



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**EFFECTOS DE LA MICRO-INYECCIÓN DE ATROPINA  
EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO EN EL DÍA DEL  
PROESTRO SOBRE LAS FUNCIONES OVÁRICAS**

***T E S I S***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

***BIÓLOGO***

PRESENTA

**NOÉ LAGUNAS CORTÉS**

Directora de tesis:

Dra. Leticia Morales Ledesma

México, D.F. 2014





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**EFFECTOS DE LA MICRO-INYECCIÓN DE ATROPINA  
EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO EN EL DÍA DEL  
PROESTRO SOBRE LAS FUNCIONES OVÁRICAS**

Tesis que presenta:

**NOÉ LAGUNAS CORTÉS**

Directora de tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma

Realizada en el Laboratorio de Fisiología Reproductiva de la Unidad de  
Investigación en Biología de la Reproducción. UMIEZ,  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

UNAM

Durante la realización de ésta tesis se contó con el apoyo  
financiero de DGAPA-PAPIIT IN218911 y IN211813.





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 **LAGUNAS CORTES NOÉ**, con número de cuenta **409023398**, de la carrera de Biología se le ha fijado el día **27** del mes de **mayo** de 2014 a las **14:00 hrs.** para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN
- VOCAL Dra. LETICIA MORALES LEDESMA
- SECRETARIO M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA
- SUPLENTE Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO
- SUPLENTE Biól. REYNALDA ROLDÁN PÉREZ

*[Handwritten signatures and names of the jury members]*

El título de la tesis que presenta es: **Efectos de la micro-inyección de atropina en el núcleo supraquiasmático en el día del proestro sobre las funciones ováricas.**

Opción de titulación: Tesis.

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

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
 México, D. F., a 24 de abril de 2014.

*[Handwritten signature of Víctor Manuel Mendoza Núñez]*  
**Dr. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
**DIRECTOR**  
**DIRECCION**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

*[Handwritten signature of Armando Cervantes Sandoval]*  
 VO. BO.  
 M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
 JEFE DE CARRERA

Este trabajo se realizó gracias al esfuerzo de muchas personas que me ayudaron a crecer en lo académico y personal.

Quisiera dar mención especial al esfuerzo realizado por mis papás, que sin cuestionar me apoyaron en todo lo que pudieron, los quiero mucho papá y mamá.

A toda mi familia, pero en especial a mis hermanas Andrómeda y Anita.

A mi tutora de tesis la Dra. Lety, que siempre me dio toda su atención, por su inagotable paciencia, sin ella, este trabajo no hubiera salido adelante.

A toda mi familia, pero en especial a mi tía Ricarda, y a mi tío Victor.

A Adriana por su apoyo y amistad.

A mis amigos Aldo, Isabel Navarrete, Isabel Sixtos, Guadalupe, Alina, Azucena, Elizabeth, Oeyra, Rosa, Gabby y Hazael.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	i
RESUMEN .....	ii
INTRODUCCIÓN .....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA .....	3
OVULACIÓN Y DESARROLLO FOLICULAR .....	7
REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DE LAS FUNCIONES OVÁRICAS .....	10
CICLO ESTRAL .....	12
NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO .....	14
ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL NSQ .....	15
AFERENCIAS Y EFERENCIAS DEL NSQ .....	16
PARTICIPACIÓN DEL NSQ SOBRE LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GnRH .....	19
ACETILCOLINA .....	23
NSQ Y SISTEMA COLINÉRGICO.....	27
ATROPINA .....	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	30
HIPÓTESIS .....	31
OBJETIVOS .....	32
MÉTODO .....	33
RESULTADOS .....	37
EXPERIMENTO 1 .....	37
EXPERIMENTO 2 .....	39
EXPERIMENTO 3 .....	42
EXPERIMENTO 4 .....	45
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	48
MODELO .....	55
CONCLUSIONES .....	56
BIBLIOGRAFÍA .....	57

## **ABREVIATURAS**

ACh	Acetilcolina
AVPV	Núcleo anteroventral periventricular
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
CRF	Factor liberador de la corticotropina
E2	Estradiol
FSH	Hormona estimulante del folículo
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
GRP	Péptido liberador de gastrina
IGL	Hojuela intergeniculada
LH	Hormona luteinizante
MPO	Área preóptica media
NSQ	Núcleo supraquiasmático
NSQ-D	Núcleo supraquiasmático derecho
NSQ-I	Núcleo supraquiasmático izquierdo
PB	Pentobarbital sódico
POA	Área preóptica anterior
sPVN	Núcleo paraventricular
TRH	Tracto retinohipotalámico
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
VP	Vasopresina

## **RESUMEN**

Muchos procesos fisiológicos y de comportamiento como son la secreción hormonal, el ciclo estral, la ovulación, la hibernación, las contracciones cardiovasculares, el ciclo sueño vigilia, etc. muestran un ritmo de tipo ultradiano, circadiano o infradiano dependiendo de la duración de dichos ciclos. Estos biorritmos son controlados por una estructura nerviosa localizada en el hipotálamo llamado núcleo supraquiasmático.

El núcleo supraquiasmático (NSQ) se ha considerado como un verdadero marcapasos ya que es capaz de generar su propio ritmo en cuanto a actividad nerviosa y metabólica.

El NSQ a través de sus eferencias regula la actividad cíclica de otras áreas como es el área preóptica anterior (POA), esta área toma importancia en nuestro estudio ya que ahí se encuentran neuronas GnRHérgicas. Poco se ha estudiado acerca de la modulación que ejerce el NSQ sobre las funciones ováricas que son la ovulación y la secreción de hormonas esteroides, sin embargo, se ha reportado que lesiones térmicas completas del NSQ causan la abolición de la ovulación y de la secreción cíclica de la hormona luteinizante.

Un neurotransmisor presente tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico es la acetilcolina y en diferentes estudios se ha mostrado que está implicado en la regulación de las funciones ováricas.

En el presente estudio se analizó la participación del sistema colinérgico del NSQ sobre las funciones ováricas, para ello a ratas hembras adultas cíclicas

de la cepa CII-ZV con fotoperiodo controlado y alimento y agua *ad libitum*, a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro, con un instrumento estereotáxico y una bomba de micro-inyección se les administraron 62.5ng de atropina en el NSQ izquierdo o derecho (NSQ-I ó NSQ-D). Todos los animales fueron sacrificados por decapitación en el estro vaginal. Se evaluó la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados y la concentración de progesterona y estradiol en suero. Como grupos de comparación, se utilizaron animales con operación simulada o aquellos a los que se les micro-inyectó solución salina como vehículo.

La operación simulada en el NSQ-D, causó un decremento en la cuota ovulatoria por ambos ovarios, sin embargo, la concentración de hormonas fue similar a la de un animal testigo.

La micro-inyección de vehículo en el NSQ-I ó NSQ-D no modificó los parámetros evaluados.

La micro-inyección de atropina en el NSQ-I ó NSQ-D a las 9:00 hrs del proestro resultó en el bloqueó de la ovulación, mientras que a las 19:00 hrs la administración de atropina no modificó la respuesta ovulatoria. Solo la micro-inyección de atropina a las 19:00 hrs del proestro causó un decremento en la concentración sérica de progesterona, en comparación con el grupo vehículo. Estas evidencias apuntan que el sistema colinérgico del NSQ ejerce una regulación circádica sobre la ovulación, en la mañana del proestro la regula de manera estimulante y por la noche parece no participar.

## INTRODUCCIÓN

El núcleo supraquiasmático (NSQ) sincroniza los procesos fisiológicos y de comportamiento en concordancia con señales ambientales como la temperatura, ruidos o movimiento, entre estas, la más importante es el ciclo luz/oscuridad. Este núcleo recibe información fótica directamente a través del tracto retino-hipotalámico, e indirectamente de la hojuela intergeniculada (IGL) a través del tracto geniculohipotalámico (Aguilar-Roblero y col., 2004). La información fótica sincroniza las neuronas del NSQ a 24 horas y éste, por medio de sus eferencias, modula la actividad de osciladores esclavos que podrían ser estructuras del sistema nervioso central, o bien, una glándula como lo es el ovario (Tresguerres y Castillo, 2005).

En la tarde del proestro el NSQ envía una señal nerviosa hacia neuronas secretoras de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Legan y Karsch, 1975), por lo que la lesión bilateral del NSQ resulta en anovulación (Brown-Grant y Raisman, 1977). De manera *in vitro*, en co-cultivos de NSQ y área preóptica anterior (POA), existe una secreción cíclica de GnRH en presencia de estradiol, secreción cíclica que se suprime cuando se elimina del cultivo el NSQ o bien el estradiol, en conclusión, es necesaria una señal circádica proveniente del NSQ y una señal humoral proveniente del ovario para que se libere GnRH en la eminencia media y con ello module la secreción de la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH), la ovulación y la secreción de hormonas ováricas (Funabashi y col., 2000).

En el NSQ se han identificado varios péptidos neuroactivos, entre ellos el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y vasopresina (VP), calbidina, péptido liberador de gastrina (GRP), glutamato, óxido nítrico, histamina, neurotensina, neuropéptido Y, serotonina, GABA, melatonina, angiotensina II y acetilcolina (Herbison, 2006; Reghunandanan y Reghunandanan, 2006).

El NSQ recibe información colinérgica del núcleo basal magnocelular, de la banda diagonal de Broca y del septum medial, y envía fibras colinérgicas hacia la zona subparaventricular (Castillo-Ruiz y Nunez, 2007). El bloqueo del sistema colinérgico periférico, por la inyección de atropina intraperitoneal, resulta en el bloqueo de la ovulación (Domínguez y col., 1982) y en la modificación de la concentración de estradiol (Cruz y col., 2006) y testosterona en suero (Flores y col., 2006). Evidencias que llevaron a sugerir que el sistema colinérgico modula los mecanismos que regulan las funciones ováricas, y que dependen del día del ciclo estral y de la hora del día.

A la fecha, no se conoce como participa la información colinérgica del NSQ sobre la actividad ovárica. Por ello, en el presente estudio se analizó la función circádica del sistema colinérgico del NSQ, sobre la ovulación y la esteroidogénesis ovárica, en la rata con bloqueo de los receptores muscarínicos del núcleo.

## MARCO TEÓRICO

### *Esteroidogénesis ovárica*

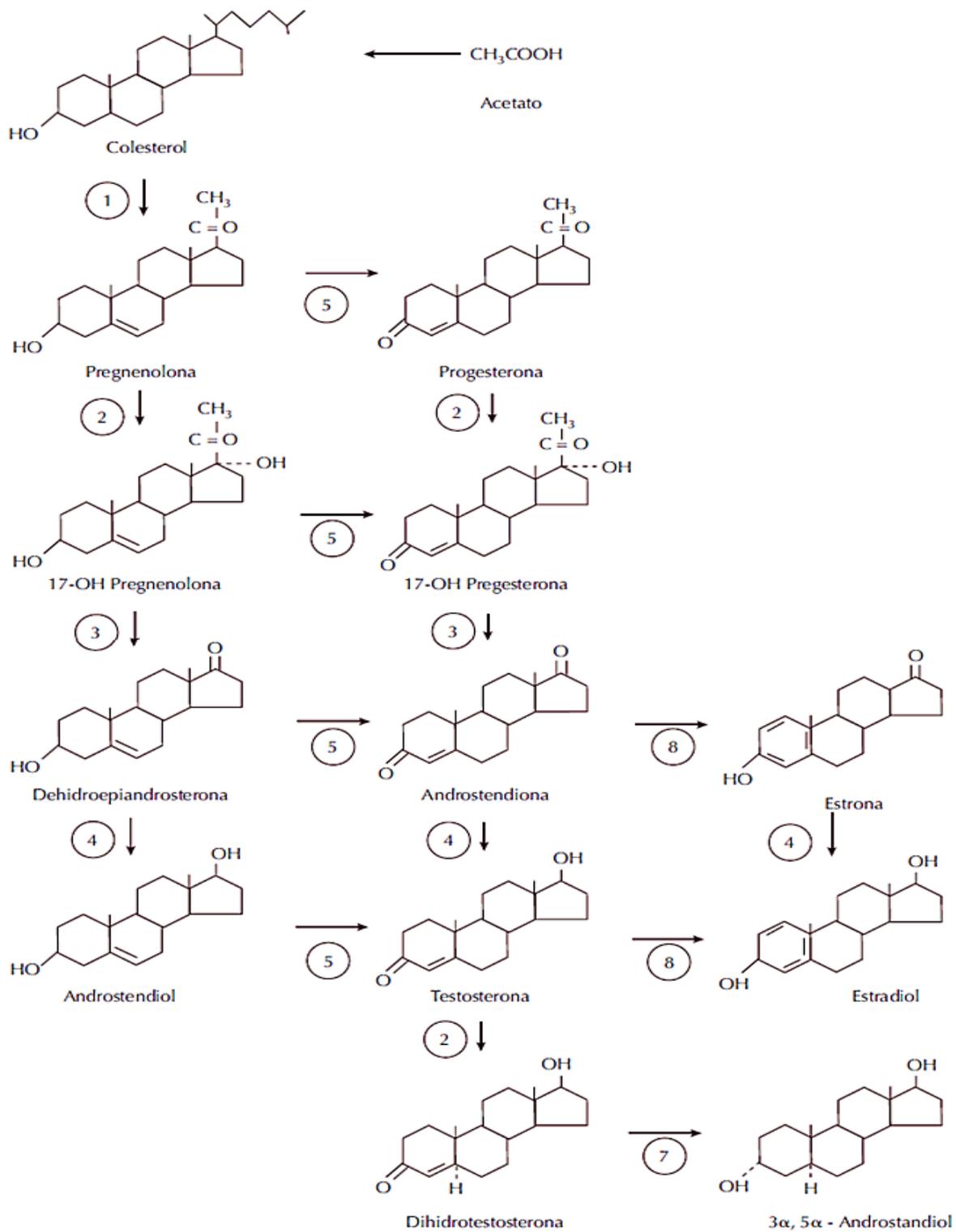
Las hormonas esteroideas son derivadas del colesterol que puede ser sintetizado en la célula a partir de acetato o de los depósitos de esteres de colesterol que se encuentran en las vacuolas lipídicas intracelulares o a partir de la captación de lipoproteínas de baja densidad que son ricas en colesterol; esta última fuente es la más importante cuando hay una estimulación crónica de las células capaces de realizar la esteroidogénesis (Jacome, 2005).

El primer paso de la esteroidogénesis es el rompimiento de la cadena lateral de la molécula de colesterol lo que forma una molécula de pregnenolona y un aldehído isocaproico, esta reacción se da en los ovarios, testículos, suprarrenales, placenta y algunas neuronas (Jacome, 2005).

La conversión de colesterol a pregnenolona se hace por medio de una enzima llamada P450<sub>sc</sub> (Side Chain Cleavage; por sus siglas en inglés) (Bajo y Coroleu, 2009). Este paso se realiza en la célula de la teca, para ello es necesario que la LH se una a su receptor de membrana que activa una cascada de eventos, el colesterol será transportado a la cara interna de la membrana de la mitocondria por la StAR (steroidogenic acute regulator), que es la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, una vez en el interior de la mitocondria la enzima P450<sub>sc</sub> convertirá dicho colesterol a pregnenolona, ésta viaja en pequeñas vesículas hasta llegar al retículo endoplásmico liso (Yeh y Adashi, 2001).

El siguiente paso es la conversión de pregnenolona a progesterona, donde participa la enzima  $3\beta$  hidroxisteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD) que se encuentra localizada en el retículo endoplasmático y mitocondria (Bajo y Coroleu, 2009). Existen dos rutas en la esteroidogénesis ovárica, la ruta  $\Delta 4$  y la ruta  $\Delta 5$ , en la vía  $\Delta 4$  (es la predominante en el cuerpo lúteo), el doble enlace está en la posición 4-5 y un grupo ceto en el C3 de la progesterona (Bajo y Coroleu, 2009). La pregnenolona se convierte en progesterona mediante dos fases enzimáticas que implican a las  $3\beta$ -ol-deshidrogenasa y  $\Delta 4$ -5-isomerasa, posteriormente la hidroxilación de la progesterona, en el carbono 17 da lugar a la 17-hidroxiprogesterona, la cual por acción de la desmolasa se convierte en androstenediona. Después la  $17\beta$ -ol-deshidrogenasa actúa sobre la androstenediona para dar lugar a la testosterona (Figura 1) (Bajo y Coroleu, 2009).

