



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Evaluación periódica de la expresión de dos genes reloj antagónica en el ganglio
celiaco-mesentérico superior durante el ciclo reproductivo de la rata hembra
adulta.**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de;

BIÓLOGO

Que presenta:

Olivia Sereno Solís

Director de Tesis;

Dra. Carolina Morán Raya

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**EVALUACIÓN PERIÓDICA DE LA EXPRESIÓN DE DOS GENES RELOJ ANTAGÓNICA EN EL
GANGLIO CELIACO-MESENTÉRICO SUPERIOR DURANTE EL CICLO REPRODUCTIVO DE LA
RATA HEMBRA ADULTA.**

Presenta: Olivia Sereno Solís

Directora de Tesis; Carolina Morán Raya.

La tesis fue desarrollada en el departamento de Biología y Toxicología de la Reproducción del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Con el apoyo del proyecto PROMEP BUAP-EXB-634.

A mi Mama;

Efigenia Solís Cruz, A usted le dedico este trabajo con todo mi amor y cariño, por ser mi mejor amiga, por sus consejos, por estar siempre conmigo, se sacrifico por apoyarme en mi carrera, me enseñó que se puede obtener en la vida lo que uno desea, eres mi mayor ejemplo, siempre nos tuviste unidos como una familia, a pesar de los tropiezos has confiado en mí, eres una inspiración para mi superación, te amo.

A mi Papa;

Pedro Sereno Casarrubias † Por guiarme, protegerme en donde te encuentras, gracias por darme la oportunidad de estar con nuestros seres queridos.

A mis Hermanos; Ricardo, Fernando, Antelmo, Ana Luisa, Gaudencio, Asunción†. Por creer en mí, por toda la ayuda que me otorgaron, aprendimos que a pesar de todas las cosas difíciles que hemos pasado juntos, hemos salido adelante como una familia.

A mis sobrinos; Jaqueline, Luis David, Brayán (Chacarrón), Nayeli, Stephani, Sammuel. Por ser parte de mi vida, y para demostrarles que podemos llegar a nuestras metas, los adoro.

A mis Amigos; Dra. Carolina Moran Raya, Joaquín Manso, Ana Karen Guadarrama, les agradezco por guiarme desde el inicio y final de mi carrera, por sus consejos, por su paciencia, en este trayecto de conocerlos he aprendido mucho de ustedes.

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de conocerlos a cada uno de ustedes, siempre estaré agradecida por brindarme su apoyo.

ÍNDICE

Índice de abreviaturas.....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
Estructura del ovario.....	2
Desarrollo folicular.....	2
Producción de hormonas esteroides.....	4
Ciclo estral.....	6
Sistema nervioso autónomo.....	8
Ganglio celiaco y mesentérico superior.....	11
Ritmos biológicos.....	11
Genes Reloj Per1 y Bmal.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
HIPOTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
MATERIAL Y METODOS.....	21
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS.....	36
BIBLIOGRAFÍA.....	37

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BMAL	Receptor translocador nuclear en el cerebro y músculo
CLOCK	Locomotor circadiano
E	Estrógenos
E2	Estradiol
FSH	Hormona estimulante del folículo
GCMS	Ganglio celiaco mesentérico superior
GnRH	Hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas
HT-HP-OV	Hipotálamo-hipófisis-ovario
LH	Hormona lutenizante
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PBS	Buffer de fosfato
PBT	Buffer de tritón
PER	Periodo
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SOP	Síndrome de ovarios poliquístico

RESUMEN

La ovulación y la secreción de hormonas esteroides por los ovarios, son procesos regulados por el Sistema Nervioso Central. La información viaja desde los centros hipotalámicos y extra-hipotalámicos hasta los ovarios por dos vías: la endocrina y la neural. En los mamíferos el control de las funciones reproductivas está asociado al reloj biológico, el cual se sitúa en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ). Las vías de sincronización de las señales externas llegan a las células individuales del NSQ que contienen un oscilador molecular autónomo que genera rítmicidad de la expresión de genes con un periodo de 24h. Dicha rítmicidad se produce no sólo en el SNC, sino en órganos y glándulas periféricas como los ovarios y las adrenales. Debido a que en trabajos de nuestro laboratorio hemos mostrado que las neuronas del ganglio celiaco asociadas con los ovarios, presentan variaciones en su actividad a lo largo del ciclo estral; en el presente trabajo se analizó la expresión de dos genes reloj antagónicos Per1 y Bmal en las neuronas del ganglio celiaco en los diferentes días del ciclo estral de la rata hembra adulta; considerando los ritmos de luz-oscuridad. Se utilizaron ratas hembras adultas vírgenes de la cepa CII-ZV las que fueron organizadas en dos grupos diferentes: grupos sacrificados en periodo de luz (13:00 horas) y en periodo de oscuridad (21:00) en cada día del ciclo estral. Se obtuvo el ganglio celiaco-mesentérico superior, se realizaron cortes histológicos, los que fueron procesados por inmunohistoquímica para identificar las neuronas inmunorreactivas a los genes reloj Per1 y Bmal. Resultados: El presente trabajo muestra la presencia de los genes reloj en neuronas del sistema nervioso periférico. En las neuronas del ganglio celiaco la proteína de los genes reloj Per1 y Bmal presenta variaciones a lo largo del ciclo estral: A las 13 horas el gen reloj Per1, presentó el pico de número de neuronas positivas en estro (774.5 ± 268.1), mientras la menor fue durante D2 (424.33 ± 102.6); en el horario de 21 h, el pico máximo fue en D2 (506.3 ± 122.3) y la menor concentración se presentó en estro (202.75 ± 202). Por otra parte, las neuronas del ganglio celiaco presentaron inmunorreactividad a gen reloj Bmal con un pico a las 13 h en D2 (3252.7 ± 109.8) y con menor número durante el proestro (296.5 ± 17.3); en el horario de 21 horas el pico fue en proestro (325 ± 143.1) y el de menor actividad fue en estro (169.75 ± 70.6). Los resultados del presente trabajo nos permiten confirmar la presencia de los dos genes reloj (Per 1 y Bmal) en el ganglio celiaco. Al mismo tiempo, mostramos que se presentan oscilaciones en su expresión durante los diferentes días del ciclo y los periodos de luz-oscuridad, lo que nos permite sugerir que la actividad de dichos genes estaría involucrada en la actividad de las neuronas relacionadas con los ovarios.

INTRODUCCIÓN

Los ovarios son las glándulas reproductoras de las hembras cuya función primordial es la producción de ovocitos y la secreción de hormonas esteroides, y a partir de la pubertad y una vez establecidos los periodos reproductivos, funcionan bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis ovarios (Moore y Persaud, 2007).

La participación de los ritmos biológicos en los procesos que regulan el desarrollo folicular, la ovulación y la secreción de hormonas esteroides, se han estudiado con esmero por varios años. Los estudios al respecto han pasado de ser desarrollados exclusivamente en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ), a estudios en órganos periféricos incluyendo glándulas endocrinas como las suprarrenales y los ovarios.

El conocimiento sobre la regulación que ejerce el sistema nervioso central sobre el funcionamiento de glándulas periféricas se ha ampliado, y cada vez hay más evidencias anatómicas y fisiológicas que vinculan a las gónadas a través de la vía neuronal directa. Al respecto, algunas patologías ováricas como el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP), en modelos animales, han sido tratadas con éxito desde la perspectiva neuronal, disminuyendo el tono de los nervios ováricos, logrando el restablecimiento de la función ovárica.

En el presente trabajo abordaremos el estudio de uno de los ganglios que inervan a las gónadas y analizaremos la expresión de los genes reloj.

ANTECEDENTES

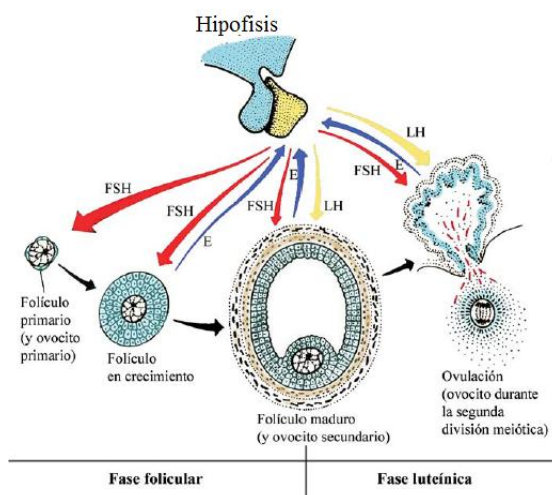
ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DEL OVARIO

Los ovarios son estructuras pares que en la rata se sitúan en las paredes laterales de la cavidad abdominal, unos pocos milímetros caudales a la última costilla. El ovario está constituido por dos estirpes celulares de origen embriológico diferente: células germinales y células somáticas. Este último componente se divide además en corteza y médula. La médula es la porción central del ovario que contiene células estromales, por lo regular inactivas. Por otra parte la corteza está constituida por un estroma conjuntivo especializado, donde se encuentran inmersos los folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo. La parte más superficial del ovario está cubierta por una capa de epitelio cilíndrico monoestratificado.

Las células germinales se pueden identificar desde las etapas fetales rodeadas por una capa simple de células estromales especializadas; estructura que se le denomina folículo ovárico. Los folículos son el componente principal de las gónadas de las hembras y son estructuras dinámicas que presentan procesos continuos y cíclicos de crecimiento y maduración que los lleva por lo regular a la atresia, y en casos excepcionales a la ovulación (Schiavon y Gayón 2012).

DESARROLLO FOLICULAR

La hormona estimulante del folículo (FSH) es imprescindible para la maduración folicular y la síntesis de estrógenos por las células de granulosa (Checa, 2007). Las células de la granulosa forman una capa continua que rodea completamente al ovocito y lo aísla del resto del ovario.



En el folículo en crecimiento las células de las granulosa proliferan rápidamente por estímulo de la FSH, fenómeno en el cual los estrógenos actúan de manera sinérgica (Domínguez, 1991).

Figura 1: Ciclo ovárico y su regulación hormonal. Estrógenos (E). Podemos observar el crecimiento de las células que rodean al folículo, por la participación LH y FSH hasta la expulsión del ovulo, como resultados de los picos de gonadotropinas. Tomado en Embriología humana (Valdés *et al* 2010).

El desarrollo folicular está regulado por un complejo mecanismo de factores paracrinos gobernados por la FSH hipofisaria (figura 1). Uno de ellos es la expresión de complejos enzimáticos involucrados en la biosíntesis de los andrógenos (células de la teca) y del estradiol (células granulosa). Por otra parte, durante el reclutamiento folicular, la FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa en forma directa e indirecta a través de los factores de crecimiento (EGF, AGF-II, inhibina) (Urbina *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2001).

El desarrollo de los folículos ováricos se caracteriza por:

- a) Crecimiento y diferenciación del ovocito.
- b) Proliferación de las células foliculares (células de la granulosa).
- c) Formación de la zona pelúcida.
- d) Desarrollo de la teca folicular.

Las células de la granulosa se dividen activamente produciendo una capa estratificada alrededor del ovocito (Moore, 2008). La LH estimula la actividad enzimática para la producción de hormonas esteroideas en aquellas células de la granulosa que fueron previamente estimuladas por la FSH. En los folículos pre-antrales, las células de la granulosa carecen de receptores a LH y la síntesis de sus receptores depende de la FSH y los estrógenos. La LH es la hormona más importante en la regulación de la reproducción de estrógenos, ya que estimula la síntesis de andrógenos y la de sus propios receptores en la célula teca (regulación inhibitoria) y la actividad aromatasa en las células de la granulosa. Después del pico de LH esta hormona inhibe a sus propios receptores en las células de granulosa (regulación inhibitoria) resulta en disminución de la síntesis de estrógenos.

La ovulación es el resultado de un proceso complejo que involucra la participación y acoplamiento de diversos factores internos (endocrinos, neuronales) y agentes externos del medio ambiente. Para que se produzca la ovulación son necesarios varios cambios en la pared del folículo y en las relaciones entre las células de la granulosa y las tecaes, durante la última etapa de crecimiento y la diferenciación folicular se produce la desaparición de los desmosomas que presentan las células de la granulosa y de la teca, así como la degradación de las fibras colágenos (Domínguez, 1991).

PRODUCCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES

Los folículos ováricos están rodeados de las células de la teca, en cuyas capas se sintetizan los andrógenos bajo la regulación de la LH hipofisaria, y las células de la granulosa, que aromatizan los andrógenos a estradiol, estimuladas por la hormona FSH. La vía de síntesis de los andrógenos se inicia mediante una enzima limitante que rompe la cadena lateral del colesterol dando lugar a la pregnenolona. La cascada de esteroidogénica inicia a partir del sustrato de colesterol, culmina en la síntesis y secreción del estradiol, pasando a través de los núcleos pregnanos y androstanos. Los esteroides sexuales son transportados en el plasma por una proteína específica, denominada globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG), similar a las proteínas transportadoras para la tiroxina o los corticosteroides. La SHBG transporta principalmente testosterona y estradiol. Una fracción menos importante de las hormonas sexuales es transportada inespecíficamente por la albúmina y aproximadamente un 1% de la testosterona circula en plasma en forma libre (Ibáñez *et al.*, 2007). La síntesis de los andrógenos ováricos varía durante el ciclo estral; es mínima en la primera fase del ciclo, denominada fase folicular.

PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO. Las señales hormonales y neuronales participan en la regulación de la síntesis y liberación de hormonas esteroides por los ovarios. Las señales hormonales se originan del hipotálamo, la hipófisis, la tiroides, el timo, el tejido adiposo, las suprarrenales, así como del propio ovario; las señales neuronales se originan en el hipotálamo y otras regiones del sistema nervioso central y periférico, modulando las respuestas a las señales hormonales enviadas hacia los ovarios (Domínguez *et al.*, 2012).

