cada subdivisión. vLS, septum ventrolateral; SPVZ, zona subparaventricular (tomada y modificada de Abrahamson y Moore, 2001).

### 5. Cronobiología de la reproducción

La función principal del SCN en los mamíferos es la de organizar las funciones vitales en un sentido temporal diario como hacer coincidir la fase de descanso con el día geográfico en los animales nocturnos (DeCoursey, 2004b). También puede influenciar procesos que ocurren en un marco temporal más amplio, como los ritmos circanuales y otros con periodicidades mayores a 24 horas. Esta influencia generalmente ocurre cuando el SCN abre "ventanas temporales" en las cuales (y solo en ellas) es posible que ocurra un evento en condiciones normales (DeCoursey, 2004c). La reproducción de los mamíferos depende de ciclos que pueden ir de unos cuantos días a muchos

meses, por ejemplo, el ciclo estral de la rata comparado con la reproducción estacional de algunos mamíferos (Moore, 1999). Este último es un claro ejemplo de la regulación que ejerce el SCN sobre los ritmos infradianos. Conforme avanza el ciclo anual, cambia la relación fotofase/escotofase, y el SCN mide la longitud de la porción luminosa. En cuanto alcanza un valor límite, envía señales específicas al sistema endocrino lo que activa las gónadas y con ello el inicio de la temporada reproductiva. Cuando la fotofase alcanza el valor contrario, el SCN envía la señal que inicia la involución gonadal poniendo fin a la temporada (Moore, 1999; Zucker *et al.*, 1991). Desde el punto de vista de la cronobiología, la reproducción es un conjunto de ritmos agrupados dentro de otros ritmos de mayor periodicidad (de la Iglesia, 2007).

La reproducción de los animales es un evento fisiológico finamente coordinado. Los estudios de Pittendrigh con moscas de la fruta mostraron que la emergencia de las larvas ocurre en una ventana de tiempo muy precisa, quizás porque en ese momento la humedad y la temperatura les son más favorables a las larvas, o incluso para diluir el efecto de la depredación cuando se observa el fenómeno a nivel poblacional (DeCoursey, 2004b; Pittendrigh, 1981; 1993). La rata por su parte, como muchos otros mamíferos, libera ovocitos de manera cíclica y espontánea cada 4 o 5 días. Para que sean fecundados, la cópula debe darse de manera sincronizada, ya que si ocurre un desfase de 4 a 6 horas entre ambos eventos la fertilización ya no es viable (Boden y Kennaway, 2006). La ovulación ocurre unas pocas horas después del inicio de actividad locomotora del animal, que es cuando está más activo y por tanto la cópula es más factible. Además, la misma señal que desencadena la ovulación también estimula la apertura de una ventana de receptividad sexual que comienza antes del periodo de actividad y dura al menos hasta la mañana siguiente (DeCoursey 2004b, c). ¿Cómo sabe el animal en qué momento ovular y cómo coordina tantos eventos a la vez aun cuando no todos están regulados por vías afines? Las secciones siguientes abordan la naturaleza de los vínculos que ha forjado el SCN en el curso de la evolución de los mamíferos a fin de coordinar el evento del cual depende la continuidad de las especies, la reproducción.

Para comprender lo estrechamente acoplados que están el sistema reproductor y el circadiano es necesario describir algunos puntos importantes, como las relaciones entre los ciclos reproductivos y algunos ritmos circadianos, los componentes de regulación temporal del ciclo estral y la ovulación, así como el sustrato anatómico, fisiológico y molecular por medio del cual se piensa que interaccionan ambos sistemas. Algunas de las primeras evidencias sobre las relaciones entre ambos sistemas se desprendieron indirectamente de los estudios sobre ritmicidad locomotora y de temperatura central realizados en mamíferos (Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003). El ritmo de actividad locomotora es muy preciso día con día; sin embargo, en las hembras de los roedores se han reportado variaciones que dependen de la etapa del ciclo estral en que se encuentra el animal. La cantidad total de actividad aumenta gradualmente con valores más altos en el día del proestro, lo cual está relacionado directamente con el adelanto en el inicio del periodo de actividad en el mismo día, posiblemente para incrementar el tiempo de interacción con el macho y las posibilidades de que se efectúe la cópula (Albers *et al.*, 1981; Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003; Kent *et al.*, 1991). En cuanto al ritmo de temperatura, en el día del proestro ocurre un retraso en la acrofase, mientras que en el día del estro aumenta la amplitud del ritmo, y se alcanza una temperatura significativamente más alta (Kent *et al.*, 1991). También se ha reportado un decremento en la cantidad de alimento y agua ingeridos en el estro (Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003). La amplitud de los cambios reportados anteriormente es menor en fotoperiodos 14:10 que en aquellos con 12:12 (Kent *et al.*, 1991). Estos efectos parecen estar determinados por las variaciones en la concentración de progesterona y estradiol (Albers *et al.*, 1981).

Un paradigma que ha mostrado alterar los ritmos circadianos de roedores nocturnos es el de LL, que también tiene efectos en los ciclos reproductivos. Bajo esta condición, las ratas albinas entran en un estado de estro vaginal permanente con lordosis diaria en presencia del macho, acompañado, sin embargo, de un alto índice de rechazo. Los autores suponen que este efecto se debe a un desfase en el pico de progesterona, que ya no estimula la receptividad sexual aun cuando la alta concentración de estrógenos mantiene cornificado el epitelio vaginal (Hardy, 1970).

A pesar de que todos los mamíferos viven en el mismo planeta y de que muchos incluso comparten condiciones ambientales idénticas, existen muchas variaciones en la longitud de sus ciclos reproductivos, lo que permite suponer una naturaleza endógena –si bien no sincronizada- para ellos (Refinetti, 2006g). Quizás la muestra más clara de que el control temporal de la reproducción depende del mismo reloj que modula los ritmos circadianos sea la demostración de que los ciclos estrales del hámster presentan FRP's que son múltiplos de 4 veces el periodo endógeno del ritmo de actividad locomotora, el cual indudablemente está bajo estricto control circadiano (Carmichael *et al.*, 1981; Fitzgerald y Sucker, 1976; Stetson y Anderson, 1980). Estos periodos no son derivados de un periodo coordinado de 96 horas como se pensó originalmente en los animales con ciclos de 4 días, como muestran los experimentos con animales tratados con óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O), el cual aumenta la longitud del periodo en el ritmo de actividad y el del ciclo estral de manera paralela (Fitzgerald y Zucker, 1976; Williams y Kriegsfeld, 2012). Esto mismo puede comprobarse utilizando la propiedad de arrastre; cuando se altera la longitud del sincronizador ambos ritmos se sincronizan a él de manera paralela alterando sus propios periodos (Carmichael *et al.*, 1981). Los ciclos estrales también cumplen con las características de un ritmo endógeno de manera semejante a los ritmos circadianos (Stetson y Anderson, 1980).

Las lesiones bilaterales del SCN no solo suprimen la ritmicidad circadiana, también eliminan la ciclicidad estral, efecto que es mimetizado por la sección de las vías de salida del SCN, mostrando que esta estructura tiene un papel preponderante en la regulación de la reproducción de los mamíferos (de la Iglesia, 2007; Meyer-Bernstein *et al.*, 1999; Sikes, 2009). Este tipo de lesiones, aún cuando no destruye el 100% del tejido del SCN, tienen un efecto inhibitorio marcado sobre la ciclicidad estral y la conducta sexual asociada a la noche del proestro (Brown-Grant y Raisman, 1977).

Estudios más sofisticados, que emplean ratones mutantes con alteraciones en algunos genes reloj, muestran que los genes que forman parte del asa inhibitoria del bucle de retroalimentación son altamente redundantes, mientras que Clock y Bmal1 son todo lo contrario (Boden y Kennaway, 2006). Los ratones con mutación en el gen

Clock tienen ciclos estrales anormales con muchos días en la etapa del estro y muchos no presentan el pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH). Al analizar las características de la hipófisis y los ovarios, los autores concluyen que los animales mutantes son idénticos a los controles, por lo que la disrupción debe ser a nivel de la señal nerviosa enviada por el SCN. Estos animales tienen una alta tasa de reabsorción de productos y alta mortalidad de neonatos, relacionadas con las bajas concentraciones de progesterona detectadas durante la preñez (Miller *et al.*, 2004). Otros autores suponen que el aumento en la tasa de mortalidad y reabsorción puede deberse a desfases en la expresión de algunas proteínas en el oviducto y el útero, cuya función es proteger al producto y que son codificadas por ccg's (Boden y Kennaway, 2006).

Antes de mencionar las conexiones anatómicas y fisiológicas entre ambos sistemas es necesario describir brevemente el funcionamiento de sus componentes. A grandes rasgos, las funciones del ovario (secreción de hormonas y liberación de ovocitos capaces de ser fertilizados) dependen de la interacción neuroendocrina de un eje formado por algunas estructuras hipotalámicas, la porción anterior de la glándula pituitaria (adenohipófisis) y la misma gónada (van der Beek, 1996), y son estas interacciones las que a su vez regulan el ciclo estral.

El ciclo estral de la rata (y en general los ciclos reproductivos de los mamíferos) es una progresión de eventos en los cuales un conjunto de folículos ováricos son seleccionados, crecen, se desarrollan, diferencian y finalmente ovulan, o bien, degeneran en un proceso conocido como atresia folicular (Domínguez *et al.*, 1991). La duración del ciclo depende principalmente del tiempo que le toma al útero prepararse para recibir al óvulo en caso de que sea fertilizado, y que en roedores es de entre 4 y 5 días, abarcando las etapas del Estro (E), Diestro-1 (D-1), Diestro-2 (D-2) y Proestro (P) (Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003). A nivel hipotalámico, las neuronas que sintetizan GnRH están dispersas sobre todo en la porción anterior del hipotálamo. La mayoría de estas neuronas se localizan en el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT), en el POA y en la banda diagonal de Broca (DBB); también existen algunas en AHA, los bulbos olfatorios y en el ARC.



En la rata existen de 1300 a 1500 células inmunoreactivas a GnRH y aproximadamente el 70% de ellas envía fibras directamente a la eminencia media (ME) (Charli *et al.*, 1991; van der Beek, 1996), donde la GnRH es liberada y desde donde viaja a la hipófisis a través de una red de capilares ubicada en el infundíbulo, conocida como sistema portal hipotalámico hipofisario. Al llegar a la adenohipófisis se une a sus receptores, en un tipo particular de células denominadas gonadotropos, que sintetizan y liberan en la circulación general las dos gonadotropinas, LH y FSH (hormona estimulante del folículo) (Sikes, 2009); éstas se unen a sus receptores en las células de los folículos ováricos y desencadenan varios procesos que incluyen el crecimiento y diferenciación del folículo, la ruptura de la pared folicular y la posterior liberación de los ovocitos, así como la síntesis y secreción de hormonas (Charli *et al.*, 1991; Sikes, 2009).

Durante la mayor parte del ciclo estral, la GnRH es liberada en pulsos que tienen una baja amplitud y una duración de unos 30 min (Chappell, 2005). La administración continua de GnRH en dosis fisiológicas bloquea la liberación de gonadotropinas (de la Iglesia, 2007). En el día del D-1 se presenta un patrón de secreción basal de GnRH suficiente para estimular la liberación igualmente basal de gonadotropinas, que en los ovarios promoverán la maduración de algunos folículos. Conforme avanza el D-2, los folículos que han sido seleccionados crecen, se diferencian y secretan estrógenos (17- $\beta$  estradiol) en concentraciones cada vez mayores. En el día del P la secreción de estrógenos por parte de los folículos maduros alcanza su punto máximo por la tarde y estimula la cornificación de las células en el epitelio vaginal, así como el engrosamiento uterino y la liberación masiva de GnRH; tras ser detectado el aumento en la concentración de estrógenos, aparentemente en el POA (Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003). Este aumento en la secreción de GnRH se logra por el aumento en la amplitud y frecuencia de los pulsos (Figura 8) (Chappell, 2005).

El aumento en la secreción de GnRH, a su vez, desencadena la secreción de FSH y LH en concentraciones mayores a las reportadas en el resto de los días del ciclo; este episodio es conocido como “pico preovulatorio de gonadotropinas” o simplemente “pico preovulatorio de LH”. Este evento ocurre alrededor de las 16:00 h y

no solo depende del pico de estrógenos, sino de su convergencia con una señal circadiana de naturaleza nerviosa.

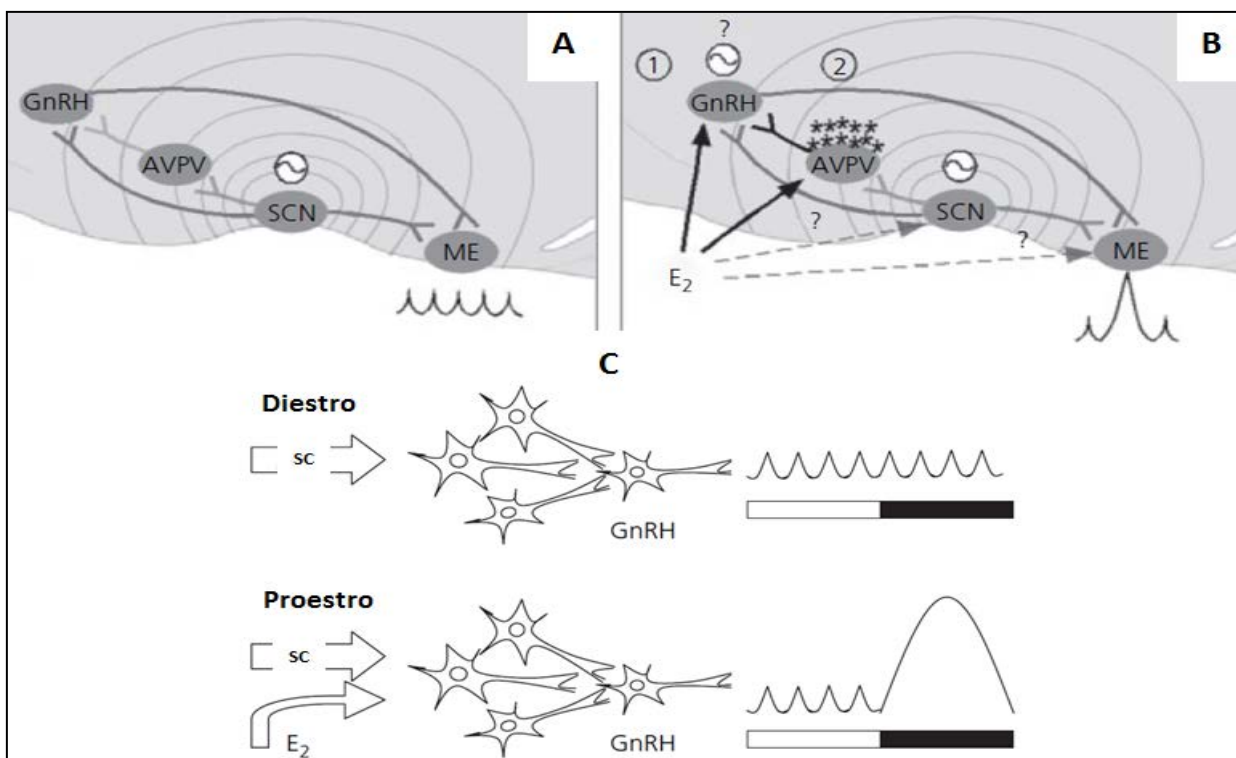


Figura 8. A, conexiones hipotéticas que regulan la secreción de GnRH en los días del diestro. B y C, señales que modifican la secreción de GnRH en el día del proestro, los asteriscos representan receptores a progesterona. sc, señal circadiana; E<sub>2</sub>, estrógenos (tomada y modificada de Chapell, 2005).

Básicamente, el aumento en la concentración de estrógenos le informa al hipotálamo que los folículos en el ovario han alcanzado la madurez necesaria para que ocurra la ovulación y evita a su vez señalizaciones incorrectas por parte del hipotálamo y la hipófisis cuando los folículos aún no han madurado (Kriegsfeld y Silver, 2006). La señal circadiana antes mencionada se traduce, como el periodo durante el cual los eventos antes mencionados pueden desencadenar la ovulación. Si se reúnen las concentraciones hormonales, pero en un momento distinto al de esta ventana, la ovulación ya no es viable. Más adelante en el tiempo, si ambas señales convergen, la liberación masiva de FSH promueve el crecimiento de un nuevo conjunto de folículos (Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003), mientras que el de LH estimula un proceso inflamatorio local en el cual aumenta la concentración de prostaglandinas, mueren algunas células foliculares y, finalmente, es expulsado el ovocito hacia el oviducto tras



el rompimiento de la pared folicular (Domínguez *et al.*, 1991). Todo esto ocurre alrededor de las 2:00 h y 4:00 h del E y es denominado ovulación. Los folículos que han liberado su ovocito comienzan el proceso de luteinización en presencia de LH y el recién formado cuerpo lúteo, que secreta progesterona, se mantendrá funcionando por algún tiempo si existen ovocitos fertilizados, en caso contrario, se reinicia el ciclo ese mismo día.

Es interesante denotar que el aumento en la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH depende de que todas las neuronas en el hipotálamo anterior sincronicen su liberación; no se sabe si esto ocurre por la expresión de relojes locales y conexiones entre sí o por la regulación que ejercen la progesterona, los estrógenos, o el mismo SCN (van der Beek, 1996). Los estrógenos también deben presentarse en concentraciones apropiadas, pero sobre todo en periodos de exposición específicos, para estimular a las neuronas GnRHérgicas (Chappell, 2009). Por otro lado, el pico de LH tiene una estrecha relación de fase con el ritmo de actividad locomotora, lo que sugiere alguna especie de control temporal en común (Mitsushima *et al.*, 1997).

En condiciones de luz constante las ratas expresan su FRP en el ritmo de actividad, pero los picos de LH no se presentan y el sistema se adapta a la ovulación refleja dependiente de progesterona (Watts, 1991). Otro ejemplo de coordinación es el observado entre el E fisiológico y el conductual. El aumento en la concentración de estrógenos durante la fase folicular del ciclo estimula también la expresión del receptor a progesterona en el cerebro, asegurando que la receptividad sexual se presente en el momento apropiado (Kriegsfeld y Silver, 2006; van der Beek, 1996). Es probable que esta misma progesterona module los efectos del 17- $\beta$  estradiol, impidiendo que se den los picos de gonadotropinas en otros días del ciclo (van der Beek, 1996). Todos los eventos antes mencionados dependen entonces de patrones de secreción hormonal muy particulares, El SCN tiene receptores de uno u otro tipo para la mayoría de ellas, posiblemente para el ajuste fino de algunos eventos (Kriegsfeld y Silver, 2006).

## 6. Control circadiano del pico preovulatorio de LH

En 1950 John Everett y Charles Sawyer publicaron uno de los artículos clave sobre el control circadiano de la ovulación. En la rata administraron distintos barbitúricos a las 14:00 o 16:00 h del P, y descubrieron que la ovulación no ocurría en el día del E inmediato, sino exactamente 24 horas después. Al administrar los fármacos en los días siguientes notaron un bloqueo similar en múltiplos de 24 horas, el cual desaparecía después de detener el tratamiento. Dado que los barbitúricos promueven la neurotransmisión inhibitoria al estimular los receptores GABA<sub>A</sub> (Kimura y Jinnai, 1994), y obstaculizan la transmisión de potenciales de acción, los autores concluyen que existe un estímulo neural que regula la liberación preovulatoria de LH en conjunto con el ya conocido aumento en la concentración de estrógenos. Adicionalmente, suponen que este estímulo es activado solo durante un margen de tiempo entre las 2:00 y las 4:00 de la tarde y que no vuelve a presentarse sino hasta 24 horas después, ya que de lo contrario el animal ovularía una vez asimilado el efecto de los fármacos (Everett y Sawyer, 1950). Los resultados de este estudio se han corroborado en otras especies de roedores (Stetson *et al.*, 1981).

Otra prueba de que esta señal nerviosa se presenta con periodicidad circadiana proviene de la gran cantidad de estudios realizados en roedores en los que se elimina la retroalimentación inhibitoria ejercida por los estrógenos ováricos. Al realizar la ovariectomía bilateral, el pico de LH se presenta diariamente si se administran estrógenos en concentraciones similares a las del P (Chappell, 2005; de la Iglesia, 2007; Seegal y Goldman, 1975; Stetson *et al.*, 1981), lo que permite suponer que en condiciones normales el aumento en la concentración de LH depende de la convergencia de dos señales: una nerviosa de naturaleza circadiana y otra representada por la retroalimentación que ejercen los estrógenos ováricos. La de origen nervioso depende a su vez de un ambiente estrogénico óptimo para tener efecto biológico; es decir, altas concentraciones que le indiquen que los folículos han alcanzado la madurez necesaria para ovular y a la vez un mecanismo que cambie el

control inhibitorio a estimulante (de la Iglesia y Schwartz, 2006; van der Beek, 1996; Williams y Kriegsfeld, 2012).

Como se mencionó en la sección de las vías eferentes, el SCN inerva estructuras relacionadas con la regulación de la reproducción. En el POA se concentra la mayor cantidad de las neuronas que sintetizan GnRH, así mismo, el ARC, la DBB, el OVLT y el AHA son regiones inervadas por el SCN que contienen este tipo de neuronas (van der Beek *et al.*, 1993; van der Beek, 1996). Estas proyecciones han sido objeto de interés por su posible papel en la regulación del pico preovulatorio de LH, lo que podría ser la base anatómica de los resultados reportados por Everett y Sawyer (1950).