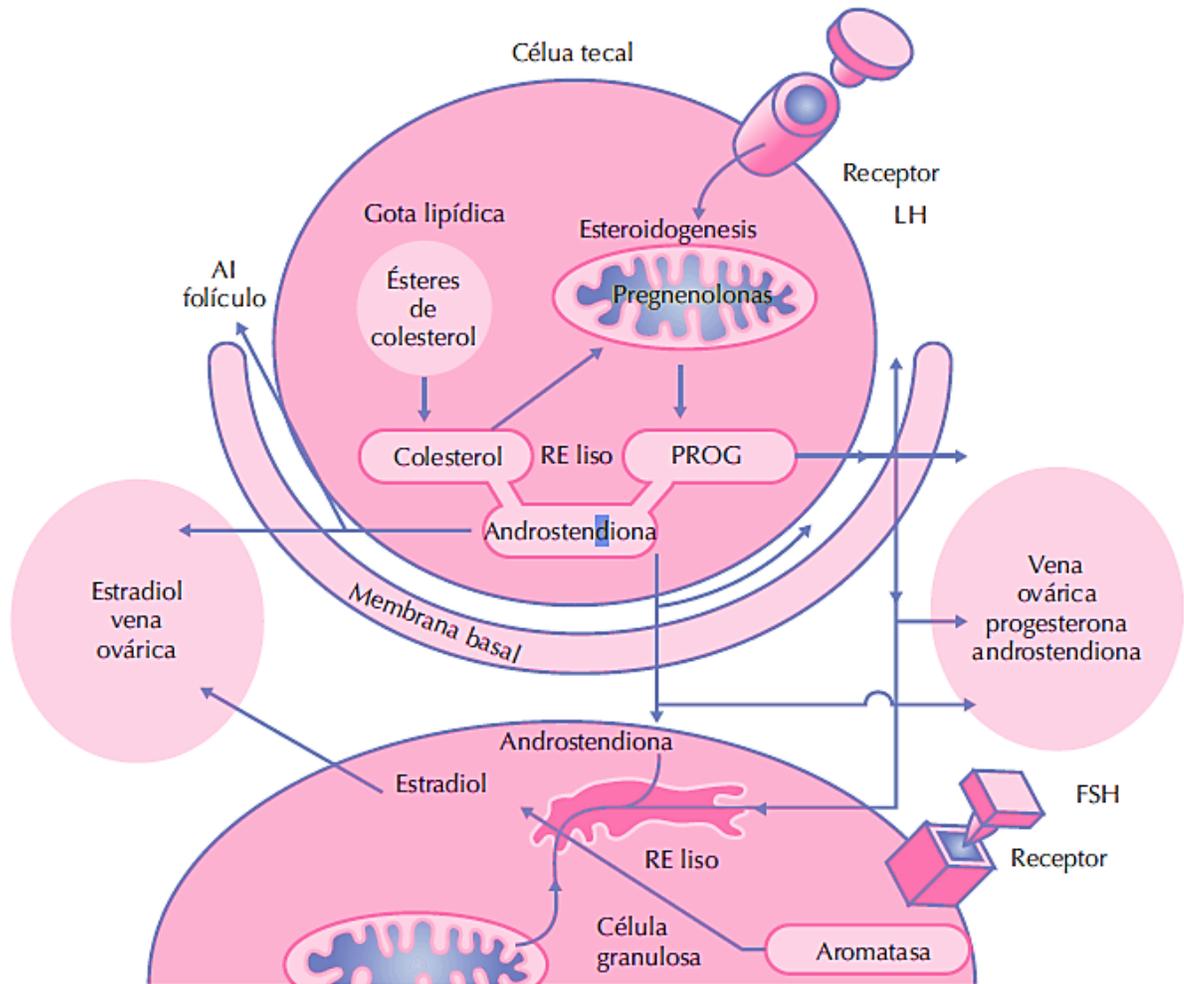
En el caso de la ruta  $\Delta 5$  que es la vía preferente del folículo, la pregnenolona se hidroxila en el C17 por acción de la enzima P450c 17OH, y forma la 17-hidroxipregnenolona que presenta un doble enlace en el C5-6 (Bajo y Coroleu, 2009).



**Figura 1:** Síntesis de hormonas esteroides gonadales. (1) P450scc, (2) P450 17-hidroxilasa, (3) 17,20-liasa, (4) 17- $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa, (5) 3- $\beta$ -ol-dehidrogenasa y  $\Delta$ 4-5 isomerasa, (6) 5 $\alpha$ -reductasa, (7) 3 $\alpha$ -reductasa, (8) P45019-aromatasa. Tomado de Tresguerres, 2005.

La 17-hidroxipregnenolona experimenta un desdoblamiento de su cadena lateral mediante una desmolasa (17,20 liasa) convirtiéndose en la dehidroepiandrosterona (DHA) y la acción de la  $3\beta$ -ol-deshidrogenasa y la  $\Delta 4$ -5 isomerasa convierte la DHA en androstenediona, por último, la  $17\beta$ -HSD convierte la androstenediona en testosterona, la cual atraviesa la membrana basal y llega a las células de la granulosa (Figura 2) (Bajo y Coroleu, 2009).

Parte de los andrógenos sintetizados por las células de la teca salen a torrente sanguíneo, y otros, debido a su carácter lipídico atraviesan la lámina basal llegando a las células de la granulosa. Es en el retículo endoplásmico liso de las células de la granulosa donde se convertirán estos andrógenos en estrógenos por acción de las aromatasas (Figura 2). La síntesis de las aromatasas requiere que la hormona estimulante del folículo (FSH) se una a su receptor en las células de la granulosa, lo que activa una cascada de eventos que culminará con la transcripción del ARNm que codifica a las aromatasas (Bajo y Coroleu, 2009). Es precisamente la colaboración entre las células de la teca y las células de la granulosa la que permite el proceso de biosíntesis de los estrógenos: teoría de las dos células (Figura 2).



**Figura 2.** El modelo de la doble célula doble hormona es ideal para explicar el mecanismo de la esteroidogénesis en el ovario. RE (retículo endoplásmico); PROG (progesterona) Tomado de Tresguerres, 2005.

## ***Ovulación y desarrollo folicular***

El desarrollo folicular está bajo el control de las hormonas hipofisarias, la transformación de un folículo ovárico en un cuerpo lúteo fue descrita por primera vez en 1672 por Regnier de Graaf. Desde ese momento quedó

demostrado que el folículo ovárico constituye la unidad funcional del ovario (Bradley y Voorhis, 1999).

De acuerdo con el grado de desarrollo de los folículos se pueden identificar los siguientes tipos:

1.- Folículos primordiales (30 a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro) compuestos por un ovocito en la etapa del diploteno de la profase de la primera división meiótica (9 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro) rodeados por una capa de células foliculares aplanadas precursoras de las células de la granulosa (Jerome y col., 2009). Estos folículos se encuentran principalmente en la periferia de la corteza por debajo de la corteza albugínea (Italo y Pineda, 1998). Los signos que indican que este tipo de folículo ha empezado a crecer es el incremento del tamaño del ovocito, el cambio en la estructura de las células de la granulosa, pasan de ser planas a cúbicas y se comienza a formar la zona pelúcida, en esta etapa se le considera folículo primario.

2.- Folículos primarios (mayores a 60  $\mu\text{m}$  de diámetro), se caracteriza porque el ovocito casi triplica el tamaño debido a la síntesis de proteínas y ADN (Italo y Pineda, 1998). En esta etapa también se forma una capa de glicoproteínas entre el ovocito y las células de la granulosa llamada zona pelúcida (Fawcett, 1995).

3.- Folículos secundarios o preantrales (mayores o iguales a 120  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente las células de la granulosa proliferan aumentando las capas de esta misma. En este momento una red de capilares invade la trama fibrosa ubicada entre las células que rodean al folículo y constituye la capa teca

interna, la cual aporta nutrientes a la granulosa y al ovocito. Durante esta etapa se empiezan a formar espacios entre las células de la granulosa por acumulación del líquido folicular, en el cual se encuentra FSH, LH, prolactina, estrógenos, progesterona, noradrenalina, entre otras sustancias más (Domínguez y col., 1991).

4.- Folículos preovulatorios (mayores o iguales a 500  $\mu\text{m}$ ). Este folículo se caracteriza por la presencia del cúmulo ovóforo y la corona radiada, los cuales se forman a partir de las células de la granulosa, el ovocito junto con el cúmulo ovóforo es desplazado de forma gradual hacia una posición en particular de la cavidad folicular, además los espacios entre las células de la granulosa constituyen el antro folicular, el líquido presente en esta cavidad se le denomina licor folicular (Palma, 2001). En este estadio, el folículo es capaz de ovular (Bradley y Voorhis, 1999).

En el folículo preovulatorio, se va a producir su ruptura con liberación del ovocito juntamente con el cúmulo ovóforo que lo rodea (Tresguerres, 2005). Este proceso es mediado también por la ruptura de tejido sano en la superficie del ovocito, esta especie de “reacción inflamatoria” local depende de histamina, colagenasas o por la contractura folicular inducida por prostaglandinas (Tresguerres, 2005; Espey, 1998).

Para que se lleve a cabo la ovulación se necesita que se dé el aumento y la disminución brusca de LH. El aumento en la liberación de LH es precedido por el aumento de estradiol en plasma, lo cual es estimulado por la FSH y LH a nivel folicular (Domínguez y col., 1991).

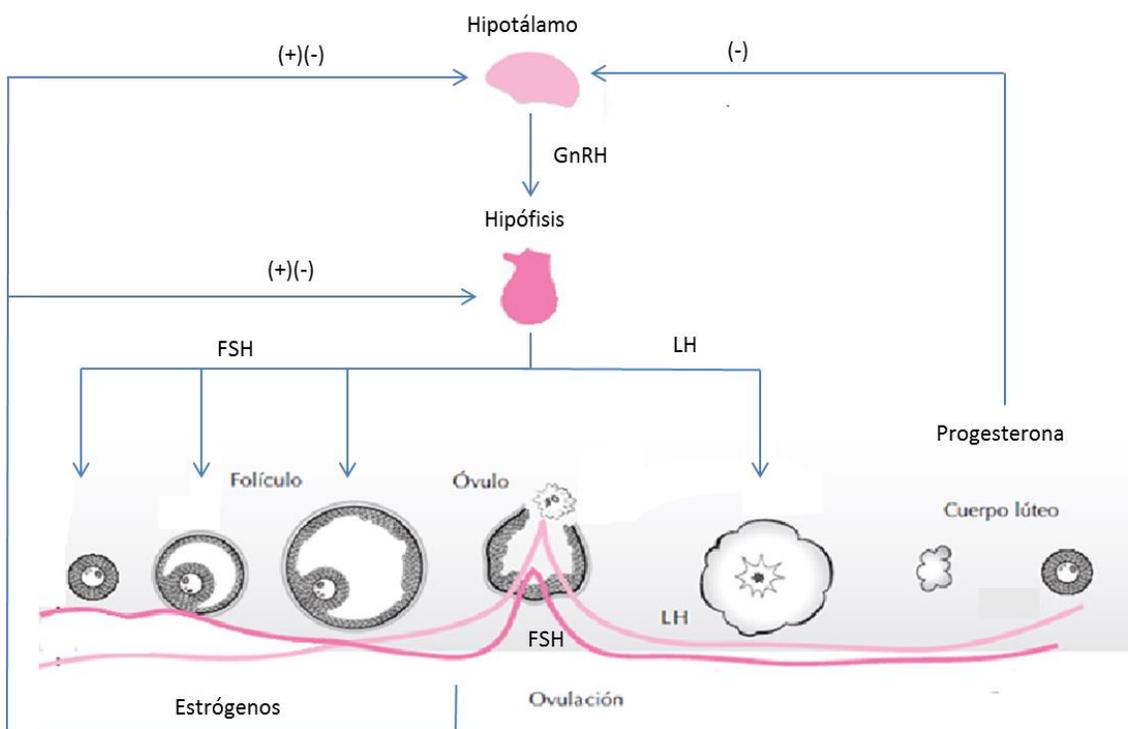
## ***Regulación neuroendocrina de las funciones ováricas***

El ciclo estral está bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. La ovulación es modulada por la GnRH, la cual es un decapeptido que se libera hacia la eminencia media de manera pulsátil (Clarke, 1996). Esta neurohormona es secretada por las neuronas GnRHérgicas que se extienden desde el bulbo olfatorio hasta el área preóptica media (MPO), pasando por el núcleo medio septal y la banda diagonal de Broca. El patrón de distribución de estas neuronas asemeja a una “Y” invertida donde los dos extremos de los brazos tocan cada lado del 3er ventrículo (Herbison, 2006).

La GnRH llega a la adenohipófisis a través del sistema portal hipotalámico hipofisario, que se describe como una red de capilares que une la eminencia media con la pars distalis (Herbison, 2006). En la adenohipófisis se localizan los gonadotropos que responden al estímulo de la GnRH secretando las gonadotropinas; la FSH y la LH, las que actúan en los ovarios regulando la esteroidogénesis y la ovulación. La FSH actúa en los folículos estimulando su desarrollo y la LH es principalmente la encargada de la ovulación. El ovario en respuesta a las gonadotropinas va a secretar hormonas, entre ellas, los estrógenos y la progesterona, las cuales por un mecanismo de retroalimentación van a regular la función del hipotálamo y de la hipófisis (Bajo y Coroleu, 2009). El estradiol amplifica la liberación pulsátil de GnRH en la eminencia media y además sensibiliza la adenohipófisis, esta combinación de efectos resulta en el incremento súbito de la concentración de LH que se

conoce como “pico” preovulatorio de LH cuya función principal es estimular la liberación del ovocito (Figura 3).

La evaluación del ciclo estral mediante la toma diaria de células epiteliales vaginales es una herramienta para analizar la integridad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La caracterización del ciclo estral en la rata lo hicieron Long y Evans, 1922 y se ha observado que existe una correlación entre la citología vaginal y las concentraciones de hormonas hipofisiarias y ováricas (Goldman y col., 2007)



**Figura 3:** Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Se observa la participación de las gonadotropinas en el proceso ovulatorio y la formación del cuerpo lúteo. Tomado y modificado de Tresguerres, 2005.

## ***Ciclo estral***

El ciclo estral se define como una cascada de eventos hormonales, conductuales, morfológicos, histológicos y bioquímicos del aparato genital, los cuales son progresivos, sincronizados y repetitivos que permiten que la hembra acepte al macho en la noche del proestro (Buxadé, 1995).

La duración del ciclo estral es diferente en las especies animales. En la oveja oscila entre 16 y 17 días, en la vaca, la cerda y la cabra, de 20 a 21 días, en la yegua dura entre 20 y 24 días (Álvarez y col., 2009). En la rata el ciclo estral tiene una duración de 4 a 5 días (Goldman y col., 2007).

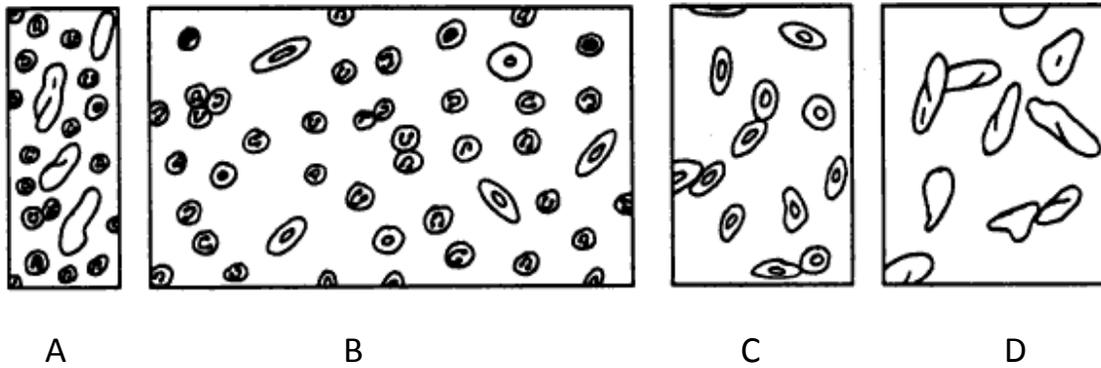
En la rata el ciclo estral se puede dividir en 4 etapas:

- 1) Diestro 1: En el ovario el cuerpo lúteo es responsable de la secreción de progesterona, característico de esta fase. La mucosa vaginal entra en regresión y es invadida por leucocitos (Figura 4A), en el frotis vaginal también se pueden observar células queratinizadas provenientes del estro anterior. Tiene una duración aproximada de 10 horas (de Costa y col., 1993).
- 2) Diestro 2: Durante esta fase se produce la regresión del cuerpo lúteo y disminuye la concentración de estrógenos y progesterona. Como consecuencia, el útero se hace pequeño y poco contráctil, la mucosa vaginal es muy delgada y los leucocitos que migran a través de ella

constituye la mayoría de las células del frotis vaginal (Figura 4B) (de Costa y col., 1993).

3) Proestro. La secreción de estrógenos alcanza su concentración máxima. Aumenta la amplitud y frecuencia de los pulsos de GnRH, aumentando la de LH a las 17 hrs, los cuales son debido a la retroalimentación positiva de E<sub>2</sub>, después la concentración de estrógenos regresa hasta su línea basal (Domínguez-González y col., 1998). El útero se va engrosando progresivamente. La mucosa vaginal sufre numerosas mitosis, apareciendo células epiteliales nucleadas en el frotis (Figura 4C). Tiene una duración aproximada de 16 horas (de Costa y col., 1993).

4) Estro: Aparecen células epiteliales cornificadas, con forma poligonal y sin núcleo (Figura 4D). La concentración de LH sérica se mantiene bajo desde el inicio del estro (Tresguerres, 2003). Tiene una duración aproximada de 20 horas (de Costa y col., 1993). Esta secuencia de sucesos está bajo el control circadiano. En los mamíferos el reloj circadiano se encuentra en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo anterior (Kriegsfeld y Silver, 2006)



**Figura 4:** Células representativas de cada una de las etapas del ciclo estral;  
 A) Diestro 1 B) Diestro 2 C) Proestro D) Estro. Tomada y modificada de Costa y col., 1993.

### ***Núcleo supraquiasmático***

En los mamíferos el NSQ es el principal marcapaso que regula los sistemas circadianos, el ritmo conductual y fisiológico en sincronía con los osciladores exógenos (Evans y col., 2011). Es una estructura pareada, localizada justo por encima del quiasma óptico, en la base y lados del tercer ventrículo (Figura 5). En la rata el NSQ contiene alrededor de 16 000 neuronas pequeñas y compactas (Van den Pol, 1980).