Las hormonas gonadales modulan las funciones del sistema nervioso más allá de sus acciones esenciales sobre la secreción de gonadotropinas, prolactina (PRL) y comportamiento sexual; también tienen la capacidad de modificar la citología neuronal y los componentes neuroquímicos. Por ejemplo, los estrógenos incrementan el número de sinapsis y son responsables de mediar algunos aspectos de plasticidad y conectividad entre células del sistema nervioso central (Lewis *et al.*, 1995). En algunos tejidos, los estrógenos pueden modular la sensibilidad celular a algunos neurotransmisores, ya que estimulan la síntesis y expresión de

los receptores a neurotransmisores en las células que expresan receptores a esteroides (McEwen y Alves, 1999).

Dado que muchos efectos de los estrógenos difieren cualitativa o cuantitativamente entre los sexos, se sugiere que ello se debe a la diferenciación sexual durante el desarrollo pre y post-natal. El mapeo de receptores intracelulares a estrógenos o progesterona, los cuales modulan sus acciones genómicas y no genómicas, han revelado la presencia de estos tipos de receptores en regiones como el bulbo olfatorio, hipocampo, la corteza, el locus coeruleus, rafe dorsal, cerebelo y la médula espinal (McEwen y Alves, 1999). La médula espinal contiene un número limitado de células que contiene el receptor intracelular a esteroides, las cuales se localizan en la porción media de la lámina VI, VII y X, cerca del canal central y en las láminas superficiales, donde pudieran estar involucradas en la modulación del proceso sensorial (Amandusson *et al* 1996). La sensibilidad al dolor, que es regulada en parte por las hormonas esteroides, difiere significativamente entre los machos y las hembras y en éstas últimas depende del momento del ciclo reproductivo en que se encuentre. También en el núcleo ventromedial del hipotálamo la densidad sináptica difiere entre hembras y machos, es regulada por los estrógenos. La densidad de sinapsis que reciben las células piramidales CA1 del hipocampo alcanza su máximo en el día del proestro (momento en el que la concentración de estradiol en plasma también alcanza su valor más elevado) y disminuye significativamente en el día del estro (Wolley y McEwen, 1992; Lewis *et al.*, 1995). Según Lewis *et al.*, (1995) esta tasa de recambio cíclica, tanto en el hipotálamo como en las células CA1 del hipocampo durante el ciclo estral de la rata, muestra un alto grado de especificidad. En las regiones lumbar y sacra de la médula espinal de la hembra, la concentración del RNAm del receptor citoplasmático a estrógenos muestra variaciones significativas que dependen del estado reproductivo.

La concentración del receptor fluctúa en paralelo con las concentraciones de estradiol circulante, son más altas durante el proestro y bajas durante los días de metaestro y diestro. La unión de una hormona esteroide con su receptor se convierte en un factor de transcripción que interactúa con el genoma donde estimula o inhibe la expresión genómica. La presencia del RNAm del receptor a estrógenos en neuronas de la médula espinal, lleva a pensar que los estrógenos influyen la expresión génica en dichas neuronas. Estas respuestas pudieran incluir variaciones en la síntesis de neurotransmisores o modulación de varios componentes de la

neurotransmisión (Williams *et al.*, 1997). En algunas zonas de la médula espinal asociadas directamente con la inervación sensorial y autonómica de los órganos reproductivos de la rata hembra, están presentes los receptores a estrógenos α y β , así como el RNAm para dichos receptores. Los estrógenos inducen la aparición de receptores a progesterona en neuronas de la lámina X y de la columna intermediolateral de la rata hembra; lo interesante de este estudio es que la densidad de los receptores a progesterona inducidos por estradiol, fluctúa a lo largo del ciclo estral, donde el máximo de expresión ocurre en el proestro tardío y la menor en el estro tardío (Bakewell *et al.*, 1995).

CICLO ESTRAL

La actividad reproductora de los animales suelen presentar un modelo cíclico impuesto por diversos factores tanto externos (temperaturas, disponibilidad de alimentos etc.) como internos (ritmos endógenos cantidad de vitelos a depositar en los ovocitos etc.). En los mamíferos es típico que el ciclo esté determinado por una fase conocida como calor, celo o estro, situación en que la hembra permite la copulación. El ciclo estral se define como el tiempo que transcurre entre un periodo de celo y de comienzo del siguiente. Su duración con la especie, siendo en las hembras de ratas y ratón de cuatro-cinco días (Álvarez *et al.*, 2009).

El periodo de crianza es crítico para permitir el éxito del proceso reproductivo, que para asegurar la supervivencia de la cría debe de coincidir con las condiciones adecuadas en el medio ambiente, que son transformados en señales endocrinas. Estas señales son duración e intensidad de luz (fotoperiodo) y a veces de la temperatura, visión, el sonido, olor del sexo opuesto, estado nutricional de animal, el cortejo y despliegue de atenciones, etc. Estas circunstancias ambientales actúan como estímulos externos que estimulan cierta transmisión nerviosa hacia el hipotálamo (De Costa *et al.*, 1993). Así pues la causa fisiológica básica del ciclo estral está en la liberación periódica de hormonas que determinan los cambios en el aparato reproductor. Dado que las hembras de rata solo recibirán al macho durante este periodo, la ovulación y la fecundación son dos procesos que están perfectamente coordinados.

El ciclo estral más conocido es el de la rata. Se compone de proestro, estro, metaestro y diestro. Los ovarios, los folículos y los ovocitos crecen, maduran y se diferencian para llegar a la capacidad a ovular durante el estro. Estos procesos son controlados primero por FSH y a

continuación por LH. Al aumentar el nivel de la FSH, estimula la proliferación de las células foliculares y la síntesis del estradiol. Es de particular interés que el aumento en el nivel E2 observado en proestro se acompaña de un aumento en la actividad locomotora de las hembras (Barbacka *et al.*, 2003). En los ciclos de cuatro días, el pico de LH ocurre en el día del proestro, en una "ventana de tiempo" específicamente: entre 2 y 4 pm. El pico de LH indica el comienzo de la fase de mayor actividad locomotora. Más tarde durante el proestro - alrededor de las 6 pm - se produce el pico máximo preovulatorio de estradiol. En la madrugada del estro se produce la ovulación, y en su caso, apareamiento y los ovocitos de la fecundación, por lo general aparece en ratas y hámsteres entre 2 a 4 de la mañana del día siguiente (figura 2). En el diestro posovulatorio se produce la formación del cuerpo lúteo (Barbacka *et al.*, 2003).

Las ratas son de ovulación espontánea en condiciones de laboratorio estándar en las (12 horas de luz y 12 horas oscuridad).

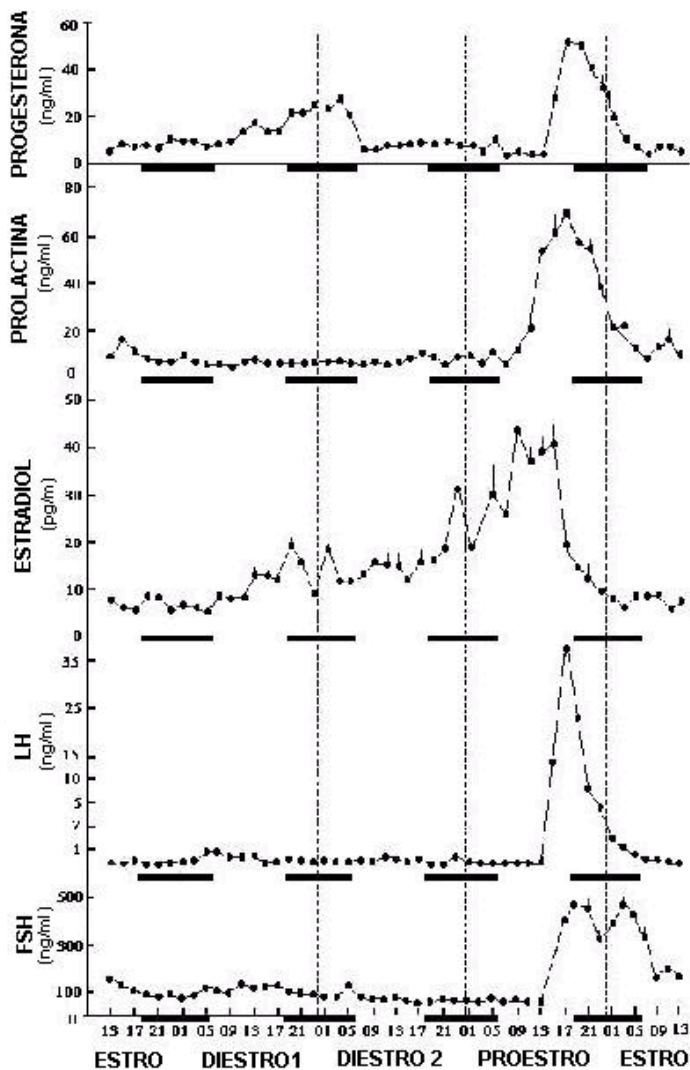


Figura 2. Perfiles de la secreción de los principales hormonas adenohipofisarias y ováricas durante el ciclo estral de 4 días en la rata adulta (Tomado de Smith *et al* 1975).

SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO

EL sistema nervioso autónomo, también llamado sistema motor involuntario, es un sistema sensitivo y motor visceral. El sistema nervioso autónomo tiene tres divisiones importantes: simpático, parasimpático y entérico. Las divisiones simpáticas y parasimpáticas inervan el musculo cardiaco, el musculo liso y los tejidos glandulares y son mediadoras de diversos reflejos viscerales. Estas dos divisiones comprenden las neuronas sensitivas asociadas a los nervios raquídeos y craneales, las neuronas motoras preganglionares, posganglionares y los circuitos del sistema nervioso central que conectan con las neuronas motoras y sensitivas y las regulan. La división entérica tiene mayor autonomía que las otras dos, con un sistema en gran medida independiente cuyas conexiones con el resto del sistema nervioso central son mínimas. Consta de las neuronas motoras y sensitivas del tubo digestivo que median los reflejos digestivos (Kandel *et al.*, 2001).

El sistema nervioso autónomo (SNA) está formado por elementos nerviosos cuya función en el organismo es de regular la actividad de las musculatura lisa que se encuentra principalmente en las vísceras huecas del cuerpo; inerva además al sistema cardiovascular, los conductos de las glándulas exocrinas, las estructuras oculares, los musculo ciliares y los músculos pilomotores de la piel. Los principales centros reguladores del SNA se encuentra en el hipotálamo y el bulbo raquídeo desde el hipotálamo desciende tractos de fibras eferentes para hacer sinapsis con los cuerpos celulares de las neuronas medulares y también con los cuerpos celulares de neuronas existentes en los cuernos laterales de la sustancia gris de la medula espinal (Michael, 1981).

El hipotálamo regula muchos de los circuitos nerviosos que median los componentes periféricos de los estados emocionales; variaciones de la frecuencias cardíaca, la presión arterial, la temperatura y la ingesta de agua y alimentos. También controla la hipófisis, y de este modo regula el sistema endocrino. Las neuronas motoras del SNA están situadas fuera del sistema nervioso central, en los ganglios autónomos. Son activadas por axones de las neuronas centrales (las neuronas preganglionares) cuyos cuerpos celulares están localizados en la medula espinal o el tronco encefálico. Las vías eectoras de los sistemas simpático y parasimpático constan, típicamente, de una cadena de dos neuronas. Una neurona preganglionar, cuyo soma se localiza en el sistema nervioso central (SNC) y envía su axón para sinapsis con una neurona posganglionar, cuyo soma está en un ganglio autonómico y que a su

vez inerva los órganos diana. Las fibras preganglionares son mielínicas delgadas de tipo B o amielínicas C, mientras que las posganglionares son mayoritariamente amielínicas. La mayor parte de las vísceras reciben una inervación doble del SNA, tanto por parte del simpático como del parasimpático. Los sistemas simpáticos y parasimpáticos poseen componentes sensitivos que envían aferencias al sistema nervioso central y desempeñan una función importante en los reflejos autónomos, además algunas fibras sensitivas que se proyectan a la medula espinal también envían una rama a los ganglios autónomos, cerrando de esta manera circuitos reflejos que controlan algunas funciones autónomas viscerales (Kandel *et al.*, 2001).