En la rata, la lesión electrolítica del SCN es acompañada por disminución en el número de neuronas GnRHérgicas en el POA ipsilateral que son inervadas por fibras inmunoreactivas a VIP, por lo que se puede concluir que existe una vía monosináptica e ipsilateral que comunica ambas regiones del hipotálamo, siendo el VIP su principal neurotransmisor (van der Beek *et al.*, 1993). Esta vía fue comprobada al utilizar trazadores anterógrados y realizar el análisis de los cortes con microscopía de luz y electrónica, lo que mostró que, si bien es mayoritariamente ipsilateral, algunas fibras alcanzan estructuras contralaterales, además de que no solo llegan al POA sino que inervan al resto de las estructuras rostrales al SCN y que contienen neuronas GnRHérgicas (van der Beek *et al.*, 1997). Las fibras GnRHérgicas provenientes del POA, a su vez, hacen contactos sinápticos con neuronas en el SCN y el área periquiasmática en su camino hacia la eminencia media; lo que podría suponer el sustrato para un mecanismo de retroalimentación entre ambos sistemas. La identidad neuroquímica de las neuronas en las que se dan estas sinapsis aún no se ha determinado (van der Beek *et al.*, 1997b). La administración de tetrodotoxina induce arritmicidad estral, lo que muestra que las conexiones sinápticas forman parte de la regulación del proceso (van der Beek, 1996).

Algunos roedores presentan una alteración en la organización de su sistema circadiano después de permanecer un tiempo en LL. Esta alteración es conocida como

"*splitting*" y consiste en la separación de dos componentes, posiblemente los osciladores E y M propuestos por Pittendrigh (1993), lo que provoca que el ritmo unimodal de actividad locomotora se bifurque en dos componentes perfectamente acoplados con un desfase de 180°. Cada componente dura unas 12 horas y, sorprendentemente, en el día del P cada uno tiene asociado un pico de LH de aproximadamente la mitad de la concentración, sincronizado de manera semejante al de un animal normal con su ciclo unimodal de actividad (Kriegsfeld y Silver, 2006). Se ha mostrado que durante *splitting* existe una activación asimétrica del SCN y POA ipsilateral con respecto a sus homólogos contralaterales (Figura 9). Durante uno de los dos picos de LH se activa el circuito en uno de los hemisferios, mientras que en el otro pico se activa el circuito contrario, mostrando que la presencia de una vía nerviosa, monosináptica e ipsilateral entre el SCN y POA es fundamental en la regulación del eje reproductivo (de la Iglesia et al., 2003; de la Iglesia y Schwartz, 2006).

van der Beek y colaboradores (1993) analizaron la activación de las neuronas GnRHérgicas inervadas por fibras VIPérgicas durante el pico de LH y utilizaron la expresión de C-fos como marcador de actividad neuronal. Las neuronas en POA que son activadas antes y durante el pico preovulatorio de LH son las mismas que están inervadas por las fibras que provienen del SCN, mientras que las neuronas inmunoreactivas a VIP en el SCN permanecen inactivas. Los resultados de este estudio permiten proponer que el VIP ejerce un efecto inhibitorio en la activación de dichas neuronas, el cual desaparece cuando el SCN disminuye su liberación en presencia de altas concentraciones de estrógenos (van der Beek et al., 1994). Esta hipótesis es sustentada además por los estudios que muestran que la inyección de VIP intracerebroventricularmente, o directamente en POA, inhibe el pico de LH (van der Beek et al., 1994; Weick y Stobie, 1995).

Los efectos de la administración de VIP son similares a los de LL y la administración de antagonistas directamente en el POA induce la activación de sus neuronas (van der Beek, 1996). El verdadero papel de VIP en la regulación del pico preovulatorio de LH aún no es del todo claro; en la rata existen estudios que le atañen

un papel estimulador y otros por el contrario concluyen que es inhibitorio o permisivo (Weick y Stobie, 1995).

Estudios *in vitro* realizados en explantes de cerebro del ratón muestran que, al menos en estas condiciones, el VIP puede estimular a las neuronas GnRHérgicas aumentando su actividad, efecto que depende de la presencia de estrógenos y del momento del día en el que se administra; este tratamiento surte efecto solo en el momento en el que el animal entero presentaría el inicio del pico de LH (Christian y Moenter, 2008). Los estudios del efecto que tiene VIP sobre las neuronas GnRHérgicas sugieren que este péptido, que es sintetizado mayoritariamente en la porción retino-recipiente del SCN, es responsable de informar al sistema reproductivo el estado del tiempo externo, lo que determina en gran medida el momento en que se da el pico. Aproximadamente 40% de las neuronas GnRHérgicas expresan el receptor VIP<sub>2</sub> y son las mismas que están en contacto con las fibras que transportan VIP desde el SCN (Smith *et al.*, 2000).

La AVP también ha sido relacionada con la ocurrencia del pico de LH. La inyección de AVP directamente en el POA de ratas hembras ovariectomizadas, tratadas con estrógenos y con lesiones totales del SCN induce el aumento inmediato en la concentración sérica de LH, lo que podría indicar que en condiciones normales este neurotransmisor es fundamental en la activación de las neuronas GnRHérgicas y la posterior liberación de GnRH en la eminencia media (Chappell, 2005; Palm *et al.*, 1999). Este efecto estimulador depende del momento en que es administrado el neurotransmisor, teniendo su mayor efecto justo antes de la ventana temporal descrita por Everett y Sawyer (Palm *et al.*, 2001). La administración de AVP en otros momentos es inefectiva, por lo que surge la hipótesis de que algunos mecanismos de inhibición impiden que las neuronas GnRHérgicas se activen en momentos inapropiados del ciclo. Algunos autores han sugerido que el GABA participa en estos mecanismos, y que desaparece de manera similar al VIP en cuanto las concentraciones de estrógenos son óptimas (Chappell, 2005; van der Beek, 1996; Palm *et al.*, 2001). La administración de naloxona o bicuculina, antagonistas de los receptores GABA<sub>A</sub>, por la mañana del P adelanta la ocurrencia del pico de LH sin modificar al ritmo de actividad locomotora, por

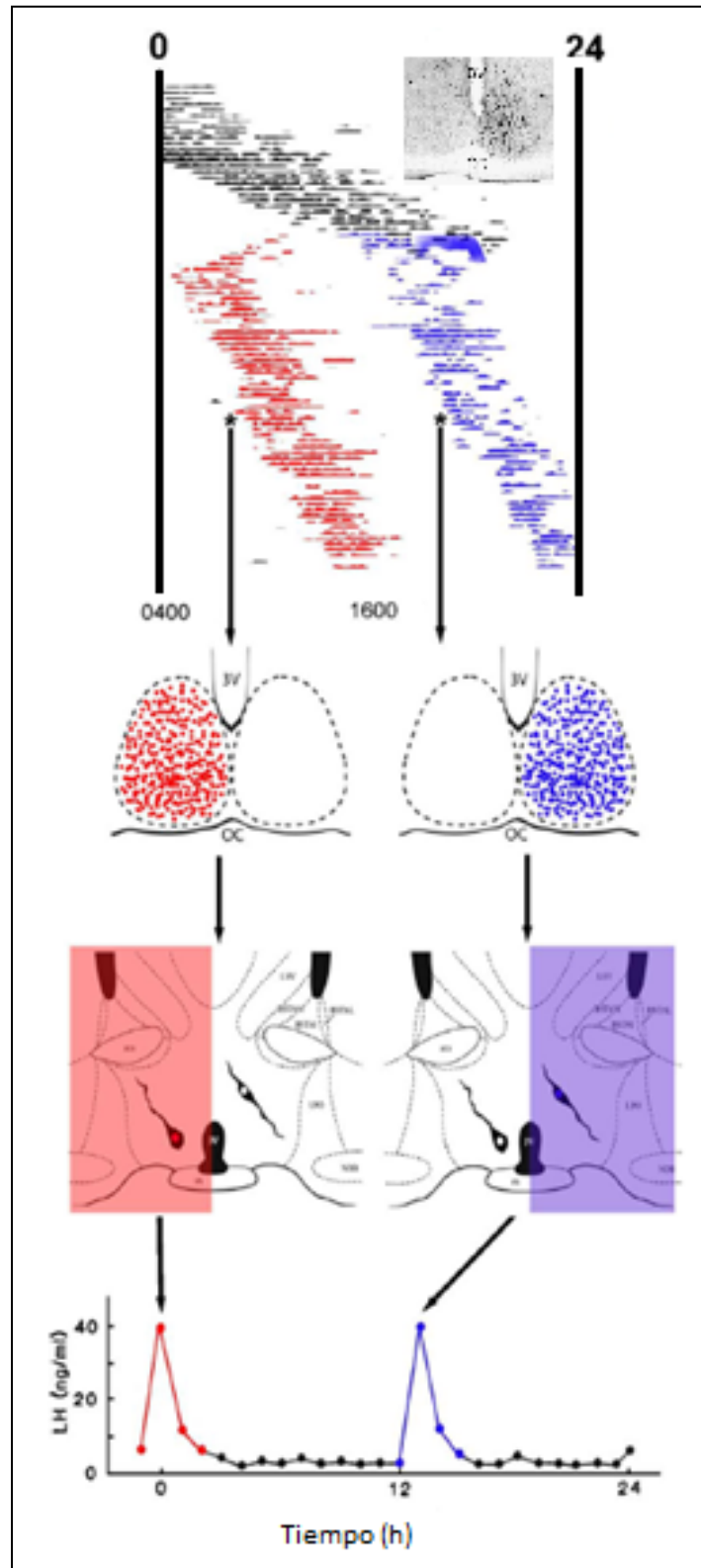


Figura 9. Modelo de *splitting*. En sentido descendente: disociación de la actividad locomotora en dos componentes, asociados a la activación asimétrica del SCN, que a su vez, activa al POA ipsilateral generando con ello dos picos de LH en el día del P (tomada y modificada de Kriegsfeld y Silver, 2006).

lo que el efecto inhibitor del GABA debe operar a nivel del POA, lo que parece apoyar esta propuesta (Kimura y Jinnai, 1994; Mitsushima *et al.*, 1997).

Los ratones mutantes Clock/Clock no presentan pico preovulatorio de LH, por lo que han sido investigadas sus deficiencias a nivel hipotalámico. El contenido de GnRH y la respuesta de las neuronas GnRHérgicas a estradiol son normales, por lo que la alteración debe estar presente a nivel del SCN o de la señal circadiana (Miller *et al.*, 2004). Se ha encontrado que la AVP no se produce de manera normal en las neuronas del SCN, que el receptor AVPR1A tampoco se expresa normalmente en las neuronas del POA y que la inyección intracerebroventricular de AVP puede restaurar el pico de LH, lo que muestra que este neurotransmisor es parte fundamental de la señal circadiana que regula la reproducción (Miller *et al.*, 2006).

Después de aclarar las posibles vías de interacción entre el POA y el SCN, hay que mencionar que ambos han sido analizados en busca de receptores a estrógenos y solo se ha encontrado el subtipo beta (ER $\beta$ ) (de la Iglesia y Schwartz, 2006; Moore, 1999; Watson *et al.*, 1995). Dado que es el receptor a estrógenos de tipo alfa (ER $\alpha$ ) el que está relacionado con la ocurrencia del pico preovulatorio de LH, el sistema debe incluir: a) a las neuronas GnRHérgicas en el hipotálamo rostral, b) las neuronas del SCN y c) un intermediario cuyas células expresen ER $\alpha$  y que tenga conexiones con ambas áreas (Figura 8) (Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003; van der Beek, 1996). El núcleo anteroventral periventricular (AVPV) es un área hipotalámica rica en ER $\alpha$  y receptores a progesterona (PR), además, es sexualmente dimórfica. En la rata hembra el volumen y la densidad neuronal es mayor que en el macho (Hahn y Coen, 2006); por lo que es un buen candidato para ser la estructura intermediaria que informa al SCN y al POA el estado de los folículos en el ovario vía estrógenos (Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003; de la Iglesia y Schwartz, 2006; Watson *et al.*, 1995). La lesión de esta zona suprime el pico preovulatorio de LH en ratas ovariectomizadas tratadas con progesterona o estradiol y al inyectar anti estrógenos directamente en el AVPV se elimina la ciclicidad estral (Barbacka-Surowiak *et al.*, 2003).



El AVPV se encuentra entre la terminación rostral del 3V y la región caudal del OVLT, por lo que originalmente fue denominado núcleo preóptico medial o núcleo preóptico anteromedial. Las inyecciones de trazadores anterógrados en el SCN de la rata permiten identificar fibras y botones terminales en el AVPV que hacen sinapsis en las neuronas que contienen, al menos, los ER $\alpha$  (Watson *et al.*, 1995). En el hámster se comprobó la comunicación entre el SCN y el AVPV y además se encontró que prácticamente todas las regiones del cerebro que contienen ER $\alpha$  inervan al SCN (de la Iglesia *et al.*, 1999). Estudios posteriores en rata determinaron que el AVPV y el POA inervan a la mayoría de las regiones que están asociadas con algún proceso reproductivo, desde la secreción hormonal hasta la conducta sexual. Este estudio comprueba la existencia de un puente de comunicación entre el AVPV, el POA y el SCN completando un posible circuito nervioso que es responsable de la regulación temporal del pico preovulatorio de LH y por tanto de la ovulación (Hahn y Coen, 2006).

### **7. Expresión de genes reloj en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario**

Partiendo del modelo multioscilar, sabemos que gran cantidad de tejidos fuera del SCN expresan activamente la maquinaria molecular que impulsa a este último. Indudablemente esta maquinaria altera el movimiento de otros engranes (ccg's), que a su vez modifican la actividad intracelular específica en cada tejido. El eje neuroendocrino responsable de la regulación de la reproducción expresa genes reloj en todas sus estructuras, por lo que es necesario preguntarse: ¿qué papel juega este reloj intracelular en la actividad específica de cada tejido? (Ball, 2007; Chappell *et al.*, 2009; Williams y Kriegsfeld, 2012).

Las células GnRHérgicas continúan secretando GnRH de manera pulsátil aún cuando están dispersas en cultivos, y estos pulsos tienen propiedades que parecen ser específicas de cada especie. Se desconoce la naturaleza exacta de esta propiedad inherente a este tipo de células, pero se piensa que es modulada por las vías aferentes que las inervan, entre ellas las que provienen del SCN. La comprobación de la expresión de genes reloj en las células GnRHérgicas inmortalizadas de la línea GT1-7

responde más preguntas al respecto que el planteamiento anterior (Chappell *et al.*, 2003). Dado que este tipo de células continúan secretando GnRH de manera pulsátil en cultivo, es evidente que algún mecanismo intracelular está acoplado a la maquinaria neurosecretora, lo que regula la temporalidad de cada pulso. La expresión cíclica de los genes reloj y su transcripción a proteínas podrían representar este mecanismo de control (Chappell *et al.*, 2003; Guillespie *et al.*, 2003). Al interrumpir la expresión de estos genes se presentan patrones anómalos en la secreción de GnRH, lo que los involucra de manera directa en la generación local de pulsos de GnRH (Chappell *et al.*, 2003).

La expresión de genes reloj ocurre de manera semejante en células de la hipófisis, pero su papel en la regulación de sus funciones ha sido escasamente estudiado (Chappell *et al.*, 2003). Sikes (2009) analizó la expresión *in vitro* de Per1 en D-2 y P en los gonadotropos hipofisarios, y encontró un pico en el día del P. La administración de GnRH induce la síntesis de la cadena  $\beta$  de la LH, que es específica en cada especie, así como la expresión de Per1; ambas por alguna vía dependiente de PKC/MAPK y además de Egr-1. El receptor a GnRH en los gonadotropos fluctúa en un patrón cuyo “pico” coincide con los pulsos de la hormona a nivel hipotalámico, lo que inmediatamente resalta la importancia de un reloj intracelular que permita coordinar sus funciones con las células GnRHérgicas. El promotor de este receptor presenta varias secuencias E-box, por lo que su expresión seguramente es coordinada por genes reloj, lo mismo ocurre en el promotor de la cadena  $\beta$  de la LH. Al inducir mutaciones en estas secuencias se altera la expresión de ambos ARNm, denotando el control circadiano en este paso vital en la regulación de la sensibilidad a GnRH y de la misma síntesis de LH a nivel hipofisario.

En el ovario, la expresión de los genes Per1 y Per2 fluctúa durante el ciclo estral con periodicidad circadiana en las células de la granulosa y de la teca (en folículos pre-antrales y antrales) y en las células luteales y del tejido intersticial. Esto puede observarse en ratas mantenidas bajo un fotoperiodo 12:12 o en condiciones constantes (DD), lo que muestra que este ritmo es endógeno (Fahrenkrug *et al.*, 2006). En un estudio posterior se comprobó la expresión rítmica de estos dos genes y del

resto de la maquinaria molecular que opera a nivel del SCN, los autores reportan que la expresión de todos se encuentra fuera de fase con respecto a la expresión en el SCN, lo que apoya la teoría de que las señales provenientes del SCN sincronizan los relojes periféricos y no la de que les aportan ritmicidad. En este estudio se reporta la expresión de *Per2* y *Bmal1* en el ovocito. En ratas hipofisectomizadas tratadas con gonadotropina coriónica equina (eCG) para estimular el desarrollo ovárico, ningún gen reloj parece oscilar y la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) induce la expresión de *Per2* y *Bmal1*, por lo que este reloj podría responder de manera directa a las gonadotropinas hipofisarias. Cabe resaltar que la expresión de estos genes varía dependiendo de la etapa del ciclo, por lo que es probable que esta maquinaria participe en la regulación del desarrollo folicular y de la ovulación (Karman y Tischkau, 2006).

Desde los estudios de Everett y Sawyer se confirió a las gonadotropinas el papel determinante en la inducción de la ovulación, sin embargo, las evidencias presentadas anteriormente dejan claro que el ovario no recibe de manera pasiva la información temporal, sino que participa activamente en su generación utilizando su propio reloj endógeno para sincronizarse con el resto del eje y a su vez para regular localmente su propia fisiología (Ball, 2007; Sellix *et al.*, 2009). La sensibilidad del mismo hacia las gonadotropinas es otro proceso vital para la ocurrencia de la ovulación y al parecer es controlada por el mismo ovario. Al bloquear las gonadotropinas endógenas e inyectar gonadotropinas, la respuesta ovulatoria varía dependiendo del día y la hora en que se aplica la inyección, mostrando que la sensibilidad del ovario a éstas se modifica con el tiempo aún en su ausencia (Sellix *et al.*, 2009).

En el ovario de aves domésticas también se expresan de manera similar los genes reloj. En los folículos preovulatorios, el gen *StAR* (Proteína reguladora de la esteroidogénesis), que codifica para una enzima limitante en la esteroidogénesis, es un ccg. (Nakao *et al.*, 2007). En el ovario de los bovinos la expresión del receptor a LH, de la enzima P450 aromatasa, así como de *StAR* es regulada por los genes *Clock* y *Per2*. En células de la granulosa en cultivo y tratadas con FSH, *CLOCK* estimula la transcripción de la P450 aromatasa, mientras que *PER2* inhibe la transcripción de

StAR. Ambos estimulan, por otro lado, la síntesis del receptor a la LH, así como la proliferación de las células de la granulosa (Shimizu *et al.*, 2011).

Finalmente, el último paso en la ovulación es la debilitación y ruptura de la pared folicular que culmina con la liberación del ovocito. El pico de LH inicia una cascada de señalización en las células de la granulosa que involucra a algunos prostanoïdes en el proceso inflamatorio que termina por expulsar al ovocito. El gen Cox2 codifica para una enzima limitante en la síntesis de prostanoïdes (ciclooxigenasa-2) y curiosamente tiene regiones E-box en su promotor. La expresión rítmica de Cox2 podría conllevar a la síntesis rítmica de PGE2 y PGF2 $\alpha$ , asociados a la ruptura de la pared folicular en respuesta al pico de LH. Este mecanismo parece estar influenciado directamente por el heterodímero CLOCK:BMAL1 a nivel ovárico (Sellix y Menaker, 2010).

Si bien todos los elementos del eje hipotálamo-hipófisis-ovario poseen relojes propios asociados con algunas de sus funciones, poco se sabe de cómo se relacionan unos con otros. La reproducción es un evento tan finamente coordinado que es improbable que cada reloj opere independientemente de los demás, es posible que las gonadotropinas sean un agente sincronizador necesario para acoplar el reloj del ovario con el resto del eje.

Yoshikawa y colaboradores (2009) mostraron que ambas gonadotropinas son capaces de ejercer cambios de fase en el reloj ovárico, que la inervación simpática del ovario no es determinante en estos cambios y que incluso los ovarios aislados en membranas semipermeables son capaces de presentarlos, mostrando que la LH y la FSH son, por lo menos, una de las señales preponderantes de información temporal que sincronizan al ovario con el resto del eje. Este estudio deja de lado la inervación de tipo parasimpático y sensorial que llega al ovario a través del nervio vago; información que también participa en la regulación de las funciones ováricas (Dominguez y Cruz-Morales, 2011) y que posiblemente lleve información proveniente del SCN hasta ellos. Kalsbeek y colaboradores (2006), resumen algunas de las vías de salida que tiene el SCN para enviar información temporal a otras regiones del sistema nervioso, entre

ellas el PVN, que a su vez está conectado con el NTS y el VMDN, que son grupos neuronales en los que tiene su origen el nervio vago. Hace falta entonces un estudio que determine si existe comunicación entre el SCN y el ovario a través de esta u otras posibles vías (Figura 10).