El modelo anatómico más común divide al NSQ en dos compartimentos el “Core” y el “Shell”, que difieren en función (Evans y col., 2011). Este modelo indica que el NSQ contiene una población neural que se divide en dos subunidades funcionales, pero no se puede dividir anatómicamente ya que existe una compleja organización (Evans y col., 2011).

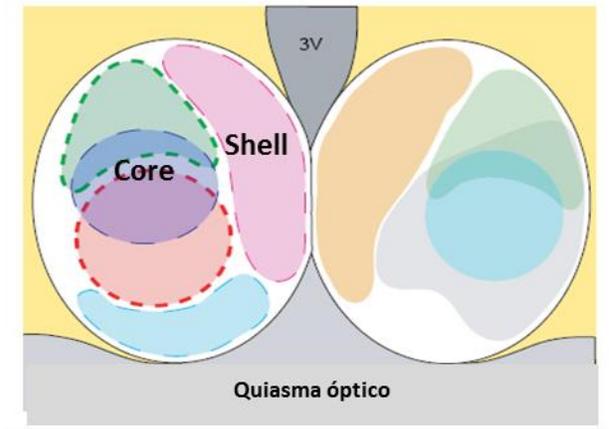
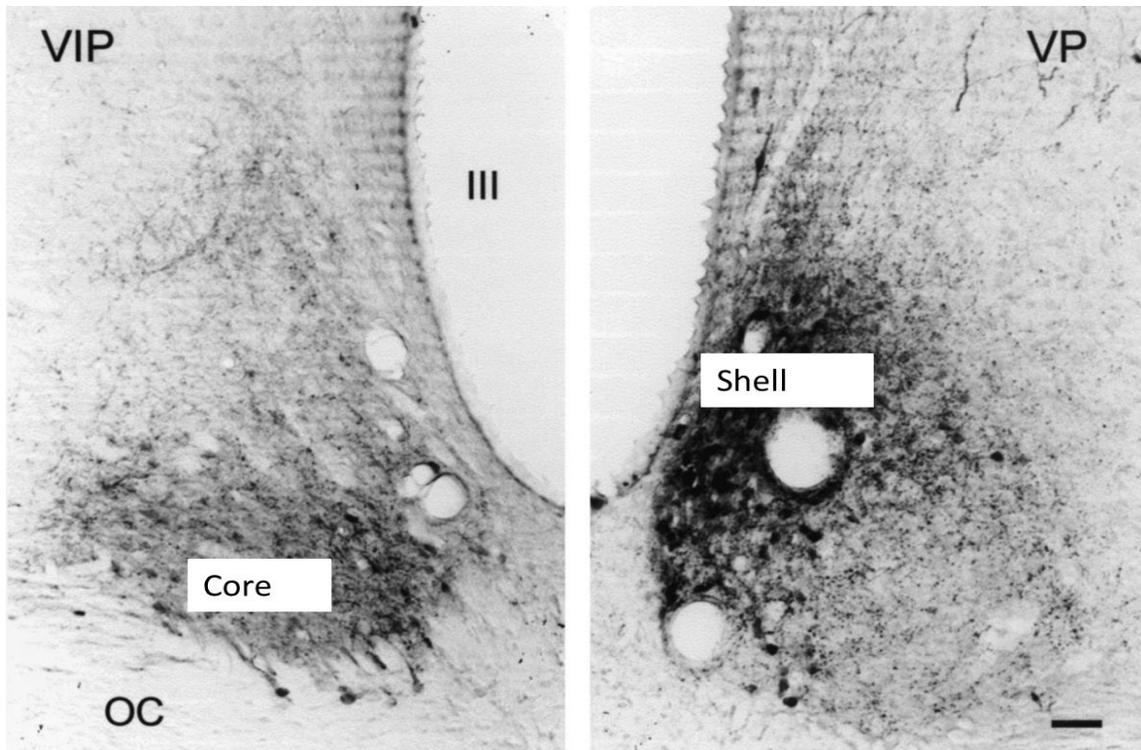


Figura 5. Ubicación del NSQ y las regiones que lo conforman. Tomado de Antle y Silver, 2005.

### ***Anatomía y fisiología del NSQ***

En el ratón la región llamada “Shell” se caracteriza por tener neuronas pequeñas y elongadas con núcleo grande y algunos organelos celulares. Por estas neuronas corre arginina vasopresina (AVP) (Evans y col., 2011). La región llamada “Core” se caracteriza por tener una baja densidad de neuronas esféricas, las cuales son inmunoreactivas al péptido intestinal VIP y péptido liberador de la gastrina (GRP), lo que sugiere que juegan papeles diferentes en la generación y regulación de los ritmos circadianos (Figura 6) (Evans y col., 2011).



**Figura 6.** Citoarquitectura del NSQ de rata, se muestra la distribución de las neuronas VIPérgicas y VPérgicas en el “Core” y “Shell” respectivamente) (Tomado de van Esseveldt y col., 2000).

La región del “core” comprende el 60 ó 70 % del núcleo (Morin, 2007). Se ha reportado angiotensina II, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), factor liberador de la corticotropina (CRF), galanina, sustancia P, hormona liberadora de la tirotropina y dinorfina (van Esseveldt y col., 2000).

### ***Aferencias y eferencias del NSQ***

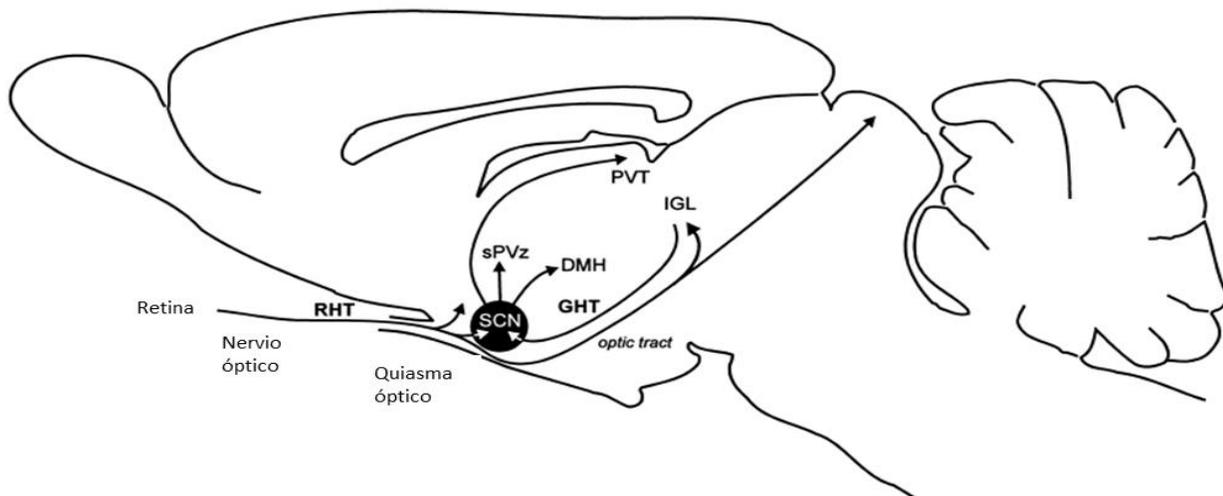
En la región del “Core” el péptido más abundante es el VIP, mientras que en el “Shell” es VP (Mahoney y Smale, 2005). Hablar de las aferencias y eferencias del NSQ en función de ésta división anatómica resulta difícil, ya

que ambas regiones “Core” y “Shell” presentan tanto terminaciones VIPérgicas como VPérgicas (Romijn y col., 1997; Buijs y col., 2003; Kriegsfeld y col., 2004).

Con la ayuda de trazadores retrógrados inyectados en el NSQ, se ha podido establecer las eferencias que se proyectan hacia diferentes regiones del hipotálamo como son: las cercanas al núcleo paraventricular, al MPO, al núcleo subparaventricular (sPVN) y al núcleo dorso medial (DMH) (Buijs y col., 2006). Fuera del hipotálamo, el NSQ inerva al núcleo geniculado lateral, la parte dorsal de tálamo, el área periventricular (Moga y col., 1995), el cuerpo geniculado ventrolateral y la IGL. Otras fibras cursan hacia la región retroquiasmática y terminan en el núcleo arqueado y ventromedial. Cabe destacar que la zona subparaventricular presenta conexiones bidireccionales con el NSQ (Aguilar-Robledo y col., 2004).

Tres de las aferencias más estudiadas del NSQ son el tracto retino-hipotalámico (TRH), el tracto genículo-hipotalámico y las fibras serotoninérgicas provenientes de los núcleos mesencefálicos del rafé (Morin y Allen, 2006). La información fótica ambiental es necesaria para la sincronización del marcapaso, ya que la información lumínica es captada por las células ganglionares de la retina que contienen un ftopigmento llamado melanopsina. Los axones de estas neuronas forman el TRH que llega principalmente a la parte ventrolateral del NSQ, donde liberan glutamato, N-N-Acetil aspartil glutamato (NAAG) o el péptido hipotalámico activador de la adenilato ciclasa (Aguilar-Robledo y col., 2004).

La región del “Core” presenta aferencias directas del TRH y IGL, la región del “Shell” recibe proyecciones del sistema límbico e hipotálamo (Abrahanson y Moore, 2001). La información serotoninérgica inerva la zona ventral y medial del NSQ, pero con una mayor densidad la zona ventral (Morin, 2013). El núcleo paraventricular del tálamo (PVT) presenta conexiones recíprocas con el NSQ (Figura 7).



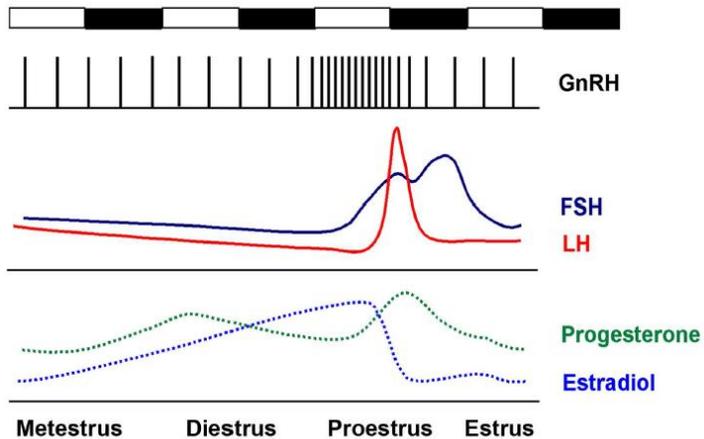
**Figura 7.** Vista longitudinal del cerebro de la rata, que ilustra la localización de las aferencias neurales del NSQ provenientes del tracto retinohipotalámico (RHT) y de la hojaleta integerculada (IGL), así como las eferencias hacia la zona subparaventricular del hipotálamo (sPVz), núcleo dorsomedial (DMH) y el núcleo paraventricular del tálamo (PVT) (Imagen tomada de van Esveldt y col., 2000).

También se ha propuesto que la IGL pueda ser un relevo en la transmisión de información no fótica al NSQ, por ejemplo ruido, temperatura, movimiento, etc. (Aguilar-Robledo y col., 2004).

## ***Participación del NSQ en la regulación de la secreción de GnRH***

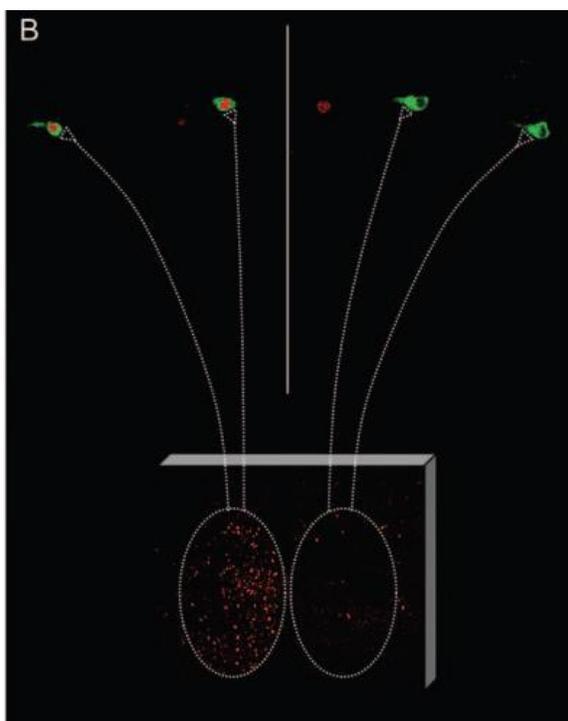
El pulso de liberación de la GnRH es regulado por diversos factores ambientales como el ciclo luz-oscuridad, las feromonas, las hormonas esteroides ováricas, así como por aferencias provenientes de diferentes partes del sistema nervioso central y por algunos neurotransmisores como VIP, VP, ácido gamma-aminobutírico (GABA), los opiodes, glutamato y kisspeptina (Herbison, 2006).

En la tarde del proestro los pulsos de secreción de GnRH se ven incrementados en frecuencia y amplitud, esta neurohormona se libera en el hipotálamo mediobasal y facilita la secreción de LH y FSH (Figura 8). Las neuronas GnRHérgicas son reguladas por un mecanismo que incluye dos tipos de información; la retroalimentación por parte de los estrógenos provenientes de los folículos ováricos, y una señal nerviosa por parte del NSQ. La interrupción de cualquiera de estas señales resulta en anovulación (Miller y Takahashi, 2014). De manera natural, las señales nerviosas que se originan en el NSQ son enviadas hacia POA con una ritmicidad diaria. Cuando la rata es tratada de manera crónica con altas concentraciones de estradiol se puede observar múltiples picos de LH, pero siempre restringidos a la tarde (Legan y Karsch, 1975).



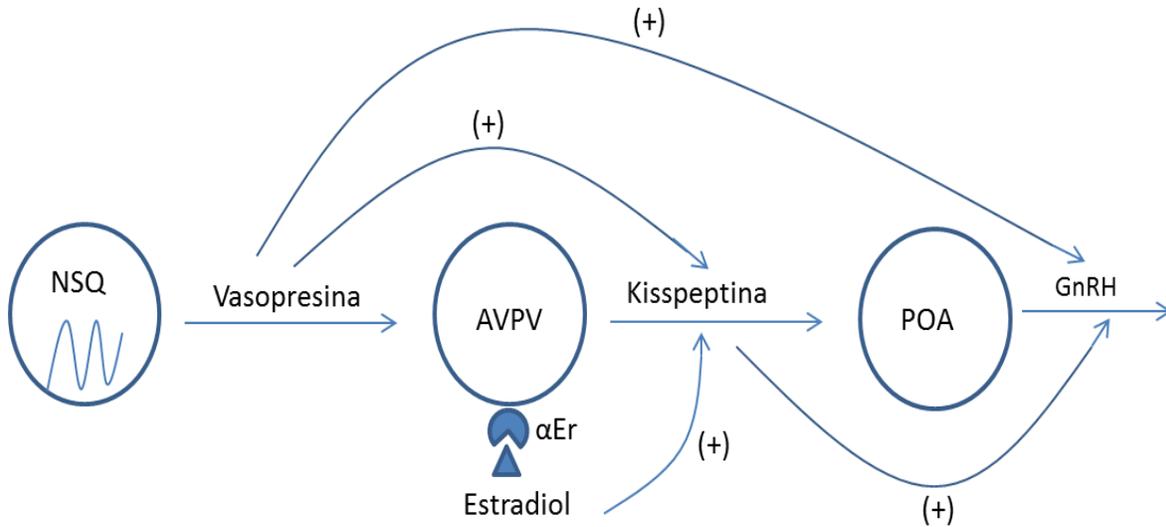
**Figura 8:** En la tarde del proestro, la alta concentración de estradiol induce la liberación de GnRH por parte del hipotálamo, el cual estimula el pico de LH y FSH.

Por inmunohistoquímica se ha identificado conexiones directas entre el NSQ y neuronas GnRHérgicas (Figura 9) y conexiones indirectas en las cuales neuronas del NSQ hacen sinapsis con interneuronas adyacentes a neuronas GnRHérgicas del POA (Van der Beek y col., 1997; de la iglesia y col., 2003). Se asume que el NSQ y las neuronas GnRHérgicas de POA no son reguladas por el estradiol, ya que ambas estructuras no expresan receptores  $\alpha$ Er (Shinohara y col., 2000), responsables de la retroalimentación positiva. Esto ha llevado a sugerir que existe una zona en la cual converge la señal del NSQ y la señal estrogénica, que podría ser representada por el núcleo anteroventral periventricular (AVPV), el cual si presenta receptores a estrógenos y además libera kisspeptina, un potente estimulador de la liberación de GnRH. La interacción de AVPV con el NSQ y la región de POA se muestra en la Figura 10 (Vida y col., 2010).



**Figura 9.** La activación de las neuronas de GnRH es asimétrica en ratas Split ovariectomizadas + E2. Las imágenes confocales muestran los somas de neuronas GnRHérgicas activadas (verde) que expresan c-Fos en sus núcleos (rojo). Notese que existe una activación ipsilateral entre las neuronas GnRHérgicas y el NSQ (óvalos punteados dentro cuadrado resaltado). (de la Iglesia y Schwartz, 2006).

La secreción cíclica de GnRH también es regulada por el VIP. En la rata ovariectomizada o intacta, la administración de VIP en el NSQ o en el tercer ventrículo reduce la amplitud del pico preovulatorio de LH (Weick y Stobie, 1992; Van der Beek y col., 1997). En hembras ovariectomizadas, tratadas con estrógenos y con lesión de NSQ, la inyección intracraneal de AVP restablece el pico de LH (Palm y col., 1999).



