



## **El reloj circadiano ovárico: un segundero en la fisiología de la reproducción** **The ovarian circadian clock: a secondhand of the clock on the reproductive physiology**

Recibido: 10 de marzo de 2016; aceptado: 25 de mayo de 2016

**Cinthia Rocío Juárez Tapia<sup>1</sup>, Manuel Miranda Anaya<sup>2</sup>**

Facultad de Ciencias, UNAM

### **Resumen**

Para garantizar el éxito reproductivo, los mamíferos requieren de la organización de muchos procesos fisiológicos y conductuales, así como la participación de señales del medio ambiente. Durante la reproducción, las hembras secretan diversas hormonas que inducen de manera óptima la ovulación para la posible fertilización. Dichos eventos, se presentan rítmicamente y están vinculados a un proceso circadiano de regulación.

El núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo es considerado el reloj maestro de los ritmos circadianos en mamíferos e influye diariamente, vía neural y endocrina en diversos sistemas fisiológicos. La fisiología reproductiva es coordinada por las conexiones del NSQ con otros núcleos hipotalámicos encargados de la liberación de las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG).

En esta revisión se abordará la comunicación entre los sistemas circadiano y el eje HHG para la regulación del ciclo estral, con particular énfasis en el reciente descubrimiento del ovario como oscilador circadiano periférico en roedores.

*Palabras clave: ovario, sistema circadiano, oscilador periférico, fisiología reproductiva.*

### **Abstract**

To secure reproductive success, mammals require the establishment of several physiological and behavioral processes, as well as the involvement of environmental signals. During reproduction, females secrete a number of different hormones to induce an optimal ovulation for a potential fertilization. These events are presented rhythmically and are linked to the circadian regulation.

The suprachiasmatic nucleus (SCN) in the hypothalamus is considered the master clock of circadian rhythms in mammals, it affects neural and endocrine manner on several physiological systems daily. Reproductive physiology is coordinated by SCN connections with other hypothalamic areas, which are responsible for the release of the hormones involved in the hypothalamic-pituitary-gonads axis (HPG).

This review will address the communication between the circadian system and the HPG axis in the regulation of the estrous cycle, with a particular emphasis on the recent discovery of the role of the ovary as a peripheral circadian oscillator in rodents.

*Keywords: ovary, circadian system, peripheral oscillator, reproductive physiology*

## **INTRODUCCIÓN**

Los organismos llevan a cabo dos funciones básicas para su supervivencia: alimentarse y reproducirse. La primera es requerida para obtener energía y poder llevar a cabo procesos implicados durante el desarrollo; la segunda

es la manera de perpetuar la especie al transmitir y recombinar su información genética de generación en generación y es el sustrato de los procesos evolutivos ante el ambiente. La reproducción sexual requiere de la

<sup>1</sup> Maestra en Ciencias. Unidad de adscripción: Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM. Facultad de Ciencias. Estudiante candidata a doctora del posgrado en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Sus líneas de investigación son: Neurobiología de ritmos circadianos y su relación con el fotoperiodo y la fisiología reproductiva. Correo electrónico: cinth@ciencias.unam.mx

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias. Profesor Titular C de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias, Campus Juriquilla, Querétaro, UNAM. Sus líneas de investigación son: Neurobiología de ritmos circadianos y su relación con problemas ecológicos y de la salud. Correo electrónico: miranmanuel@ciencias.unam.mx.

fecundación para la combinación genética de dos células germinales, lo que implica una coincidencia en espacio y en tiempo para el encuentro de los gametos femeninos y masculinos.

En hembras de mamíferos, previo a la fecundación del óvulo, son necesarios una serie de procesos coordinados, tanto conductuales como fisiológicos con la pareja. La observación de los cambios de la diversidad de conductas y rasgos fenotípicos permitió a Darwin en 1859, postular una teoría de “la selección sexual”. Junto a los procesos conductuales, los procesos fisiológicos involucrados en la reproducción reciben una fuerte influencia del ambiente, lo que requiere de la coordinación óptima en el tiempo para que aumente la probabilidad del éxito reproductivo, tal función se logra, al parecer, a través de la participación del sistema circadiano.

El presente trabajo provee una revisión sobre el conjunto de evidencias relacionadas con el control circadiano en la reproducción de las hembras, específicamente en roedores; y hace énfasis en aquellos descubrimientos que analizan al ovario como tejido con funciones rítmicas circadianas. El artículo se estructura desarrollando a grandes rasgos los dos temas principales: fisiología del ciclo estral y ritmos circadianos; posteriormente se desarrolló un tema sobre la interacción de estos procesos. Estos tres temas fueron sustentados tanto con literatura clásica en el tema con enfoque de ritmos biológicos y/o circadianos, así como con literatura reciente.