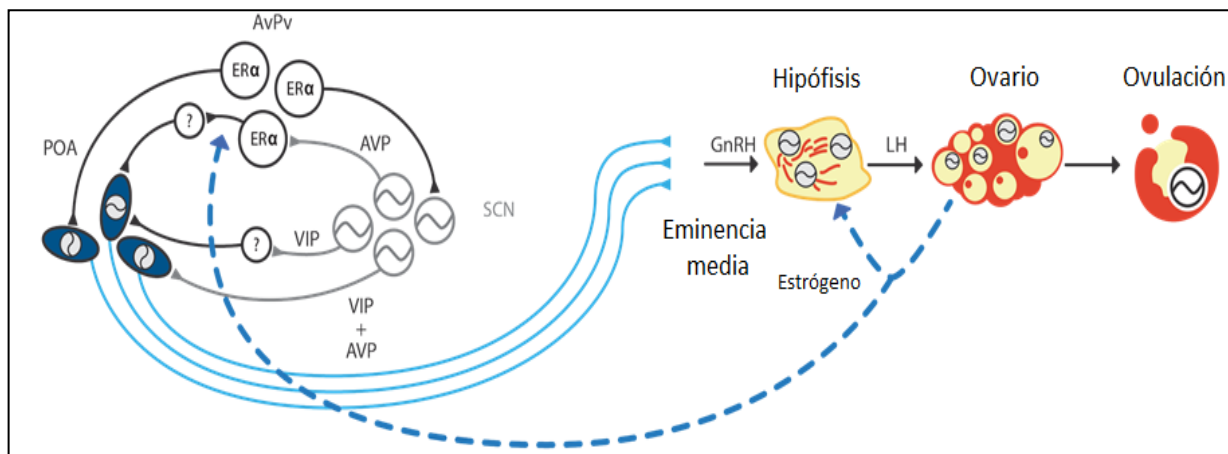


Figura 10. Modelo actualizado que representa los principales elementos involucrados en la regulación temporal de la ovulación, para detalles, remítase al texto. Los círculos blancos con la línea oblicua al centro representan osciladores intracelulares (diseño de Armando Martínez; [www.ploop.net](http://www.ploop.net)).

Con base en lo anterior, se puede concluir que la información temporal se genera activamente en todos los puntos del eje neuroendocrino y que son necesarios más estudios para entender las relaciones que vinculan a cada punto con los demás, así como para entender como la expresión de estos genes impacta la fisiología local de cada tejido. Se ha propuesto, por ejemplo, que los estrógenos ováricos podrían actuar intracelularmente directamente sobre los genes reloj o los ccg's, al modificar la actividad de las células hipotalámicas; pero aún es un campo joven dentro de la investigación de la fisiología reproductiva (Chappell *et al.*, 2009). El control temporal de la reproducción entonces está ligado a las relaciones que establece el SCN con los tejidos apropiados, ya que puede influenciar células neurosecretoras en el sistema nervioso central, ya sea de manera directa o indirecta, también puede controlar glándulas de secreción por medio del sistema nervioso autónomo y además puede incidir en la regulación a nivel genético (Kriegsfeld y Silver, 2006).

### Justificación del problema

*In vitro*, el SCN del hámster puede mantener sus oscilaciones aún separado en dos componentes, el SCN izquierdo y el derecho (Gillete, 1991). En el animal entero existe una disociación del sistema circadiano en los mismos componentes; aparentemente la ocurrencia de esta anomalía, conocida como *splitting*, se debe a la pérdida en la coordinación de dos componentes en el sistema circadiano que usualmente operan acoplados. Existe una activación asimétrica del lado izquierdo y derecho del SCN, ya que se activan cada uno por separado (de la Iglesia *et al.*, 2003), lo que está a su vez relacionado con diferencias en la actividad eléctrica (Jagota *et al.*, 2000), la expresión diferencial y asimétrica de los genes reloj y los ccg's al interior de las neuronas de cada lado (de la Iglesia *et al.*, 2000).

El hecho de que se haya reportado que cada lado del SCN es responsable de la activación de la mitad de algunos circuitos en el sistema nervioso central nos hace pensar en la posibilidad de que esta regulación no sea del todo simétrica. Si bien se ha mostrado que las lesiones unilaterales del SCN afectan de manera similar el ritmo de actividad locomotora, sin importar cual lado del núcleo es destruido (Davis y Gorski, 1984; Donaldson y Stephan, 1982), también se ha evidenciado que la regulación temporal de los ritmos neuroendocrinos por parte del SCN no comparte elementos en común con el de actividad locomotora una vez que la información abandona el núcleo (Kriegsfeld y Silver, 2006; Lehman *et al.*, 1991; Meyer-Bernstein *et al.*, 1999; Sollaret *et al.*, 1995).

En ratas sometidas a *zeitgebers* fuera del rango de sincronización (T=22 horas) se ha reportado la existencia de dos osciladores desacoplados, pero al analizar la expresión de los genes reloj fue evidente que se trataba de las porciones ventrolateral y dorsomedial de ambos del SCN (de la Iglesia *et al.*, 2004). También se ha reportado la ocurrencia de *splitting* en la actividad locomotora y la ingesta de agua y alimento (Boulos y Terman, 1979).

Los resultados mencionados muestran que el SCN tiene plasticidad en su configuración y que ésta puede ser modificada bajo algunos parámetros. En los ritmos de actividad locomotora y de ingesta puede reajustarse, desacoplarse y funcionar cada lado como una entidad independiente; incluso un lado puede compensar la ausencia de su par como han demostrado los escasos experimentos que utilizan el paradigma de la lesión unilateral (Davis y Gorski, 1984).

El tema de las asimetrías funcionales en el sistema nervioso, y sobre todo su relación con las funciones de los ovarios, ha sido mostrado ampliamente (Domínguez, 1992). Los dos hemisferios del hipotálamo no juegan el mismo papel en la regulación de la ovulación e incluso existen asimetrías funcionales y anatómicas en el sistema nervioso periférico relacionadas con el mismo proceso (Nance *et al.*, 1983; 1984; Fukuda *et al.*, 1984). La carencia de estudios sobre la regulación temporal de la reproducción por parte del SCN deja abierta la posibilidad de que también existan diferencias en el control de varios procesos entre el SCN izquierdo y derecho.

Prácticamente nada se sabe al respecto sobre la regulación de los ritmos reproductivos, a pesar de que ambos lados pueden dissociarse durante la activación de las neuronas GnRHérgicas en el día del proestro en animales con *splitting*. Se desconoce si en condiciones normales ambos lados participan equitativamente en la activación de dichas neuronas o si uno es preponderante y puede, en ausencia del otro, regular el proceso; es por ello que en el presente estudio nos propusimos analizar, por la mañana de cada etapa del ciclo estral, la participación de ambos núcleos Supraquiasmáticos en la regulación de la ovulación y la progresión del ciclo.



### **Hipótesis**

Si la información nerviosa que es generada en el SCN y transmitida a las estructuras involucradas en el eje neuroendocrino formado por el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios es asimétrica en cuanto al momento del ciclo y el lado del núcleo del que proviene, entonces la destrucción de un lado del SCN inducirá efectos distintos sobre la ovulación y la progresión del ciclo estral, dependiendo del lado que sea destruido y de la etapa del ciclo estral en que se lleve a cabo el procedimiento quirúrgico.

### **Objetivo general**

- Analizar la participación de cada lado del SCN en cada etapa del ciclo estral sobre la ovulación y la progresión del ciclo estral de la rata adulta.

### **Objetivos particulares**

1. Analizar el efecto del bloqueo en la transmisión de información nerviosa inducido por barbitúricos en la mañana de cada día del ciclo estral sobre la ovulación y la progresión del ciclo estral de la rata adulta.
2. Analizar la participación de las vías nerviosas dorsales al SCN sobre la ovulación y la progresión del ciclo estral de la rata adulta.
3. Analizar si existen asimetrías entre ambos lados del SCN en cuanto a su participación en la regulación de la ovulación y la progresión del ciclo estral de la rata adulta.
4. Analizar el efecto de la anestesia, la sección de las vías dorsales al SCN y la lesión del SCN sobre la masa de los ovarios y el útero.

## Métodos y materiales

### ***Selección de los animales***

Para el presente estudio se utilizaron ratas hembras vírgenes de la cepa CIIZ-V, de tres a tres y medio meses de edad. Los animales fueron alojados en grupos de 7 individuos, en jaulas acrílicas claras, no porosas (45x22x20 cm), con reja superior de acero inoxidable, a través de la cual se administró el agua por medio de bebederos de cristal con boquillas de acero inoxidable y alimento en pellets (Purina S.A., México), ambos *ad libitum*. Se utilizó viruta de madera como pienso.

La temperatura de la sala (misma en la que permanecieron todos los animales utilizados en el experimento) se mantuvo a  $22\pm 1$  °C y se adoptó un fotoperiodo controlado de 14 horas luz y 10 de oscuridad con luces encendidas de las 05:00 a las 19:00 h, tiempo del centro (GMT-6).

Cuatro días antes de cumplir los 3 meses de edad todas las ratas fueron anestesiadas con éter y marcadas con un horador para orejas para su identificación. Se inició la toma de muestras del epitelio vaginal con un asa bacteriológica modificada a fin de disminuir el diámetro de la punta. El ciclo estral de los animales se monitoreó con la toma de este frotis vaginal, que se realizó diariamente entre las 11:00 y las 12:00 h y se analizó en un microscopio óptico compuesto Nikon OPTIPHOT-2 con un aumento de 10X, tras ser teñido con la técnica de Hematoxilina-Eosina (Ellis, 2003). Únicamente se utilizaron aquellos animales que mostraron ciclicidad (dos ciclos consecutivos de 4 días de duración) y una masa corporal de entre 230 g y 260 g en el día de la cirugía. El frotis vaginal nos permite asegurar la probabilidad de que el siguiente ciclo tuviera la misma longitud es de por lo menos el 95%.

### **Grupos experimentales**

Al cumplir los 3 meses de edad los animales fueron distribuidos aleatoriamente entre alguno de los grupos experimentales descritos a continuación (n=7). Los tratamientos se realizaron en el intervalo comprendido desde las 09:00 a las 10:10 h en cada día del ciclo estral.

#### **1. Lesión unilateral del núcleo Supraquiasmático (SCN-I y SCN-D)**

Con la finalidad de analizar la participación de cada lado del núcleo en la regulación de la ovulación, además de la posible existencia de asimetrías funcionales, se procedió a realizar la lesión térmica (electrolítica) del núcleo Supraquiasmático; ya sea del lado izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D). Las coordenadas y el tiempo de exposición/temperatura fueron calculados previamente y se determinó para la zona media del núcleo izquierdo: Antero-Posterior=-0.3, Medio-Lateral=+0.3, Dorso-Ventral=-9.1 y para la zona media del núcleo derecho: Antero-Posterior=-0.3, Medio-Lateral=-0.5, Dorso-Ventral=-9.1 (Figura 11). La barra de los incisivos se colocó en -0.5 (5 mm por debajo de las barras de las orejas) El tiempo de exposición/temperatura apropiado para destruir un lado del SCN con la punta del electrodo ubicada en las coordenadas anteriores fue: 15 segundos a 95° C, con un retraso de  $7 \pm 1$  s. Este retraso cuantifica el tiempo que toma al sistema lograr la temperatura indicada; la corriente necesaria para ello fue variable. El circuito fue cerrado por medio de una aguja esterilizada colocada subcutáneamente en el cuarto posterior izquierdo de todos los animales.

#### **2. Operación simulada unilateral (Sham-I y Sham-D)**

Para discernir entre el efecto de la lesión térmica dirigida a un lado del SCN y la sección de las vías dorsales al mismo, ocasionada por el descenso del electrodo con el que se realizó el tratamiento; así como la perforación de la piel, músculo, cráneo y meninges, se realizaron operaciones simuladas que consistieron en el procedimiento

regular que se siguió para los grupos de lesión, con la diferencia de que una vez posicionado el electrodo en la región deseada no se hizo pasar corriente por el sistema, dejando el electrodo un tiempo equivalente al que tomaría la lesión completa, pero sin efectuar la misma. Esta simulación se realizó del lado izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D).

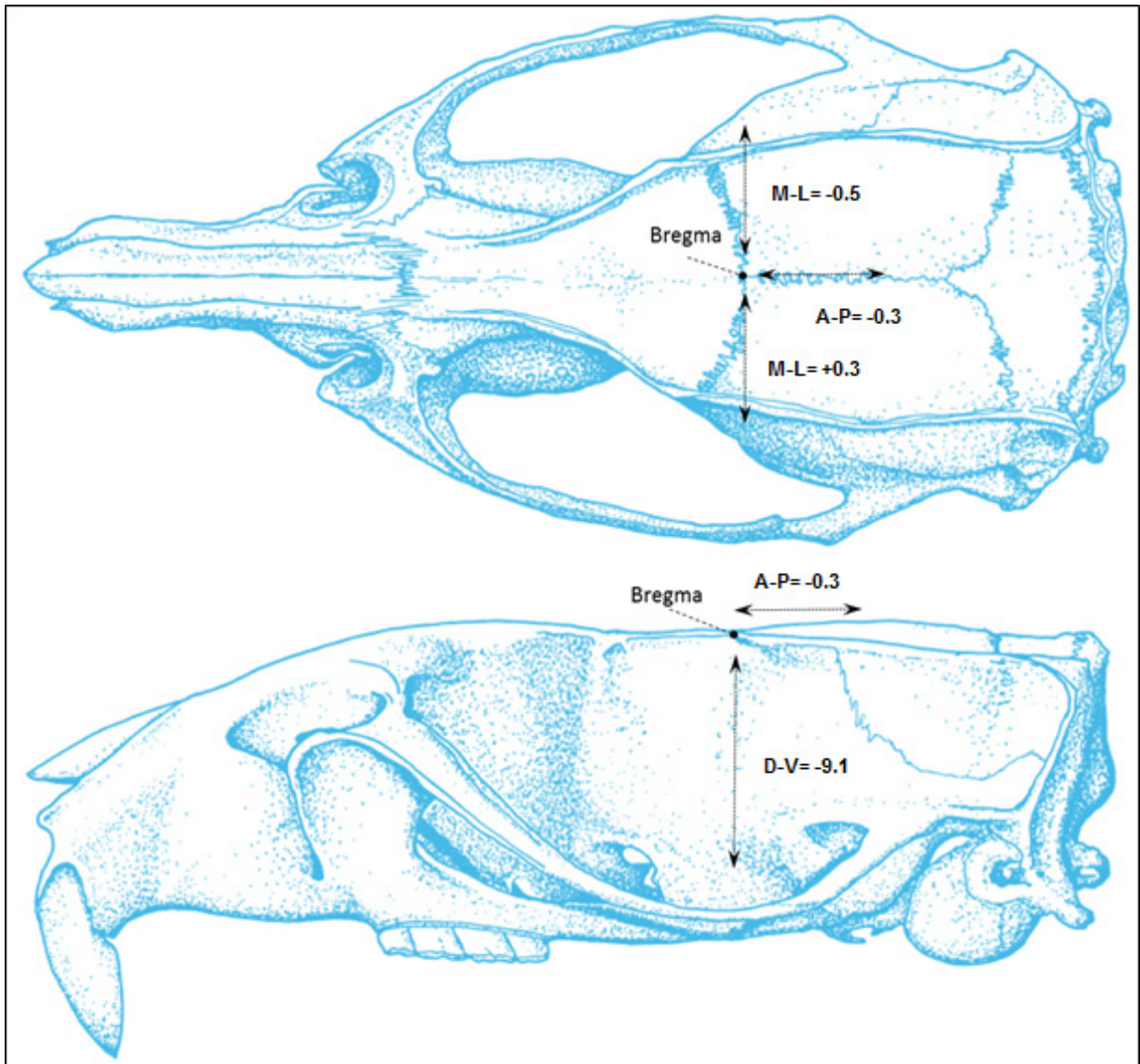


Figura 11. Representación esquemática del cráneo de la rata, denotando el punto de referencia cero (Bregma) y las coordenadas Medio-Lateral (M-L), Antero-Posterior (A-P) y Dorso-Ventral (D-V) empleadas a partir de él en las cirugías (Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 2004).

En ambos casos se utilizó la técnica descrita por Wirtshafter *et al.* (1979), para evitar daños al seno sagital superior, principal vena de la porción rostral y caudal del cerebro. Los animales en los que se dañó el seno y por tanto presentaron sangrado excesivo fueron descartados del experimento, pues en la autopsia se observaron grandes hematomas ubicados entre las meninges y el cerebro; similares a los reportados por Wirtshafter *et al.* (1979), los cuales probablemente afectan el funcionamiento normal de estructuras en la corteza cerebral (Figura 12).

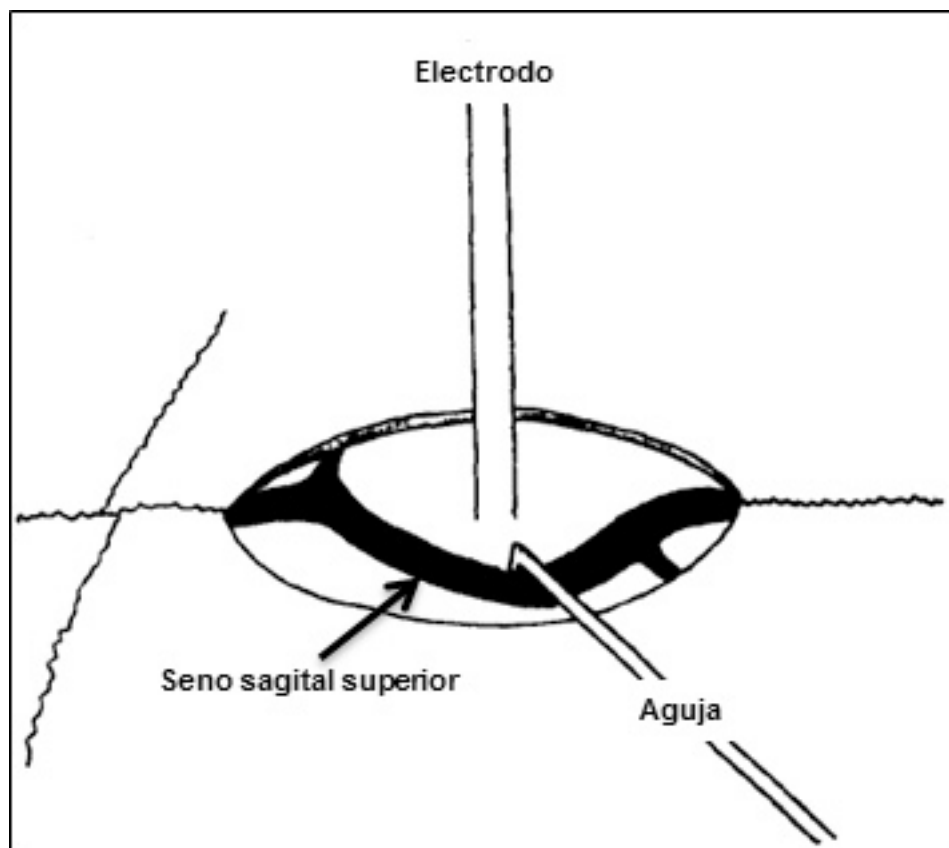


Figura 12. Técnica de Wirtshafter y colaboradores (1979) para evitar el daño al seno sagital superior en cirugías estereotáxicas con objetivos cercanos a la línea media.

Todos los tratamientos se realizaron bajo los efectos del Pentobarbital sódico Sedalphorte (Salud y Bienestar Animal S. A. de C. V., México) como agente anestésico (administrado como se describe a continuación para el grupo de anestesia) y adicionalmente se utilizó éter como anestesia complementaria. Las cirugías se realizaron en un aparato estereotáxico David Kopf modelo 900, tomando

a bregma como punto 0 de referencia (Figura 11). Los procedimientos se realizaron con un electrodo TCZ con una punta de 0.5 mm de largo por 0.25 mm de diámetro y una longitud total de 100 mm. El estimulador utilizado para las lesiones fue un generador de radiofrecuencia Radionics modelo RFG4A. La inserción del electrodo en las coordenadas antes mencionadas se logró a través de una craneotomía realizada con una fresa odontológica CARBIDE BURS HP-4 montada en un instrumento rotatorio Dremel 300; adicionado con una extensión flexible y funcionando a media capacidad.

Como grupos de comparación se utilizaron animales sometidos a alguno de los siguientes tratamientos.

### 3. Anestesia (PA)

Animales a los cuales se les inyectó una única dosis (25 mg/kg) intraperitoneal de Pentobarbital sódico Sedalphorte a las 09:00 h.

### 4. Control absoluto (Intacto)

Animales intactos, sin ninguna manipulación adicional al marcaje y frotis vaginal diario, fueron sacrificados en el día del Estro vaginal.