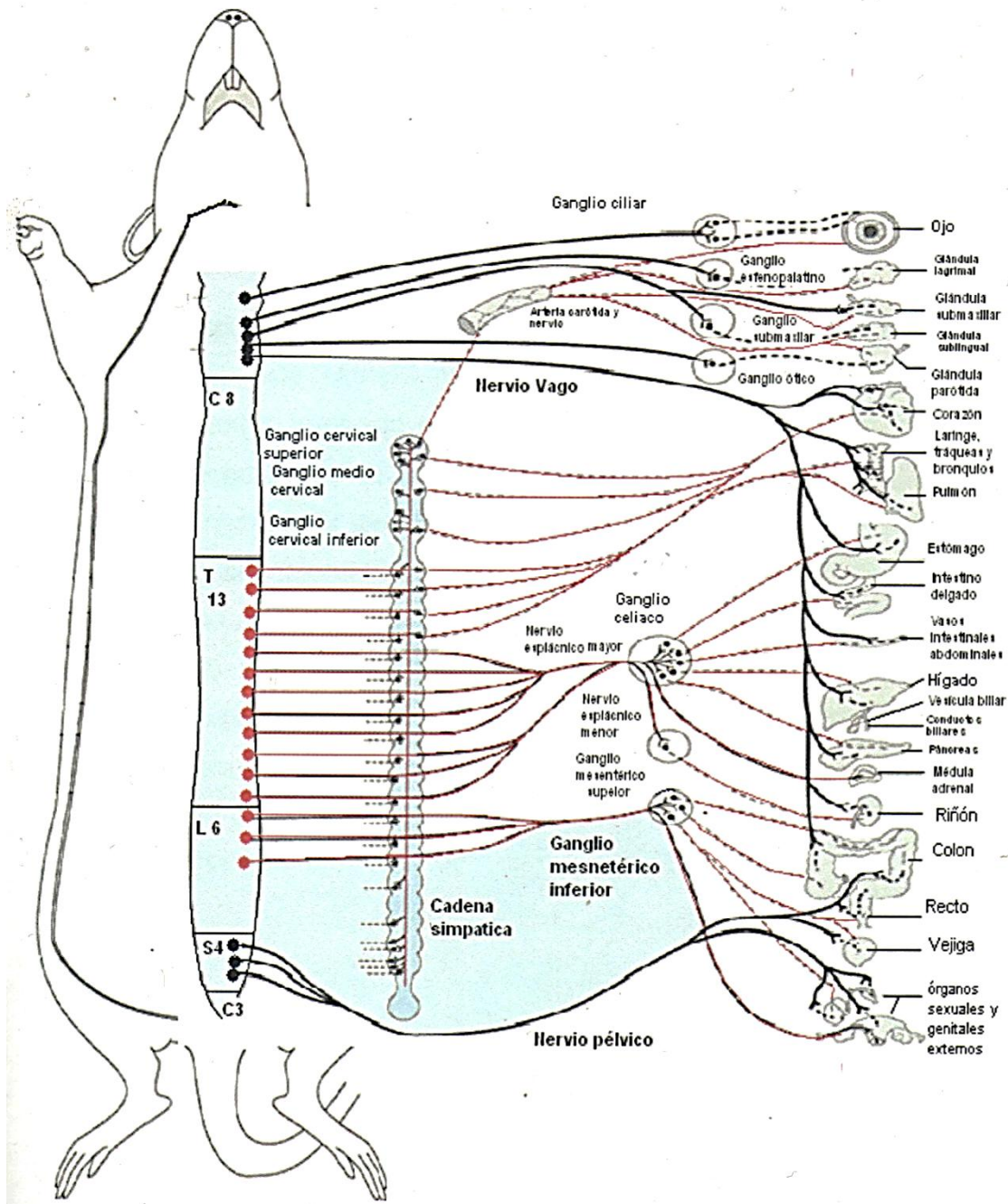


Figura 3. Esquema que se muestra la división simpática del sistema nervioso autónomo en líneas rojas: Las fibras preganglionares se extienden desde el núcleo intermedio lateral de la médula espinal hacia los ganglios periféricos mientras que las fibras posganglionares se extiende desde los ganglios periféricos hacia los órganos. Las líneas negras muestran la división parasimpática del sistema nervioso autónomo: Las neuronas preganglionares están localizadas en los núcleos de los nervios craneales del a base en el encéfalo y en los segmentos S2-S4 de la médula espinal (modificado de Novak 1967).

GANGLIO CELIACO, MESENTERICO SUPERIOR Y SUPRARRENAL. Los plexos autónomos abdominales son redes de somas neuronales de naturaleza simpáticas o parasimpáticas y rodean la aorta abdominal y sus ramas principales. Los plexos celiaco, mesentérico superior, suprarrenal y mesentérico inferior están interconectados (figura 3). Los ganglios simpáticos prevertebrales están dispersos entre los plexos celiacos y mesentérico (Moore y Agur 2003; Berthoud y Powley 1993). Los ganglios celiacos tienen forma de semilunar de concavidad superior con un asta medial y un asta lateral situados a derecha e izquierda del tronco celiaco. Se puede distinguir en cada uno un borde superior más o menos cóncavo que recibe a la derecha una rama del nervio frénico; un borde inferior convexo donde llegan algunas ramas del nervio esplácnico menor, un extremo medial que recibe al vago derecho, y a la izquierda de modo inconstante una rama del vago derecho. Por su asta lateral el ganglio recibe influencia de dos masas ganglionares: una medial yuxtaceliar que recibe el ramo del vago, la otra lateral que se designa ganglio suprarrenal principal; la cual recibe aferencias del nervio esplácnico y genera ramas hacia la suprarrenal (Latarjet y Ruiz-Liard, 2004). Ambos ganglios suprarrenales, derecho e izquierdo, están en íntima relación con la glándula suprarrenal correspondiente, comunicados por nervios y un tejido conjuntivo laxo. Los bordes superiores de ambos ganglios exceden el borde superior del páncreas. El plexo mesentérico superior y el ganglio rodean el origen de la arteria mesentérica superior. Éste plexo tiene una rama media y dos laterales. La rama media proviene el plexo celiaco y las ramas laterales se originan en los nervios esplácnicos menor e inferior (Moore, 2003).

RITMOS BIOLÓGICOS

La rítmicidad es una propiedad de los seres vivos que se presentan como parte de la adaptación al entorno y favorece la supervivencia de las especies. Los animales y probablemente todos los organismos muestran ciertos ritmos fisiológicos que se asocian a algún ritmo del medio ambiente (figura 4). Un ritmo se compone de diversas características; frecuencias, amplitud, periodo y fase. El ritmo biológico se puede definir como fluctuación bioquímica fisiológica o conductual que tiene un recurrencia en intervalos regulares. La frecuencia se refiere al número de acontecimientos de un evento repetido por una unidad de tiempo. El periodo se conoce a su vez, que el tiempo se tarda cada ciclo de fluctuación. La amplitud, es una medida en la magnitud de la oscilación de un ciclo, la fase, se puede considerar como el comienzo de la actividad locomotora o la transición de la luz en un ciclo ambiental, la sincronización se refiere

a la capacidad de los ritmos biológicos para ajustar su periodo endógenos con el de un sincronizador. Término que se refiere a determinada señal externa que se presentan periódicamente al darse una sincronización se crea una relación de fase estable entre el sincronizador y el ritmo endógeno (reloj interno del organismo), de manera que el tiempo biológico corresponde con el geográfico (Caba, 2008). Los ritmos biológicos con su naturaleza endógena, persisten en ausencia de señales externas pero están sincronizadas a algún ritmo del medio ambiente. Debido al ciclo de rotación de la Tierra, el ritmo más prescindible en el medio ambiente es el ciclo de luz/ oscuridad, por lo que este ritmo es el principal sincronizador en los mamíferos. Una manera de clasificar a los ritmos es por frecuencia con que se repiten en un ciclo de luz/oscuridad, de esta manera se las llama circadianos aquellos ritmos cuya frecuencia es de aproximadamente de 24 horas. Se ha determinado que los ritmos biológicos son de naturaleza endógena, las señales ambientales son tan importantes que regulan profundamente nuestros ritmos fisiológicos y pautas conductuales, estas señales lo que hacen, fundamentalmente, es sincronizar cada día nuestros relojes internos para que los ritmos sean muy aproximados a las 24 horas del día (Caba, 2008).

De acuerdo con los principios de la cronobiología, ritmos infradianos, que duran más de 24 horas, son los ritmos predominantes de la reproducción de los mamíferos (Barbacka *et al.*, 2003). Y un ritmo circadiano es un ritmo biológico que persiste bajo condiciones ambientales constantes (luz oscuridad, temperatura) con duración del periodo de 24 horas. Su fase se puede restablecer de una breve interrupción en el régimen constante (Kennaway, 2003 y 2004). El sistema circadiano se encuentra formado por las siguientes estructuras: 1) un reloj biológico que en los mamíferos se sitúa en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ); 2) las vías de sincronización, encargadas de proporcionar al reloj la información de las señales externas. Principalmente el tracto retino-hipotalámico transmite la información luminosa de la retina hacia el NSQ para mantener una congruencia entre el reloj y el medio ambiente; y finalmente 3) las vías eferentes que transmiten las señales a los sistemas efectores que expresan los diferentes ritmos fisiológicos y conductuales.

Ejemplos de sistemas eferentes son: el eje hipotálamo-hipofisarios-suprarrenal, los sistemas cardiovascular, inmunitario, hematopoyético, el ciclo celular, la glándula pineal, etc. Todos estos sistemas se sincronizan con el NSQ a través de señales neuronales o sustancias que interaccionan con ellos, que pueden ser las hormonas y neurotransmisores (Castellanos *et al.*,

2007). El ritmo circadiano de circulación de glucocorticoides suprarrenales, cortisol o corticosterona en ratas, están activas el poco máximo de corticosterona se observa cuando empiezan a estar activas, que al anochecer. Si se invierten los ciclos de luz y oscuridad el ritmo de secreción de glucocorticoides se invierte también (Funjul *et al.*, 1998).

Propiedades del reloj;

- 1) Persisten aun en condiciones constantes en ausencia de indicaciones temporales externas. Al ritmo adquirido en ausencia de indicadores de tiempo se llama ritmo de libre corrimiento (τ), los ritmos continúan pero no hay sincronización por factores externos.
- 2) No son sensibles a la temperatura. Este tipo de relojes no se aceleran o retrasan con los cambios de temperatura.
- 3) Son sensibles a la intensidad de luz: luminosidad, intensidad y duración de exposición a la luz tiene grandes efectos en el reloj biológico.
- 4) Están bajo control genético: mutaciones puntuales pueden afectar grandemente en periodo de reloj alargándolo o reduciéndolo.
- 5) Son ajustables; Tienen capacidad de elemental de reorganizarse, por lo que se puede ajustar a un periodo específico por medio de sincronizadores.
- 6) Los sincronizadores ejercen un control de fase; los sincronizadores no controlan el periodo de reloj, sino que también controla la fase.
- 7) Posen un rango de sincronización; el reloj puede ajustarse por un sincronizador hacia adelante o hacia atrás, pero solo pocas horas.

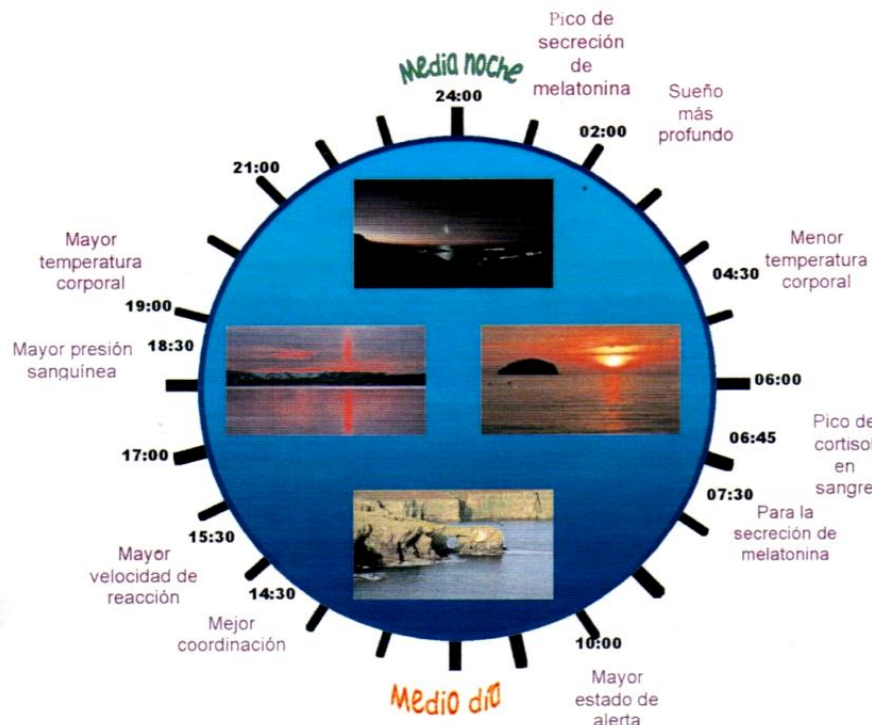


Figura 4. En el cuerpo humano experimentamos diversos ritmos hormonales, conductuales y bioquímicos a lo largo del día. Aquí se señalan algunos ejemplos que ocurren comúnmente, pero que pueden variar en personas con un ciclo de luz-oscuridad diferente a la mayoría de nosotros (Caba, 2008).

Mecanismo molecular del reloj circadiano.

En las ratas, el reloj central (NSQ) se comunica con la glándula suprarrenal por dos vías: 1.- la humoral, que implica la liberación de la hormona liberadora de la corticotropina (ACTH) proveniente de la hipófisis 2.- una vía neuronal que implica en el sistema nervioso autónomo (Fahrenkrug *et al.*, 2008; Hernández y García., 2010). Para que funcione correctamente el reloj circadiano, los productos de la expresión de los genes, son factores básicos para la transcripción de señales. La evidencia reciente implica una multitud de genes implicados en las vías de señalización celular, el metabolismo celular y la regulación del ciclo celular (Sellix y Menaker 2010).

Genes Reloj Per1 y Bmal

El mecanismo molecular del reloj circadiano periféricos involucra la interacción de señales positivas y negativas que regulan la transcripción rítmica de los genes reloj. En los mamíferos se han descrito al menos nueve genes reloj denominados; Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Clock, Bmal, Ckl y REv-Erb. La regulación de estos genes se da por medio de dos asas de activación/

represión transcripcional. El asa de señales positivas está controlada por los genes Clock y Bmal1 mientras el asa negativa por los genes Per y Cry, Al inicio del día circadiano (primeras horas de la mañana). La transcripción de los genes Per y Cry se activan por los heterodímeros que forman las proteínas CLOCK; BMAL1, las cuales se unen a secuencias reguladoras conocidas como cajas E, localizadas en los promotores de los genes Per y Cry para activar la transcripción. Los mensajeros de estos genes son traducidos a sus proteínas correspondientes (PER y CRY) en el citosol. Hacia la mitad del día circadiano (comienzo de la noche) las proteínas PER y CRY se asocian y forman heterodímero (PER: CRY), que se fosforila por la enzima CKI para después ser translocados al núcleo. Los heterodímeros PER:CRY secuestran los heterodímero CLOCK: BAML1, interfiriendo su unión al sitio promotor de los genes Per y Cry inhibiendo su transcripción. Por lo tanto las proteínas PER y CRY, actúan como reguladores negativos, los heterodímeros CLOCK:Bmal1 también activan la transcripción del gen que codifica para un receptor huérfano nuclear conocido como Rev-Erb. Una vez en el núcleo la proteína REV-ERB se une al promotor del gen Bmal y reprime su transcripción, provocando que los niveles del ARNm de Bmal1 Caigan. Por otro lado cuando los dímeros de las proteínas PER:CRY entran al núcleo e inhiben la transcripción de Per y Cry, también inhiben la transcripción de Per y Cry también inhiben la transcripción de Rev-Erb e indirectamente estimulan la transcripción del gen Bmal1. (Hernández y García., 2010). Adicionalmente la transmisión de la información circadiana generada en el sistema nervioso central puede ser transmitida hacia el resto de los órganos por vía neuroendocrina, por ejemplo por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal a través de la secreción de las hormonas. El oscilador en el NSQ, que ha sido considerado el reloj maestro en un modelo jerárquico del sistema de cronometraje circadiano, no parece ser esencial para la conducción de los relojes periféricos (Fahrenkrug *et al.*, 2006).