**Figura 10:** Representación esquemática de la liberación de GnRH del área preóptica anterior (POA), y su regulación por parte del núcleo anteroventral periventricular (AVPV) que presenta  $\alpha$ Er y sus respectivos neurotransmisores (A partir de la información de Funabashi y col., 2000; Herbison, 2006; Vida y col., 2010).

En co-cultivos de neuronas de NSQ con POA medial, se libera de forma simultánea Arginina-VP y GnRH (Funabashi y col., 2000). Se ha propuesto que la vía por la cual Arginina-VP regula la liberación de GnRH no es directa, sino que el NSQ manda información hacia AVPV y de aquí hacia mPOA, donde hay receptores a vasopresina del tipo  $V_{1a}$  (Ostrowski y col., 1994, Vida y col; 2010).

La acetilcolina (ACh) fue el primer neurotransmisor identificado en la regulación de los ritmos circadianos. Los estudios electrofisiológicos indican la excitación de algunas neuronas del NSQ por agentes colinérgicos (Reghunandanan y Reghunandanan, 2006).

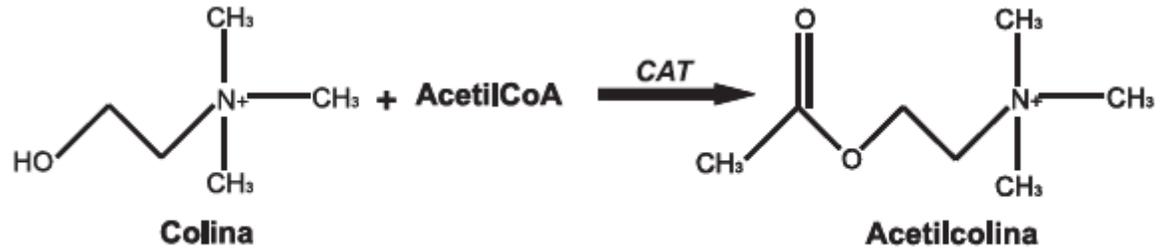
## ***Acetilcolina***

La acetilcolina es considerada como un neurotransmisor clásico de la inervación parasimpática ya que fue el primer neurotransmisor caracterizado del sistema nervioso central y sistema nervioso periférico (Goodman y Gilman, 2001).

Todas las regiones de la corteza cerebral están inervadas por fibras que transportan acetilcolina (Flores y Segura, 2005).

La ACh participa en la regulación de diversas funciones, como el ciclo vigilia/sueño, activación cortical, en procesos de memoria y asociación, y poco se conoce sobre su participación en la regulación de las funciones ováricas. Se consideran neuronas colinérgicas aquellas que liberan ACh (Flores y Segura, 2005).

La ACh se sintetiza en el soma de las neuronas a partir de la colina y de la acetil CoA, esta reacción de síntesis es catalizada por la enzima colina acetil transferasa (CAT) (Figura 11).



**Figura 11.** Síntesis de acetilcolina a partir de colina y acetil-CoA. Tomada de Flores y Segura, 2005.

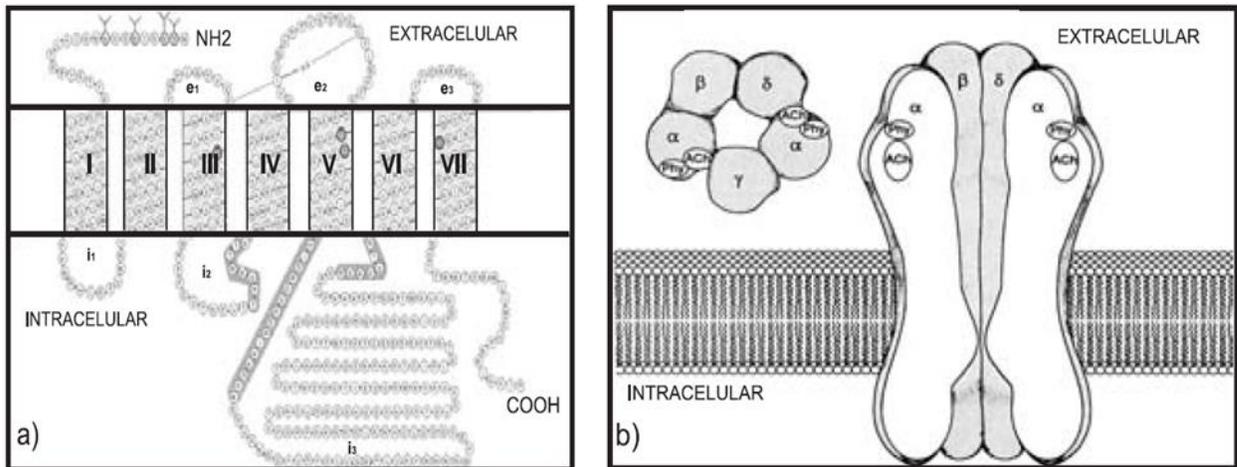
La ACh se libera de las vesículas de las terminales nerviosas presinápticas y se une a cualquiera de los dos receptores de superficie celular: los nicotínicos o ionotrópicos y los muscarínicos o metabotrópicos. Estos dos tipos de receptores de la ACh son considerablemente diferentes, tanto en estructura como en función (Figura 12) (Felder, 1995).

Ambos tipos de receptores comparten la propiedad de ser activados por el neurotransmisor endógeno la ACh, y que se expresan tanto en las células neuronales como no neuronales (Albuquerque y col., 2009).

*Los receptores nicotínicos* son de tipo ionotrópico, son sensibles a la activación por la nicotina, cuya actividad es inducida en microsegundos (Albuquerque y col., 2009). Son canales iónicos que poseen un sitio de unión para el neurotransmisor, responsable de transmitir la señal hacia el interior de la célula. Están formados por 5 subunidades: 2 alpha, 1 beta, 1 gamma y 1 delta. Cada subunidad está constituida por una proteína que atraviesa 4 veces la membrana, con extremos C-ter y N-ter extracelulares (Figura 12A) (Albuquerque y col., 2009). Las 5 subunidades forman un poro central. Por este poro, al unirse la ACh a su sitio de unión provoca la apertura del canal

iónico, que permite la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  a favor del gradiente de concentración, produciéndose la despolarización de la membrana (López, 2010).

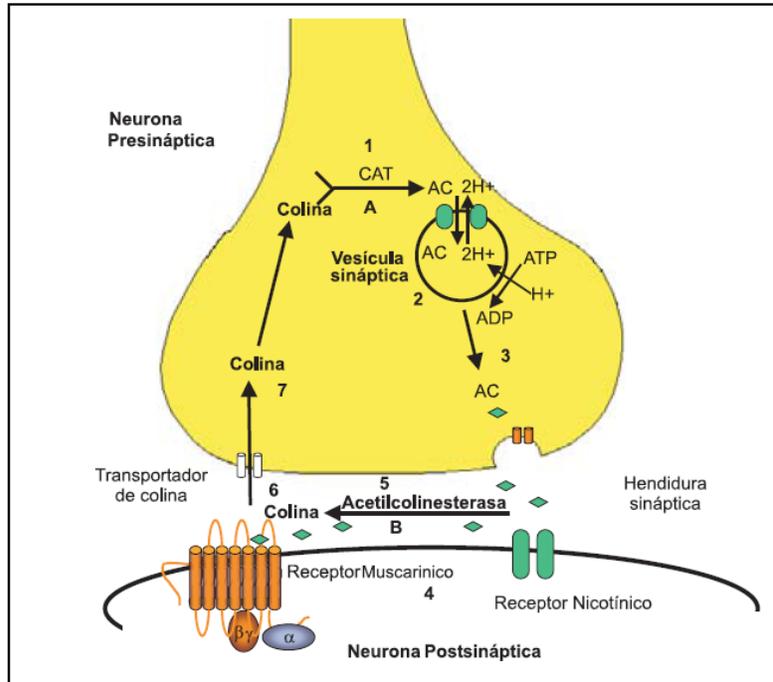
Los receptores muscarínicos son activados por la muscarina, una toxina de la *Amanita muscaria*, e inhibida por la atropina, una toxina de la *Atropa belladonna*, un miembro de la familia de las solanáceas (Albuquerque y col., 2009). Interactúan con proteínas G unidas a nucleótidos de guanina. Los receptores acoplados a proteínas G, incluyendo a los muscarínicos presentan una proteína que atraviesa la membrana plasmática 7 veces, dando por resultado 7 dominios transmembranales conectados por 3 bucles extracelulares y 3 bucles intracelulares (Figura 12B) (Felder, 1995). Los receptores muscarínicos se encuentran distribuidos en muchos órganos y tejidos como el corazón, músculo liso y glándulas exocrinas. Mediante estudios de biología molecular se han identificado 5 genes  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ ,  $m_4$  y  $m_5$  que codifican para la síntesis de los receptores  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_5$  (Flores y Segura, 2005). La activación de receptores  $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_5$  resulta en la activación de las proteínas  $G_s$  y en consecuencia la activación del segundo mensajero AMPc, este segundo mensajero se forma a partir de ATP por la acción de adenilciclasa. Los efectos de la formación de AMPc puede deberse a la activación de proteincinasa C (PKC) y la fosforilación de proteínas, la inhibición de fosfatasas, la regulación directa de canales iónicos y la activación de la expresión de genes (Flores y Segura, 2005).



**Figura 12.** a) Estructura del receptor muscarínico. b) Estructura del receptor nicotínico. Imagen tomada y modificada de Flores y Segura, 2005.

La ACh sintetizada en el citoplasma de la neurona puede ser liberada directamente a la hendidura sináptica o bien, ser transportada al botón sináptico por medio de vesículas donde por exocitosis, es liberada a la hendidura sináptica. Una vez en la hendidura sináptica este neurotransmisor se une a los receptores de membrana específicos de la neurona receptora que traducen las señales en un cambio conformacional (Figura 13) (Flores y Segura, 2005).

En el SNC existe un patrón ritmo circadiano en la liberación de ACh, donde existe una mayor secreción de este neurotransmisor durante el día y por la noche las concentraciones son bajas (Hut y Van der Zee, 2011). En especies nocturnas los agonistas colinérgicos alteran la fase del ritmo circadiano cuando se inyecta por vía intraventricular o directamente en el NSQ.



**Figura 13.** Esquema que representa la sinapsis colinérgica. Colina acetil transferasa (CAT), Acetil colina (AC). Tomado de Flores y Segura, 2005.

### ***NSQ y sistema colinérgico***

Se ha sugerido que la acetilcolina juega un papel importante en la mediación de la información fótica (Castillo-Ruiz y Nunez, 2007), hipótesis que se basa en el hecho de que al inyectar el carbacol, agonista colinérgico no selectivo, causa un cambio de fase en los ritmos circadianos, similar a lo inducido por la luz (Zatz y Brownstein, 1979; Zatz y Herkenham, 1981). El NSQ de rata presenta receptores muscarínicos, del tipo M1 a M5, y nicotínicos del tipo Nn (Liu y Gillete, 1996). El cultivo de rebanadas del NSQ en presencia de diversos agonistas y antagonistas colinérgicos *muestra* cambio de fase de la tasa de disparo neural, siendo el carbacol (un agonista a acetilcolina) el causante del avance de fase más significativo, seguido de muscarina y por último, nicotina (Liu y Gillete, 1996).

La presencia del transportador vesicular de acetilcolina en el NSQ, permite postular la existencia de somas colinérgicos (Liu y Gillette, 1996).

Con ayuda de trazadores retrógrados y anterógrados se han podido identificar las estructuras del sistema nervioso central con las que el NSQ intercambia información colinérgica. El NSQ recibe proyecciones colinérgicas del complejo nuclear basal, con mayor densidad de estas fibras en la sustancia innominada y el núcleo basal magnocelular, algunas otras células también fueron marcadas en el septum medial y en la banda diagonal de broca (Madeira y col., 2004; Bina y col., 1993). Asimismo, existe intercambio de información colinérgica entre el NSQ y la zona baja subparaventricular (Castillo y Nunez, 2007). La actividad de estas fibras colinérgicas está relacionada con la información fótica del tracto retinohipotalámico y existen diferencias en el número de fibras colinérgicas presentes en el NSQ entre los mamíferos diurnos y nocturnos. Estos resultados han llevado a los autores a sugerir que el sistema colinérgico regula de forma circádica la información fótica (Castillo y Nunez, 2007).

La ovulación es regulada de manera circádica, entre otros factores, por el sistema colinérgico. Aseveración que se apoya en el hecho de que el bloqueo del sistema por la administración de atropina resulta en un bloqueo total de la ovulación si se administra a las 09:00 o 13:00 hrs del diestro 1, mientras que no tiene efecto si se inyecta en el día del proestro (Domínguez y col., 1982). Para el análisis de sistema colinérgico en POA ó NSQ se ha recurrido al uso de agonistas o bien de antagonistas colinérgicos como la atropina.

## ***Atropina***

La atropina es un agente antagonista colinérgico. Los antagonistas colinérgicos, son fármacos que se unen a los receptores colinérgicos para bloquear el acceso de la acetilcolina y prevenir su acción en las células. También se les conoce como bloqueadores colinérgicos o anticolinérgicos (Mendoza, 2008).

La atropina es capaz de bloquear el sistema parasimpático gracias a dos características importantes:

- 1) Su afinidad por los receptores muscarínicos es mayor que la de ACh. Por lo tanto, la atropina va a competir con la ACh endógena por ocupar estos receptores. La atropina tiene afinidad específica por los receptores muscarínicos, no tiene afinidad por los nicotínicos neuronales ni musculares (Mendoza, 2008).
  
- 2) La atropina unida a los receptores muscarínicos, no puede estimularlos, ya que carece de actividad intrínseca, por lo tanto, la molécula de atropina en sí misma no tiene ningún efecto en órganos inervados por fibras parasimpáticas (Mendoza, 2008).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El NSQ presenta varios sistemas de neurotransmisores, uno de ellos es el sistema colinérgico.

El sistema colinérgico central regula tanto el reloj circadiano y el ciclo sueño-vigilia, y participa en el control de la excitabilidad neuronal en el núcleo supraquiasmático que alberga el reloj circadiano. Además existe una vía multisináptica que conecta el NSQ directa o indirectamente con neuronas GnRHérgicas de POA en las que participa VP, VIP, Kisspeptina, GABA, neuropéptido Y, entre otros.

Estas evidencias anatómicas nos llevan a plantear que el sistema colinérgico del NSQ, podría estar regulando el patrón de secreción de la GnRH y con ello modular la producción y liberación de la hormona LH y FSH. Estas gonadotropinas van actuar sobre el ovario regulando el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico que va a culminar con la ovulación.

Al momento, no se conoce si el sistema colinérgico del NSQ regula la ovulación y la secreción de hormonas esteroideas ováricas en función de la hora del día. Para analizar esta posibilidad, en el presente estudio se realizó el bloqueo del sistema colinérgico del NSQ por la micro-inyección de un antagonista muscarínico no selectivo, en el lado izquierdo o derecho del núcleo, a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro, y se evaluó la respuesta ovulatoria al estro vaginal inmediato y la concentración de progesterona y estradiol.

## **HIPÓTESIS**

El sistema colinérgico regula la actividad nerviosa y metabólica del reloj circadiano localizado en el NSQ, éste mediante sus eferencias regula la secreción de GnRH, por lo que el bloqueo de los receptores muscarínicos, por la micro-inyección de atropina, resultará en la alteración de la secreción de la GNRH, que se traducirá en el bloqueo de la ovulación y la alteración en la concentración de hormonas esteroideas en plasma, y dependerá del lado del NSQ inyectado y de la hora a la cual se administre la atropina.

# ***OBJETIVOS***

## ***GENERAL***

- Evaluar en la rata los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en el NSQ Izquierdo (NSQ-I) o NSQ Derecho (NSQ-D) a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro sobre la ovulación y la concentración de hormonas esteroides en suero sanguíneo.

## ***PARTICULARES***

- ✓ Estudiar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en el NSQ-I o NSQ-D sobre la tasa de animales ovulantes en el día del estro vaginal inmediato.
- ✓ Evaluar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en el NSQ-I o NSQ-D sobre el número de ovocitos liberados en el día del estro vaginal inmediato.
- ✓ Estudiar los efectos del bloqueo de los receptores muscarínicos en el NSQ-I o NSQ-D sobre la concentración de progesterona y estradiol en el día del estro vaginal inmediato.

## MÉTODO

Se utilizaron ratas hembra adultas vírgenes de la cepa CII-ZV, con libre acceso al agua y alimento, mantenidas en condiciones de iluminación controlada de 14 hrs de luz y 10 hrs de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 hrs) y temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . En todos los casos se siguió lo establecido por la ley de protección animal para el uso de animales de experimentación. El ciclo estral de los animales fue monitoreado por la toma diaria de frotis vaginales. Solo se utilizaron los animales que presentaron al menos 2 ciclos consecutivos de 4 días de duración.

Se establecieron 5 grupos de trabajo:

- Grupo con micro-inyección de atropina (ATR-NSQ-D o ATR-NSQ-I)

En el día del proestro a las 9:00 ó 19:00 hrs, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico en una dosis de 25 mg/Kg de peso corporal, vía intraperitoneal. Una vez anestesiados los animales, se colocaron en el estereotáxico, se afeitó la cabeza, se seccionó el cuero cabelludo, se localizó el punto bregma y siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (2004), se realizó un orificio con un taladro odontológico. Se bajó la aguja de micro-inyección conectada a la bomba de micro-inyección y se administró la solución de atropina en un minuto (62.5 ng disueltos en 0.3  $\mu\text{L}$  de solución salina) en el NSQ-I o NSQ-D, terminada la cirugía se cerró la herida.

- Grupo con micro-inyección de vehículo (VH-NSQ-D o VH-NSQ-I).