- **Sacrificio y autopsia**

Después de los procedimientos realizados se retomaron los *frotis* vaginales y todos los animales fueron sacrificados a las 09:00 h del Estro esperado por decapitación con una guillotina para roedor.

En la autopsia se removieron ambos ovarios, el útero y el encéfalo (Paul *et al.*, 2008a). Utilizando un microscopio estereoscopio Carl Zeiss Stemi DV4 se separó el oviducto de cada ovario y se verificó la presencia de ovocitos, la cual fue confirmada tras una tinción con Hematoxilina-Eosina (Figura 13). Los resultados del número de ovocitos liberados se expresaron como los correspondientes al ovario izquierdo (OI), al derecho (OD) o los totales (OI+OD). Partiendo de esos datos fue



posible calcular la tasa de animales ovulantes (TAO) definida como el número de animales que ovulan entre el número de animales totales. Los ovarios y el útero fueron pesados en una balanza de precisión Mettler AT261 Delta Range. La masa de los órganos se expresó en mg por cada 100 g de masa corporal del animal evaluado (mg/100 g masa corporal). Todos los resultados se expresaron como la media más menos el error estándar de la media (Media  $\pm$  e.e.m.). Por último, el cerebelo y la porción rostral del cerebro, justo después de la región caudal de los bulbos olfatorios, se removieron del encéfalo. El restante se almacenó a -70 °C en contenedores plásticos con interior de aluminio hasta su procesamiento (al menos 24 horas).

- ***Cortes histológicos de cerebro***

Se realizaron cortes seriados de 60  $\mu$ m en un criostato MICROM HM 505 N a una temperatura de -20 °C en la cámara (Paul *et al.*, 2008b). Se montaron en laminillas preparadas con una solución de gelatina (Paul *et al.*, 2008c) para su tinción con la técnica de Nissl para tejido nervioso (Paul *et al.*, 2008d) (solamente los cortes provenientes de animales lesionados fueron teñidos).

Los cortes fueron revisados en el microscopio óptico compuesto Nikon OPTIPHOT-2 con un aumento de 10X con la finalidad de determinar el alcance de la lesión y solamente se usaron los datos provenientes de animales en los cuales se confirmó la correcta trayectoria del electrodo hacia el SCN (para el caso de las Sham) o la destrucción total del SCN izquierdo o derecho (para el caso de las lesiones), con la condición de que no se destruyera la pared adyacente del 3V y que el OC y la zona inmediata al SCN recibieran el mínimo daño posible (Figura 14). Se utilizaron simultáneamente dos atlas del cerebro de la rata para la identificación de las estructuras necesarias (Köning y Klippel, 1963; Paxinos y Watson, 2004)

- **Análisis estadístico**

El número de ovocitos liberados fue analizado con la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn. La tasa de animales ovulantes se analizó con la prueba de  $\chi^2$  (Chi cuadrada). Los resultados de las masas de los órganos se analizaron con la prueba de análisis de varianza múltiple (ANOVA) seguida de la prueba de Tukey. Cuando fue necesario hacer comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba “t” de Student. En todos los casos se consideraron significativas las diferencias en las cuales la probabilidad fue menor o igual a 0.05 ( $p \leq 0.05$ ). El programa estadístico utilizado en todas las pruebas fue GraphPad InStat versión 3.05 (GraphPad InStat Software, 2003).

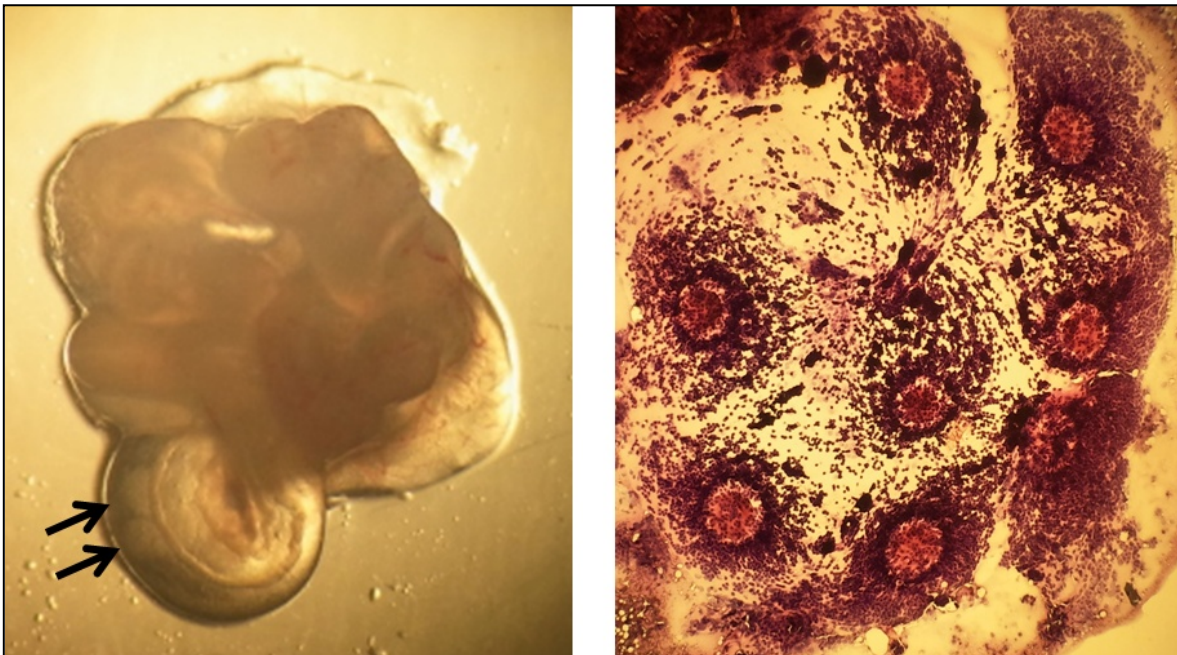


Figura 13. Oviducto (izquierda) y ovocitos contenidos en el mismo (derecha) de un animal intacto sacrificado el día del estro vaginal. Las flechas señalan dos ovocitos dentro del oviducto antes de ser extraídos y teñidos.

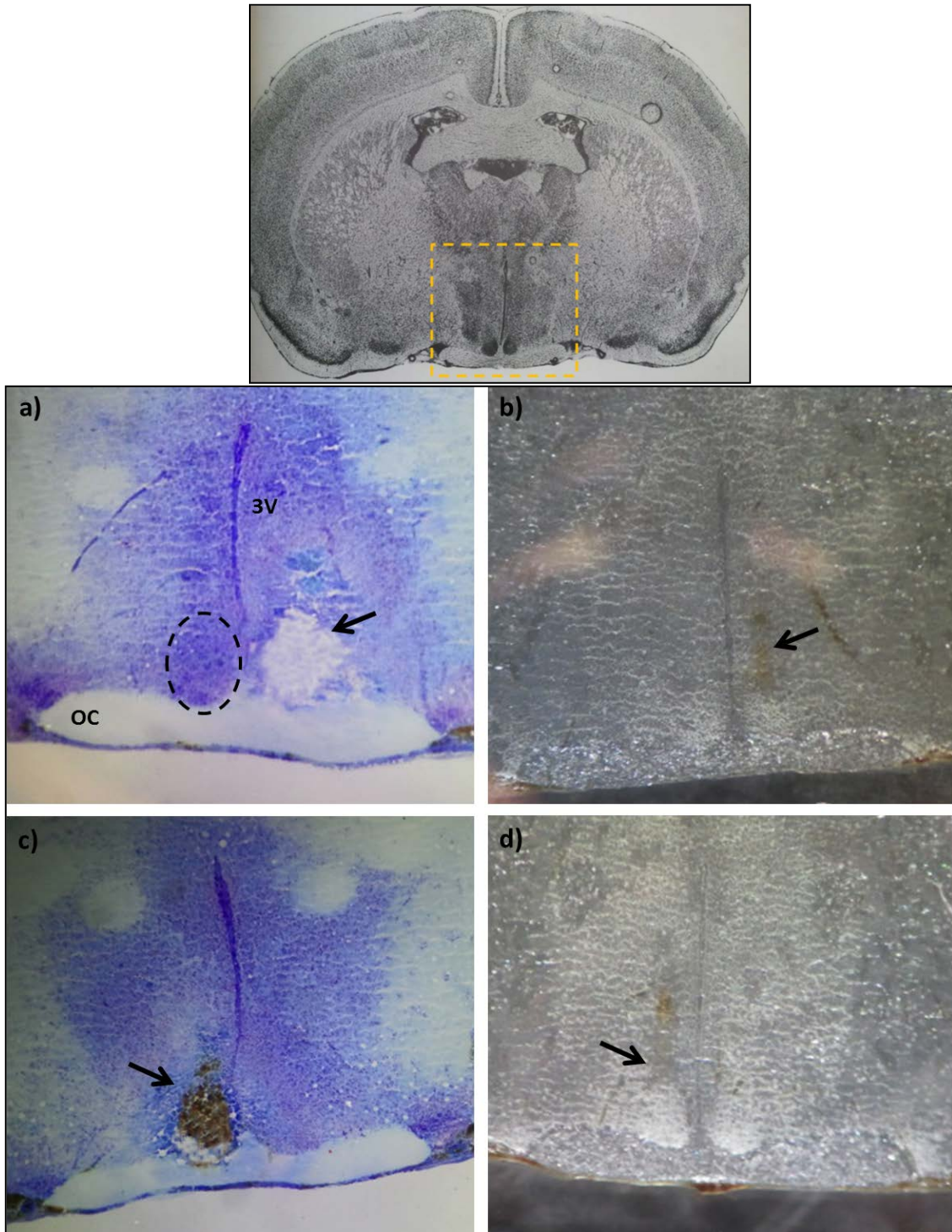


Figura 14. Secciones coronales del cerebro de animales que cumplen con las condiciones para ser utilizados en el análisis de resultados. El primer recuadro contiene un corte del cerebro completo y la región dentro del cuadro amarillo corresponde a la porción retratada en los incisos inferiores: a) SCN-I, b) Sham-I, c) SCN-D y d) Sham-D. Las flechas en cada caso indican la región en que se observa la trayectoria del electrodo o el daño de la lesión, la región dentro del ovalo marca la posición del SCN contralateral a la cirugía. 3V, tercer ventrículo; OC, quiasma óptico.

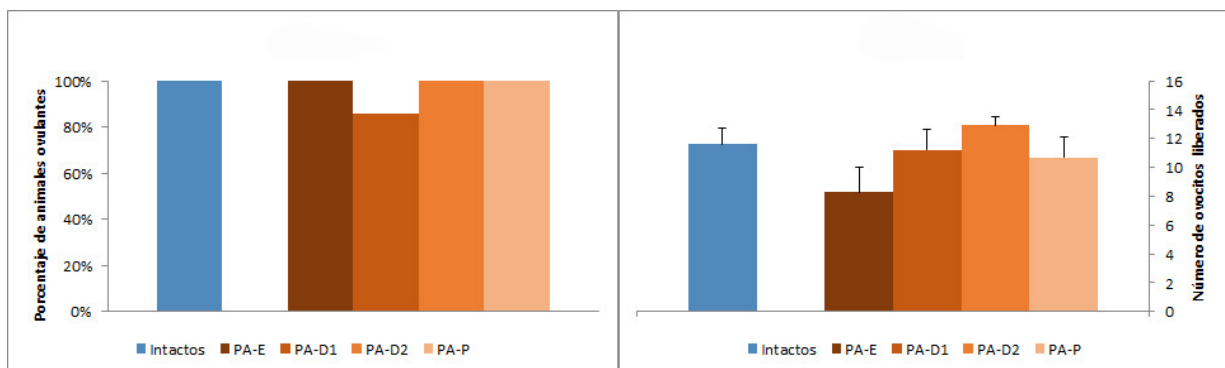
## Resultados

### Animales Intactos

El 100% de los animales intactos ovuló en el día del E vaginal y liberó una media de 12 ovocitos. Si bien el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo no es igual al que libera el derecho ( $5.1 \pm 0.8$  vs  $7.5 \pm 0.8$ ), no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos.

### Grupo con anestesia

La administración del pentobarbital sódico no modificó la ciclicidad y, como se observa en la Gráfica 1, tampoco la ovulación. La anestesia en D-1 resultó en menor masa de la gónada derecha, lo que se refleja en la masa ovárica respecto a la de los animales intactos (Cuadro 1).



**Gráfica 1.** Porcentaje de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberados por animales intactos o anestesiados en el día del Estro (PA-E), Diestro-1 (PA-D1), Diestro-2 (PA-D2) o Proestro (PA-P).

**Cuadro 1.** Media  $\pm$  e.e.m de la masa (mg/100 g de masa corporal) de los órganos de animales intactos o con anestesia en cada día del ciclo estral (n=7).

Grupos Experimentales	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
Intactos	14.2 $\pm$ 0.8	16.4 $\pm$ 1.1	30.5 $\pm$ 1.8	151.5 $\pm$ 8.6
PA-E	13.8 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 0.7	27.8 $\pm$ 1.2	135.0 $\pm$ 7.2
PA-D1	12.0 $\pm$ 1.1	<b>13.1 <math>\pm</math> 0.4 *</b>	<b>25.1 <math>\pm</math> 1.3 *</b>	149.1 $\pm$ 8.3
PA-D2	13.9 $\pm$ 0.5	13.9 $\pm$ 0.5	27.8 $\pm$ 0.8	163.0 $\pm$ 6.3
PA-P	14.6 $\pm$ 1.1	15.7 $\pm$ 0.8	30.3 $\pm$ 1.6	142.8 $\pm$ 5.4

\* $p < 0.05$  vs Intactos (ANOVA seguida de Tukey). Anestesia en el día del Estro (PA-E), Diestro-1 (PA-D1), Diestro-2 (PA-D2) o Proestro (PA-P).

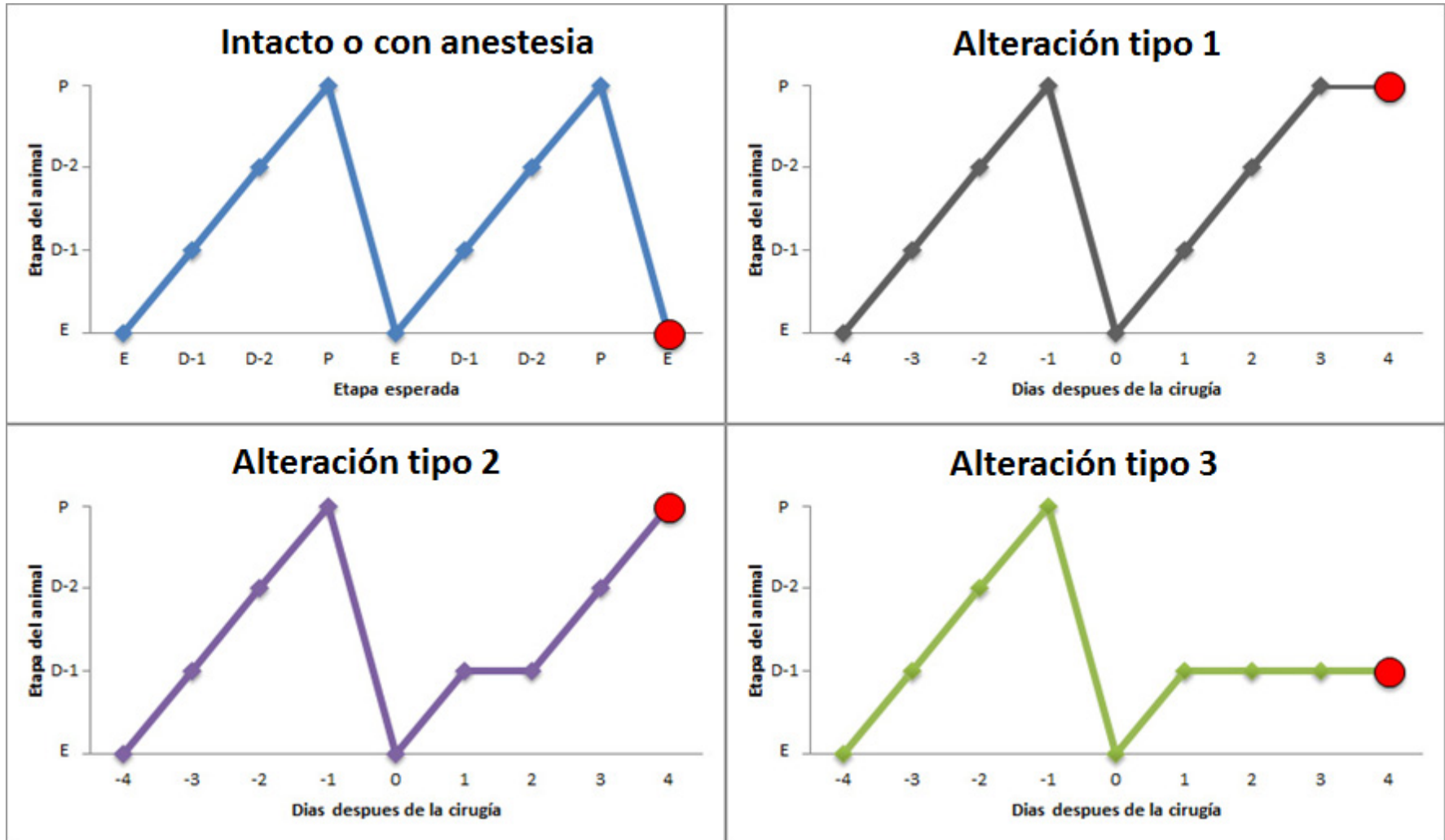


### ***Operación simulada***

La Gráfica 2 es representativa para los 7 animales que conforman al grupo intacto y también para los animales que fueron anestesiados en cada día del ciclo. El resto de los paneles de la misma gráfica contienen el ciclo en el que se llevó a cabo un tratamiento hipotético X (que puede ser una operación simulada o una lesión del SCN) en la etapa del E, así como el ciclo inmediatamente anterior a éste. Asimismo, pueden observarse los tres tipos de anomalías en la ciclicidad estral que se detectaron en el presente estudio.

La disrupción en el ciclo estral de los animales puede ser de 3 tipos: 1) dos días consecutivos en la etapa del P (alteración tipo 1), 2) dos días consecutivos en la etapa del D (alteración tipo 2) y 3) cuatro días consecutivos en la etapa del D (alteración tipo 3); estas alteraciones se presentan en el mismo ciclo en el cual son tratados los animales.

La operación simulada en las etapas del E y D-1 resultó en alteraciones del ciclo estral, lo cual fue más severo en los animales tratados en D-1 (Cuadro 2). La disrupción en la ciclicidad estral de los animales tratados en el día del E se debe principalmente al aumento en el número de días que permanecen en la etapa del D (alteración tipo 3). La operación simulada resultó en mayor número de animales con alteraciones de la ciclicidad de tipo 2 y 3, que depende del lado y la etapa en que se realizó. El 71% de los animales con Sham-I en D-1 presentaron alteración de su ciclicidad de tipo 2, mientras que el 71% de ratas con Sham-D presentó dicho tipo de alteración cuando se realizó en el E (Cuadro 3).



**Gráfica 2.** Progresión del ciclo estral de un animal del grupo intacto (arriba a la izquierda). Los paneles superior derecho e inferiores representan distintos tipos de disrupción de la ciclicidad en animales que fueron operados en la etapa del Estro, los cuales son representativos también para los animales tratados en Diestro-1. Todos los animales fueron sacrificados en el punto denotado con el círculo rojo.

**Cuadro 2.** Porcentaje de animales con operación simulada unilateral que presentaron alteraciones del ciclo estral (n=7).

Grupos experimentales	Estro	Diestro-1	Diestro-2	Proestro
Sham-I	43	86	0	0
Sham-D	43	100	0	0

Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D).

**Cuadro 3.** Número de animales con operación simulada unilateral en Estro o Diestro-1 que presentaron alteraciones en su ciclicidad (n=7).

Grupos experimentales	Estro			Diestro-1		
	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Sham-I	0	2	1	0	5	1
Sham-D	0	5	0	0	2	3

Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D).