En las células de los tejido periféricos, estos relojes celulares son importados por una molécula oscilador que esta auto-sostenida y que genera la expresión genética rítmica con una periodicidad de aproximadamente 24 hrs. El NSQ y las células de tejidos periféricos recibe información diaria, sobre todo en el medio ambiente, luz y oscuridad a través de la vía neuronal sináptica originado de un subconjunto de células fotosensibles de la retina. (Fahrenkrug *et al.*, 2006 y 2008).

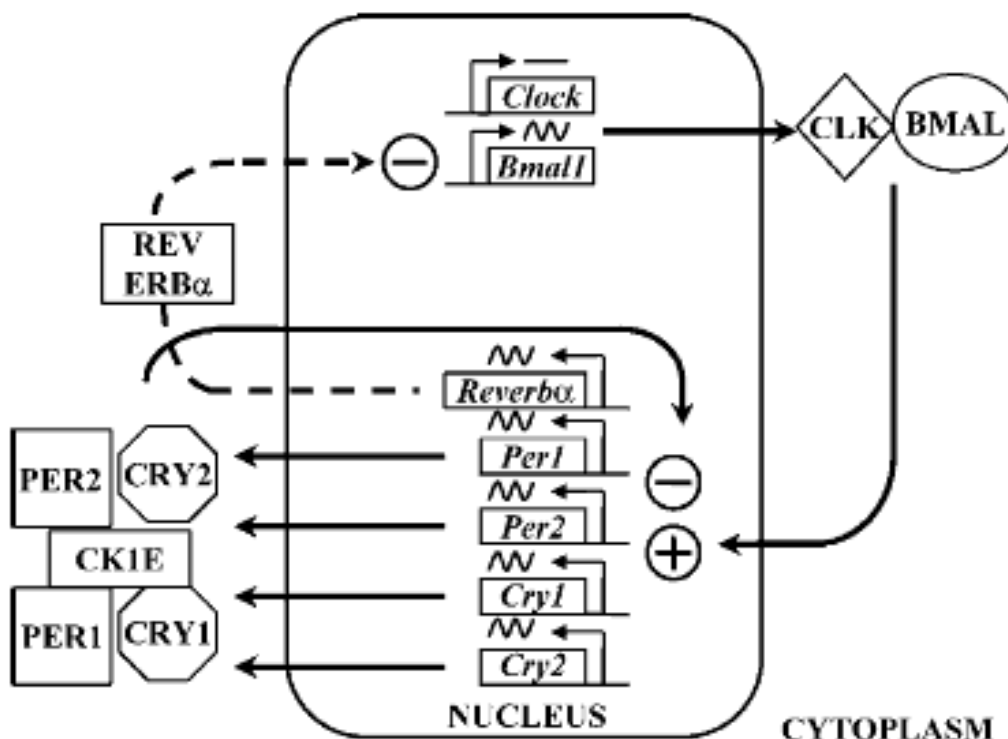


Figura 5. Esquema de los bucles principales de factor de transcripción de los ritmos de genes reloj. Unidad positiva se produjo por el complejo heterodímero CLK/BMAL1 que inicia la transcripción de *per1*, *per2*, *cry1* y *cry2*. Las proteínas de estos genes en el complejo con la inducción 1E caseína quinasa inhibición CLK/BMAL1. Mientras tanto, la proteína REV ERB α inhibe la transcripción de BMAL1. Reloj la expresión es constitutiva, mientras que normalmente *Bmal1* es rítmica y en antifase para el período y la expresión génica criptocromo. A no bucle secundario muestra aquí implica *dec1* y *dec2* (Honma y Honma, 2003).

EL papel de los osciladores periféricos como los de ovario no esta tan claro. Los relojes circadianos en el ovario podrían desempeñar un papel en el momento de la ovulación (Sellix y Menaker, 2010). (Takahashi *et al.*, 2006) mostraron que el NSQ modula la función autonómica y neuroendocrina para preparar los cambios diurnos y nocturnos en el compartimento, pero las conexiones precisas con el SNA son desconocidas.

Hay estudios que muestran la expresión diaria de dos genes reloj, *Per1* y *Per2* en el ovario de rata utilizando la técnica de RT-PCR en tiempo real, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, encontrando en el ARNm de *Per1* y *Per2* muestra una oscilación rítmica significativa en el ovario, con un periodo de 24 horas (Fig. 6). Estos hallazgos sugieren la existencia de un reloj circadiano en el ovario, que puede desempeñar un papel tanto a nivel local como en el eje hipófisis ovario-hipotálamo (Fahrenkrug *et al.*, 2006).

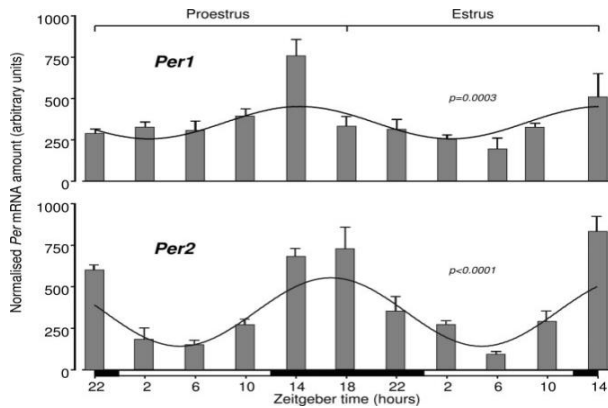


Figura 6. Cambios rítmicos en Per1 y Per2 del ARNm en los ovarios de ratas durante proestro y estro. Los niveles de ARNm tanto para Per1 y Per2 eran rítmicos y cambiados de manera significativa en función de un ciclo de 24 h. Las barras blancas en la parte inferior de la gráfica representan el período de luz (ZT 0 a ZT 12), mientras las barras negras representan período de oscuridad (ZT 12 a SD 24), (Fahrenkrug *et al.*, 2006).

Otro grupo de investigadores han recibido la evidencia de la participación del reloj en la fusión del ovario en diferentes especies y ofrecer una nueva perspectiva enfocada a enfermedades que afecta negativamente a la fertilidad. Considerando que el periodo del oscilador es relativamente constante entorno a 24 h, independientemente de los tejidos, la fase del gen reloj varia en gran medida el pico de expresión, dependiendo de la célula y tejido. Describieron la evidencia de la existencia de los relojes circadianos en los ovarios de invertebrados, vertebrados con énfasis en los roedores. Concluyendo que enfermedades tales como síndrome de ovario poliquístico (SOP), la endometriosis o tumores malignos endocrinos, que son comunes y tienen efectos adversos sobre la fertilidad, pueden ser causados o exacerbados por desincronización entre los relojes circadianos en el ovario, la hipófisis, útero, oviducto e hipotálamo medio basal (Sellix y Manaker 2010).

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema nervioso autónomo, por medio del hipotálamo, participa en la regulación de las funciones de los ovarios por dos vías, la endócrina y la neural directa a través de conexiones simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso periférico.

Varios autores han reportado que el ganglio celiaco es el sitio donde se localizan la mayor cantidad de neuronas que inervan a los ovarios. Los resultados experimentales de nuestro grupo muestran que la conexión nerviosa entre el ovario y el ganglio celiaco presenta variaciones a lo largo del ciclo estral, lo que implica cambios en la actividad neuronal.

Está pendiente conocer los mecanismos involucrados en el control o regulación de la expresión de los genes reloj en el ganglio celiaco y su relación con las funciones del órgano de la información nerviosa, que está procesada y enviada al ganglio celiaco hacia al sistema nervioso central que viaja hasta el sistema nervioso autónomo, que pueden permitir las variaciones temporales en la participación de los genes de luz-oscuridad para regular las funciones del órgano.

Dado que el núcleo supraquiasmático controla muchos procesos fisiológicos y del comportamiento que presentan ritmicidad, tanto en regiones centrales como en células de tejidos periféricos, existe la posibilidad de que los cambios observados en la actividad de las neuronas del ganglio celiaco que inervan a los ovarios, estén relacionados con los osciladores moleculares que generan ritmos en las glándulas periféricas.

En este trabajo nos propusimos evaluar la expresión de los relojes antagónicos Per1 y Bmal en las neuronas del ganglio celiaco durante el ciclo estral, tomando en cuenta dos horarios diferentes; uno en periodo de luz y otro en periodo de oscuridad.

HIPÓTESIS

Dado que el hipotálamo es el regulador principal del funcionamiento de los ovarios, y a través del núcleo supraquiasmático controla la expresión de los genes reloj centrales y periféricos, al evaluar dos genes reloj antagónicos, relacionados con los ritmos de luz-oscuridad, en las neuronas de ganglio celiaco; se expresaran de manera diferencial en los cuatro días del ciclo estral de la rata.

OBJETIVO GENERAL

Analizar las variaciones en la expresión de los genes reloj Per1 y Bmal, en los horarios de las 13:00 y 21:00 horas en las neuronas del ganglio celiaco durante los días del ciclo estral de la rata hembra adulta.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la presencia de la proteína de los genes reloj Per 1 y Bmal en las neuronas del ganglio celiaco.
2. Analizar la expresión de los genes reloj Per1 y Bmal en las neuronas del ganglio celiaco en dos horarios 13:00 y 21:00 horas durante los cuatros días del ciclo estral de la rata adulta.
3. Comparar en las graficas el posible antagonismo de los genes reloj Per1 y Bmal en las neuronas del ganglio celiaco durante los dos periodos y a lo largo del ciclo estral.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa CIIZV de 90 a 130 días de edad con un peso corporal de 200 a 276 g. mantenidas en condiciones controladas de iluminación de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad y con libre acceso a alimento y agua durante el estudio.

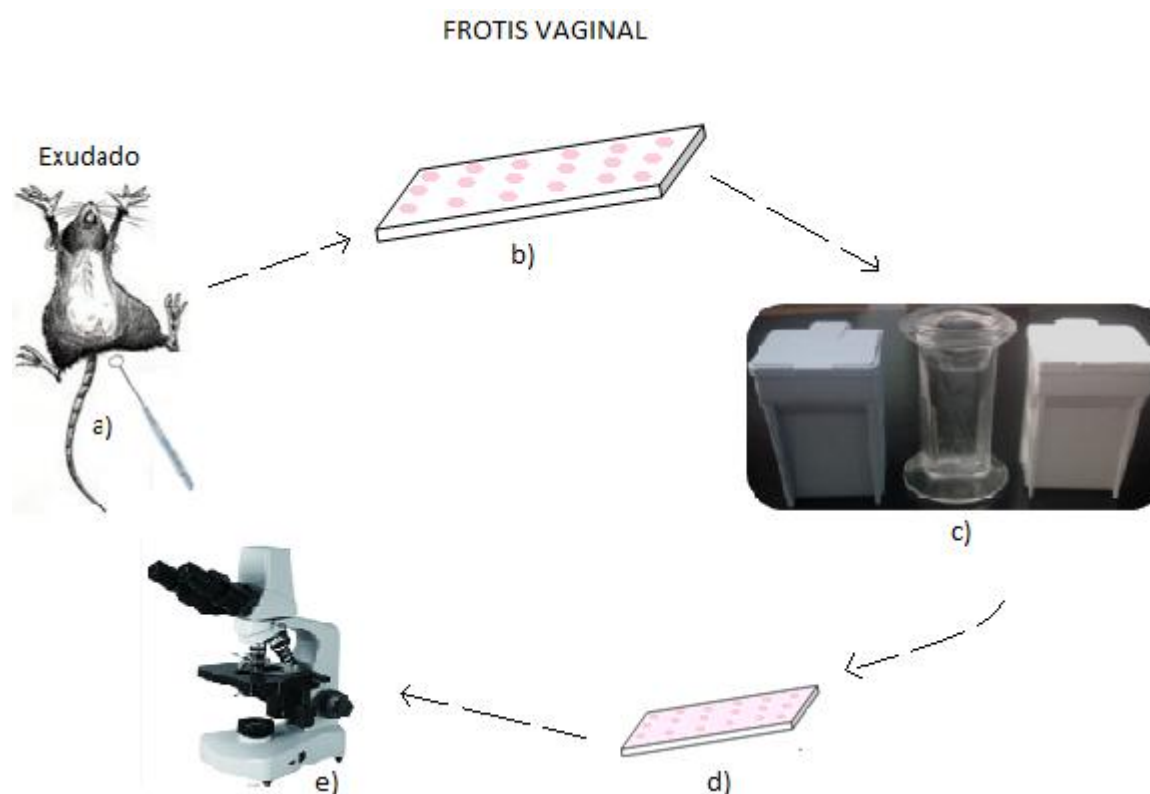


Figura 7. Procedimiento del frotis vaginal. Como se muestra en la figura en la a) exudado, b) Laminilla con los frotis, c) Colorantes, eosina y hematoxilina, d) laminilla con los frotis teñidos, e) Microscopio óptico para leer los frotis.

A las ratas se les realizó un frotis vaginal diario entre las 09:00 horas, para llevar un control de su ciclo durante 3 ciclos consecutivos. Una vez que se tomó muestra del exudado vaginal de las ratas, éste se extendió sobre una portaobjetos limpio y fue secado al aire. El frotis se tiñó con hematoxilina, se enjuagó con agua, se secó y se sumergió en Eosina, se enjuagó con alcohol se secó y se observó al microscopio (10X) (Fig. 7). Una vez definido el periodo del ciclo en que se encontraban las ratas, estas fueron sacrificadas por perfusión.