Los animales fueron manipulados como en el caso anterior, pero sólo se micro-inyectó en el NSQ-I o NSQ-D 0.3 µL de solución salina (NaCl 0.9% ) que fungió como vehículo.

- Grupo con operación simulada (OS-NSQ-I o OS-NSQ-D)

Una vez realizada la trepanación se procedió a realizar la operación simulada en el NSQ-I o NSQ-D, que consistió en bajar la aguja de micro-inyección por un minuto e inmediatamente después se retiró de la zona.

Terminadas las cirugías lo animales se regresaron a sus cajas y al día siguiente se tomó el frotis vaginal.

- Grupo con pentobarbital sódico (PB)

Los animales fueron anestesiados con una dosis de 25 mg/Kg de pesos corporal vía intraperitoneal.

- Testigo absoluto (TA)

Otro grupo más de comparación estuvo conformado por animales intactos sacrificados a las 9:00 ó 19:00 hrs del estro vaginal.

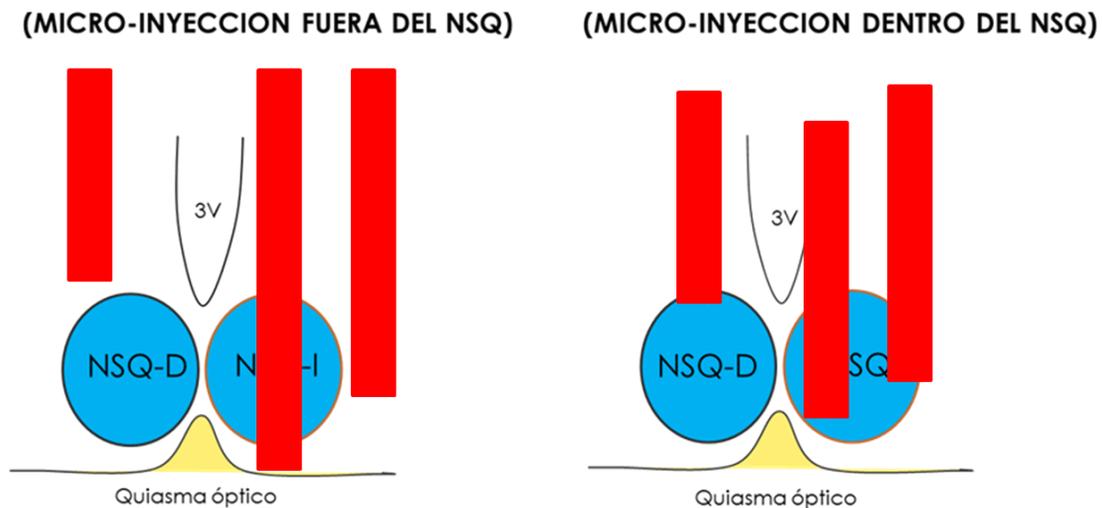
### ***Autopsia***

Todos los animales de los diferentes grupos se sacrificaron por decapitación en el primer estro vaginal después de las operaciones, la sangre fue colectada en tubos de ensaye y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos. Se separó el suero, se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C

hasta el momento de la cuantificación de progesterona y estradiol por radioinmunoanálisis (RIA). A los animales se les extrajeron los oviductos y con ayuda de un microscopio estereoscópico se contaron los ovocitos liberados.

### ***Análisis de trayectoria de la aguja de micro-inyección***

Para el análisis de trayectoria de la aguja de micro-inyección, los cerebros fueron extraídos al momento de la autopsia y colocados en paraformaldehído al 10% por lo menos tres días. Después con ayuda de un vibrátomo se realizaron cortes coronales de 100 µm de grosor. Los cortes de cerebro fueron teñidos siguiendo la técnica de Nissl. Los resultados fueron analizados en dos grupos: 1) en aquellos en donde la micro-inyección se localizó dentro del NSQ y 2) y los animales en donde la micro-inyección se localizó por fuera del NSQ (Figura 14).



**Figura 14.** En línea roja se representa la trayectoria de la aguja de micro-inyección.

## **Cuantificación de hormonas esteroideas**

La concentración de progesterona y estradiol en suero fue cuantificada por RIA de fase sólida, mediante estuches comerciales Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, USA).

A los tubos de polipropileno que contienen el anticuerpo específico para cada hormona se les adicionó 100  $\mu\text{m}$  de la muestra problema y después se agregó 1 mL de hormona marcada con  $\text{I}^{125}$ , se agitó en un vortex durante 1 min y se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego se determinó la cantidad de radioactividad con la ayuda de un contador de rayos gamma modelo Cobra 5005. Con la ayuda de una curva estándar se calculó la concentración de hormonas esteroideas. La concentración de progesterona se expresó en ng/mL, mientras que la de estradiol en pg/mL de suero.

### ***Análisis estadístico***

La tasa de animales ovulantes se analizó por la prueba exacta de Fisher para proporciones.

El número de ovocitos liberados se analizó por medio de la prueba de U de Mann-Whitney.

La concentración de progesterona y estradiol en suero se analizó por la prueba “t” de student.

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  e.e.m. y se consideraron como significativos aquellos datos cuyas diferencias fuera igual o menor a 0.05.

## RESULTADOS

### **EXPERIMENTO 1: EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAPERITONEAL DE PENTOBARBITAL SÓDICO A LAS 9:00 ó 19:00 HRS DEL DÍA PROESTRO SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA.**

#### RESPUESTA OVULATORIA

La administración de PB en la mañana del proestro no modificó la tasa de animales ovulantes, ni el número de ovocitos liberados por ambos ovarios, en comparación con el testigo absoluto (Figura 15).

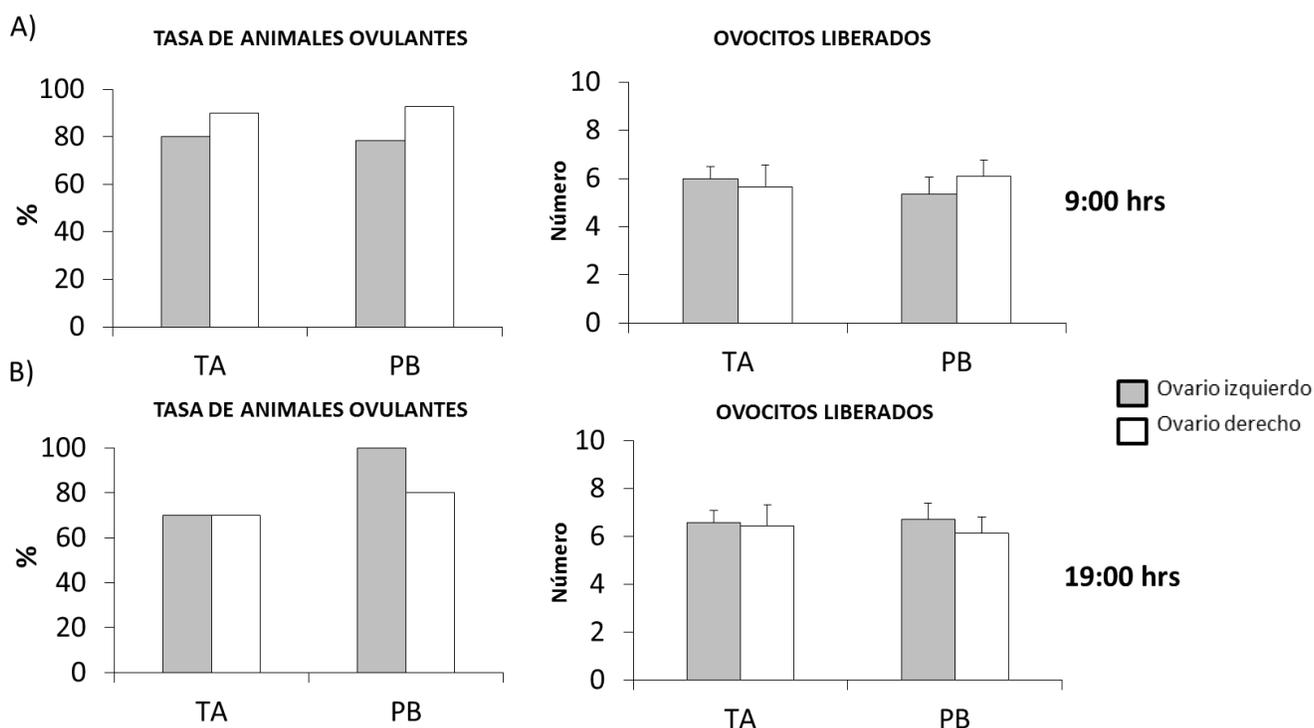
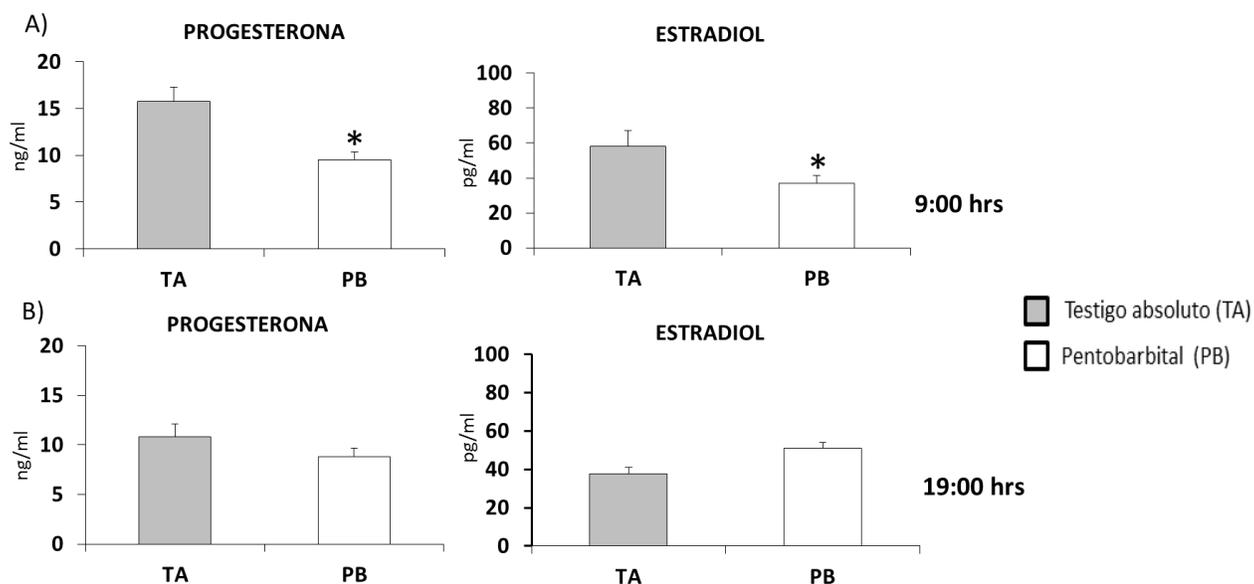


Figura 15: Porcentaje de animales ovulantes y la media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados por ambos ovarios de animales testigo absoluto (TA) o con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PB) como anestésico, realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal.

## PROGESTERONA Y ESTRADIOL

A las 9:00 hrs del proestro, la administración de pentobarbital sódico causó un decremento estadísticamente significativo en la concentración de progesterona y estradiol en comparación con su grupo testigo (Figura 16A). El PB a las 19:00 hrs no modificó la concentración de las hormonas (Figura 16B).



\* $p < 0.05$  vs. TA.

Figura 16: Media  $\pm$  e.e.m de la concentración de progesterona y estradiol en suero de animales testigo absoluto (TA) o con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PB) como anestésico, realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs. del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal.

**EXPERIMENTO 2: EFECTO DE LA OPERACIÓN SIMULADA EN EL NSQ IZQUIERO O DERECHO A LAS 9:00 ó 19:00 HRS DEL PROESTRO SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA**

**RESPUESTA OVULATORIA**

La operación simulada realizada a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro no modificó la tasa de animales ovulantes.

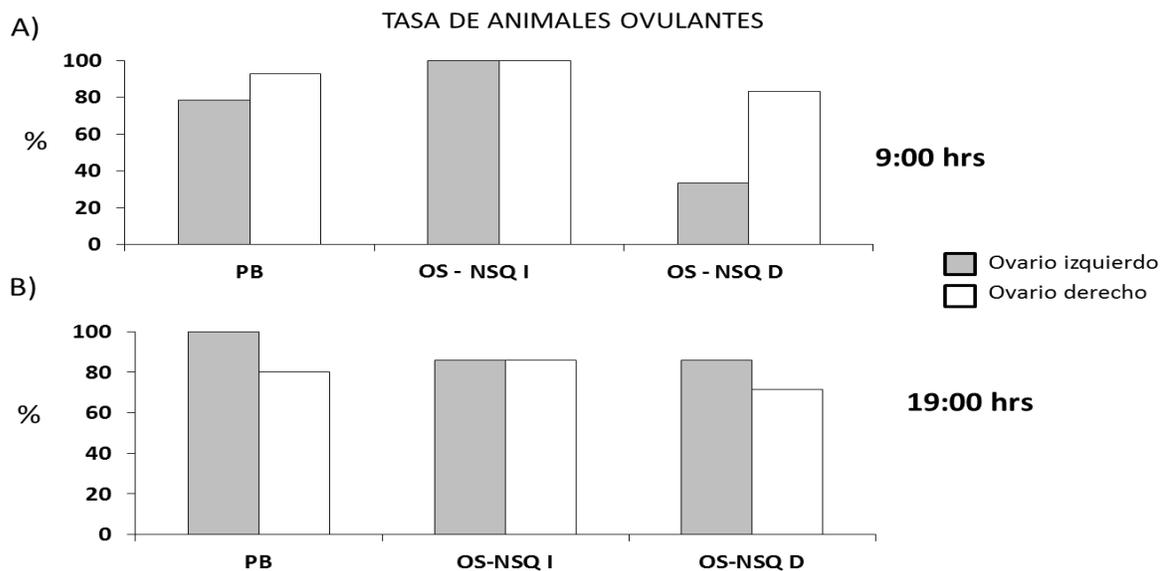
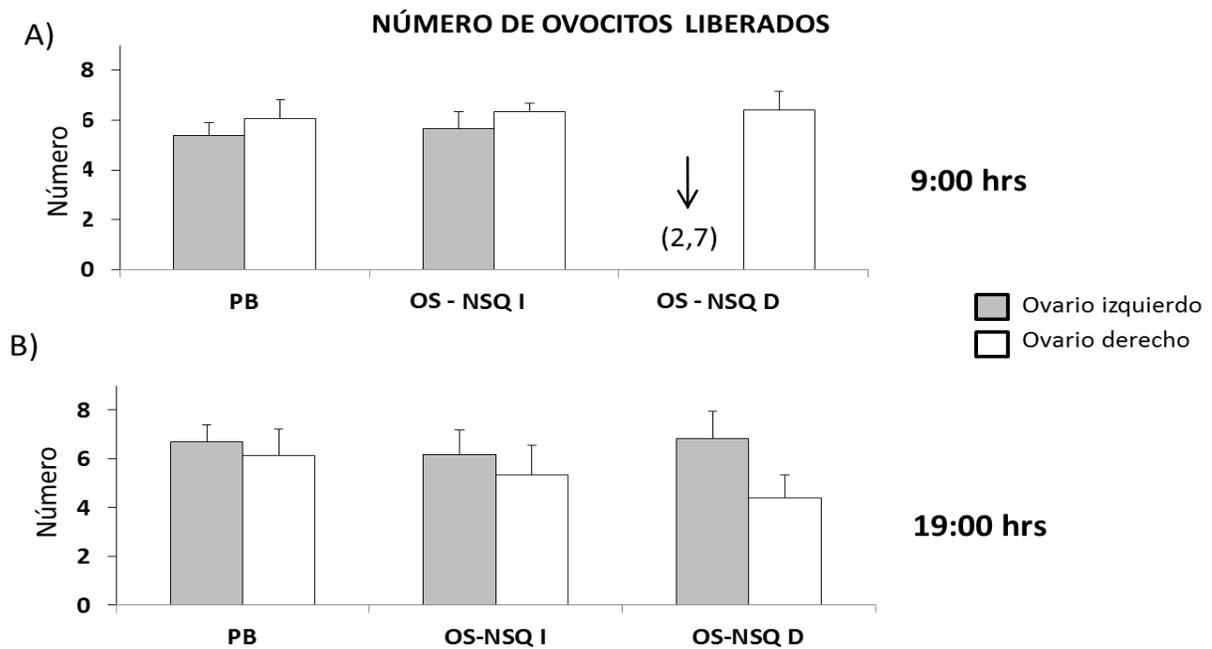


Figura 17: Porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho de animales con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PB) como anestésico, y animales con operación simulada en el núcleo supraquiasmático izquierdo (OS-NSQ I) o derecho (OS-NSQ D), realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal.

En la mañana del proestro, la operación simulada en el núcleo supraquiasmático derecho disminuyó la cuota ovulatoria por el ovario izquierdo (Figura 18A). Esta cirugía en la tarde del proestro no modificó la respuesta ovulatoria (Figura 18B).



**Figura 18:** Media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberados por ambos ovarios de animales con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PB) como anestésico y animales con operación simulada en el núcleo supraquiasmático izquierdo (OS-NSQ I) o derecho (OS-NSQ D), realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs. del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal. Los números entre ( ) representan al número de ovocitos liberados cuando ovularon dos animales. La flecha indica el bloqueo de la ovulación.

## PROGESTERONA Y ESTRADIOL

La operación simulada en el NSQ-Izquierdo o derecho realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro, no modificó la concentración de progesterona ó estradiol en suero (Figura 19).