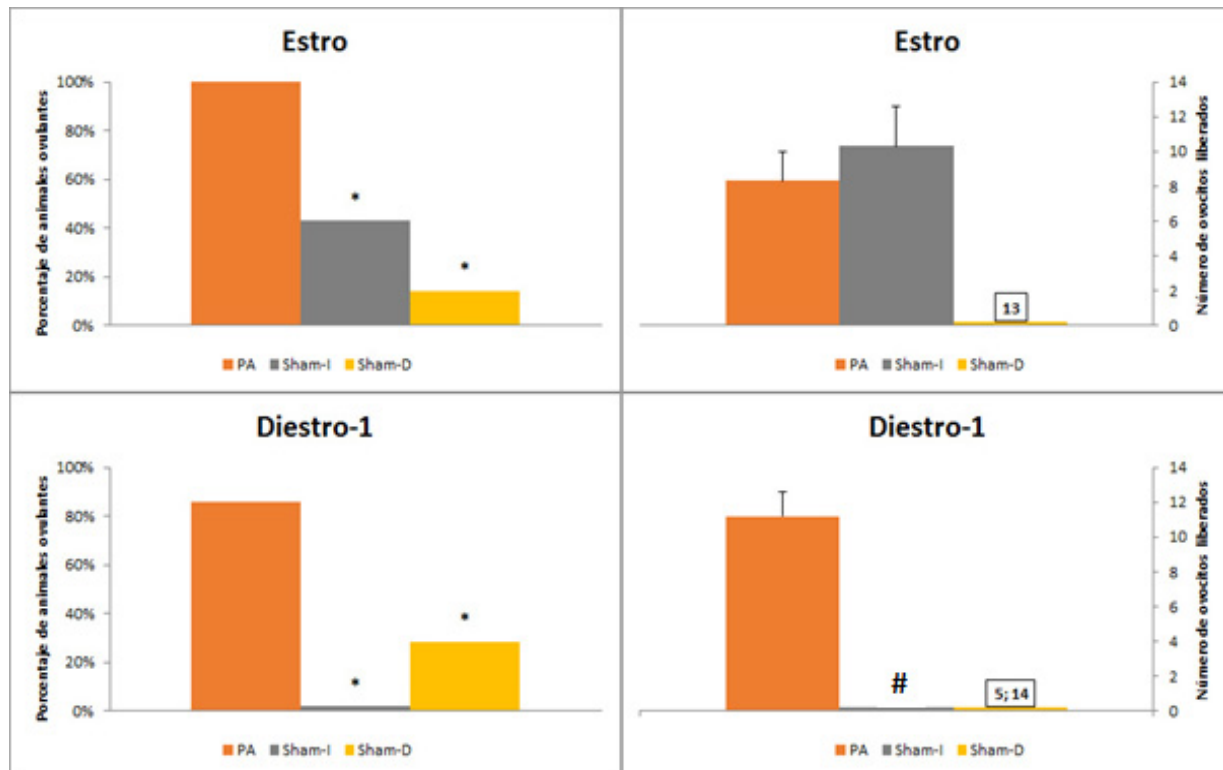
En cuanto a la ovulación, la operación simulada del lado izquierdo realizada en el día del E disminuyó la tasa de animales ovulantes aproximadamente en un 60%, mientras que la misma cirugía realizada en el hemisferio derecho indujo una disminución de más del 80% (Gráfica 3); ambas al ser comparadas contra el grupo de anestesia.

Cuando se realizó la operación simulada del lado izquierdo en el día del D-1, ninguno de los animales ovuló, mientras que la operación simulada del lado derecho disminuyó la tasa de animales ovulantes al ser comparada con la del grupo con anestesia (Gráfica 3).

En los cuadros 4 y 5 se resume la información concerniente a la masa de ambas gónadas y el útero. Cuando las operaciones simuladas se realizaron en la etapa del E, se aprecia un efecto asimétrico similar al observado al analizar los parámetros de la ovulación, la Sham-D induce cambios en la masa del ovario izquierdo y el útero, mientras que tras la Sham-I ninguno de los órganos evaluados presenta cambios en su



masa. En el día del D-1 los efectos de las operaciones simuladas son igualmente asimétricos, pero contrarios a los observados en el día del E; en este caso la masa del útero aumenta con la operación simulada izquierda sin que ocurra lo mismo con la operación simulada del lado derecho. La masa de las gónadas no se modificó con ninguno de los tratamientos.



**Gráfica 3.** Porcentaje de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberados por animales anestesiados (PA) o con operación simulada del lado izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D) en el día del Estro o Diestro-1. \* $p < 0.05$  vs PA (prueba de  $\chi^2$ ). En la columna derecha las cifras dentro de los recuadros indican el número de ovocitos liberados cuando el número de observaciones no permitió realizar la prueba estadística correspondiente y el # que el número de observaciones es 0.

**Cuadro 4.** Media  $\pm$  e.e.m de la masa (mg/100 g de masa corporal) de los órganos de animales anestesiados (PA) o con operación simulada unilateral en la etapa del Estro (n=7).

Grupos experimentales	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
PA	13.8 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 0.7	27.8 $\pm$ 1.2	135.0 $\pm$ 7.2
Sham-I	13.0 $\pm$ 0.8	12.3 $\pm$ 0.7	25.3 $\pm$ 1.2	168.1 $\pm$ 14.3
Sham-D	<b>11.2 <math>\pm</math> 0.7 *</b>	11.0 $\pm$ 1.1	22.1 $\pm$ 1.7	<b>197.1 <math>\pm</math> 9.1 *</b>

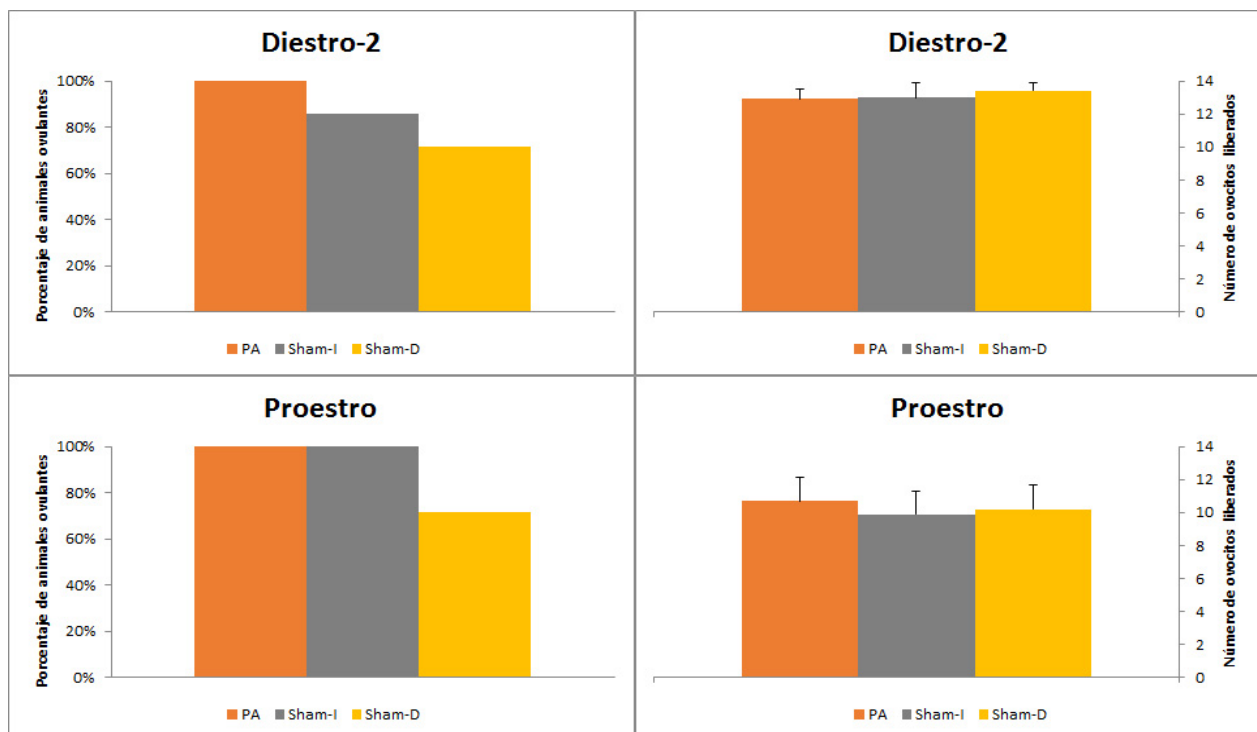
\* $p < 0.05$  vs PA (ANOVA seguida de la prueba de Tukey). Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D).

**Cuadro 5.** Media  $\pm$  e.e.m de la masa (mg/100 g de masa corporal) de los órganos de animales anestesiados (PA) o con operación simulada unilateral en la etapa del Diestro-1 (n=7).

Grupos experimentales	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
PA	12.0 $\pm$ 1.1	13.1 $\pm$ 0.4	25.1 $\pm$ 1.3	149.1 $\pm$ 8.3
Sham-I	11.1 $\pm$ 0.8	11.8 $\pm$ 0.6	22.9 $\pm$ 1.1	<b>192.4 <math>\pm</math> 9.7 *</b>
Sham-D	13.5 $\pm$ 1.3	12.3 $\pm$ 0.7	25.8 $\pm$ 1.1	169.1 $\pm$ 10.2

\*p < 0.05 vs PA (ANOVA seguida de la prueba de Tukey). Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D).

Las operaciones simuladas realizadas en las etapas del D-2 y P, sin importar el hemisferio cerebral en el que fueron realizadas, no alteraron la progresión del ciclo estral de ninguno de los animales (Cuadro 2), la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados (Gráfica 4) o la masa de los órganos respecto a lo registrado en los animales con anestesia (Cuadros 6 y 7).



**Gráfica 4.** Porcentaje de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberados por animales anestesiados (PA) o con operación simulada del lado izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D) en el día del Diestro-2 o Proestro.

**Cuadro 6.** Media  $\pm$  e.e.m de la masa (mg/100 g de masa corporal) de los órganos de animales anestesiados (PA) o con operación simulada unilateral en la etapa del Diestro-2 (n=7).

Grupos experimentales	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
PA	13.9 $\pm$ 0.5	13.9 $\pm$ 0.5	27.8 $\pm$ 0.8	163.0 $\pm$ 6.3
Sham-I	12.8 $\pm$ 0.9	14.9 $\pm$ 0.8	27.7 $\pm$ 1.6	199.0 $\pm$ 29.7
Sham-D	12.7 $\pm$ 0.5	11.3 $\pm$ 0.8	24.0 $\pm$ 1.1	146.7 $\pm$ 83

Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D).

**Cuadro 7.** Media  $\pm$  e.e.m de la masa (mg/100 g de masa corporal) de los órganos de animales anestesiados (PA) o con operación simulada unilateral en la etapa del Proestro (n=7).

Grupos experimentales	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
PA	14.6 $\pm$ 1.1	15.7 $\pm$ 0.8	30.3 $\pm$ 1.6	142.8 $\pm$ 5.4
Sham-I	13.1 $\pm$ 1.7	14.1 $\pm$ 0.7	27.2 $\pm$ 1.9	138.2 $\pm$ 5.6
Sham-D	12.5 $\pm$ 0.7	14.0 $\pm$ 1.3	26.5 $\pm$ 1.9	158.1 $\pm$ 6.2

Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I) o derecho (Sham-D).

### **Lesión del SCN**

La lesión del SCN del lado izquierdo en E o D-1 resultó en el mismo porcentaje de animales con alteración del ciclo estral, mientras que la realizada del lado derecho en D-1 resultó en mayor porcentaje de animales con alteración de su ciclicidad que la efectuada en E (Cuadro 8). Ambos tipos de lesión inducen un mayor número de alteraciones en la ciclicidad del tipo 2 (Cuadro 9).

**Cuadro 8.** Porcentaje de animales con lesión unilateral del SCN que presentaron alteraciones del ciclo estral (n=7).

Grupos experimentales	Estro	Diestro-1	Diestro-2	Proestro
SCN-I	71	71	0	0
SCN-D	29	86	0	0

Lesión del núcleo supraquiasmático del lado izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D).

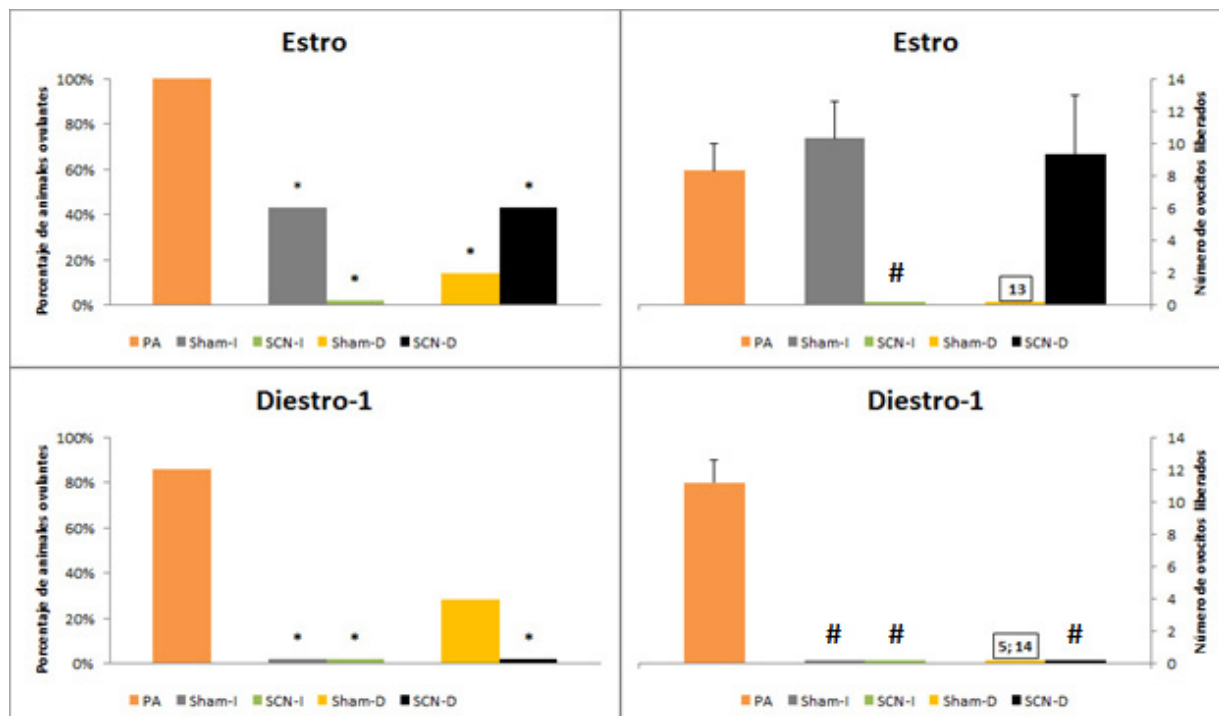
**Cuadro 9.** Número de animales con lesión unilateral del SCN en E o D-1 que presentaron alteraciones en su ciclicidad (n=7).

Grupos experimentales	Estro			Diestro-1		
	Tipo1	Tipo 2	Tipo 3	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
SCN-I	0	3	0	2	4	1
SCN-D	0	2	0	0	6	0

Lesión del núcleo supraquiasmático del lado izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D).

En la etapa del E, la lesión del SCN del lado izquierdo indujo una disminución del 100% en el porcentaje de animales ovulantes, mientras que la lesión del lado opuesto lo disminuyó en un 60% con respecto al del grupo con anestesia. En éste grupo no se modificó el número de ovocitos liberados. Este efecto asimétrico es semejante al de las operaciones simuladas.

La lesión unilateral del SCN en la etapa del D-1 resultó en ausencia de ovulación, independientemente del lado lesionado (Gráfica 5).



**Gráfica 5.** Porcentaje de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberados por animales anestesiados (PA) o con lesión del núcleo supraquiasmático izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) en el día del Estro o Diestro-1. \* $p < 0.05$  vs PA (prueba de  $\chi^2$ ). En la columna derecha las cifras dentro de los recuadros indican el número de ovocitos liberados cuando el número de observaciones no permite realizar la prueba estadística correspondiente y el # que el número de observaciones es 0.

La lesión del SCN del lado izquierdo en la etapa del E resultó en aumento de la masa del útero, respecto a la observada en los animales con Sham-I (Cuadro 10). Este resultado es similar en animales con lesión del SCN del lado derecho en el día del D-1 (Cuadro 11).

Las lesiones del SCN realizadas en las etapas del D-2 y P no alteraron la progresión del ciclo estral de ninguno de los animales (Cuadro 8). Al ser comparadas con los tratamientos de operación simulada, la lesión del SCN izquierdo en la etapa del D-2 disminuyó el porcentaje de animales ovulantes en un 100% mientras que la del lado derecho en un 80%. En el P, la disminución fue del 80% sin importar el lado que fue destruido (Gráfica 6).

**Cuadro 10.** Media  $\pm$  e.e.m de la masa (mg/100 g de masa corporal) de los órganos de animales con operación simulada o lesión unilateral del SCN en la etapa del Estro (n=7).

Grupos experimentales	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
Sham-I	13.0 $\pm$ 0.8	12.3 $\pm$ 0.7	25.3 $\pm$ 1.2	168.1 $\pm$ 14.3
SCN-I	11.7 $\pm$ 0.9	10.1 $\pm$ 1.0	21.7 $\pm$ 1.3	<b>203.8 <math>\pm</math> 5.6 *</b>
Sham-D	11.2 $\pm$ 0.7	11.0 $\pm$ 1.1	22.1 $\pm$ 1.7	197.1 $\pm$ 9.1
SCN-D	13.0 $\pm$ 1.2	13.3 $\pm$ 0.6	26.3 $\pm$ 1.8	177.2 $\pm$ 6.9

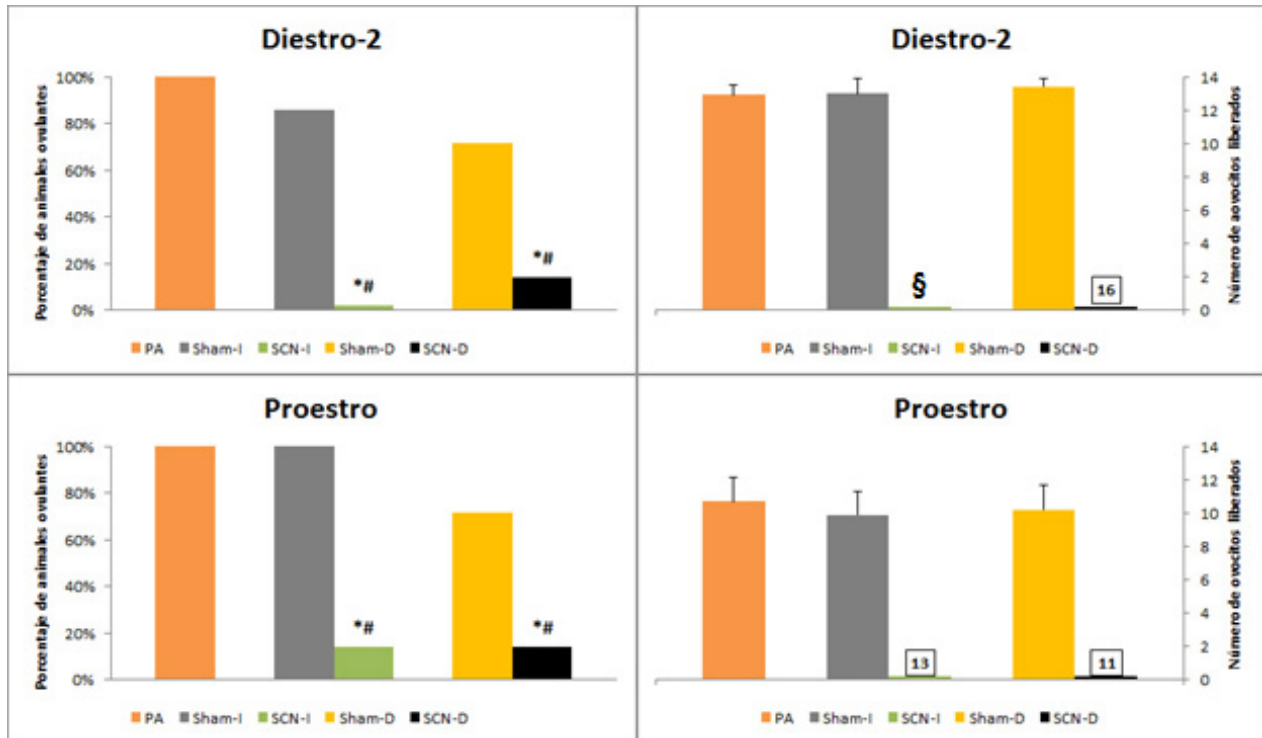
\*p < 0.05 vs Sham-I (ANOVA seguida de la prueba de Tukey). Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I), derecho (Sham-D), lesión del núcleo supraquiasmático del lado izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D).

**Cuadro 11.** Media  $\pm$  e.e.m de la masa (mg/100 g de masa corporal) de los órganos de animales con operación simulada o lesión unilateral del SCN en la etapa del Diestro-1 (n=7).

Grupos experimentales	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
Sham-I	11.1 $\pm$ 0.8	11.8 $\pm$ 0.6	22.9 $\pm$ 1.1	192.4 $\pm$ 9.7
SCN-I	11.5 $\pm$ 0.5	11.1 $\pm$ 0.5	22.6 $\pm$ 0.6	182.6 $\pm$ 6.1
Sham-D	13.5 $\pm$ 1.3	12.3 $\pm$ 0.7	25.8 $\pm$ 1.1	169.1 $\pm$ 10.2
SCN-D	10.7 $\pm$ 0.3	12.7 $\pm$ 0.5	23.4 $\pm$ 0.6	<b>198.9 <math>\pm</math> 6.9 *</b>

\*p < 0.05 vs Sham-D (ANOVA seguida de la prueba de Tukey). Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I), derecho (Sham-D), lesión del núcleo supraquiasmático del lado izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D).

En la etapa del P ambas lesiones resultaron en una mayor masa del. El resto de las lesiones del SCN realizadas en las etapas del D-2 y P no modificaron la masa de los órganos evaluados (Cuadros 12 y 13).



**Gráfica 6.** Porcentaje de animales ovulantes y media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberados por animales anestesiados (PA) o con lesión del SCN izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D) en el día del Diestro-2 o Proestro. \* $p < 0.05$  vs PA; # $p < 0.05$  vs Sham-I (prueba de  $\chi^2$ ). En la columna derecha las cifras dentro de los recuadros indican el número de ovocitos liberados cuando el número de observaciones no permite realizar la prueba estadística correspondiente y el § que el número de observaciones es 0.