Proceso de la perfusión: Se sacrificaron 32 ratas (16 en cada uno de los horarios 13:00 y 21:00 horas), Los grupos fueron organizados con 4 ratas por cada día del ciclo estral; diestro 1, diestro 2, proestro y estro. Previo a la eutanasia se evaluó el peso corporal, se aplicó la anestesia (pentobarbital sódico 40mg/kg de peso vía IP). Se hizo un corte en la pared abdominal lateralmente a lo largo de ambos márgenes de los huesos de las costillas, después se cortó en musculo del diafragma, se despejó el corazón y posteriormente se hizo un pequeño corte en la aurícula derecha y rápidamente a través del ápice del ventrículo izquierdo se inserto un catéter de perfusión manteniéndolo fijo. Con la bomba de perfusión se paso lentamente 250ml de solución salina fisiológica (0.9%) fría, al momento de bombear el corazón el agua salina supe a la sangre que recorre por todo el organismo y hace que pase en todo el organismo para limpiar cada órgano. Después se hizo cambio de solución a paraformaldeido al 4% (200ml) diluida en buffer de fosfatos con pH de 7.2 (fosfatos de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, cloruro de sodio, agua destilada e hidróxido de sodio para ajustar el pH); finalmente se extrajo el tejido y se colocó en frascos con la misma solución fijadora (figura 8).

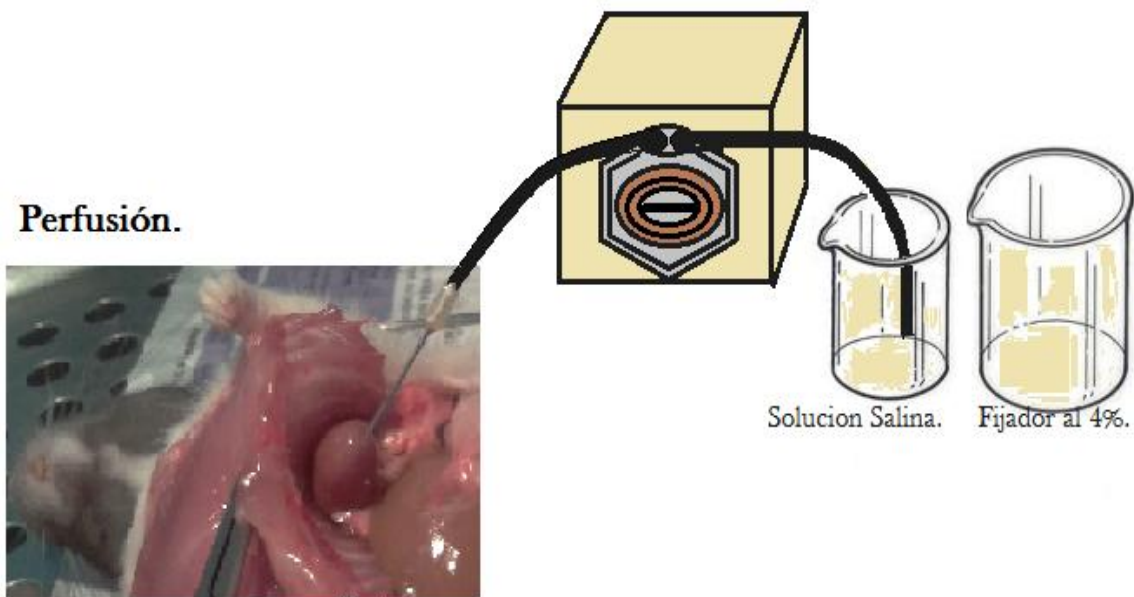


Figura 8. Perfusión de Rata hembra adulta (90 -130 días de edad). Se muestra el catéter insertado en el corazón para el proceso de la perfusión.

Manejos de los tejidos. Después de permanecer en solución fijadora por 12 horas, los tejidos del ganglio celiaco se pasaron a buffer de fosfatos por 12 horas. Posteriormente se hicieron cambios en concentraciones de sacarosas crecientes al 10% 20% y 30% cada una durante 12 horas. Por otra parte se prepararon laminillas con la solución Poly-L-Lysine 0.1% (Sigma-Aldrich) se agrega 3 µl en cada laminilla con la finalidad de adherir el tejido en el porta objetos. Se hicieron cortes histológicos por congelación a 50 µm de grosor dentro de la cabina del criostato (MICROM HM 505N) a -22°C. Los cortes histológicos se distribuyeron de manera simultánea en dos juegos de portaobjetos: uno para cada uno de los dos genes reloj Per1 y Bmal. Los cortes fueron secados a temperatura ambiente en un secador.

Inmunohistoquímica. Las secciones del ganglio fueron expuestas a tres lavados de 10 minutos en buffer de fosfatos (PBS), posteriormente las laminillas se secaron por la base y los costados y se les agregó peróxido de hidrógeno al 0.3% durante 10 minutos, proceso que ayuda a eliminar la actividad endógena de las peroxidasas, posteriormente se hacen otros 2 lavados de PBS de 10 minutos cada uno. A continuación se agregó suero normal de cabra (Vector Labs. Burlingame CA, EUA) en PBT (buffer de fosfatos de tritón) al 0.3% durante 1 hora, después se les agregó el anticuerpo primario de las proteínas PER1 o BMAL (Santa Cruz Biotechnology, santa Cruz CA EUA) diluido 1:1000 en suero normal de cabra al 3 disuelto en PBT, durante 72 horas de refrigeración (4°C) en cámara húmeda. Pasado lo anterior se realizaron tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno. A continuación se les agrego el anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (Vector Labs) diluido 1:200 en PBT, durante una hora. Después se hicieron tres lavados de PBS y a continuación los cortes fueron incubados en el complejo enzimático Avidina-Biotina (1:250 Vector Labs) por una hora. Se siguieron dos lavados en PBS por 10 minutos. La localización de la proteína de los genes reloj Per1 y Bmal fue revelado en con una solución 0.05% de diaminobencidina (Polyscience, Warrington PA EUA) en presencia de sulfato de níquel (10 mg/ml Fisher Scientific, Pittsburg PA EUA) cloruro de cobalto (10 mg/ml Fisher Scientific) y 0.01% de peróxido de hidrogeno lo que produce un precipitado purpura-negrusco. Se realizaron dos lavados con agua destilada, el primero de 5 minutos y el segundo de 3 minutos, posteriormente se pasan a deshidratar con alcoholes graduados al 70%, al 90% y al 100% de tres minutos cada uno. Finalmente las laminillas fueron montadas en Permount (Fisher Scientific) y observadas al microscopio.

Análisis de tejidos. Los tejidos se observaron con un microscopio de campo claro (Olympus BX41), conectado a la cámara del microscopio (Evolución VF Mediacybernetics) a un software (Imagen-Pro Plus) analizador de imágenes. Todas las micrografías están tomadas con el objetivo 10X.

CONTROL POSITIVO: Tejido en que se conoce que hay una abundante expresión de los genes reloj con los que trabajamos, para comparar la tinción con la del tejido problema. En este caso utilizamos el núcleo supraquiasmático del hipotálamo.

CONTROL NEGATIVO: Muestra representativa del tejido ganglionar de cada uno de los grupos experimentales a los que se omitió el anticuerpo primario, con la finalidad de distinguir las marcas propias del proceso, de las que resultan de la unión del anticuerpo con el ligando.

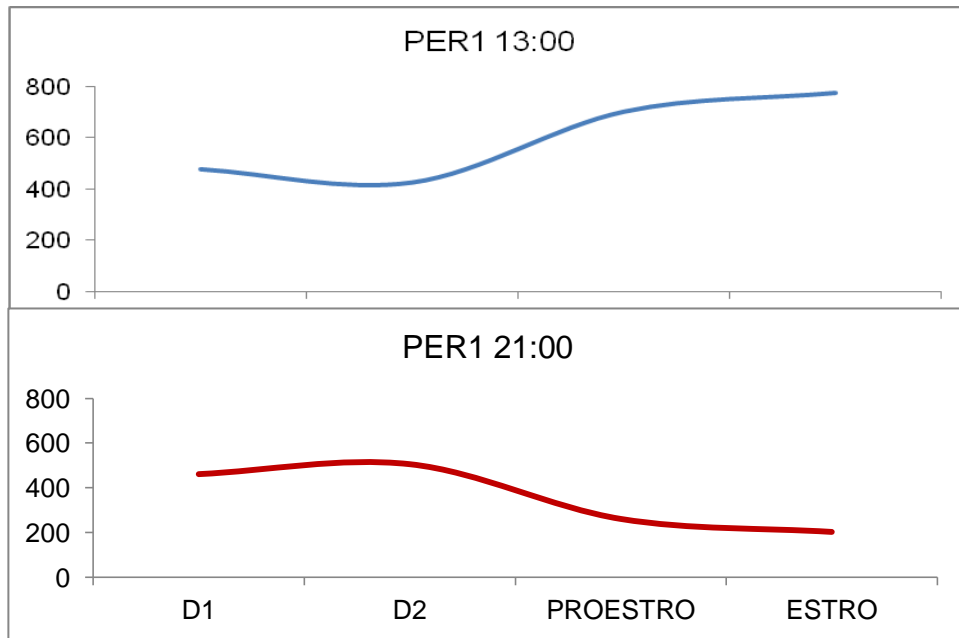
Análisis estadístico: Los resultados del número de neuronas que presentaron marca inmunopositiva a los genes reloj fueron analizados con una prueba no paramétrica Kruskal Wallis seguida de “U” de Mann-Whitney.

RESULTADOS

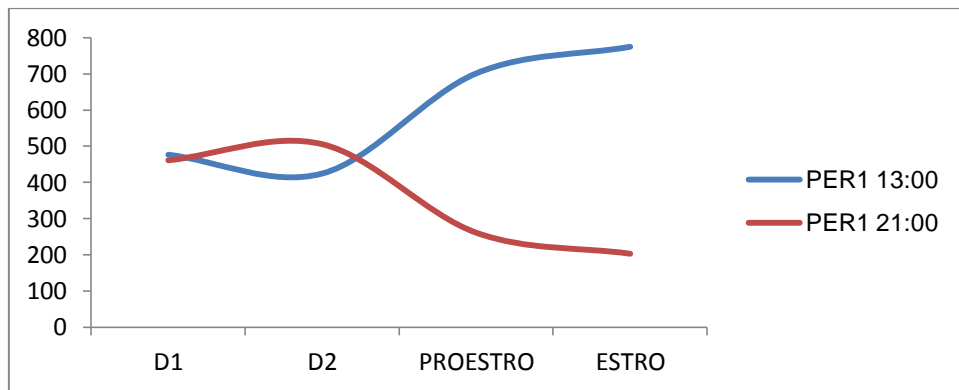
Cuadro 1. Media \pm e.e.m. del número de neuronas inmunorreactivas a la proteína de Per 1 y Bmal, en el GCMS de ratas sacrificadas a las 13 y 21 horas, en los diferentes días del ciclo estral.

	D1	D2	PROESTRO	ESTRO
PER1 13:00	476.25 \pm 171	424.33 \pm 102.6	701 \pm 217.2	774.5 \pm 268.1
PER1 21:00	461.67 \pm 150	506.3 \pm 122.3	261 \pm 26.2	202.75 \pm 202
BMAL13:00	1133.25 \pm 440	3252.7 \pm 109.8	296.5 \pm 17.3	2320.25 \pm 1112
BMAL21:00	214 \pm 24.8	243.75 \pm 31.7	325 \pm 143.1	169.75 \pm 70.6

En el cuadro 1, se observa la diferencia en el número de neuronas que expresan los genes reloj Per1 y Bmal en las neuronas del ganglio celiaco mesentérico superior de grupos de ratas sacrificadas en los diferentes días del ciclo estral y en los diferentes horarios: 13:00 h y 21:00 h. Se observa que el gen reloj que tuvo mayor expresión fue el gen reloj Bmal de las 13:00 h en D2, mientras que su actividad menor fue durante el periodo de oscuridad en estro (21 h). Por otra parte el gen reloj Per1 tuvo su máxima expresión en el periodo de luz de las 13:00 h en estro y menor actividad fue en el periodo de oscuridad en estro.

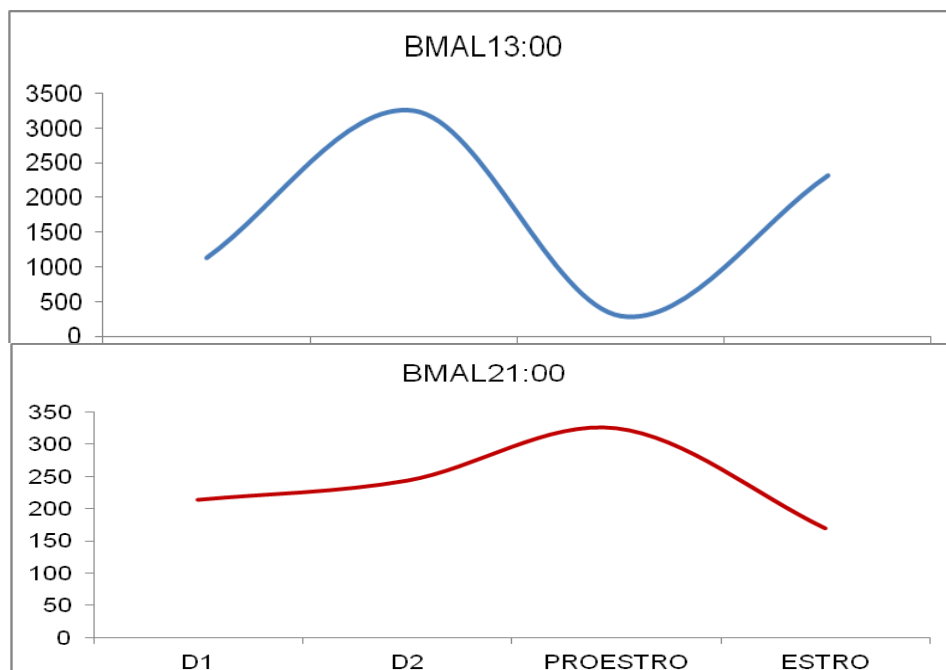


Grafica 1. Media \pm e.e.m. del número de neuronas inmunorreactivas a Per 1 localizadas en el GCMS de ratas sacrificadas a las 13:00 o a las 21:00 horas durante los días del ciclo estral de la rata hembra adulta.