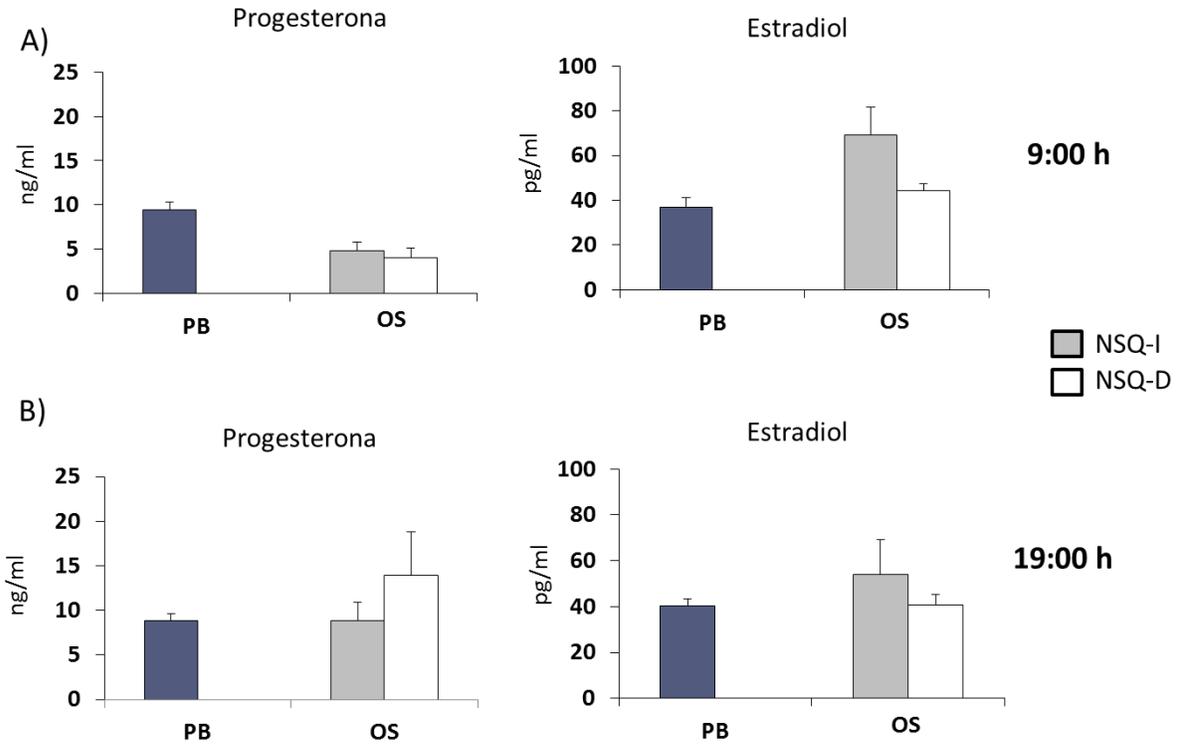


Figura 19: Media  $\pm$  e.e.m de la concentración de progesterona y estradiol en suero de animales con inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (PB) como anestésico o con operación simulada (OS) en núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D) realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal.

**EXPERIMENTO 3: EFECTO DE LA MICRO-INYECCIÓN DE SOLUCIÓN SALINA COMO VEHÍCULO EN EL NSQ IZQUIERDO O DERECHO A LAS 9:00 HRS O 19:00 HRS DEL PROESTRO SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA**  
**RESPUESTA OVULATORIA**

A las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro, la micro-inyección de solución salina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho, no modificó la tasa de animales ovulantes (Figura 20).

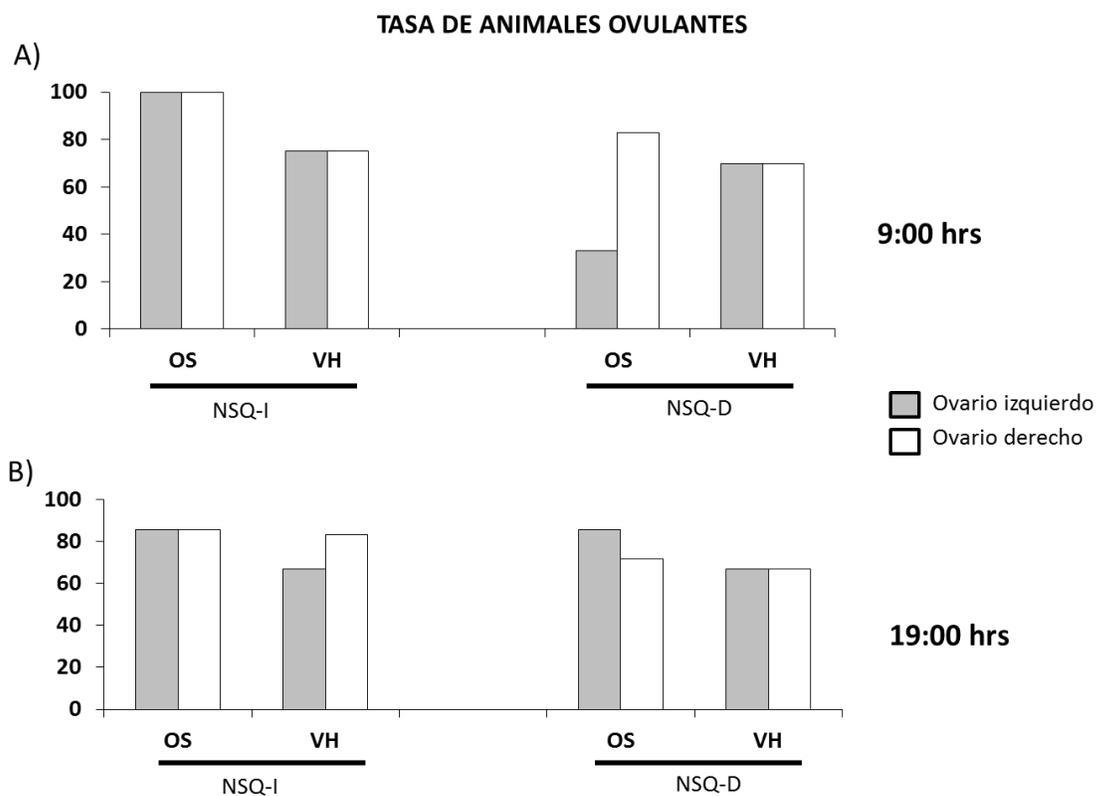


Figura 20: Porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo o derecho de animales con operación simulada (OS) o con micro-inyección de solución salina como vehículo (VH) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ I) o derecho (NSQ D), realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal.

A las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro, la micro-inyección de solución salina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho no modificó significativamente el número de ovocitos liberados, en comparación al grupo con operación simulada (Figura 21).

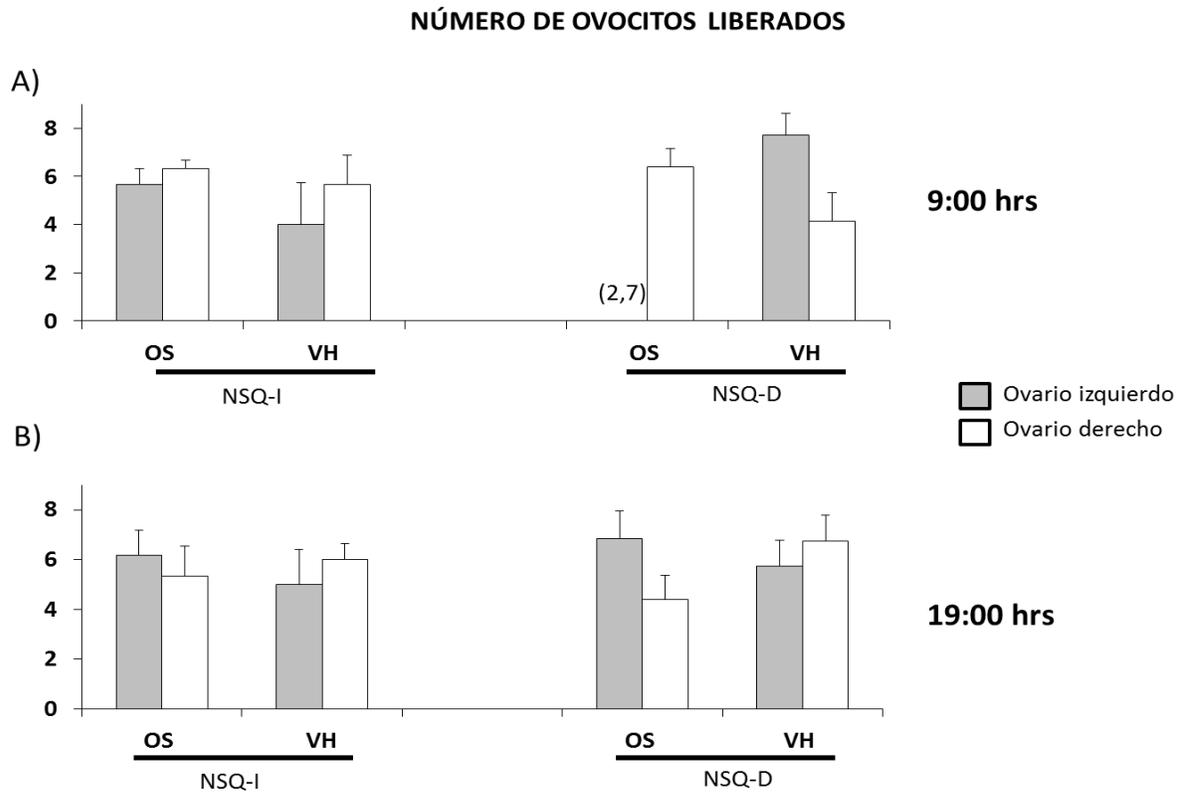


Figura 21. Media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho de ratas con operación simulada (OS) o con micro-inyección de solución salina como vehículo (VH), en el núcleo supraquiasmático Izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D), a las 9:00 ó 19:00 hrs del día del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal. Los números entre ( ) representan el número de ovocitos liberados por dos animales.

## PROGESTERONA Y ESTRADIOL

La administración de vehículo en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro, no modificó la concentración de progesterona y estradiol en suero (Figura 22).

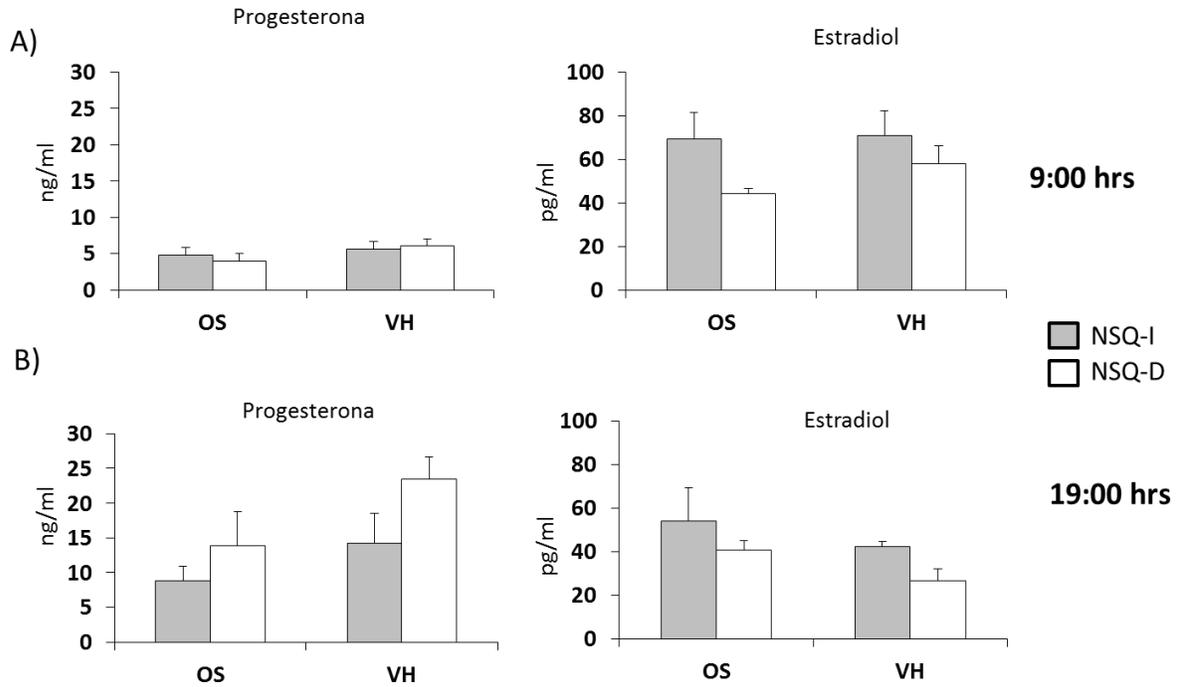
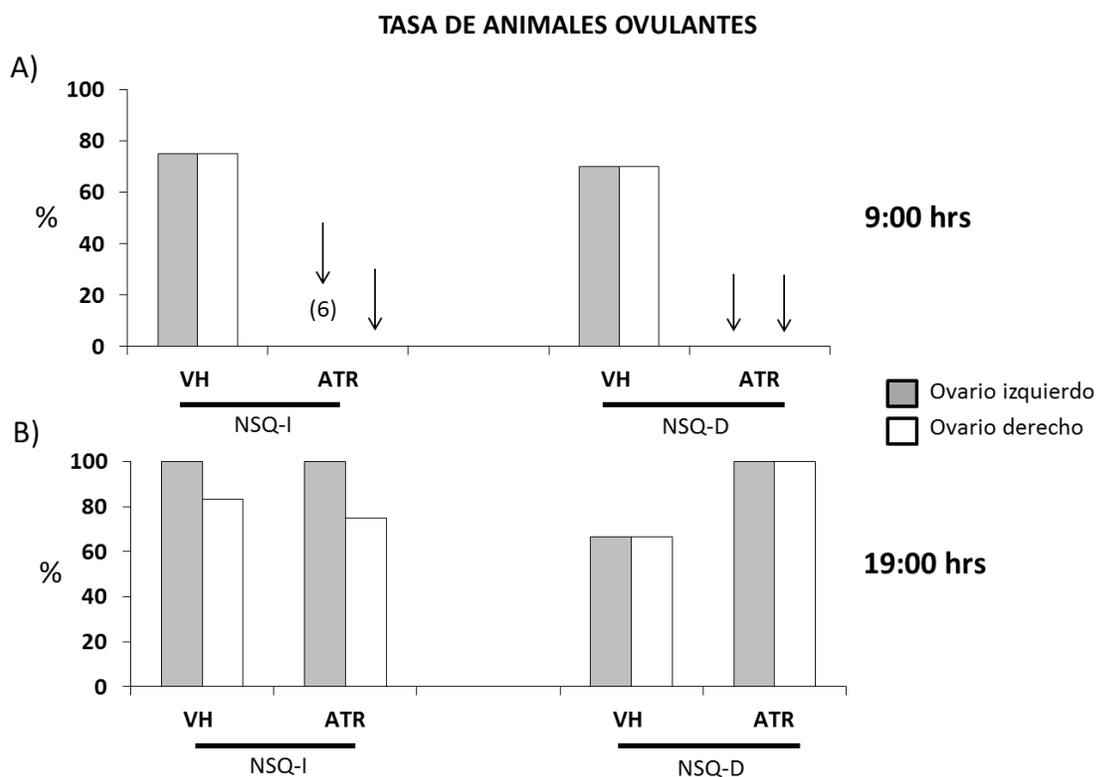


Figura 22: Media  $\pm$  e.e.m de la concentración de progesterona y estradiol en suero. Grupos con operación simulada (OS) o con micro-inyección de solución salina como vehículo en núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D), realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs. del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal.

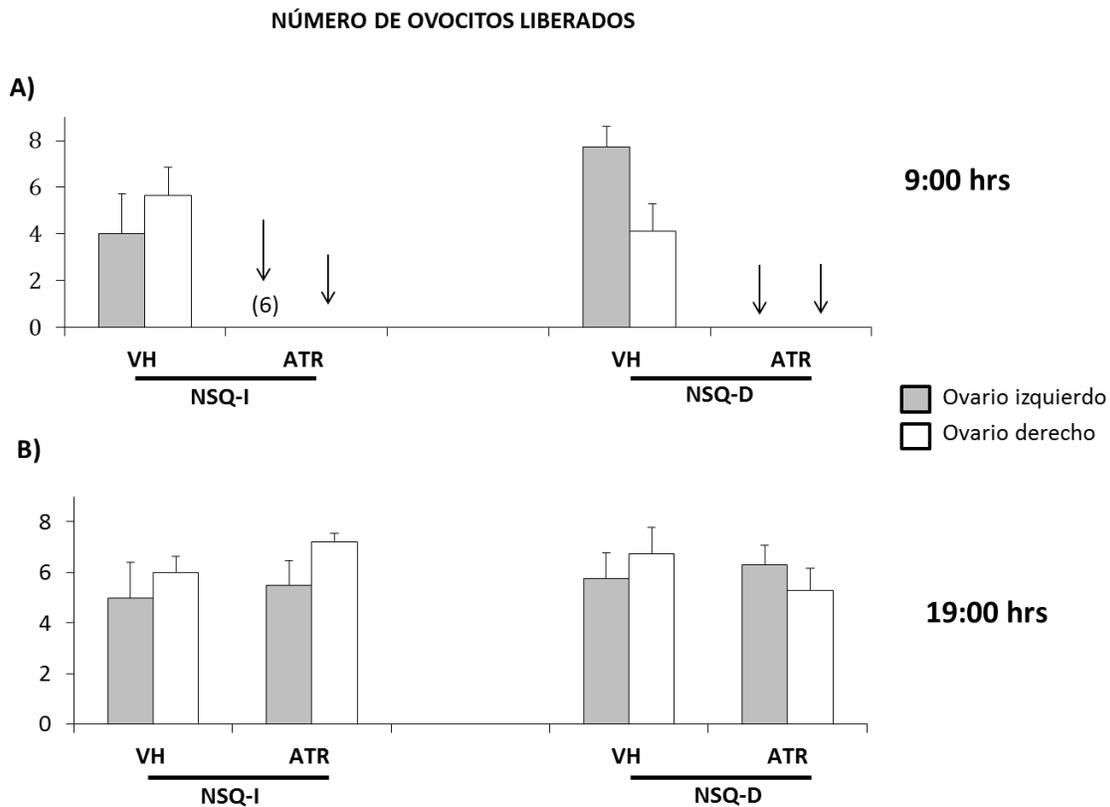
**EXPERIMENTO 4: EFECTO DE LA MICRO-INYECCIÓN DE ATROPINA EN EL NSQ IZQUIERO O DERECHO A LAS 9:00 Ó 19:00 HRS DEL PROESTRO SOBRE LA RESPUESTA OVÁRICA**

**RESPUESTA OVULATORIA**

A las 9:00 hrs, la administración de atropina en el núcleo supraquiasmático izquierdo o derecho resultó en el bloqueo de la ovulación por ambos ovarios (Figura 23A y 24A). Este parámetro no se modificó cuando la atropina se micro-inyectó a las 19:00 hrs (Figura 23B y 24B).