**Cuadro 12.** Media  $\pm$  e.e.m de la masa (mg/100 g de masa corporal) de los órganos de animales con operación simulada o lesión unilateral del SCN en la etapa del Diestro-2 (n=7).

Grupos experimentales	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
Sham-I	12.8 $\pm$ 0.9	14.9 $\pm$ 0.8	27.7 $\pm$ 1.6	199.0 $\pm$ 29.7
SCN-I	15.7 $\pm$ 1.2	13.6 $\pm$ 1.1	29.3 $\pm$ 2.2	183.6 $\pm$ 8.7
Sham-D	12.7 $\pm$ 0.5	11.3 $\pm$ 0.8	24.0 $\pm$ 1.1	146.7 $\pm$ 8.3
SCN-D	11.1 $\pm$ 0.8	11.5 $\pm$ 0.7	22.7 $\pm$ 1.3	177.4 $\pm$ 11.4

Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I), derecho (Sham-D), lesión del núcleo supraquiasmático del lado izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D).



**Cuadro 13.** Media  $\pm$  e.e.m de la masa (mg/100 g de masa corporal) de los órganos de animales con operación simulada o lesión unilateral del SCN en la etapa del Proestro (n=7).

Grupos experimentales	Ovario izquierdo	Ovario derecho	Masa ovárica	Útero
Sham-I	13.1 $\pm$ 1.7	14.1 $\pm$ 0.7	27.2 $\pm$ 1.9	138.2 $\pm$ 5.6
SCN-I	13.0 $\pm$ 1.4	12.5 $\pm$ 1.1	25.6 $\pm$ 2.4	<b>161.6 <math>\pm</math> 9.0 *</b>
Sham-D	12.5 $\pm$ 0.7	14.0 $\pm$ 1.3	26.5 $\pm$ 1.9	158.1 $\pm$ 6.2
SCN-D	12.3 $\pm$ 1.5	13.2 $\pm$ 0.9	25.5 $\pm$ 2.2	<b>213.0 <math>\pm</math> 27.8 *</b>

\*p < 0.05 vs Sham-I (ANOVA seguida de la prueba de Tukey). Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I), derecho (Sham-D), lesión del núcleo supraquiasmático del lado izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D).

Finalmente, es importante mencionar que el útero de muchos de los animales que recibieron las operaciones simuladas o las lesiones dirigidas hacia el SCN, presentó un grado de engrosamiento semejante al observado en la etapa del P (útero balonado), aun cuando el frotis vaginal realizado minutos antes del sacrificio revelara que el animal se encontraba en la etapa del E u otra distinta al P (dependiendo si existió o no interrupción en la ciclicidad estral). Esta característica no llega a ser significativa al observar la masa de los úteros en todos los casos, revelando que parte del volumen observado estaba dado no solo por el engrosamiento de la pared uterina, sino también por la acumulación de líquido al interior, el cual fue desalojado al diseccionar el órgano (Cuadro 14). No obstante, el tipo de comparación realizada en los cuadros de masas no permite observar que el peso de los úteros de los animales sometidos a las lesiones unilaterales del SCN es, de hecho, significativamente distinto al del grupo intacto y el grupo con anestesia de la etapa correspondiente.

**Cuadro 14.** Porcentaje de animales que presentaron útero balonado el día del sacrificio tras realizar la operación simulada o lesión unilateral del SCN en cada etapa del ciclo estral

Grupos experimentales	Estro	Diestro-1	Diestro-2	Proestro
Sham-I	43	71	14	0
SCN-I	71	29	14	29
Sham-D	100	86	100	29
SCN-D	57	100	86	57

Operación simulada del lado izquierdo (Sham-I), derecho (Sham-D), lesión del núcleo supraquiasmático del lado izquierdo (SCN-I) o derecho (SCN-D).

### Análisis de los resultados

La anestesia no bloquea la ovulación de los animales ni induce alteraciones en su ciclicidad. Esto puede deberse a que la administración de barbitúricos a las 9:00 h, sin importar la etapa del ciclo estral en que se inyecten, no tenga efectos en la secreción de GnRH y por tanto de LH; totalmente contrario a lo que se ha probado que ocurre por la tarde del P (Everett y Sawyer, 1959; Gosden *et al.*, 1976; Kim *et al.*, 1994). Por lo tanto, la inhibición de la neurotransmisión estimuladora por la mañana no afecta la progresión normal de dichos procesos, ya que la señal nerviosa circadiana necesaria para la sincronización de la secreción de GnRH y LH ocurre más tarde y solo en la etapa del P, y quizás antes de este momento no es requerida.

También es posible que la ausencia de efecto sea producto de la baja concentración inyectada. Se ha mostrado que el bloqueo de la ovulación con barbitúricos no es exclusivo de la etapa del P. Cuando son administrados a las 9:00 h de los días del E, D-1 o D-2, se observa bloqueo de la ovulación en cierto porcentaje de los animales. Cuando el tratamiento se realiza a las 12:45 h, aumenta el porcentaje de animales que presentan bloqueo. En el día del E y D-1 se mantiene este efecto hasta las 17:00 h, mientras que en el D-2 declina el porcentaje del bloqueo de la ovulación (Domínguez y Smith, 1974).

El bloqueo por barbitúricos se ha atribuido, al menos en el día del P, al avance de fase observado a nivel del SCN y posteriormente de los ritmos eferentes después del tratamiento (Legan *et al.*, 2009). Este avance de fase concuerda con la curva de respuesta de fase fabricada con pentobarbital sódico como agente de reinicio, la cual difiere de la convencional pues no tiene ninguna región en la que el sincronizador carezca de efecto. Toda la porción anterior al inicio de la actividad en los animales nocturnos (CT=12) es susceptible a adelantos de fase, mientras que el resto lo es a retrasos (Morin, 1991).

Los resultados mostrados en el presente estudio no son similares a los que presentan Domínguez y Smith (1974) a pesar de que en ambos estudios se utilizaron

ratas Long-Evans adultas con ciclos estrales de cuatro días cada uno y de que el horario de administración, así como el fármaco utilizado, fue el mismo. Todo ello permite sugerir que esta discrepancia se debe a la diferencia entre las dosis utilizadas, mientras que los autores antes mencionados inyectaron una dosis de 50 mg/kg, la dosis utilizada en este experimento fue de la mitad (25 mg/kg), calculada en un experimento piloto para determinar la dosis mínima necesaria que a las 9:00 h de cada día del ciclo indujera anestesia quirúrgica sin bloquear la ovulación.

El éter, que fue utilizado como anestesia complementaria, tampoco tiene efectos negativos sobre la ovulación; se ha mostrado que este anestésico solo bloquea la ovulación cuando es utilizado de manera continua por lo menos durante 6 horas (Kim *et al.*, 1994), por lo que es poco probable que la exposición por menos de 20 minutos (que es el tiempo aproximado de una cirugía típica de este experimento) induzca anomalías en la ovulación del ciclo en curso.

Las operaciones simuladas evidencian que las vías nerviosas ubicadas dentro o por encima del SCN juegan un papel distinto en la regulación de la ovulación espontánea y del ciclo estral, lo que depende de la etapa del ciclo en que se encuentra el animal. En el día del E, a diferencia del resto de las etapas, existen diferencias que dependen del hemisferio cerebral en que se encuentran las fibras. La ausencia de ovulación inducida por la Sham-D en E, comparada con la disminución del porcentaje de animales ovulantes después de la misma operación realizada en el hemisferio contrario, muestra que si bien las vías de ambos lados participan en la regulación de los dos procesos, no lo hacen de manera simétrica.

La Sham-D se acompañó de la disminución de la masa del ovario izquierdo y el aumento en la del útero, mientras que la operación del lado izquierdo no modificó la masa de ninguno de los órganos evaluados. Las características citológicas encontradas en el frotis vaginal de muchos de los animales no corresponden a las del E, por lo que es posible que la disrupción en la ovulación, al evaluarse en el día del E esperado, se deba a un alargamiento del ciclo estral más que a la pérdida de la capacidad de ovular en el ciclo en curso. Esta suposición es sustentada por un

estudio previo en el cual se seccionaron las vías internas y dorsales al POA (Cruz *et al.*, 2009), cuya parte medio-posterior se ubica, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (2004), justo por encima del SCN. En general, los resultados son similares a los del presente experimento.

En un experimento semejante, los animales fueron tratados con GnRH y hCG después de las cirugías, tras lo cual ovularon en el día del E esperado; contrario a lo ocurrido al ser tratados con estrógenos (Reynoso, 2013). Otros animales que no fueron sacrificados en el día del E esperado presentaron el E vaginal 24 horas después y ovularon. Estos animales presentaron características citológicas del día del P en los frotis realizados en el E esperado, lo que permite suponer que las alteraciones en la ciclicidad observadas en este estudio son transitorias.

El reemplazo hormonal que realizó Reynoso (2013) arroja información sobre la naturaleza de las alteraciones mencionadas, debidas a cambios en la señal hipofisaria. Gran parte de las neuronas GnRHérgicas se localizan en el POA (Merchenthaler *et al.*, 1984; van der Beek, 1996), por lo que el daño a las mismas, o a las fibras que parten en dirección a la eminencia media, podría traducirse en cambios en el contenido de GnRH a nivel hipofisario y por tanto cambios en la liberación de LH. Esto es lógico partiendo de los resultados del experimento en que la operación simulada fue modificada intencionalmente de tal manera que no se dañó POA, pero sí todas las estructuras dorsales a ella, en el cual se observó que no se modifica la ovulación de los animales (Reynoso, 2013).

Otra posible explicación podría ser que las cirugías dañen las neuronas que originan la vía ipsilateral que une al POA con el SCN (de la Iglesia *et al.*, 2003; van der Beek *et al.*, 1993; 1997). Esto podría inducir alteraciones en el patrón temporal de la secreción de GnRH. Esta última propuesta cobra importancia debido a la teoría de que es el SCN quien regula los patrones temporales de la secreción fásica y tónica de dicha hormona (Chapell, 2005). La alteración de estos patrones a su vez repercutiría directamente en la secreción de gonadotropinas y por tanto en el desarrollo de los folículos ováricos y la progresión del ciclo estral. En favor de ello, se ha reportado que

los ratones con alteraciones en el gen *Clock* presentan ciclos estrales anormalmente largos (Chapell *et al.*, 2003). Quizás la sección de la vía que comunica al sistema circadiano con el neuroendocrino tenga el mismo efecto que la disrupción del primero a nivel genético. La idea de que el desarrollo de los folículos seleccionados para ovular en el día del E se retrasó y que a su vez el ciclo estral se alargó un día coincide con la disminución de la masa ovárica en algunos tratamientos, asimismo, con las características citológicas del frotis vaginal, la apariencia balonada del útero y el aumento en su masa.

Una diferencia entre el presente estudio y los realizados por Cruz *et al.* (2009), radica en el porcentaje de animales que fueron afectados por la operación simulada izquierda (60% en el presente y 30% en el trabajo de Cruz y colaboradores). Estos resultados pueden deberse a las distintas estructuras dañadas en cada estudio, mientras que Cruz y colaboradores seccionaron únicamente las estructuras dentro y por encima de POA, en el presente trabajo se seccionaron vías también entre el POA y el SCN, así como otras dentro de éste último. Las coordenadas utilizadas para ubicar las respectivas áreas de estudio son distintas, por lo que si bien algunas estructuras en común son dañadas en ambos procedimientos, hay otras tantas que no se comparten y a las cuales se les puede atribuir esta diferencia. De manera semejante, el electrodo utilizado en este experimento tiene una composición y configuración totalmente distintas a las de la aguja metálica utilizada por el equipo de Cruz, por lo que interactúa de manera diferente con el tejido que le rodea.

En el día del D-1, ambas operaciones simuladas inducen alteraciones en el ciclo estral. El frotis vaginal de estos animales tiene características citológicas que no corresponden con las del E, ya que son propias del D o del P, por lo que en esta etapa existen estructuras dorsales al SCN que están netamente relacionadas con la regulación de la ciclicidad estral, sustentado además por el aumento en el porcentaje de animales que se vuelven acíclicos después de los tratamientos. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en la etapa del E, por lo que se puede sugerir que son resultado del daño al POA. El sistema es particularmente sensible a los tratamientos en el D-1, quizás, porque los folículos ováricos aún dependen de varias señales, por

ejemplo la FSH, que deben presentarse en el momento y de la manera apropiada para continuar su crecimiento, maduración y finalmente ser capaces de liberar su ovocito.

Cuando las operaciones simuladas se realizan en los días restantes del ciclo, los resultados son totalmente contrarios. No existen diferencias significativas con respecto al grupo con anestesia. La ciclicidad de los animales tampoco se modificó y todos presentaron el E vaginal en el día esperado, por lo que podemos suponer que la secreción de estradiol se mantuvo sin cambio y probablemente el daño al POA no alteró los mecanismos neuroendocrinos involucrados en la secreción de la neurohormona hipotalámica y de las gonadotropinas hipofisiarias.

Partiendo de lo anterior, se puede sugerir que en en D-2 y P las vías de información nerviosa dorsales al SCN no están involucradas en la regulación de la ovulación y la ciclicidad estral, y que existen diferencias en su participación durante el ciclo estral. Adicionalmente, permiten proponer que el daño a la piel, músculo, cráneo, meninges y a las fibras nerviosas que inervan a cada uno de los anteriores, no es un factor lo suficientemente estresante como para inducir bloqueo de la ovulación o disrupción en la ciclicidad derivado de la liberación de glucocorticoides, los cuales afectan de manera inhibitoria la función de los tejidos reproductivos.

En conjunto, los resultados de todas las etapas apoyan la idea general de que la sección de las vías nerviosas que se encuentran en el POA, en el SCN, y entre ambas estructuras, afecta el desarrollo folicular más que la capacidad de ovular en el ciclo en curso debido a la ausencia del pico preovulatorio de gonadotropinas. En ese sentido, los tratamientos realizados en E y D-1 tienen un efecto inhibitorio pues se eliminan las señales que regulan el desarrollo de los folículos cuando estos aún son inmaduros y dependen de la secreción de gonadotropinas para culminar su desarrollo. Por otro lado, en D-2 y P no se aprecia este efecto pues los folículos han madurado lo suficiente y solo dependen del pico preovulatorio de LH para liberar su ovocito.

Las lesiones unilaterales del SCN tienen un efecto inhibitorio sobre la ovulación espontánea. Éste es asimétrico solo en la etapa del E, donde la lesión



izquierda alteró la ciclicidad de la mayoría de los animales, que no alcanzaron el E en el día esperado y por tanto no ovularon. La lesión derecha solo alteró la ciclicidad en dos animales, aún con ello, solo el 40% del total fue capaz de ovular. Este efecto es contrario al observado con las operaciones simuladas.

¿Cómo es posible que la lesión térmica, que incluye todo el daño infligido por la operación simulada, tenga menos efectos que esta última? Es posible que el SCN que permaneció en el hemisferio dañado por la Sham fue estimulado de manera constante por los factores liberados en el tejido afectado, así como por la amplia gama de mecanismos de compensación que usualmente se ponen en marcha para solucionar los problemas resultantes del daño al sistema nervioso (vasodilatación, coagulación y activación y reclutamiento de la glía). Ante el daño tisular el sistema libera citosinas; iniciando la respuesta inflamatoria local. En ese sentido, se busca reparar el tejido reclutando células de la glía. El siguiente paso es la amplificación de la señal de emergencia; parte de las citosinas liberadas entran en la circulación y reclutan plaquetas y macrófagos que reparan el daño (Davies y Hagen, 1997). Al considerar que todo el microambiente dentro y fuera del SCN dañado se modificó y que posiblemente muchos de los elementos que respondieron al daño en el tejido interactuaron con las neuronas del núcleo, cabe la posibilidad de que haya enviado estímulos inhibitorios tanto a su homólogo contralateral como al resto de las estructuras inervadas por él. En el caso de las lesiones, la ausencia del tejido fue remediada y las señales inhibitorias no se generaron, por lo que el resto el sistema continuó con sus funciones de manera “compensada” ante la pérdida del SCN destruido.

Inmediatamente surge una pregunta: ¿por qué las operaciones contralaterales no tienen el mismo efecto si el sistema intenta reparar el daño en ambos hemisferios por medio de los mismos mecanismos? La única respuesta que aparentemente es válida para responder a estas interrogantes depende de la consideración general de las asimetrías en estructuras pareadas. Si bien ambos SCN son anatómicamente semejantes, funcionalmente pueden representar entidades heterogéneas, al menos,

en el día del E. Esto implica que en teoría interpretan el daño y responden a éste de manera distinta.

Sabemos por la revisión bibliográfica que esto se ha demostrado en varias regiones pareadas dentro y fuera del hipotálamo (Domínguez, 1992). Poco se sabe al respecto en el caso del SCN, dejando abierta la posibilidad de que los resultados del presente estudio se deban, en efecto, a una asimetría funcional entre ambos lados del núcleo. Podemos citar la clara diferencia en la coordenada medio-lateral utilizada en el presente estudio para alcanzar al SCN izquierdo y al derecho (+0.3 vs -0.5). Partiendo de cualquier atlas del cerebro de la rata, y una vez calculadas las diferencias debidas a la cepa, raza y género del animal, la coordenada para ambos núcleos debería ser exactamente la misma, pero con símbolo contrario. En el presente estudio esto no ocurrió, y el cambio entre las coordenadas es considerable. Al observar bajo el microscopio óptico no parece existir diferencia en la ubicación de ambos núcleos dentro del hipotálamo ni en las dimensiones de cada uno. Por lo que se podría sugerir que este resultado se debe a diferencias en las suturas craneales utilizadas como puntos de referencia "0" o a una disposición asimétrica del cerebro dentro del cráneo en la cepa CIIZ-V, pero en ausencia del análisis morfo-métrico apropiado queda abierta la posibilidad de que existan también asimetrías anatómicas.

En el D-1 las lesiones también son acompañadas por un porcentaje de alteraciones en la ciclicidad semejante al observado con las operaciones simuladas. En esta etapa, además, es particularmente difícil discernir el efecto real de las lesiones realizadas debido a que las operaciones simuladas, por sí mismas, inducen alteraciones semejantes en la ciclicidad, la ovulación y la masa de los órganos. No obstante, el estudio de Brown-Grant y Raisman (1977) parece responder a esta incertidumbre. Los autores reportan que al realizar la lesión bilateral en el día del D, con un ángulo de entrada tal que la trayectoria del electrodo evite el POA, los animales con menos del 25% de daño del SCN (que de alguna manera puede ser considerado como una operación simulada) son capaces de ovular normalmente, mientras que los animales con daño del 75% o más no lo hacen. Estos además presentan anomalías en el ciclo estral y en la conducta propia de cada etapa. Lo

anterior permite suponer que la integridad de por lo menos el 75% del SCN es indispensable para la generación de las señales –cualquiera que estas sean– necesarias para coordinar los eventos que deben acoplarse para que el ciclo estral progrese de manera íntegra y culmine con la ovulación; y también respalda el razonamiento que se planteó al analizar el efecto de las operaciones simuladas, es decir, que las alteraciones observadas son producto del daño al POA.

Esta interpretación debe ser considerada con cautela debido a que los datos en ambos estudios no son del todo comparables. En primer lugar, el anestésico utilizado no es el mismo, segundo, la vía de entrada involucra no solo el daño a distintas estructuras extra e intra-craneales, sino que al ser bilateral implica una mayor cantidad de daño en los distintos tejidos. En tercer lugar, y quizás el más controversial, es que un daño menor al 25% del volumen total del SCN puede interpretarse también como la estimulación eléctrica del mismo, lo cual tiene un efecto semejante al de la luz en cuanto a la fase del oscilador (Morin, 1991), ¿cómo repercute esto a nivel reproductivo? es algo que no se ha estudiado.

Silva y colaboradores (2012) mostraron que el 75% del SCN en las etapas del D-2 y P es suficiente para que la ovulación culmine exitosamente. Estos resultados concuerdan con los datos de Brown-Grant y Raisman (1977). En dicho estudio, las lesiones unilaterales parciales del SCN (50% o más del SCN objetivo permanece *in situ*) en el día del D-2 y P no son efectivas para bloquear la ovulación, contrario a lo que observan con las lesiones exitosas. La región dañada en las lesiones parciales es distinta en cada animal; por lo que concluyen que el SCN participa de manera cuantitativa y no cualitativa en la regulación de la secreción de GnRH (Silva *et al.*, 2012).

Con base en los resultados de las etapas del E y D-1, se propone que la ausencia de ovulación en los animales tratados en dichas etapas se debe al retraso en el desarrollo folicular, por lo menos, en los animales que aún son cíclicos después de la lesión. Esto quiere decir que probablemente los sistemas circadiano y reproductivo de los animales se hayan desacoplado y que los folículos ováricos

recibieron las señales necesarias para continuar con su desarrollo después del momento en que la recibieron los animales intactos o con anestesia. Una vez reajustado el sistema, la ovulación es viable, por lo que los animales que no ovularon en el E esperado pudieran haberlo hecho en las próximas 24-48 horas, lo que depende del tipo de alteración en su ciclicidad.