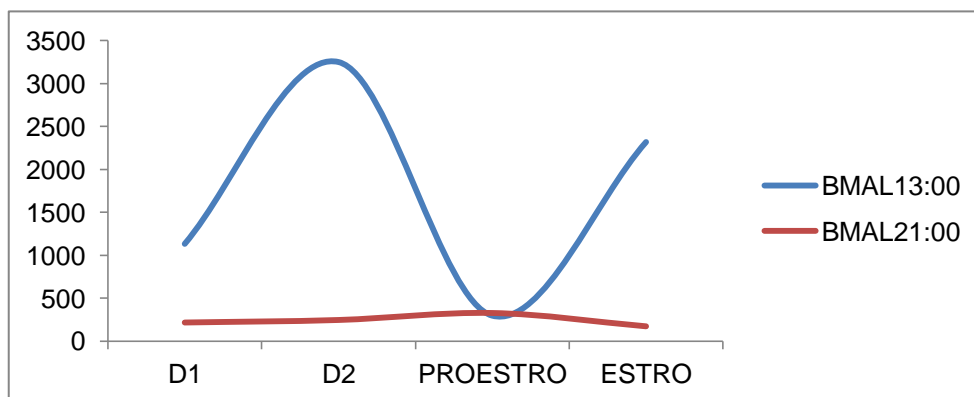


Grafica 2. Media \pm e.e.m. del número de neuronas inmunorreactivas a Per 1 localizadas en el GCMS de ratas sacrificadas a las 13: 00 y 21:00, durante los días del ciclo estral de la rata hembra adulta.

En la gráfica 1. Se muestra que la expresión del gen Per1 en las neuronas del ganglio celiaco a las 13:00 (línea azul) es baja durante los dos días del diestro, e incrementa en proestro y en estro. Sin embargo a las 21:00 horas (línea roja), este proceso se revierte, siendo los días de diestro los de mayor expresión que disminuye en proestro y estro. Efecto que se visualiza mejor en la gráfica 2, donde se hace una comparación entre los horarios, se pueden observar fluctuaciones de los genes reloj durante el ciclo estral obteniendo una imagen de espejo.

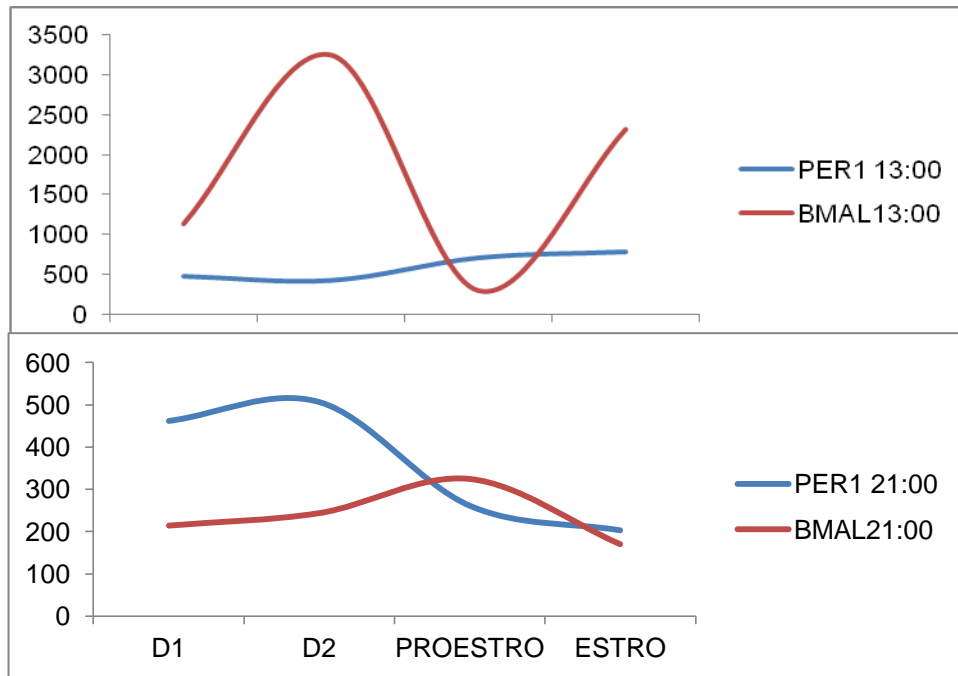


Gráfica 3. Media \pm e.e.m. del número de neuronas inmunorreactivas a Bmal localizadas en el GCMS de ratas sacrificadas a las 13:00 o a las 21:00 horas durante los días del ciclo estral de la rata hembra adulta.

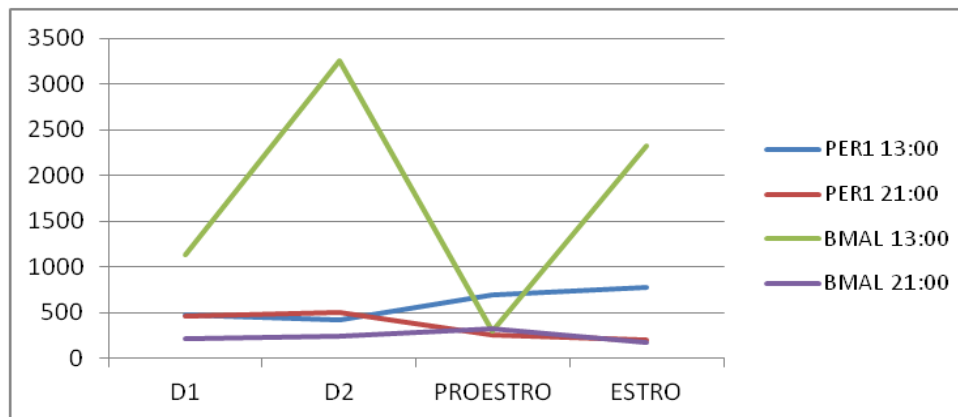


Gráfica 4. Media \pm e.e.m. del número de neuronas inmunorreactivas a Bmal localizadas en el GCMS de ratas sacrificadas a las 13:00 y 21:00, durante los días del ciclo estral de la rata hembra adulta.

En la gráfica 3. Se muestra la expresión del gen reloj Bmal en las neuronas del ganglio celiaco a las 13:00h (línea azul) donde se muestra que oscila a lo largo del ciclo estral, obteniendo un pico máximo en diestro 2 y estro, baja en diestro1 y en proestro. A las 21:00h (línea roja) observamos un aumento en proestro. En la gráfica 4 se comparan los dos horarios y se muestra que el valor más alto de neuronas inmunopositivas a BMAL es en diestro 2 de 13:00 comparando este horario con el de 21:00 este es menor un 10% aproximadamente, y se pierde la oscilación.



Gráfica 5. Media \pm e.e.m. Del número de neuronas inmunorreactivas de Per 1 y Bmal localizadas en el GCMS de ratas sacrificadas a las 13: 00 a lo largo del ciclo estral de la rata hembra adulta.



Gráfica 6. Media \pm e.e.m. Del número de neuronas inmunorreactivas a Per 1 y Bmal localizadas en el GCMS de ratas sacrificadas en los dos diferentes horarios 13.00 y 21.00 a lo largo del ciclo estral de la rata hembra adulta.

En la gráfica 5. Se muestran los valores del número de neuronas inmunopositivas a la proteína de los dos genes reloj las 13:00 h: Bmal presenta una mayor expresión en diestro 2 y estro, a lo contrario de Per1 con poca oscilación y un máximo en el estro. A las 21:00 se observan diferencias entre la expresión de ambos genes en los días de diestro se muestra que dejan de fluctuar en proestro y estro. En la gráfica 6. se muestra la expresión de los dos genes reloj en las neuronas ganglionares en los dos horarios, es notable que la cantidad de neuronas que expresan BMAL a las 13:00 h minimice las oscilaciones del otro horario y del otro gen reloj.

RESULTADOS INUNOHISTOQUÍMICA

FIG. 1: RATA 17. D1 GCMS PER1 21:00

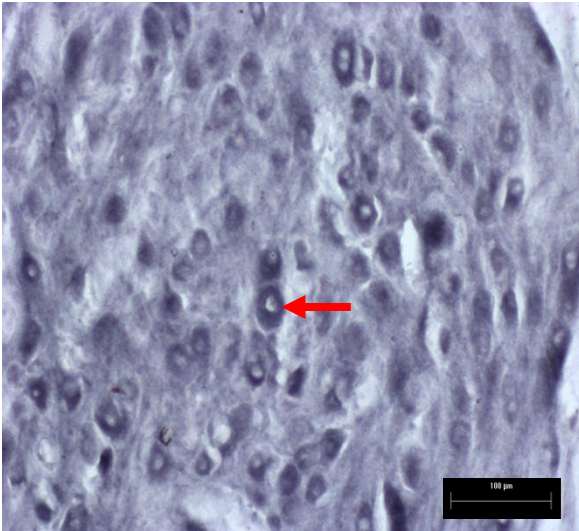


FIG. 2: RATA 17. D1 GCMS BMAL 21:00

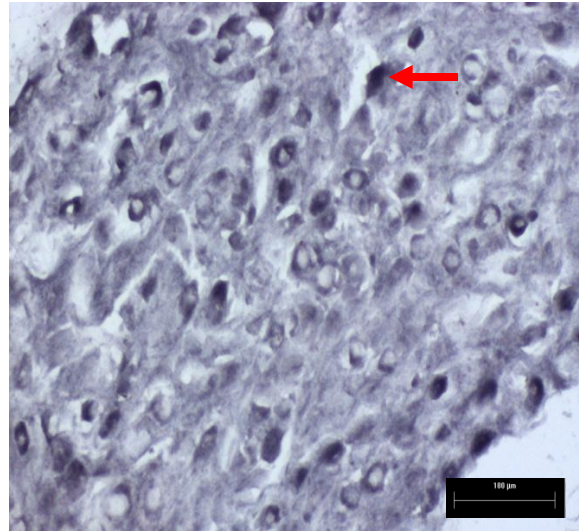


FIG. 3: R13. D2. GCMS PER1 13:00

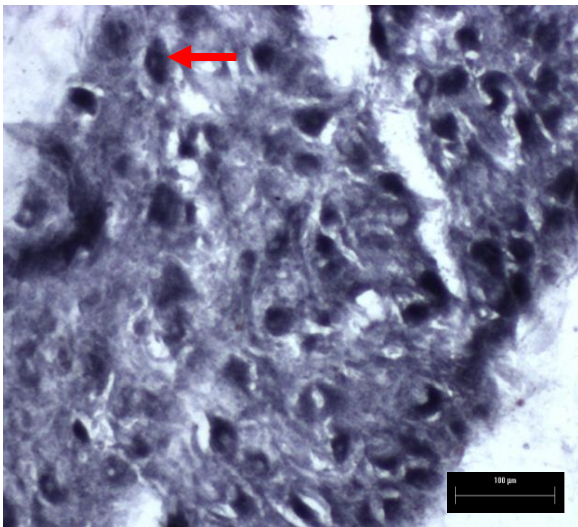
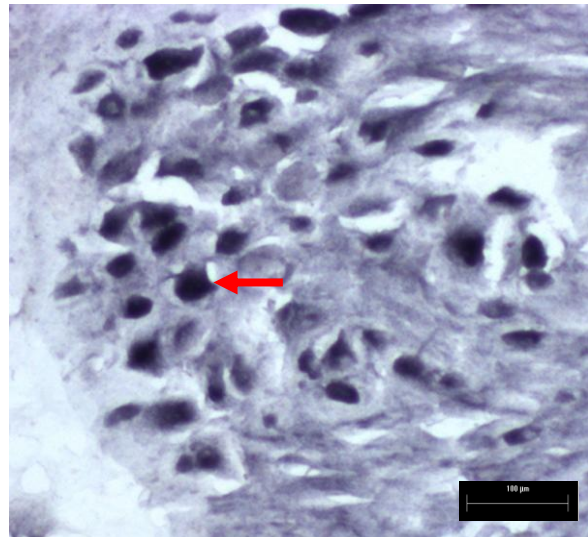


FIG. 4: R4. D2 GCMS BMAL 13:00



Micrografías de neuronas inmunorreactivas a Per 1 y Bmal localizadas en el GCMS de ratas sacrificadas en los dos diferentes horarios 13.00 y 21.00 a lo largo del ciclo estral de la rata hembra adulta.

En las figuras 1 y 2 se muestran de color negro las neuronas que expresaron inmunorreactividad a la proteína de los genes reloj Per1 y Bmal. En diestro 1 se observa los dos genes reloj de 21:00 donde se observa mayor expresión a gen reloj Bmal, en las figuras 3 y 4 en diestro 2 de 13:00 h, con los genes reloj se muestra mayor expresión al gen per1.