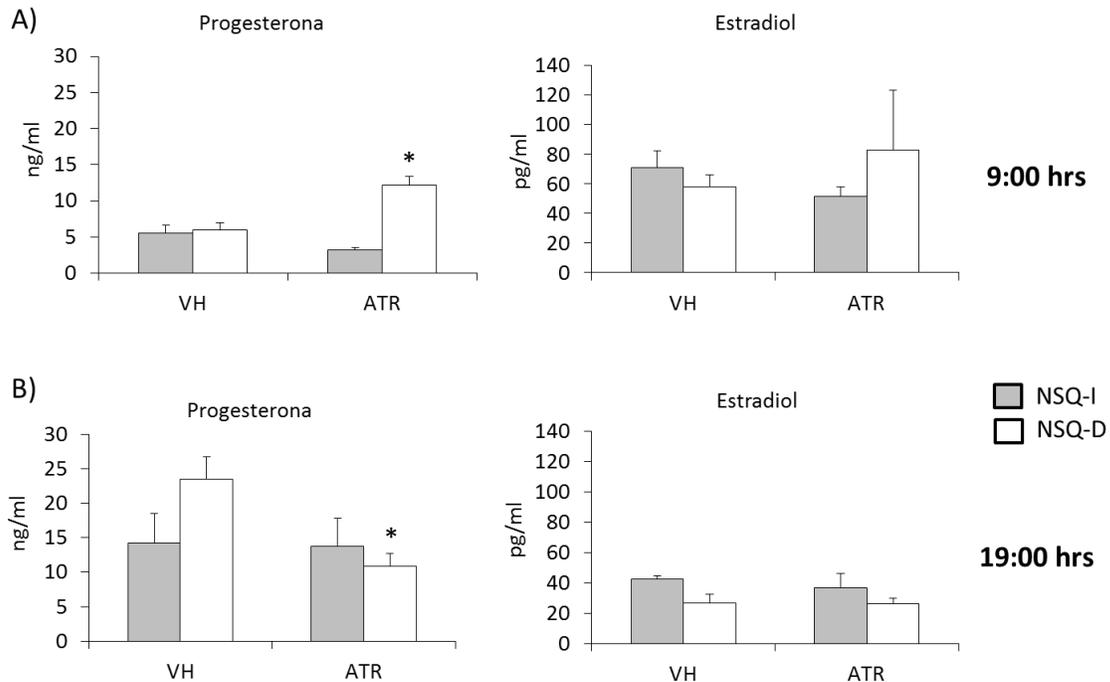
**Figura 23:** Porcentaje de animales ovulantes por el ovario izquierdo y derecho animales a los cuales se les micro-inyectó solución salina como vehículo (VH) o 62.5 ng de atropina (ATR) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ I) o derecho (NSQ D), realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs. del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal. El número entre ( ) representa que sólo un animal ovuló. Las flechas indican el bloqueo de la ovulación.



**Figura 24:** Media  $\pm$  e.e.m del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o derecho de animales con micro-inyección de solución salina como vehículo (VH) o 62.5 ng de atropina (ATR) en el núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ I) o derecho (NSQ D), realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs. del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal. El número entre ( ) representa los ovocitos por el animal ovulante. Las flechas indican el bloqueo de la ovulación.

## PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN SUERO

A las 9:00 hrs la micro-inyección de atropina en el núcleo supraquiasmático derecho aumentó la secreción de progesterona (Figura 25A), y por la tarde disminuyó (Figura 25B). En la mañana del proestro el bloqueo del sistema muscarínico del NSQ no modificó la concentración de estradiol.



\* $p < 0.05$  vs. VH NSQ-D (prueba de "t" de Student)

**Figura 25: Media  $\pm$  e.e.m de la concentración de progesterona y estradiol en suero. Grupos con micro-inyección de solución salina como vehículo (VH) o 62.5 ng de atropina (ATR) en núcleo supraquiasmático izquierdo (NSQ-I) o derecho (NSQ-D), realizado a las 9:00 ó 19:00 hrs. del proestro. Los animales fueron sacrificados al estro vaginal.**

## DISCUSIÓN

En la rata el sistema colinérgico del NSQ modula de manera circadiana las funciones del ovario. En la mañana del proestro el sistema colinérgico del NSQ modula de manera estimulante la ovulación, al parecer por la tarde este sistema de neurotransmisión no participa en la regulación de la ovulación. En la tarde del proestro, la secreción de progesterona es regulada por el sistema colinérgico del NSQ-D de manera estimulante.

En la literatura se ha reportado que el efecto de los barbitúricos está en función del día del ciclo estral y de la hora en que se administra. En la rata adulta con ciclos estrales de cuatro días de duración, la inyección intraperitoneal de PB a las 9:00 h del proestro bloqueó la ovulación en un 22 %, mientras que el bloqueo fue total si el barbitúrico se administró a las 11:00 ó 12:45 hrs del proestro (Domínguez y Smith, 1971, 1974). Se ha sugerido que la respuesta al bloqueo de la ovulación se debe a la supresión de la secreción del factor liberador de la hormona luteinizante (Brown-Grant y Naftolin, 1972; Naftolin y col., 1972) o de la LH (Schwartz y Lawton, 1968), ya que cuando el barbitúrico se administra simultáneamente con la gonadotropina coriónica humana (hCG) no hay bloqueo de la ovulación (Domínguez y Smith, 1974). Todas estas evidencias apuntan a que el día del proestro es un día crítico, ya que se produce el pico preovulatorio de las gonadotropinas que conlleva a la ovulación. En el presente estudio, la administración de PB a las 9:00 ó 19:00 hrs del proestro no modificó la respuesta ovulatoria inmediata. La discrepancia con los estudios anteriores podría ser atribuida a la dosis usada,

mientras que Domínguez y Smith administraron 50 mg/kg de peso corporal, en nuestro estudio se administró la mitad de la dosis, suficiente para mantener sedado al animal. Con estos resultados se descarta la alteración de la función ovárica por la administración de barbitúricos.

A las 9:00 del proestro el pentobarbital sódico causó decremento en la concentración de P4 y E2, esto se podría deber a una alteración causada a nivel hipotalámico o hipofisario, que se tradujo en el decremento de la secreción de LH. Sin embargo, la cantidad de LH liberada fue la necesaria para que la ovulación se diera de forma normal. Se ha reportado que la concentración de LH, correspondiente al pico preovulatorio, es mucho mayor que el que se requiere para la ovulación (Flores y col., 1990).

El núcleo supraquiasmático es una estructura pareada, cada lado es una estructura histológicamente similar, pero representa dos entidades funcionales diferentes. Esto se apoya en el hecho de que en el fenómeno de “splitting” se produce una alternancia de la función del NSQ (de la Iglesia y Schwartz, 2006). Esta alternancia en la función del NSQ podría explicar porqué sólo introducir la aguja de micro-inyección en uno u otro lado del núcleo, resulta en cambios de la respuesta ovárica. Los resultados del presente estudio, apuntan a que en la rata hembra el lado derecho del NSQ está más comprometido en la regulación de las funciones reproductivas, y que su regulación en el día del proestro depende de la hora del día. Así, la operación simulada del NSQ-D, realizada en la mañana del proestro, resultó en la disminución de la tasa de animales ovulantes y del número de ovocitos liberados por parte del ovario contralateral al NSQ-D. Esta respuesta difiere si

la aguja se introduce a las 19:00 hrs del proestro, donde ambos ovarios presentaron una respuesta ovulatoria semejante al animal testigo. Resultados que apoyan la idea que el NSQ es una estructura par morfológicamente similar pero que difiere en función ya que representan dos osciladores independientes (de la Iglesia y col., 2003).

La respuesta asimétrica del NSQ ante la operación simulada, depende de la hora del día cuando se introduce la aguja. Con la operación simulada en el NSQ-Izquierdo o derecho realizada a las 9:00 hrs del proestro, tiende a disminuir la secreción de progesterona, efecto que se revierte sí la aguja se introduce en el NSQ-D a las 19:00 h. Para explicar la disminución en P4 existen dos posibilidades:

1) Al introducir la aguja se cortaron algunas fibras que comunican al NSQ con POA. El grupo de Watts (1987) mostró que al interrumpir la información nerviosa que se origina en el NSQ y que va hacia POA, por cortes discretos dorsocaudales al NSQ, se elimina la secreción circadiana de LH. Por ende, el ovario sintetizaría menor cantidad de progesterona.

2) Existen una vía que conecta al NSQ con el núcleo dorsal motor del vago y el núcleo del tracto solitario, de donde se originan las fibras vagales (Buijs y col., 2008). Lawrence y col., (1978) mostraron que la sección bilateral del nervio vago resulta en un decremento de la concentración de progesterona, como resultado de una menor actividad de la enzima  $3\beta$ -HSD, implicada en la conversión de pregnenolona a progesterona. Con base en estas evidencias, sugerimos que la aguja de micro-inyección afectó al NSQ y las vías dorsales a éste.

La regulación de la secreción de estradiol no se modificó al introducir la aguja de micro-inyección, ya que es similar a la de un animal intacto. Sin embargo, pudiera existir una vía multisináptica entre el NSQ y el ovario, que fuera diferente entre el NSQ-I y el derecho, lo que podría explicar el hecho de que cuando se introduce la aguja en el lado izquierdo es mayor la concentración de estradiol, comparado con introducirla en el NSQ-D.

En la mañana o tarde del proestro la micro-inyección de solución salina en el NSQ izquierdo o derecho, no modificó la ovulación ni la concentración de progesterona y estradiol en suero. Al momento, no contamos con datos en la bibliografía que reporten si la sola administración de solución salina en alguna región del cerebro resulta en alteraciones de las funciones ováricas. Sin embargo, esperábamos que al inyectar la solución salina se afectara el microambiente de la estructura, que se reflejara en la ovulación y en la capacidad de secreción de las hormonas ováricas.

De manera directa, el NSQ envía proyecciones de naturaleza VP y VIPérgica hacia las neuronas GnRHérgicas que se localizan en el área POA. A través del AVPV, el arcuato y el núcleo NPV, el NSQ también envía información hacia la neurona GnRHérgica de POA (Smarr y col., 2012, Castillo-Ruiz y Nunez, 2007; Buijs y col., 1999; Morin, 2013; Abrahamson y Moore, 2001). Estas evidencias anatómicas han servido para mostrar que la secreción de GnRH es regulada por la información que se genera en el NSQ. Así, se ha mostrado que la lesión completa del NSQ es capaz de abolir el pico preovulatorio de LH (Antunes-Rodriguez y McCann, 1967). Lo que podría explicar la falta de ovulación después de la lesión (Brown-Grant y Raisman, 1977).

Las fibras VIP, VP, Kisspeptina y NPY modulan de manera estimulante la secreción de GnRH. Otro sistema de neurotransmisión que se origina en el NSQ y que podría estar implicado en la regulación de GnRH es el sistema colinérgico, ya que los agentes colinérgicos pueden alterar la fase del reloj circadiano (Bina y col., 1993).

El núcleo basal magnocelular envía proyecciones de naturaleza colinérgica hacia el NSQ, cuando se destruye ésta vía por la administración de ácido quinolínico disminuye el tamaño del soma de las neuronas VP y VIP, y la concentración de ARNm que codifica la síntesis de estos péptidos. Resultados que fueron interpretados como disminución de la actividad metabólica del NSQ (Madeira y col., 2004). En el presente estudio, la microinyección con atropina en el NSQ resultó en el bloqueo de la ovulación. El bloqueo de los receptores muscarínicos en el NSQ provoca que no pueda responder al estímulo colinérgico procedente del núcleo basal magnocelular, y como consecuencia disminuye la actividad de las fibras VPérgicas y VIPérgicas que van a POA. Esta posibilidad plantea la alteración de la vía eferente del NSQ hacia POA, disminuyendo la secreción de GnRH y de LH y por tanto como producto final se bloqueó la ovulación (ver modelo).

El bloqueo del sistema muscarínico es capaz de abolir la ovulación, sí se microinyecta la atropina en la mañana del proestro, pero no tiene efectos si se realiza en la tarde. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo mostraron que la inyección intraperitoneal de atropina resulta en el bloqueo total de la ovulación, sí el fármaco se administra a las 13:00 del diestro 1, o en un bloqueo del 75% de los animales si se inyecta a la misma hora del diestro 2,

mientras es inefectivo a las 21:00 del diestro 1 o 17:00 del diestro 2 (Domínguez y col., 1982). Todas estas evidencias nos llevan a pensar en la regulación circádica del sistema muscarínico sobre el NSQ. Castillo y Ruiz (2007) compararon la presencia de fibras colinérgicas en el NSQ de dos especies de roedores (una diurna y otra nocturna), encontrando que el sistema colinérgico regula de forma circádica el ciclo sueño-vigilia y que la especie nocturna tiene una mayor densidad de fibras colinérgicas.

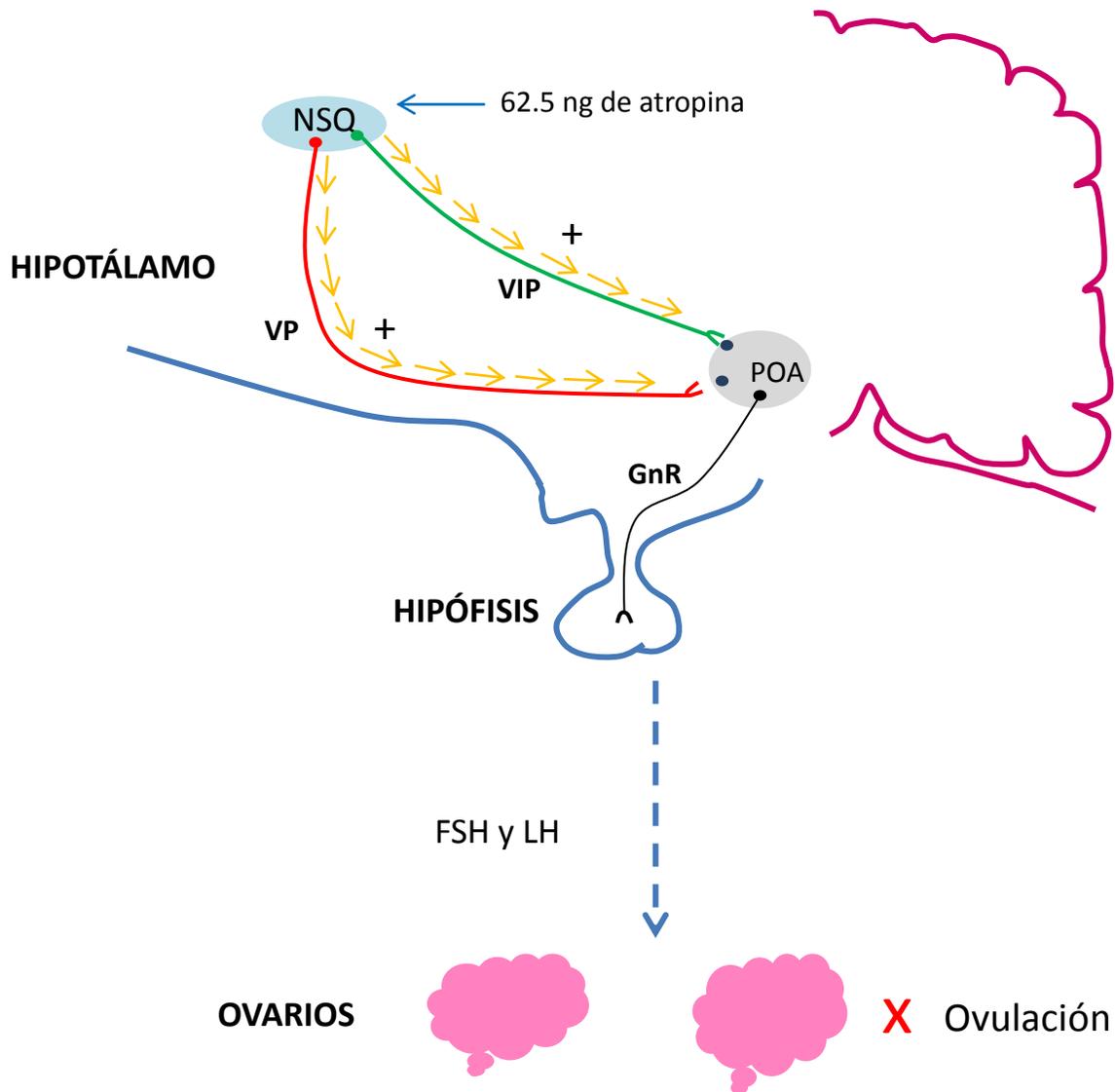
Estas evidencias apuntan a que el sistema colinérgico está implicado en la regulación circádica del NSQ (Yang y col., 2010), de la ovulación (Domínguez y col., 1982) y de la secreción de E2 (Cruz y col., 2006). Otra posible explicación es que a las 7 PM ya se dieron los eventos que conlleva a la ovulación y que el bloqueo del sistema muscarínico no revierte los eventos fisiológicos sucedidos anteriormente como el pico preovulatorio de LH. Everett y Sawyer (1950) reportan que existe un tiempo crítico en donde podemos bloquear la ovulación, este periodo corresponde entre las 16:00 h y 17:00h del proestro.