Por otro lado, las lesiones realizadas en las etapas del D-2 y P, sin importar si fueron derechas o izquierdas, bloquean la ovulación pero no generan alteraciones en la ciclicidad. Queda claro entonces que ambos lados del núcleo tienen un papel preponderantemente estimulador (y aparentemente simétrico), al menos, en la regulación del proceso global que culmina con la secreción preovulatoria de gonadotropinas. El hecho de que todos los animales tratados en este par de etapas (hablando también de las operaciones simuladas), presentaron el E vaginal en el día esperado implica, que al menos la secreción de estrógenos permaneció inmutable ante los tratamientos. En los estudios en que se realizan lesiones bilaterales normalmente se reporta arritmicidad y aciclicidad después de la operación (los animales permanecen en E indefinidamente, similar al efecto observado cuando los animales permanecen en luz constante); lo que se atribuye al daño que sufren los axones que llevan GnRH directamente a la eminencia media ([Samson and McCann, 1979](#)), o incluso al daño en estructuras tales como el POA y el AVPV ([de la Iglesia and Schwartz, 2006](#); [Terasawa et al., 1980](#)). El presente trabajo muestra que el 50% del SCN es capaz de regular la progresión del ciclo estral, mas no así de la ovulación.

Las lesiones muy localizadas como las de esta investigación parecieran no afectar ninguna de las estructuras relacionadas con la síntesis y secreción de GnRH. En cuanto a las fibras GnRHérgicas, no parece prudente descartar la posibilidad de que aún este tipo de lesiones pequeñas puedan interrumpir vías importantes. El estudio de Merchenthaler y colaboradores ([1984](#)), muestra que existen fibras que cruzan, en su camino hacia la eminencia media, la región inmediatamente lateral a la pared del 3V, muy cerca del SCN. Partiendo de ello, es posible que el contenido de GnRH que logra llegar a la eminencia media después de las lesiones sea suficiente para estimular la liberación basal de gonadotropinas, que a su vez estimularán el

desarrollo folicular y la progresión del ciclo estral, mientras que este mismo contenido no es capaz de inducir el “pico” preovulatorio de LH y por tanto la ovulación no se lleve a cabo.

Considerando otras posibilidades, la presencia de ciclos normales con bloqueo de ovulación puede deberse a varias causas:

1. En principio, la cornificación del epitelio vaginal, dependiente del aumento en la concentración sérica de estrógenos, no implica que haya acaecido el pico de GnRH y por tanto el de LH. En ese sentido, el bloqueo de la ovulación puede deberse a la ausencia de la señal hipofisaria, previniendo la reacción inflamatoria en el folículo ovárico y la liberación del ovocito. El SCN ha sido relacionado con la modulación de la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH, en particular, con el cambio en el patrón normal de liberación presente en el D al del modelo incrementado característico del P (Chapell, 2005). Adicionalmente, el paradigma del hámster con *splitting* demostró que cada lado del SCN modula a las neuronas GnRHérgicas del POA ipsilateral mediando la mitad de la liberación preovulatoria de LH (de la Iglesia *et al.*, 2003). Quizás la pérdida de la mitad de la información circadiana basta para que las neuronas GnRHérgicas no respondan totalmente o lo hagan sin sincronía y por tanto decrezca la cuota de LH que es liberada en el “pico” preovulatorio. Esta interpretación depende de que el pico de LH resultante sea ínfimo, pues Gosden y su equipo (1976) probaron que las ratas son capaces de ovular aun en presencia de concentraciones mucho menores de LH que las liberadas en el “pico” preovulatorio. De manera contradictoria, Palm y colaboradores (1999) encontraron que al realizar la lesión bilateral, los animales con lesiones parciales aún presentaban el pico de LH, por lo que se acepta la posibilidad de que los animales del presente experimento presentaron secreción preovulatoria de LH, pero los folículos ováricos no se encontraban lo suficientemente maduros o, existió algún impedimento de otro tipo para la respuesta adecuada de los folículos maduros.

2. Otra posibilidad puede ser que exista disminución en la sensibilidad del hipotálamo a los estrógenos, de la hipófisis a la GnRH o del ovario a las gonadotropinas. Esta disminución podría ser el efecto del desacople entre el SCN remanente y los osciladores periféricos en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario, inducido por la pérdida de su homólogo o por la disminución de señales eferentes. Esto podría resultar en la secreción de las hormonas propias de cada tejido en momentos inapropiados del ciclo estral o circadiano, y también a cambios en la expresión de los receptores adecuados. Esto concuerda con la demostración de Sikes (2009) de que la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH depende de la expresión de algunos genes reloj en los gonadotropos. Adicionalmente, y pesar de lo que se mencionó en el marco teórico sobre la regulación temporal del eje HPO (Yoshikawa *et al.*, 2009), se ha demostrado que la expresión de genes reloj en los ovarios de ratas adultas hipofisectomizadas es rítmica, por lo que es posible que las señales de comunicación en un animal entero se transmitan por la inervación que recibe la gónada o por señales endócrinas provenientes de otras estructuras (Gräs *et al.*, 2012). Si bien Yoshikawa y su equipo aparentemente refutaron la participación de la inervación del ovario con la sección del Nervio Ovárico Superior, no tomaron en cuenta al Nervio Vago, que se origina en estructuras del sistema nervioso central que están inervadas por fibras del SCN y que probablemente recienten de manera directa la destrucción de una parte de dicho núcleo. Un dato relevante que se desprende del estudio de Gräs y colaboradores es que los genes reloj comienzan a presentar patrones rítmicos en las células ováricas cuando éstas expresan receptores a LH, por lo que es probable que un desacople entre los osciladores en cada peldaño en el eje realmente culmine con anomalías reproductivas tales como el bloqueo de la ovulación o la aciclicidad estral.

3. Finalmente, los osciladores intracelulares en el ovario, la hipófisis y el hipotálamo, así como los del SCN, están relacionados con la expresión de algunos genes (ccg's) esenciales para la ovulación. Tal es el caso del gen *Cox2* (Cyclooxygenasa-2) que codifica para la enzima limitante en la síntesis de prostaglandinas en las células de la granulosa. La disrupción en la sincronía entre el SCN y los relojes periféricos puede alterar la expresión de dichos genes inducen anomalías en la señalización de

prostanoides y con ello impiden el debilitamiento de la pared folicular necesario para la liberación de los ovocitos.

Resumiendo, el SCN de la rata participa en dos procesos distintos dependiendo de la de la etapa del ciclo estral en que se encuentra el animal. Al inicio del ciclo (E y D-1) está involucrado con la generación de las señales que regulan el crecimiento y la maduración de los folículos ováricos seleccionados para ovular en el ciclo en curso. Su contribución en el día del E asimétrica. Cuando los folículos han madurado y son dependientes solo del pico de LH para liberar su ovocito, el SCN regula principalmente la señalización preovulatoria de gonadotropinas, que desencadena la ovulación misma. Es posible que esta regulación dependa de la interacción entre el SCN y las neuronas GnRHérgicas dado que los patrones de secreción de la GnRH modulan la secreción de FSH, que regula el desarrollo folicular, y de LH, que al presentarse en el momento apropiado, induce la ovulación. No obstante, es posible que los osciladores periféricos ubicados en el eje reproductivo, así como la comunicación entre estos, estén involucrados en ajustes esenciales para el proceso ovulatorio.

Según nuestro conocimiento, el presente estudio representa el primer intento por comprender la participación de cada lado del SCN, considerados como unidades independientes, en la regulación de la ovulación de la rata adulta. A pesar de la dirección en que nos conducen estos resultados, son necesarios más estudios para eliminar la incertidumbre sobre el bloqueo de la ovulación (cuando esto ocurrió) y por tanto de la participación del SCN y los circuitos nerviosos que le rodean en la regulación de la reproducción. Alargando el tiempo de evaluación se puede comprobar la hipótesis de que la pérdida de la capacidad de ovular de los animales tratados en E y D-1 se debe a que el ciclo estral se alargó. Como muestran Vogelbaum y colaboradores (1993), después de lesiones parciales muy pequeñas del SCN, los ritmos de actividad locomotora se interrumpen por un periodo para luego reanudarse de manera espontánea. En ese sentido, las lesiones realizadas en este estudio podrían estar deteniendo al oscilador por uno o dos días o generar un desacople entre éste y sus vías efectoras.



Adicionalmente, es recomendable el análisis morfométrico de la población folicular en los ovarios de los animales utilizados en este experimento a fin de comprobar la hipótesis sobre el retraso en el desarrollo de los folículos destinados a ovular.

El reemplazo hormonal con LHRH, eCH, hCG o E<sub>2</sub>, permitirá mostrar cuál de las señales fue interrumpida o alterada después de los tratamientos en D-2 y P. Con la finalidad de determinar si la expresión de los genes reloj y por tanto los ccg's se altera después de la lesión, es necesario realizar nuevamente estos tratamientos, cuantificando la expresión de los genes por PCR o hibridación *in situ* en cada tejido particular. El ángulo de entrada, modificado para evitar el POA, permitiría reinterpretar los resultados, pero tendrían que considerarse los potenciales efectos del daño en otras regiones encefálicas, que metodológicamente son preferibles dado el proceso que se analiza. Finalmente, un estudio con trazadores retrógrados y anterógrados, en conjunto con secciones de los nervios que llegan al ovario, podría desvanecer la duda que queda con respecto a cómo es que las señales del SCN inciden en la gónada. Para ello, tendrá que hacerse énfasis no solo en el Nervio Ovárico Superior, sino también en el Plexo Ovárico y el Nervio Vago.

### Conclusiones

- El bloqueo en la neurotransmisión estimulante por la mañana de cada etapa del ciclo estral no interviene con la progresión del ciclo estral ni con la ovulación.
- Las vías nerviosas dorsales al SCN forman parte de los mecanismos neuroendocrinos que regulan el ciclo estral y la ovulación solo en los días del Estro y Diestro-1
- Los núcleos Supraquiasmáticos izquierdo y derecho son unidades heterogéneas en la regulación del ciclo estral y la ovulación en la etapa del Estro. Durante el resto de las etapas su actividad es simétrica y estimulante.
- La participación de ambos SCN sobre la regulación de la ciclicidad y la ovulación depende de la etapa del ciclo estral. En el Estro y Diestro-1, participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la progresión del ciclo estral. En el Diestro-2 y Proestro participa en la generación de las señales preovulatorias que culminan con la ovulación.

## Bibliografía

**Abrahamson EE, Moore RY.** 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* 916(1-2): 172-191.

**Abrahamson EE, Leak RK, Moore RY.** 2000. The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* 12(2): 435-440.

**Albers HE, Gerall AA, Axelson JF.** 1981. Effect of reproductive state on circadian periodicity in the rat. *Physiology & Behavior* 26(1): 21-25.

**Albers HE, Liou S, Ferris CF, Stopa EG, Zoeller RT.** 1991. Neurochemistry of circadian timing. p. 263-288. *In* Klein DC, Moore RY and Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.

**Ángeles-Castellanos M, Rodríguez K, Salgado-Delgado R, Escobar C.** 2007. Anatomía de un reloj (anatomía del sistema circadiano). *Archivos Mexicanos de Anatomía Nueva Época* 2(1): 15-20.

**Atkins N, Mitchell JW, Romanova EV, Morgan D, Cominski TP, Ecker JL, Pintar JE, Sweedler JV, Guillelte MU.** 2010. Circadian integration of glutamatergic signals by little SAAS in novel Suprachiasmatic circuits. *Public Library of Science one* 5(9): [disponible solo en línea en: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0012612>].

**Ball GF.** 2007. The ovary knows more than you think! News views on clock genes and the positive feedback control of luteinizing hormone. *Endocrinology*. 148(7): 3029-3030.

**Barbacka-Surowiak G, Surowiak J, Stoklosowa S.** 2003. The involvement of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents. *Reproductive Biology* 3(2): 99-129.

**Berson DM, Dunn FA, Takao M.** 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295: 1070-1073.

- Boden MJ, Kennaway J.** 2006. Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction* 132: 379-392.
- Bos NP, Mirmiran M.** 1990. Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* 511(1): 158-162.
- Boulos Z, Terman M.** 1979. Splitting of circadian rhythms in the rat. *Journal of Comparative Physiology A*. 134: 75-83.
- Bouskila Y, Dudek FE.** 1995. Can a population of suprachiasmatic nucleus neurons with different period lengths produce a stable circadian rhythm? *Brain Research* 670(2): 333-336.
- Brown MH, Nunez AA.** 1986. Hypothalamic circuits and circadian rhythms: effects of knife cuts vary with their placement within the suprachiasmatic area. *Brain Research Bulletin* 16(5): 705-711.
- Brown-Grant K, Raisman G.** 1977. Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character*. Royal Society (Great Britain) 198(1132): 279-296.
- Buijs RM.** 1996. The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. p. 229-240. *In* Buijs RM, Kalsbeek A, Romijn HJ, Pennartz CMA, Mirmiran M (eds.) *Progress in Brain Research* Vol. 111: Hypothalamic integration of circadian rhythms. Elsevier. NED.
- Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A.** 2003. The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *The Journal of endocrinology* 177(1): 17-26.
- Card JP, Moore RY.** 1991. The organization of visual circuits influencing the circadian activity of the suprachiasmatic nucleus. p. 51-74. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.

- Carmichael MS, Nelson RJ, Zucker I.** 1981. Hamster activity and estrous cycles: control by a single versus multiple circadian oscillator(s). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(12): 7830-7834.
- Cermakian N, Sassone-Corsi P.** 2002. Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Current Opinion in Neurobiology* 12(4): 359-365.
- Challet E.** 2007. Minireview: entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology* 148(12): 5648-5655.
- Challet E, Pevet P.** 2003. Interactions between photic and nonphotic stimuli to synchronize the master circadian clock in mammals. *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*. 8: s246-s257.
- Chappell PE.** 2005. Clocks and the black box: circadian influences on gonadotropin-releasing hormone secretion. *Journal of Neuroendocrinology* 17(2): 119-130.
- Chappell PE, Goodall CP, Tonsfeldt KJ, White RS, Bredeweg E, Latham KL.** 2009. Modulation of gonadotrophin-releasing hormone secretion by an endogenous circadian clock. *Journal of Neuroendocrinology* 21(4): 339-345.
- Chappell PE, White RS, Mellon PL.** 2003. Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *The Journal of Neuroscience* 23(35): 11202-11213.
- Charli J, Ponce G, Joseph-Bravo P.** 1991. Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotálamicas. p. 57-81. *In* Domínguez R (ed.) *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. Miguel Ángel Porrúa. MEX.
- Christian AC, Moenter SM.** 2008. Vasoactive intestinal polypeptide can excite gonadotropin-releasing hormone neurons in a manner dependent on estradiol and gated by time of day. *Endocrinology* 149(6): 3130-3136.

- Cruz ME, Rodríguez D, Olvera E, Flores A, Galindo JL, Vázquez M, Domínguez R.** 2009. Asymmetric effects of unilateral section of dorsal POA-AHA on spontaneous ovulation. 39<sup>th</sup> Meeting of Society for Neuroscience. Chicago. Program No. 81.18/CC11.
- Daan S, Pittendrigh CS.** 1976a. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents II. The variability of phase response curves. *Journal of Comparative Physiology A* 106(3): 223-252.
- Davies MG, Hagen PO.** 1997. Systemic inflammatory response syndrome. *The British journal of surgery* 84(7): 920-935.
- Davis FC, Gorski RA.** 1984. Unilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei: evidence for redundant control of circadian rhythms. *Journal of Comparative Physiology A* 154(2): 221-232.
- de la Iglesia HO.** 2007. Ritmos hormonales y reproductivos. p. 187-231. *In* Golombek DA (ed.) *Cronobiología humana, ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. Universidad nacional de Quilmes. 2da edición. BA.
- de la Iglesia HO, Schwartz WJ.** 2006. Minireview: timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 147(3): 1148-1153.
- de la Iglesia HO, Blaustein JD, Bittman EL.** 1999. Oestrogen receptor-alpha-immunoreactive neurones project to the suprachiasmatic nucleus of the female syrian hamster. *Journal of Neuroendocrinology* 11(7): 481-490.
- de la Iglesia HO, Cambras T, Schwartz WJ, Díez-Noguera A.** 2004. Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Current Biology* 14(9): 796-800.
- de la Iglesia HO, Meyer J, Schwartz WJ.** 2003. Lateralization of circadian pacemaker output: activation of left- and right-sided luteinizing hormone-releasing hormone

neurons involves a neural rather than a humoral pathway. *The Journal of Neuroscience* 23(19): 7412-7414.

**de la Iglesia HO, Meyer J, Carpino A, Schwatz WJ.** 2000. Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* 290(5492): 799-801.

**DeCoursey PJ.** 2004b. The behavioral ecology and evolution of biological timing systems. p. 26-65. *In* Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ (eds.) *Chronobiology biological timekeeping*. Sinauer Associates. USA.

**DeCoursey PJ.** 2004c. Functional organization of circadian systems in multicellular animals. p. 144-178. *In* Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. (eds.) *Chronobiology biological timekeeping*. Sinauer Associates. USA.

**DeCoursey PJ.** 2004d. Cell physiology of circadian pacemakers systems in metazoan animals. p. 180-210. *In* Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ. (eds.) *Chronobiology biological timekeeping*. Sinauer Associates. USA.

**Do MT, Yao KW.** 2010. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *Physiological Reviews* 90(4): 1547-1581.

**Domínguez R.** 1992. La derecha y la izquierda ¿son también diferentes en el hipotálamo? *Ciencia Hoy* 4 (19): 40-46.

**Domínguez R, Cruz-Morales SE.** 2011. The ovarian innervation participates in the regulation of the ovarian functions. *Endocrinology & Metabolic Syndrome*. S4: 001 [disponible solo en línea en: <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1017.S4-001>].

**Domínguez R, Chávez R, Cruz ME.** 1991. La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. p. 161-192. *In* Domínguez R (ed.) *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. Miguel Ángel Porrúa. MEX.

**Domínguez R, Smith ER.** 1974. Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology* 14(3): 212-223.



**Donaldson JA, Stephan FK.** 1982. Entrainment of circadian rhythms: retinofugal pathways and unilateral suprachiasmatic nucleus lesions. *Physiology & Behavior* 29(6): 1161-1169.

**Dunlap JC.** 1999. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96(2): 271-290.

**Dunlap JC.** 2004. Molecular biology of circadian pacemaker systems. p. 212-253. *In* Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ (eds.) *Chronobiology biological timekeeping*. Sinauer Associates. USA.

**Ellis R.** 2003 Hematoxylin and Eosin (H&E) staining protocol. [En línea] Disponible en: [http://www.ihcworld.com/protocols/special\\_stains/h&e\\_ellis.htm](http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/h&e_ellis.htm) (revisado el 030512).

**Everett JW, Sawyer CH.** 1950. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 47(3): 198-218.

**Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Hindersson P, Gräs S.** 2006. Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology* 147(8): 3769-3776.

**Fitzgerald K, Zucker I.** 1976. Circadian organization of the estrous cycle of the golden hamster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(8): 2923-2927.

**Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Muñoz M, David-Gray Z, Foster R.** 1999. Regulation of mammalian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284(5413): 502-504.

**Fukuda M, Yamanouchi K, Nakano Y, Furuya H, Arai Y.** 1984. Hypothalamic laterality in regulating gonadotropic function: unilateral hypothalamic lesion and ovarian compensatory hypertrophy. *Neuroscience Letters* 51(3): 365-370.

**Gillespie JM, Chan BP, Roy D, Cai F, Belsham DD.** 2003. Expression of circadian rhythm genes in gonadotropin-releasing hormone-secreting GT1-7 neurons. *Endocrinology* 144(12): 5285-5292.

**Gillete MU.** 1991. SCN electrophysiology *in vitro*: rhythmic activity and endogenous clock properties. p. 125-143. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.

**Gosden RG, Everett JW, Tyrey L.** 1976. Luteinizing hormone requirements for ovulation in the pentobarbital-treated proestrus rat. *Endocrinology* 99(4): 1046-1053.

**GraphPad InStat Software.** 2003. GraphPad InStat versión 3.05 para Windows 95. USA.

**Gräs S, Georg B, Jørgensen HL, Fahrenkrug J.** 2012. Expression of the clock genes *Per1* and *Bmal1* during follicle development in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation and hypophysectomy. *Cell and tissue research* 350(3): 539-548.

**Guido ME, de Guido LB, Goguen D, Robertson HA, Rusak B.** 1999. Daily rhythm of spontaneous immediate-early gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms* 14(4): 275-280.

**Hahn JD, Coen CW.** 2006. Comparative study of the sources of neuronal projections to the site of gonadotrophin-releasing hormone perikarya and to the anteroventral periventricular nucleus in female rats. *The Journal of Comparative Neurology* 494(1): 190-214.

**Hardy DF.** 1970. The effect of constant light on the estrous cycle and behaviour of the female rat. *Physiology & Behavior* 5(4): 421-425.

**Hannibal J.** 2002. Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Research* 309(1): 73-88.

**Hastings M, O'Neil JS, Maywood ES.** 2007. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *The Journal of endocrinology* 195(2): 187-198.

**Herzog ED, Aton SJ, Numano R, Sakaki Y, Tei H.** 2004. Temporal precision in the mammalian circadian system: a reliable clock from less reliable neurons. *Journal of Biological Rhythms* 19(1): 35-46.