FIG. 5: R8. PROESTRO GCMS PER1 21:00

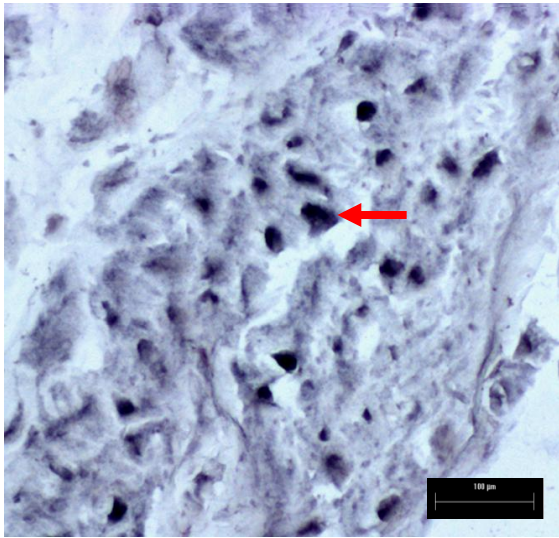


FIG. 6: R8. PROESTRO GCMS BMAL 21:00

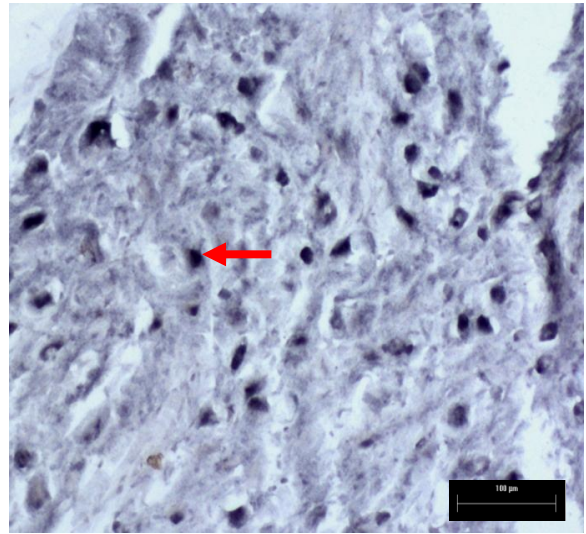


FIG. 7: RATA2. ESTRO GCMS PER1 13:00

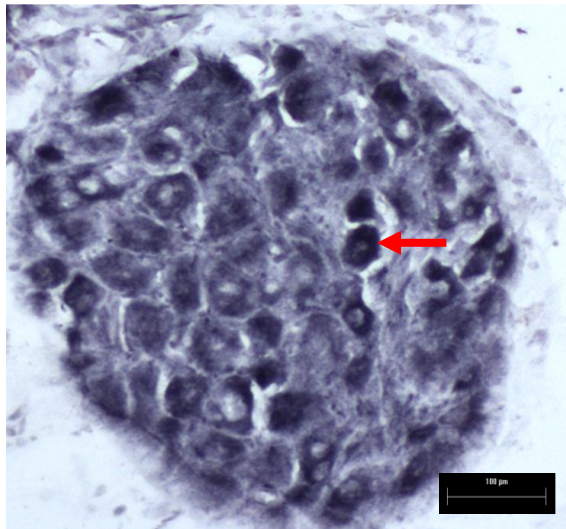
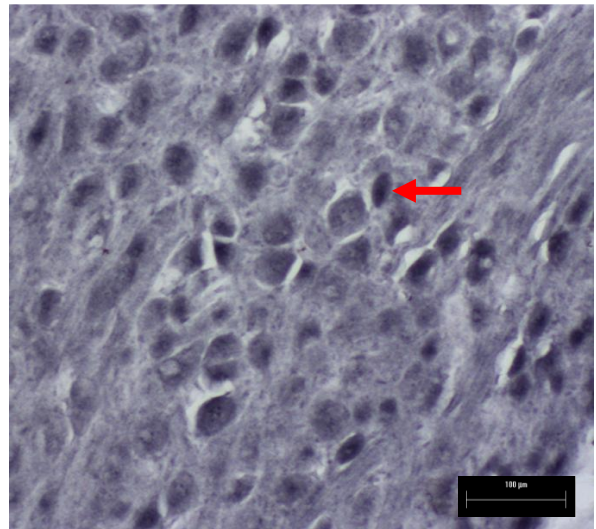


FIG. 8: R2. ESTRO GCMS BMAL 13:00



Micrografías de neuronas inmunorreactivas a Per 1 y Bmal localizadas en el GCMS de ratas sacrificadas en los dos diferentes horarios 13.00 y 21.00 a lo largo del ciclo estral de la rata hembra adulta.

En las figuras 5 y 6 se muestra mayor expresión al gen reloj bmal en el día del proestro a las 21:00 h. En las figuras 7 y 8 durante el día del estro a las 13:00 h, se muestra mayor expresión del gen reloj Bmal. Las neuronas inmunorreactivas en las imágenes están indicadas por las flechas rojas.

Control negativo 13 horas

FIG.9. R10 D1 EN EL GCMS

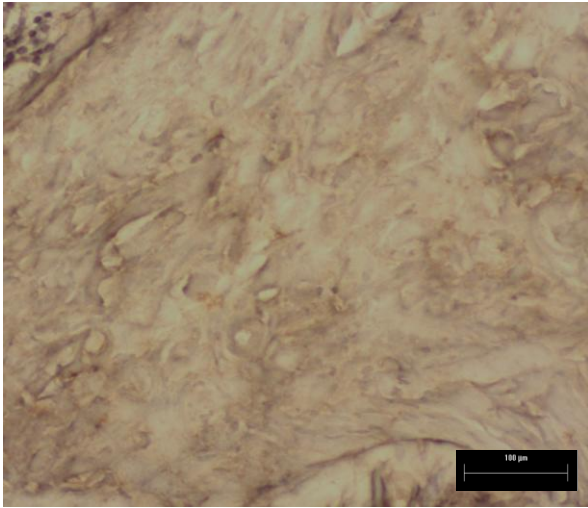
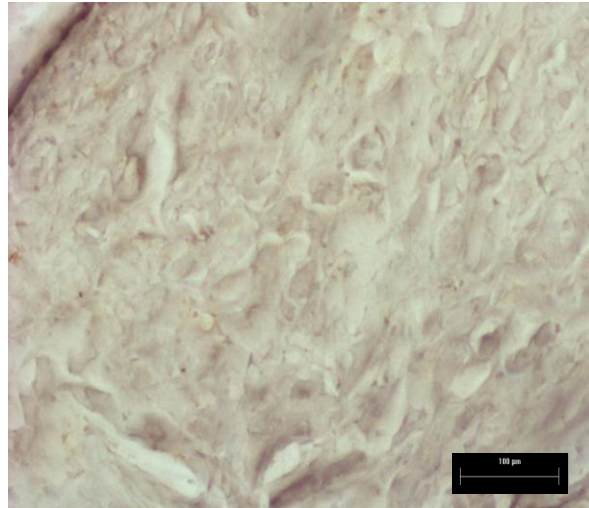


FIG.10. R2 D2 EN EL GCMS



Control negativo 21 horas

FIG.11. R6 PROESTRO EN EL GCMS

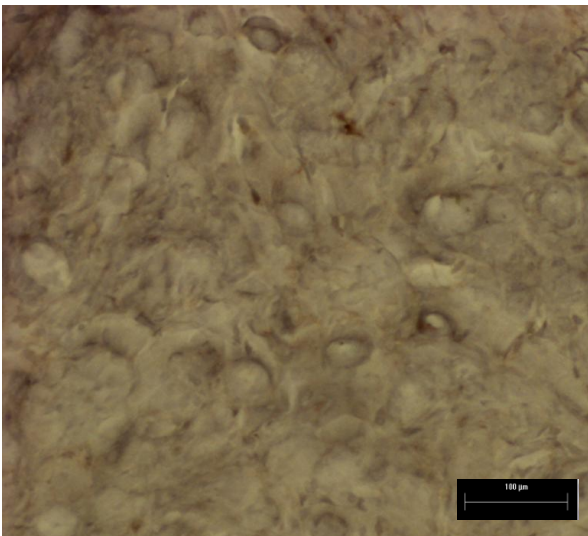
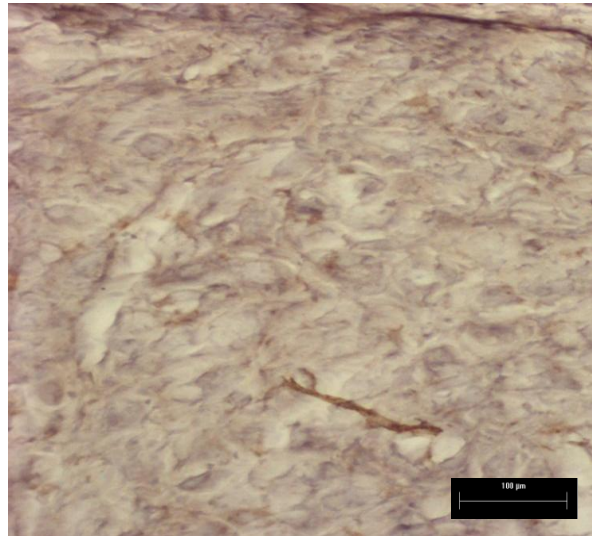


FIG.12. ESTRO EN EL GCMS



Micrografías del GCMS (control negativo) de ratas sacrificadas en los dos diferentes horarios 13.00 y 21.00 a lo largo del ciclo estral de la rata hembra adulta.

En las figuras 9-12 se muestran imágenes del GCMS de control negativo, en el procedimiento de la inmuno-histoquímica no se aplicó el anticuerpo primario. Sólo se observa los contornos suaves de las neuronas.

Control positivo 13 horas

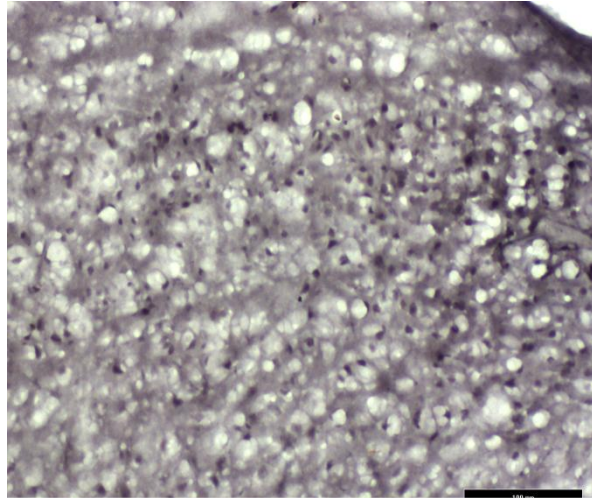


FIG.13. Imagen del NSQ derecho durante el día de diestro 2 mostrando neuronas inmunoreactivas a Per1 (puntos más oscuros)

En la figura 13 se muestra la imagen del núcleo supraquiasmático derecho, donde observamos neuronas inmunoreactivas a Per1 (control positivo) donde los puntos negros son las neuronas que expresan al gen reloj. Se observa bien las diferencias en su expresión del control positivo, control negativo.

DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos del presente proyecto podemos confirmar la presencia de los dos principales genes reloj (Per 1 y Bmal) en el ganglio celiaco, descritos ampliamente en hipotálamo y en los órganos periféricos, pero no en el sistema nervioso periférico. Al mismo tiempo, mostramos que se presentan oscilaciones en su expresión durante los diferentes días del ciclo y los periodos de luz-oscuridad, lo que nos permite sugerir que la actividad de dichos genes estaría involucrada en la actividad de las neuronas conectadas con las gónadas.

En nuestro laboratorio se mostró (Morán *et al.*, 2005) que las neuronas del GC que inervan a los ovarios, tienen capacidad de transportar un trazador retrogrado desde el ovario hasta los somas neuronales en el GC, de manera diferencial para el lado izquierdo y derecho, dependiendo del día del ciclo estral en que se encontraba la rata. Por lo que este trabajo decidimos hacer el estudio lateralizado. Al inicio del trabajo se realizó un conteo diferenciando el lado izquierdo del lado derecho del complejo ganglionar: ganglio celiaco, ganglio mesentérico, ganglio suprarrenal (GCMS), sin embargo dado que no se encontraron diferencias entre ambos segmentos, se decidió reportar un solo número por las estructuras izquierdas y derechas conformando el complejo Ganglio Celiaco Mesentérico Superior (GCMS).

Burden (1985) describió un sólo ganglio celiaco, sin embargo varios autores, (Kandel *et al.*, 2001, Moore *et al.*, 2002, Romero, 2012) han mostrado el ganglio derecho e izquierdo, para los ganglios celiaco y suprarrenal y un ganglio mesentérico superior. El plexo celiaco, rodea la raíz del tronco arterial celiaco, contiene los ganglios celiacos derecho e izquierdo, se une por encima y por debajo a tronco celiaco, la raíz parasimpática del plexo celiaco es una rama del tronco posterior que contiene fibras de los nervios vagos derecho e izquierdo (More *et al.*, 2002), otros autores (Berthoud y Powely, 1996) describen el (GMS) ganglio mesentérico superior y el Ganglio Celiaco (GC) para formar un complejo ganglionar que se sitúa alrededor de la arteria celiaca y la arteria mesentérica superior, formando así el ganglio celiaco derecho; en nuestro trabajo, aunque se distinguió entre las porciones derecha e izquierda, se realizó el estudio como un solo complejo ganglionar.

Algunas fibras preganglionares pasan a través de los ganglios simpáticos y de las ramas de los nervios esplácnicos para establecer sinapsis sobre los ganglios prevertebrales, que

comprenden el ganglio celiaco y los ganglios mesentéricos superior e inferior. Las neuronas de estos ganglios inervan el aparato digestivo y los órganos digestivos accesorios, incluidos el páncreas y el hígado y también proporcionan inervación simpática a los riñones, la vejiga y los genitales, (Kandel *et al.*, 2001). Una vez que conocemos que el GCMS inerva a varios órganos abdominales, entonces, con los resultados mostrados en el presente estudio, podemos afirmar que la actividad de los genes reloj del complejo ganglionar es un reflejo del vínculo de las neuronas del ganglio nervioso con las gónadas y los demás tejidos abdominales.

Este es el primer trabajo que describe la presencia de los genes reloj en neuronas del sistema nervioso periférico (GCMS). Se han reportado estudios con los genes reloj en diversas especies: ratón, en rata, conejo, hámster, etc. Y dichos genes (*Per*, *Cry* y *Bmal1*), similares a los que se expresan en las neuronas del núcleo supraquiasmático (NSQ), han sido descritos en una gran variedad de tejidos periféricos: hígado, corazón, pulmón, riñón, musculo, tejido adiposo, páncreas, pulmón, suprarrenales y ovarios (Fahrenkrug, 2006 y 2008, Hernández y García, 2010: Valdés *et al.*, 2010.), en los que también se ha evidenciado que presentan una expresión rítmica en los ciclos de luz-oscuridad.

En tejidos periféricos de la rata cultivados *in vitro* (hígado, riñón, corazón, pulmón fibroblastos entre otros tejidos), la expresión circadiana de los genes reloj se pierde en 2 a 7 días. Lo que ha llevado a postular que el NSQ es el reloj maestro o central con un ritmo circadiano intrínseco que sincroniza, por medio de diversas señales neurales y humorales, la actividad de los osciladores circadianos localizados en los tejidos periféricos y otras regiones del cerebro. También, se ha destacado la participación del Sistema Nervioso Autónomo como un mecanismo por el cual las vías de salida del reloj transmiten la información circadiana generada en el NSQ hacia todos los órganos y tejidos periféricos (Hernández y García, 2010).