A las 9:00 hrs del proestro, el bloqueo del sistema muscarínico por la microinyección de atropina en el NSQ-Derecho resultó en el incremento de la concentración de progesterona y un decremento cuando se realiza a las 19:00 hrs del mismo día. Lo que podría ser explicado por la activación de una vía multisináptica entre el NSQ y el ovario, a través del núcleo paraventricular y los núcleos que originan al nervio vago (Buijs y col., 2006).

En resumen, con los resultados del presente estudio sugerimos que en el día del proestro, la regulación que ejerce el sistema colinérgico sobre la ovulación está en función de la hora del día. La microinyección de atropina a

las 9:00 hrs del proestro resultó en el bloqueo de la ovulación, independientemente del lado del NSQ en el cual se administró el fármaco, mientras que a las 19:00 hrs el sistema colinérgico ya no participa en los mecanismos que culminan con la ovulación.

## MODELO



En el presente modelo se resume el efecto del bloqueo de los receptores muscarínicos del NSQ, por la microinyección de atropina a las 9:00 hrs del día proestro sobre la ovulación. Donde las flechas amarillas simbolizan el flujo de la información por las fibras VPérgica (rojas) o VIPérgica (verdes) proveniente del NSQ hacia las neuronas GnRHérgicas. Cuando se administra la atropina, antagonista muscarínico no selectivo, independientemente de lado del núcleo estudiado, existe un bloqueo de la ovulación, que podría ser explicado por una disminución de la actividad de las fibras peptidérgicas. Es posible que el sistema muscarínico del NSQ regule la secreción de GnRH hacia la eminencia media, controlando la liberación de las gonadotropinas y así, estaría regulando de manera estimulante la ovulación.

## **CONCLUSIONES**

- El NSQ es una estructura par, donde cada núcleo es una identidad funcional distinta.
- En la mañana del proestro el sistema muscarínico del NSQ modula de manera estimulante la ovulación y parece no participar por la tarde.
- El sistema colinérgico del NSQ tiene una regulación de tipo infradiana.
- En la tarde del proestro la información colinérgica del NSQ derecho regula de manera estimulante la secreción de progesterona.
- La información colinérgica del NSQ no participa en la regulación de la secreción de estradiol.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- ❖ Abrahamson E y Moore R. (2001). *Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. Brain Research* 916: 172–191.
- ❖ Aguilar-Roblero R, Mercado C, Guadarrama P y Chávez JL. (2004). Aspectos celulares y moleculares del núcleo supraquiasmático, tomado de Hernández ME y Ortega A. *Fisiología celular y molecular: Principios y conceptos.* Universidad Veracruzana. Pp. 181-192.
- ❖ Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M y Rogers SW. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews.* 89: 73-120.
- ❖ Álvarez DA, Pérez EH, de la Cruz MH, Quincosa TJ y Sánchez PA. (2009). *Fisiología animal aplicada.* Editorial Universidad de Antioquia. pp. 104-107.
- ❖ Antle MC y Silver R. (2005). Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *TRENDS in Neurosciences.* 28 (3): 145-151.
- ❖ Antunez-Rodrigues J y McCann SM. (1967). Effect of suprachiasmatic lesions on the regulation of luteinizing hormone secretion in the female rat. *Endocrinology.* 81: 666.

- ❖ Bajo AJ y Coroleu LIB. (2009). Fundamentos de reproducción. Editorial Médica Panamericana. pp. 16-19.
  
- ❖ Bina KG, Rusak B y Semba K. (1993). Localization of cholinergic neurons in the forebrain and brainstem that project to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus in rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 335: 295–307.
  
- ❖ Bradley J y Van Voorhis B. (1999). Control of Follicular Development, tomado de Knobil and Neill *Physiology of Reproduction*. Volume 2. Pp. 389-395.
  
- ❖ Brown-Grant K y Naftolin F. (1972). Facilitation of luteinizing hormone secretion in the female rat by progesterone. *Journal of Endocrinology*. 53: 37-46.
  
- ❖ Brunton L, Lazo J y Parker K. (2005). Goodman & Gilman. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Ed. Médica Panamericana.
  
- ❖ Buijs RM, La Fleur SE, Wortel J, Van Heyningen C, Zuiddam L., Mettenleiter TC, Kalsbeek A, Nagai K y Nijijima A. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *The Journal of Comparative Neurology*. 464: 36–48.

- ❖ Buijs RM, Scheer F, Kreier F, Yi C, Bos N, Goncharuk V, y Kalsbeek A. (2006). Organization of circadian functions: interaction with the body. *Progress in Brain Research*. Vol. 153. Chapter 20.
  
- ❖ Buijs RM, van der Vliet J, Mari-Laure G, Huitinga I y Escobar C. (2008). Spleen Vagal Denervation Inhibits the Production of Antibodies to Circulating Antigens. *PLoS ONE* 3(9): e3152.
  
- ❖ Buijs RM, Wortel J, van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ y Kalsbeek A. (1999). Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *European Journal of Neuroscience*. 11: 1535–1544.
  
- ❖ Buxadé. (1995). Zootecnia: estructura, etnología, anatomía y fisiología. Grupo mundi-prensa. Pp. 243-245.
  
- ❖ Castillo-Ruiz A y Nunez A. (2007). Cholinergic projections to the suprachiasmatic nucleus and lower subparaventricular zone of diurnal and nocturnal rodents. *Brain Research*. 1151: 91–101.
  
- ❖ Clarke IJ. (1996). The hypothalamo-pituitary axis. In: Hillier, S.G., Kitchener, H.C., Neilson, J.P. (Eds.), *Scientific Essentials of Reproductive Medicine*. WB Saunders, London, pp. 120–133.

- ❖ Cruz ME, Flores A, Palafox M, Meléndez G, Rodríguez J, Chavira R, y Domínguez R. (2006). The role of the muscarinic system in regulating estradiol secretion varies during the estrous cycle: the hemiovariectomized rat model. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4:43.
  
- ❖ de Costa J, Madrid J y Zamora S. (1993). Manual de clases prácticas de fisiología animal. Secretariado de publicaciones Universidad de Murcia. pp.147 y 148.
  
- ❖ de la Iglesia HO y Schwartz W. (2006). Timely Ovulation: Circadian Regulation of the Female Hypothalamo-Pituitary-Gonadal Axis. *Endocrinology*. 147(3):1148–1153.
  
- ❖ de la Iglesia HO, Meyer J y 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*. 23:7412–7414.
  
- ❖ Domínguez R y Smith ER. (1971). Evidence for a daily neural event affecting ovulation in the rat. *Federation Proceedings*. 30: abstract 310.
  
- ❖ Domínguez R y Smith ER. (1974). Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology*. 14: 212-233.

- ❖ Domínguez R, Chávez R y Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y del Desarrollo del folículo ovárico. En tópicos selectos de biología de la reproducción. Miguel Angel Porrúa. México. Pp: 161-192.
  
- ❖ Domínguez R, Riboni L, Zipitria D y Revilla R. (1982). Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?. *Journal of Endocrinology*. 95: 175-180.
  
- ❖ Domínguez-González A, Damián-Matsumura P, Timossi C, Cruz ME y Domínguez R. (1998). Characterization of monoamine neural activity in the preoptic anterior hypothalamic area and medial basal hypothalamus in rats during the day pro-estrus and its relation to gonadotropins and sexual steroids hormone plasma level. *Medical Science Research*. 26 :275- 278.
  
- ❖ Espey LL. (1998). Ovulation, tomado de Knobil and Neill. *Physiology of Reproduction*. Volume 1. Pp. 605-606.
  
- ❖ Evans JA, Leise TL, Castanon-Cervantes O y Davidson AJ. (2011). Intrinsic Regulation of Spatiotemporal Organization within the Suprachiasmatic Nucleus. *PLoS ONE* 6(1): e15869.
  
- ❖ Everett JW y Sawyer CH. (1950). A 24-hour periodicity in the “LH release apparatus” of female rat disclosed by barbiturate administration. *Endocrinology*. 47: 198–218.

- ❖ Fawcett DW. (1995). Tratado de histología. McGraw-Hill Interamericana. 12<sup>o</sup> ed. Pp: 886-904.
  
- ❖ Felder CC. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *The Journal Federation of American Societies for Experimental Biology*. 9 (8): 619-625.
  
- ❖ Flores A, Rodríguez JO, Palafox MT, Griselda Meléndez, Barco AI, Chavira R, Cruz ME y Domínguez R. (2006). The acute asymmetric effects of hemiovariectomy on testosterone secretion vary along the estrous cycle. The participation of the cholinergic system. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4:11.
  
- ❖ Flores ME y Segura JE. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Revista mexicana de neurociencia*. 6(4): 315 - 326.
  
- ❖ Funabashi T, Shinohara K, Mitsushima D y Kimura F. (2000). Gonadotropin releasing hormone exhibits circadian rhythm in phase with arginine-vasopressin in co-cultures of the female rat preoptic area and suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*. 12: 521–528.
  
- ❖ Goldman JM, Murr AS y Cooper RL. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research*. 80: 84–97.

- ❖ Herbison A. (2006). Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neuronal Network, tomado de Knobil and Neill. *Physiology of Reproduction*. Volume 1. Pp. 1415-1430.
  
- ❖ Hut RA y Van der Zee. (2011). The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. *Behavioural Brain Research*.221: 466–480.
  
- ❖ Italo TR y Pineda (1998). Fisiología del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal en la edad reproductiva de la mujer. *Avances de Reproducción humana*. Sociedad argentina de esterilidad y fertilidad. Ed. Panamericana. Pp.21-49.
  
- ❖ Jacome RA. (2005). Fisiología endocrina. Editorial Kimpres Ltda. 3° Ed. Pp. 82 – 83.
  
- ❖ Kriegsfeld LJ y Silver R. (2006). The regulation of neuroendocrine function: Timing is everything. *Hormones and Behavior*.49: 557–574.
  
- ❖ Kriegsfeld LJ, Lesauter J y Silver R. (2004). Targeted microlesions reveal novel organization of the hamster suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 24: 2449–2457.
  
- ❖ Lawrence IE, Burden HW y Louis TM. (1978). Effect of abdominal vagotomy of the pregnant rat on LH and progesterone concentrations and fetal resorption. *Journal of Reproduction and Fertility*. 53: 131-136.

- ❖ Legan SJ y Karsch FJ. (1975). A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology*. 96: 57–62.
- ❖ Liu C y Gillette M. (1996). Cholinergic Regulation of the Suprachiasmatic Nucleus Circadian Rhythm via a Muscarinic Mechanism at Night. *The Journal of Neuroscience*. 16(2): 744-751.
- ❖ López VE. (2010). Los receptores nicotínicos de acetilcolina y las  $\alpha$ -conotoxinas. *Revista de Educación Bioquímica*. 29: 8-12.
- ❖ Madeira MD, Pereira PA, Silva SM, Cadete-Leite A y Paula-Barbosa MM. (2004). Basal forebrain neurons modulate the synthesis and expression of neuropeptides in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 125: 889-901.
- ❖ Mahoney MM y Smale, L. (2005). Arginine vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide fibers make appositions with gonadotropin-releasing hormone and estrogen receptor cells in the diurnal rodent *Arvicanthis niloticus*. *Brain Research*. 1049, 156–164.
- ❖ Mendoza NP. (2008). Farmacología médica. Editorial Médica Panamericana. Pp. 231-237.
- ❖ Miller BH y Takahashi JS. (2014). Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers in Endocrinology*. 4: 1-8.

- ❖ Moga MM, Weis RP y Moore RY. (1995). Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 359: 221–238.
  
- ❖ Morin LP y Allen CN. (2006). The circadian visual system, 2005. *Brain Research Reviews*. 51: 1-60.
  
- ❖ Morin LP. (2007). SCN Organization Reconsidered. *Journal of Biological Rhythms*. 22 (1) : 3-13.
  
- ❖ Morin LP. (2013). Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental Neurology*. 243: 4–20.
  
- ❖ Naftolin F, Brown-Grant K y Corker CS. (1972). Plasma and pituitary luteinizing hormone and peripheral plasma estradiol concentrations in the normal oestrus cycle of the rat and after experimental manipulation of the cycle. *Journal of Endocrinology*. 53: 17-30.
  
- ❖ Ostrowski NL, Lolait SJ y Young WS. (1994). Cellular localization of vasopressin V1a receptor messenger ribonucleic acid in adult male rat brain, pineal, and brain vasculature. *Endocrinology*. 135(4):1511-28.
  
- ❖ Palm IF, Van Der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM y Kalsbeek A. (1999). Vasopressin induces a luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol

treated rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 93: 659–666.

- ❖ Palma GA. (2001). *Biotecnología de la reproducción*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Pp. 37-38.
- ❖ Paxinos G y Watson C. (2004). *The rat brain in stereotaxic coordinates: the new coronal set*. 5ta edition. Elsevier Academic Press. CHN.
- ❖ Raisman G y Brown-Grant K. (1977). The 'suprachiasmatic syndrome': endocrine and behavioural abnormalities following lesions of the suprachiasmatic nuclei in the female rat. *Proceedings of the Royal Society of London*. 198(1132):297–314.
- ❖ Reghunandanan V y Reghunandanav R. (2006). Neurotransmitters of the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Circadian Rhythms*. 4 (2): 1-20.
- ❖ Romijn HJ, Sluiter AA, Pool CW, Wortel J y Buijs RM. (1997). Evidence from confocal fluorescence microscopy for a dense, reciprocal innervation between AVP-, somatostatin-, VIP/PHI-, GRP-, and VIP/PHI/GRP-immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 9: 2613–2623.

- ❖ Schwartz NB y Lawton LE. (1968). Effects of barbiturate injection on the day before proestrus in the rat. *Neuroendocrinology*. 3: 9-19.
  
- ❖ Shinohara K, Funabashi T, Mitushima D y Kimura F. (2000). Effects of estrogen on the expression of connexin32 and connexin43 mRNAs in the suprachiasmatic nucleus of female rats. *Neuroscience Letters*. 286: 107–110.
  
- ❖ Smarr BL, Morris E y de la Iglesia HO. (2012). The Dorsomedial Suprachiasmatic Nucleus Times Circadian Expression of Kiss1 and the Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology*. 153(6): 2839–2850.
  
- ❖ Strauss III JF y Williams CJ. (2009). The Ovarian Life Cycle, tomado de Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management, 6th Elsevier. Pp: 155-160.
  
- ❖ Tresguerres AF y Castillo C. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, tomado de Fisiología humana. Editorial McGrawHill. Pp.1007-1010.
  
- ❖ Tresguerres AF. (2003). Fisiología humana. 2ª ed. McGraw-Hill Interamericana. España. Pp. 1036-1048.
  
- ❖ Van den Pol AN. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy, *The Journal of Comparative Neurology*. 191: 661–702.

- ❖ Van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, Van den HR y Buijs RM. (1997). Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *Journal of Comparative Neurology*. 384: 569–579.
- ❖ van Esseveldt KE, Lehman MN y Boer JG. (2000). The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Research Reviews* 33: 34–77.
- ❖ Vida B, Deli L, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Caraty A, Coen CW, Liposits Z y Kallo I. (2010). Evidence for suprachiasmatic vasopressin neurones innervating kisspeptin neurones in the rostral periventricular area of the mouse brain: regulation by oestrogen. *Journal of Neuroendocrinology* . 22: 1032–1039.
- ❖ Watts AG y Swanson LW. (1987). Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: II. Studies using retrograde transport of fluorescent dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 258: 230–252.
- ❖ Weick RF y Stobie KM. (1992). Vasoactive intestinal peptide inhibits the steroid induced LH surge in the ovariectomized rat. *Journal of Endocrinology*. 133: 433–437.

- ❖ Yang JJ, Wang YT, Cheng PC, Kuo YJ y Huang RC. (2010). Cholinergic Modulation of Neuronal Excitability in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Neurophysiology*. 103:1397-1409.
  
- ❖ Yeh J y Adashi YE. (2001) El ciclo ovárico en Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4th edición. Ed. Médica Panamericana. Pp: 174-185.
  
- ❖ Zatz M y Brownstein MJ. (1979). Intraventricular carbachol mimics the effects of light on the circadian rhythm in the rat pineal gland. *Science*. 203: 358–361.
  
- ❖ Zatz M y Herkenham MA. (1981). Intraventricular carbachol mimics the phase-shifting effect of light on the circadian rhythm of wheel running activity. *Brain Research*. 212: 234–238.