**Honma S, Nakamura W, Shirakawa T, Honma K.** 2004. Diversity in the circadian periods of single neurons of the rat suprachiasmatic nucleus depends on nuclear structure and intrinsic period. *Neuroscience Letters* 358(3): 173-176.

**Honma S, Shirakawa T, Katsuno Y, Namihira M, Honma K.** 1998. Circadian periods of single suprachiasmatic neurons in rats. *Neuroscience Letters* 250(3): 157-160.

**Honma S, Shirakawa T, Nakamura W, Honma K.** 2000. Synaptic communication of cellular oscillations in the rat suprachiasmatic neurons. *Neuroscience Letters* 294(2): 113-116.

**Illnerová H.** 1991. The Suprachiasmatic nucleus and rhythmic pineal melatonin production. p. 197-216. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM. (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. NY, USA.

**Johnson RF, Moore RY, Morin LP.** 1988a. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. *Brain Research* 460(2): 297-313.

**Johnson RF, Morin LP, Moore RY.** 1988b. Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Research* 462(2): 301-312.

**Kalsbeek A, Palm IF, La Fleur FE, Scheer FAJL, Perreau-Lenz S, Ruitter M, Kreier F, Cailotto C, Buijs RM.** 2006. SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *Journal of Biological Rhythms* 21(6): 458-469.

**Karman BN, Tischkau SA.** 2006. Circadian clock gene expression in the ovary: effects of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction* 75(4): 624-632.

- Kaufman CM, Menaker M.** 1993. Effect of transplanting suprachiasmatic nuclei from donors of different ages into completely SCN lesioned hamsters. *Journal of Neural Transplantation & Plasticity* 4(4):257-265.
- Kent S, Hurd M, Satinoff E.** 1991. Interactions between body temperature and wheel running over the estrous cycle in rats. *Physiology & Behavior* 49(6): 1079-1084.
- Kim CY, Wakabayashi K, Nobunaga T.** 1994. Time-dependent ovulation-blocking effect of ether anesthesia differs from pentobarbital in rats. *The Tokohu journal of experimental medicine* 172(3): 237-242.
- Kimura F, Jinnai K.** 1994. Bicuculline infusions advance the timing of luteinizing hormone surge in proestrous rats: comparisons with naloxone effects. *Hormones and Behavior* 28(4): 424-430.
- Köning JFR, Klippel RA.** 1963. *The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem.* The Williams and Wilkins Company. USA.
- Kriegsfeld LJ, Silver R.** 2006. The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Hormones and Behavior* 49(5): 557-574.
- Leak RK, Moore RY.** 2001. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *The Journal of Comparative Neurology* 433(3): 312-334.
- Leak RK, Card JP, Moore RY.** 1999. Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research* 819(1-2): 23-32.
- Legan SJ, Donoghue KM, Franklin KM, Duncan MJ.** 2009. Phentobarbital blockade of the preovulatory luteinizing hormone surge: association with phase-advanced circadian clock and altered suprachiasmatic nucleus *Period1* gene expression. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 296(5): R1620-R1630.

- Lehman MN, Silver R, Bittman EL.** 1991. Anatomy of Suprachiasmatic nucleus grafts. p. 349-374. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) Suprachiasmatic nucleus the mind's clock. Oxford University Press. USA.
- LeSauter J, Silver R.** 1998. Output signals of the SCN. *Chronobiology International* 15(5): 535-550.
- Loros JJ, Hastings JW, Schibler U.** 2004. Adapting to life on a rotating world at the gene expression level. p. 254-289. *In* Dunlap JC, Loros JJ, DeCoursey PJ (eds.) *Chronobiology biological timekeeping*. Sinauer Associates. MA, USA.
- McWatters H, Dunlap JC, Millar AJ.** 1999. Circadian biology: clocks for the real world. *Current Biology* 9(17): R633-R635.
- Meijer JH.** 1991. Integration of visual information by the Suprachiasmatic nucleus. p. 107-119. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.
- Meijer JH, Schwartz WJ.** 2003. In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms* 18(3): 235-249.
- Meijer JH, Michel S, Vansteensel MJ.** 2007. Processing of daily and seasonal light information in the mammalian circadian clock. *General and Comparative Endocrinology* 152(2-3): 159-164.
- Meijer JH., Schaap J, Watanabe K, Albus H.** 1997. Multiunit activity recordings in the suprachiasmatic nuclei: *in vivo* versus *in vitro* models. *Brain Research* 753(2): 322-327.
- Meijer JH, Watanabe K, Dètàri L, Schaap J.** 1996. Circadian rhythm in light response in suprachiasmatic nucleus neurons of freely moving rats. *Brain Research* 741(1-2): 352-355.
- Menaker M.** 2003. Circadian photoreception. *Science* 299(5604): 213-214.

- Merchenthaler L, Görcs T, Sétáló G, Petrusz P, Flerkó B.** 1984. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and pathways in the rat brain. *Cell and tissue research* 237(1): 15-29.
- Meyer-Bernstein EL, Jetton AE, Matsumoto SI, Markuns JF, Lehman MN, Bittman EL.** 1999. Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology* 140(1): 207-218.
- Miller BH, Olson SL, Levine JE, Turek FW, Horton TH, Takahashi JS.** 2006. Vasopressin regulation of the proestrous luteinizing hormone surge in wild-type and Clock mutant mice. *Biology of Reproduction* 75(5): 778-784.
- Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS.** 2004. Circadian Clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Current Biology* 14(15): 1367-1373.
- Mirmiran M, Koster-Van Hoffen GC, Bos NP.** 1995. Circadian rhythm generation in cultured suprachiasmatic nucleus. *Brain Research Bulletin* 38(3): 275-283.
- Mitsushima D, Jinnai K, Kimura F.** 1997. Possible role of the gamma-aminobutyric acid-A receptor system in the timing of the proestrous luteinizing hormone surge in rats. *Endocrinology* 138(5): 1944-1948.
- Moga MM, Moore RY.** 1996. Putative excitatory amino acid projections to the suprachiasmatic nuclei in the rat. *Brain Research* 743(1-2): 171-177.
- Moga MM, Moore RY.** 1997. Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 389(3): 508-534.
- Moore RY.** 1991. Development of the Suprachiasmatic nucleus. p. 391-404. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.
- Moore RY.** 1999. Suprachiasmatic nucleus. p. 686-691. *In* Knobil E, Neill JD (eds.) *Encyclopedia of reproduction Vol. 4*. Academic press. USA.

- Moore RY, Card JP.** 1985. Visual pathways and the entrainment of circadian rhythms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 453: 123-133.
- Moore RY, Eichler VB.** 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research* 42(1): 201-206.
- Moore RY, Lenn NJ.** 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 146(1): 1-14.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK.** 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Research* 309(1): 89-98.
- Moore RY, Weis R, Moga MM.** 2000. Efferent projections of the geniculate leaflet and the ventral lateral geniculate nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 420(3): 398-418.
- Morin LP.** 1991. Neural control of circadian rhythms as revealed through the use of benzodiazepines. p. 324-338. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.
- Morse D, Sassone-Corsi P.** 2002. Time after time: inputs to and outputs from the mammalian circadian oscillators. *Trends in Neurosciences* 25(12): 632-637.
- Nakao N, Yasuo S, Nishimura A, Yamamura T, Watanabe T, Anraku T, Okano T, Fukada Y, Sharp PJ, Ebihara S, Yoshimura T.** 2007. Circadian clock gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles. *Endocrinology* 148(7): 3031-3038.
- Nance DM, Bhargava M, Myatt GA.** 1984. Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Research Bulletin* 13(5): 651-655.
- Nance DM, White JP, Moger WH.** 1983. Neural regulation of the ovary: evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control. *Brain Research Bulletin* 10(3): 353-355.



- Newman GC.** 1991. SCN metabolic activity *in vitro*. p. 157-176. In Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.
- Palm IF, van Der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM. and Kalsbeek A.** 1999. Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 93(2): 659-666.
- Palm IF, van der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM, Kalsbeek A.** 2001. The stimulatory effect of vasopressin on the luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats is time-dependent. *Brain Research* 901(1-2): 109-116.
- Panda S, Hogenesch JB.** 2004. It's all in the timing: many clocks, many outputs. *Journal of Biological Rhythms* 19(5): 374-387.
- Paul CA, Beltz B, Berger-Sweeney J.** 2008a. Dissection of rat brains. *Cold Spring Harbor protocols* 3(4): 1-2.
- Paul CA, Beltz B, Berger-Sweeney J.** 2008b. Sectioning of brain tissues. *Cold Spring Harbor protocols* 3(4): 1-2.
- Paul CA, Beltz B, Berger-Sweeney J.** 2008c. Subbing slides. *Cold Spring Harbor protocols* 3(9): 1.
- Paul CA, Beltz B, Berger-Sweeney J.** 2008d. The Nissl stain: a stain for cell bodies in brain sections. *Cold Spring Harbor protocols* 3(9): 1-2.
- Paxinos G, Watson C.** 2004. *The rat brain in stereotaxic coordinates: the new coronal set*. 5th edition. Elsevier Academic Press. CHN.
- Pickard GE, Rea MA.** 1997. Serotonergic innervation of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. *Biology of the Cell* 89(8): 513-523.

**Pittendrigh CS.** 1981. Circadian systems: general perspective. p. 57-80. *In* Aschoff J (ed.) Handbook of behavioral neurobiology vol. 4, biological rhythms. Plenum Press. USA.

**Pittendrigh CS.** 1993. Temporal Organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual Review of Physiology* 55: 16-54.

**Pittendrigh CS, Daan S.** 1976a. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents I. The stability of spontaneous frequency. *Journal of Comparative Physiology A* 106(3): 223-252.

**Prosser RA.** 1998. *In vitro* circadian rhythm of the mammalian suprachiasmatic nuclei: comparison of multi-unit and single-unit neuronal activity recordings. *Journal of Biological Rhythms* 13(1): 30-38.

**Ralph MR.** 1991. Suprachiasmatic nucleus transplant studies using the *tau* mutation in golden hamsters. p. 341-348. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) Suprachiasmatic nucleus the mind's clock. Oxford University Press. USA.

**Refinetti R.** 2006i. Receptors. p. 387-443. *In* Refinetti R (ed.) Circadian physiology. 2da edición. CRC Press. USA.

**Reghunandanan V, Reghunandanan R.** 2006. Neurotransmitters of the Suprachiasmatic nuclei. *Journal of Circadian Rhythms* 4(2): [disponible sólo en línea en: <http://www.jcircadianrhythms.com/content/4/1/2>].

**Reppert SM, Schwartz WJ.** 1984. The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of a functional circadian clock using <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose. *The journal of Neuroscience* 4(7): 1677-1682.

**Reppert SM, Weaver DR.** 1991. A biological clock is oscillating in the fetal Suprachiasmatic nuclei. p. 405-418. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) Suprachiasmatic nucleus the mind's clock. Oxford University Press. USA.

- Reynoso A.** 2013. Estructuras nerviosas dorsales a POA-AHA que participan en la regulación de la ovulación. MEX. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Roennenberg T, Daan S, Merrow M.** 2003. The art of entrainment. *Journal of Biological Rhythms* 18(3): 183-194.
- Rusak B, Sucker I.** 1979. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiological Reviews* 59(3): 449-526.
- Saitoh Y, Matsui Y, Nihonmatsu I, Kawamura H.** 1991. Cross-species transplantation of the suprachiasmatic nuclei from rats to Siberian chipmunks (*Eutamias sibiricus*) with suprachiasmatic lesions. *Neuroscience Letters* 123(1): 77-81.
- Samson WK, McCann SM.** 1979. Effects of suprachiasmatic nucleus lesions on hypothalamic LH-releasing hormone (LHRH) content and gonadotropin secretion in the ovariectomized (OVX) female rat. *Brain research bulletin* 4(6): 783-788.
- Schwartz WJ.** 1991. SCN metabolic activity *in vivo*. p. 144-156. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.
- Schwartz WJ, Davidsen LC, Smith CB.** 1980. *In vivo* metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology* 189(1): 157-167.
- Schwartz WJ, Reppert SM, Eagan SM, Moore-Ede MC.** 1983. *In vivo* metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Research* 274(1): 184-187.
- Seegal RF, Goldman BD.** 1975. Effects of photoperiod on cyclicity and serum gonadotropins in the Syrian hamster. *Biology of Reproduction* 12(2): 223-231.
- Sellix MT, Menaker M.** 2010. Circadian clocks in the ovary. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 21(10): 628-636.

- Sellix MT, Yoshikawa T, Menaker M.** 2009. A circadian egg timer gates ovulation. *Current Biology* 20(6): R266-R267.
- Shibata S, Moore RY.** 1987. Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research* 34: 311-315.
- Shimizu T, Hirai Y, Murayama C, Miyamoto A, Miyazaki H, Miyazaki K.** 2011. Circadian clock genes *Per2* and *Clock* regulate steroid production, cell proliferation, and luteinizing hormone receptor transcription in ovarian granulosa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412(1): 132-135.
- Sikes HE.** 2009. Circadian clock gene involvement in the regulation of the reproductive neuroendocrine axis. UMI dissertation publishing. USA. Tesis para obtener el grado de doctor en filosofía, Universidad Estatal de Florida.
- Silva CC, Benítez DP, Monroy J, Ayala ME, Flores A, Domínguez R.** 2012. Unilateral lesions of the Suprachiasmatic nucleus performed at diestrus-2 or proestrus induces a blockade of ovulation in the rat. I Congreso FALAN y 55 Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Cancún, Quintana Roo. Program No. Th142.
- Smith MJ, Jiennes L, Wise PM.** 2000. Localization of the VIP2 receptor protein on GnRH neurons in the female rat. *Endocrinology* 141(11): 4317-4320.
- Sollar PJ, Kimble DP, Pickard GE.** 1995. Restoration of circadian behavior by anterior hypothalamic heterografts. *The Journal of Neuroscience* 15(3 pt 2): 2109-2122.
- Stephan FK, Donaldson JA, Gellert J.** 1982. Retinohypothalamic tract symmetry and phase shifts of circadian rhythms in rats and hamsters. *Physiology & Behavior* 29(6): 1153-1159.
- Stephan FK, Sucker I.** 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69(6): 1583-1586.

**Stetson MH, Anderson PJ.** 1980. Circadian pacemaker times gonadotropin release in free-running female hamsters. *American Journal of Physiology* 238(1): R23-R27.

**Stetson MH, Watson-Whitmyre M, Dipinto MN, Smith SG.** 1981. Daily luteinizing hormone release in ovariectomized hamsters: effect of barbiturate blockade. *Biology of Reproduction* 24(1): 139-144.

**Terasawa E, Wiegand SJ, Bridson WE.** 1980. A role for medial preoptic nucleus on afternoon of proestrus in female rats. *The American journal of physiology* 238(6): E533-E539.

**van den Pol AN.** 1980. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *The Journal of Comparative Neurology* 191(4): 661-702.

**van den Pol AN.** 1991. The Suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. p. 17-50. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.

**van der Beek EM.** 1996. Circadian control of reproduction in the female rat. p. 295-320. *In* Buijs RM, Kalsbeek A, Romijn HJ, Pennartz CMA, Mirmiran M (eds.) *Hypothalamic integration of circadian rhythms*, *Progress in brain research* Vol. 111. Elsevier. NED.

**Van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, Van der Hurk R, Buijs RM.** 1997a. 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* 384(4): 569-579.

**van der Beek EM, van Oudheusden HJ, Buijs RM, van der Donk HA, van der 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): 2636-2644.

**van der Beek EM, Wiegant VM, van der Donk HA, van der Hurk R, Buijs RM.** 1993. Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotropin-releasing hormone neurons in the female rat. *Journal of Neuroendocrinology* 5(2): 137-144.

**van der Beek EM, Wiegant VM, van Oudheusden HJ, van der Donk HA, van den Hurk R, Buijs RM.** 1997b. Synaptic contacts between gonadotropin-releasing hormone-containing fibers and neurons in the suprachiasmatic nucleus and perichiasmatic area: an anatomical substrate for feedback regulation? *Brain Research* 755(1): 101-111.

**Vogelbaum MA, Menaker M.** 1992. Temporal chimeras produced by hypothalamic transplants. *The Journal of Neuroscience* 12(9): 3619-3627.

**Vogelbaum MA., Galef J, Menaker M.** 1993. Factors determining the restoration of circadian behavior by hypothalamic transplants. *Journal of Neural Transplantation & Plasticity* 4(4): 239-256.

**Watson RE, Langub MC, Engle MG, Maley BE.** 1995. Estrogen-receptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and peri-suprachiasmatic region. *Brain Research* 689(2): 254-264.

**Watts AG.** 1991. The efferent projections of the Suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms. p. 77-106. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.

**Weick RF, Stobie KM.** 1995. Role of VIP in the regulation of LH secretion in the female rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19(2): 251-259.

**Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM.** 1995. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14(4): 697-706.

**Williams WP, Kriegsfeld LJ.** 2012. Circadian control of neuroendocrine circuits regulating female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology* 3(60): 1-14.

**Wirtshafter D, Asin K, Kent EW.** 1979 Simple technique for midline stereotaxic surgery in the rat. *Physiology & Behavior* 23(2): 409-410.

**Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H.** 2003. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302(5649): 1408-1412.

**Yamazaki S, Kerbeshian MC, Hocker CG, Block GD, Menaker M.** 1998. Rhythmic properties of the hamster suprachiasmatic nucleus *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* 18(24): 10709-10723.

**Yoshikawa T, Sellix MT, Pezuk P, Menaker M.** 2009. Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology* 150(9): 4338-4347.

**Young MW.** 2000. Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animals cells. *Trends in Biochemical Sciences* 25(12): 601-606.

**Zucker I, Lee TM, Dark J.** 1991. The Suprachiasmatic nucleus and annual rhythms in mammals. p. 246-259. *In* Klein DC, Moore RY, Reppert SM (eds.) *Suprachiasmatic nucleus the mind's clock*. Oxford University Press. USA.





**I Congreso FALAN**  
Federación de Asociaciones Latinoamericanas y  
del Caribe de Neurociencias

**LV Congreso**  
Nacional de Ciencias Fisiológicas.



Sociedad Mexicana  
de Ciencias Fisiológicas, A.C.

# Certificate

that:

**SILVA CC ,BENÍTEZ DP ,MONROY J ,AYALA ME ,FLORES A ,  
DOMÍNGUEZ R**

*presented THE POSTER titled:*

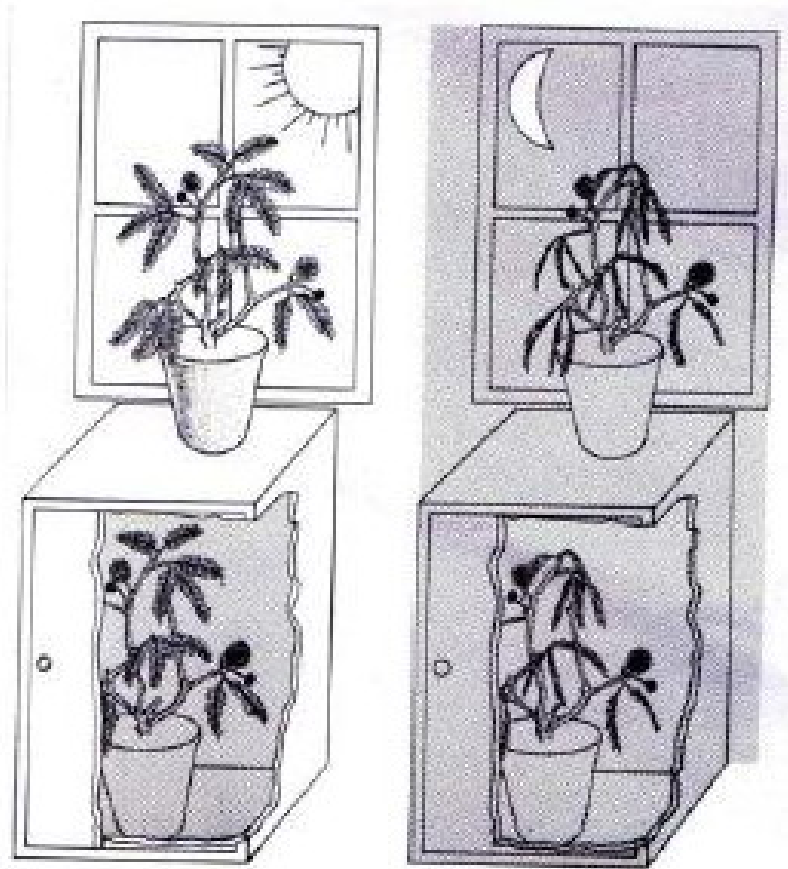
**UNILATERAL LESIONS OF THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS PERFORMED AT  
DIESTRUS-2 OR PROESTRUS INDUCES A BLOCKADE OF OVULATION IN THE RAT**

*in Cancún, México (November 4-9, 2012)*

Rommy Von Bernhardi  
President of FALAN

Gabriela González-Mariscal  
President of the Mexican Society of  
Physiological Sciences

Rafael Guzmán  
President of the Scientific  
Committee



“...the beauty of science comes from the unexpected findings that change the focus of the things, that allows to link concepts and to understand what before couldn't be understood.”

Menaker M.