La actividad endógena del NSQ depende de estímulos fóticos para su sincronización y es fundamental para mantener el ritmo circadiano en una gran variedad de organismos. El NSQ está formado por múltiples células autónomas que oscilan de manera circadiana, están sincronizadas para activarse de manera rítmica y generar una respuesta circadiana coordinada en el organismo intacto por este reloj central. Los ritmos de osciladores periféricos que se encuentran en muchas células y en diversos órganos de las ratas, no es auto sostenible y requiere de señales del NSQ (Caba, 2008).

Se describe en la literatura que la expresión de los genes *Per 1* y *Bmal* son antagónicos. El reloj circadiano se expresa regularmente en periodos que oscilan cada 24 horas: 12 de luz y 12 de oscuridad, en condiciones ambientales constantes. Fahrenkrug *et al.*, (2008) trabajo con los genes reloj en ovario y en glándula suprarrenal, reportando que el gen reloj *Per1* es más alto en la oscuridad a diferencia del gen reloj *Bmal* que presentó un máximo en el periodo de luz. Por estas características varios autores (Schibler *et al.*, 2003, Fahrenkrug *et al.*, 2006 y 2008, Gutu *et al.*, 2013) han generalizado la premisa del antagonismo de estos dos genes reloj. En este trabajo se decidió estudiar ambos relojes en el complejo ganglionar, porque hay evidencias fisiológicas y anatómicas que muestran diferencias en la actividad de las neuronas a lo largo del ciclo reproductivo de la rata y entre ambas gónadas. Las diferencias que no han podido ser asociadas a las hormonas circulantes (Fahrenkrug, 2008) o la capacidad de respuesta de la misma glándula (Fahrenkrug, 2006) o al número de receptores a estradiol en las mismas neuronas del ganglio (Bravo, 2014).

Nuestros resultados mostraron que el antagonismo no aplica rígidamente para este sistema, ya que la expresión de ambos genes depende más bien de la etapa del ciclo estral en la que fue sacrificado el animal, que de los periodos de luz-oscuridad. Ejemplo: la expresión del gen reloj *Bmal* presentó un pico máximo a las 13.00 h del diestro², mientras que su concentración fue mínima en proestro a la misma hora. El mismo gen evaluado en el periodo nocturno (21horas), tuvo sólo un pico en proestro.

En este apartado consideramos además otros factores: la mayoría de los estudios utilizan periodos de luz-oscuridad (12:12) parejos, sin embargo las condiciones en las que permanecen nuestros animales en el bioterio Claude Bernard de la BUAP, es de 14 horas luz y 10 horas oscuridad. Por otra parte, la mayoría de autores reporta sus resultados en ratón, y aunque describen resultados en periodos diurnos y nocturnos, no establecen un horario definido. La complejidad de trabajar con la rata adulta radica en que sus ciclos representan cambios asociados con la concentración variable de las hormonas circulantes, sobre todo las hormonas esteroides.

Hay numerosas evidencias en grupos neuronales tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico, que modifican su funcionamiento en las respuestas a las variación en la concentración de las hormonas esteroides (Papka *et al.*, 2001) Por otro lado se ha visto que

diversas señales, como la administración de análogos de los glucocorticoides y el cambio en el horario de alimentación, alteran los patrones circadianos de expresión de los genes reloj en el hígado y en otros tejidos periféricos, pero no afectan su expresión en el NSQ. Esto sugiere que bajo ciertas condiciones metabólicas o fisiológicas, el control local del ritmo de los osciladores periféricos se puede desacoplar del control del NSQ, para adaptarse a condiciones particulares sin afectar el reloj central, esto a su vez permitiría optimizar la fisiología celular, de tal forma que se restrinja la expresión de ciertos genes cuando sus productos son requeridos. Cuando estas condiciones particulares desaparecen, el NSQ puede sincronizar a los osciladores periféricos de regreso a su ritmo normal (Hernández, 2010).

Haciendo una comparación de los dos genes reloj Per1 y Bmal con el horario de 13:00 se observa su antagonismo y su respuesta diferencial dependiendo de la concentración de esteroides circulante: Después del pico máximo de Bmal en D2, se presenta una caída en proestro, lo que podría estar asociado a concentraciones elevadas de progesterona, o un incremento del estradiol; en el mismo horario Per1 es baja en los días de diestro y se eleva en proestro. En el horario de 21:00 con Bmal presenta su pico máximo en proestro evento que además de estar acompañado de pico máximo de estradiol pudiera estar potenciado por el periodo de oscuridad; mientras que Per1 presenta su pico máximo de expresión en diestro y cae en proestro, en un claro antagonismo con Bmal.

Los resultados del presente trabajo coinciden parcialmente con lo descrito por Fahrenkrug *et al.*, 2006, y 2008. En glándulas como los ovarios y las suprarrenales, en donde reporta al gen reloj Per1 con concentraciones elevadas en la oscuridad y Bmal en el periodo de luz. Nuestros resultados varían con este autor en primera porque nuestro trabajo está hecho en un grupo de ganglio celiaco (GCMS) del sistema nervioso autónomo. Y aunque también se muestran antagonismos entre ambos genes en los periodo de luz oscuridad, las variaciones en la expresión de dichos genes es más diversa acorde a las etapas del ciclo estral de la rata.

Entonces con los resultados del presente trabajo podemos sugerir que los genes reloj Per 1 y Bmal son antagónicos tanto en los periodos de luz-oscuridad como a lo largo del ciclo estral: La mayor expresión de Bmal fue en el día, mientras que para Per1 fue durante la noche, obteniendo oscilaciones importantes por la inervación autonómica del GCMS durante los

diferentes días del ciclo estral de la rata, probablemente debido a la acción diferencial de las hormonas esteroides, como el estradiol y progesterona la influencia del NSQ.

CONCLUSIONES

Este es el primer trabajo que describe la expresión de los genes reloj Per 1 y Bmal en los ganglios nerviosos periféricos (Celiaco, suprarrenal y mesentérico superior).

La expresión de los genes reloj Per1 y Bmal en el GCMS presentó variaciones durante el ciclo estral de la rata, que pudieran estar asociadas a la concentración de hormonas esteroides circulantes.

Se obtuvo una expresión diferenciada de los dos genes reloj Per1 y Bmal, en los horarios de 13:00 y 21:00.

En los genes reloj Per1 y Bmal con los horarios de 13:00 y 21:00 se observa su antagonismo a lo largo del ciclo estral, obteniendo un pico máximo en el gen reloj Bmal de 13:00 horas en el D2.

Se comprueba que en los genes reloj varía en su expresión en los diferentes días del ciclo estral, así comprobando que el gen reloj Bmal ocurre en el periodo de luz, mientras que Per1 se expresa en el periodo de oscuridad.

PERSPECTIVAS

Evaluar la expresión de los genes reloj en horarios diferentes para hacer un mapeo de dicha actividad a lo largo del ciclo estral.

Evaluar la expresión de los genes reloj con receptores a hormonas esteroides.

Analizar los efectos de la falta de comunicación con el NSQ en la expresión de los genes reloj con el Ganglio celiaco.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez A, Pérez E, De la Cruz t, Hernández M, Quincosa J, Sánchez A, 2009. Fisiología animal aplicada Editorial universidad de Antioquia., I.S.B.N 978-958-714-219-8. Pág. 104.

Amandusson, Blomqvist, 2009. Estrogen receptor-alpha expression in nociceptive-responsive neurons in the medullary dorsal horn of the female rat, doi:10.1016/j.ejpain.05.008.

Castellanos Á, Rodríguez K, Salgado R, Carolina Escobar, 2007. Cronobiología Medica, Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos., Rev Fac Med UNAM Vol.50 No.6.

Bakewell S, Pratt O, Gwinnutt C, 1995. The Autonomic Nervous System-Dasic Anatomy and physiology. Issue; Vol 5: Article 6:1-2.

Barbacka G, Surowiak J, Stanisława S, 2003. The involvement of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of estrous cycles in rodents., Reproductive Biology., Vol. 3, No. 2.: 99-129.

Berthoud H, Powley T, 1993. Characterization of vagal innervations to the rat celiac, suprarenal and mesenteric ganglia. J Journal of the autonomic nervous system. Vol. 42, No 2 - ISSN 1872-7484. Paginas 153-169.

Bravo-Benítez J, 2014. Identificación de los receptores a 17β -Estradiol en las neuronas del GC. Durante el ciclo estral de la rata adulta. . Tesis de maestría en Ciencias de la Salud. UPAEP, BUAP.

Burden H, Lawrence IE Jr, Louis M. Hodson CA, 1983. Abdominal Vagotomy does not active the corpus luteum in rats. Neuroendocrinology 37:288-290

Caba M, Morgado E, Meza, Tovar A, 2008. Bases celulares y moleculares de los ritmos biológicos. Primera edición., I.S.B.N.978-968-834-843-7. Paginas: 15-24. 39, 81-95. 97-104, 115.

ChecaM, Espinos J, Matorras R, 2007. Síndrome del Ovario Poliquístico., Editorial Panamericana. Páginas 46-49.

De Costa, Madrid Z, 1993. Manual de clases prácticas de fisiología animal., I.S.B.N.: 84-7684-449-7. Paginas 146-148.

Domínguez R, Flores A, Cruz Morales, 2012. Hormonal and Neural Mechanisms Regulating Hormone Steroids Secretion, Steroids-Basic Science. I.S.B.N. 978 953 307 866 3.

Fahrenkrug J, Birgitte G, Hannibal J, Hindersson P, and Graas S, 2006. Diurnal Rhythmicity of the Clock Genes Per1 and Per2 in the Rat Ovary. *Endocrinology* 147(8):3769–3776.

Fahrenkrug J, Hannibal G, Birigitte, 2008. Diurnal Rhythmicity of the Canonical Clock Genes Per1, Per2 and Bmal1 in the Rat Adrenal Gland is Unaltered after Hypophysectomy *Journal of Neuroendocrinology* 20, 323–329.

Fanjul M, Hiriart M, 1998. *Biología funcional de los animales. Mensajeros químicos y regulación neuroendocrina*, Primera edición, siglo xxi editores. I.S.B.N. 968-23-21-36-0. Páginas 279- 301.

Gutu A, O' Shea E, 2013. Two antagonistic Clock-Regulated Histidine Kinases Time the Activation Of Circadian Gene Expression. *Molecular cells* 50, 1-7.

Hernández F, García S, 2010. Ritmos circadianos, Genes reloj y cáncer. Vol. 6. No. 2:3. doi: 10.3823/059.

Honma S, and Honma K, 2003. The biological clock: Ca²⁺ links the pendulum to the hands. *Trends Neurosci* 26,650–653.

Ibáñez T, Potau N, 2007. Ovario: estrógenos, gestágenos, andrógenos, globulina fijadora de hormonas sexuales, inhibinas y cariotipo *Endocrinología y Nutrición*, 54(3)174-181).

Kandel E, Schwartz H, Jessell M, 2001. *The Autonomic Nervous System and the hypothalamus. En: Principles of Neuronal Science. Ed. Kandel JH Schwartz TM Jessell (Eds) 4th Edition, Mc Graw-Hill* 49:961-964.

Kennaway J, Varcoe J, MAU J, 2003. Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Molecular human Reproduction*, Vol.9, No,9 pp.503-507.

Kennaway J, 2004. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human Reproduction Update*, Vol.11, No.1. Páginas 91–101.

Latarjet M, Ruiz A, 2004. *Anatomía humana., Cuarta Edición., Editorial Medica., Panamericana.* Páginas 144-149.

Lewis C, Bruce S, McEwen, Maya F, 1995. Estrogen-induction of dendritic spines in ventromedial hypothalamus and hippocampus: effects of neonatal aromatase blockade and adult GDx DOI: 10.1016/0165-3806(95)00052-F.

McEwen B, Alves S, 1999. Estrogen actions in the central nervous system *Endocrine*, Vol 20 no. 3. 279-307.

Michael D, 1981. *Farmacología del Sistema Nervioso Autónomo*, Editorial El manual moderno., Paginas 26-70.

Moore KL, 2008 *Embriología Clínica.*, octava Edición., Editorial Elsevier Saunders., paginas 20-24.

Moore K, Agur M, 2003. *Fundamentos de anatomía con orientación clínica.* Segunda edición, Editorial Medica panamericana S.A, I.S.B.N. 950-06-1578-9. Paginas 18-21.

Moore K, Persaud V, 2007. *Embriología clínica: el desarrollo del ser humano*, sexta edición, MMIII Elsevier Science, an Elsevier Imprint. Páginas 22-25.

Morán C, Franco A, Morán J, Handal A, Morales L, Domínguez R. 2005. Neural activity between ovaries and the prevertebral celiac- superior mesenteric ganglia varies during the estrous cycle of the rat. *Endocrine*. 26, no 2: 147,152.

Papka R, Storey M, 2001. Estrogen receptor-alpha and -beta coexist in a subpopulation of sensory neurons of female rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 319(2):71-74.

Romero L, 2012. Tesis de maestría: Estudio morfológico de las cadenas ganglionares cervicales y ganglios celiacos simpáticos y su relación con la terapia neural. Universidad nacional de Colombia.

Schiavon R, Gayon E, 2012. *Endocrinología Clínica.*, Editorial El manual moderno. Pag. 649-657.

Sellix MT, Menaker M, 2010. Circadian Clocks in the ovary, *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Vol.21, No.10.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD, 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with resorption of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226.

Takahashi JS, Ko C, 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock, *Human Molecular Genetics*, Vol. 15.

Urbina MT, Lerner Biber J, 2008. *Fertilidad y Reproducción Asistida.*, Editorial Medica Panamericana., Paginas 150, 152.

Valdés A, Pérez H, García RE, López A, 2010. *Embriología Humana.*, La Habana, Editorial Ciencias Medicas, paginas 25-39.

Williams SJ, Kyung C, Om AE, Papka RE, 1997. Cytosolic estrogen receptor concentrations in the lumbosacral spinal cord fluctuate during the estrous cycle. *Life Sci* 61: (26) 2551-2559.

Woolley CS, McEwen BS, 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci* 12:2549-2554.

Yen SS, Jaffe RB, Barbieri RL, 2001. *Endocrinología de la Reproducción: Fisiología Fisiopatología y manejo clínico.*, Editorial Panamericana. Pagina 174.