Una vez establecidos los antecedentes generales, se abordó de lleno el análisis sobre el tema del ovario como oscilador periférico con base en la literatura especializada. Se plantearon las siguientes preguntas: ¿cómo se genera la coordinación entre un ritmo circadiano y uno infradiano?, ¿cuál es la importancia del ovario como oscilador periférico? Para coleccionar las referencias específicas en el tema, se realizó una búsqueda en las bases de datos *Pubmed* y *Scopus* con las siguientes palabras clave: *circadian clock in ovary*, *circadian rhythm*, *ovary* y *clock genes* utilizando el operador booleano *AND*. De los resultados de la búsqueda se seleccionaron aquellos artículos con los siguientes criterios: *a*) que analizaran componentes del reloj molecular circadiano en el ovario, *b*) que el estudio fuera en mamíferos y *c*) que el modelo biológico empleado para el estudio fuera en roedores. Tras la búsqueda se descartaron aquellos artículos irrelevantes con base en su título y resumen y se revisaron

los relevantes para el tema.

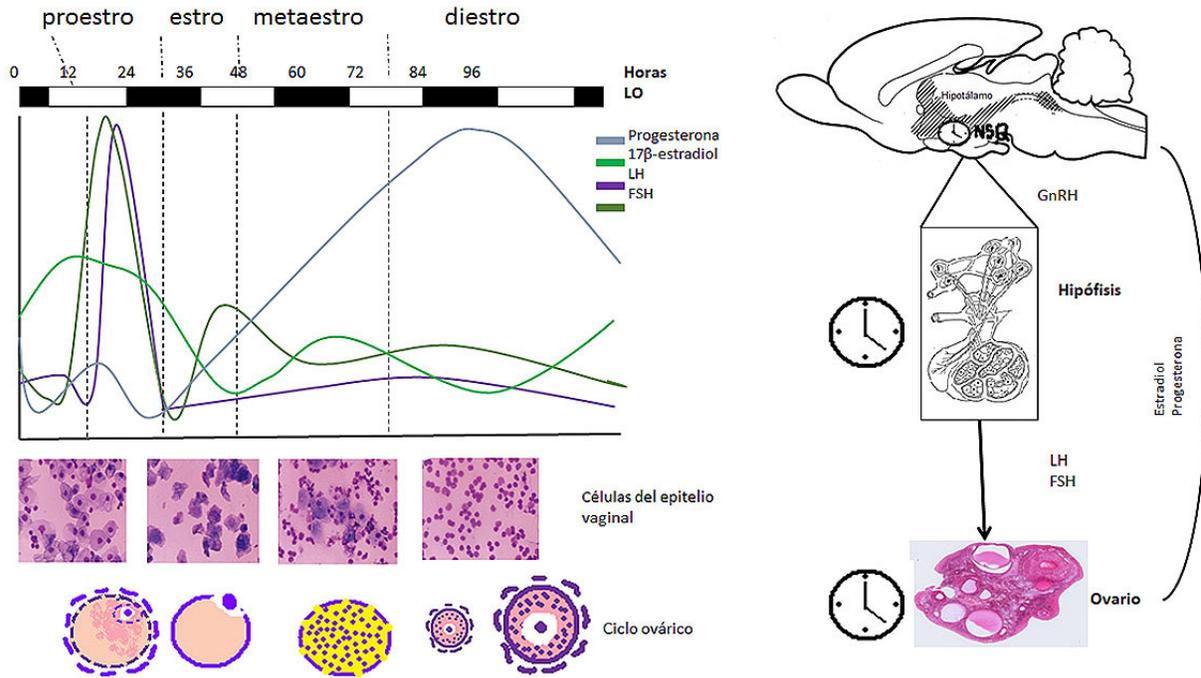
## EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS Y CICLO ESTRAL

La reproducción en la hembra es un tema de estudio sumamente amplio, pues abarca desde la conducta sexual y su control hormonal hasta la crianza y cuidado de las crías. La conducta sexual está conformada por tres procesos: atracción, proceptividad y receptividad, todos ellos con particularidades hormonales y fisiológicas muy específicas para cada especie. Para más detalles ver Beyer, Hoffman y González (2007). Para los fines de la presente revisión, se abordará directamente y de manera general, la fisiología del ciclo estral, la cual está inmersa en la conducta de receptividad, ya que existe un momento específico de éste ciclo donde la hembra es receptiva al macho.

A grandes rasgos, los ciclos reproductivos en las hembras de roedores son llamados ciclos estrales y tienen una duración aproximada de 4-5 días; cada ciclo consta de 4 etapas: proestro (*P*), estro (*E*), metaestro (*M*) y diestro (*D*), (Freeman, 1994). En cada una de ellas existen cambios hormonales bien definidos, ejemplo de ello son las altas concentraciones en plasma de la prolactina, la hormona luteinizante (*HL*) y la hormona folículo estimulante (*FSH*) en la tarde del proestro, específicamente a las 18:00 horas (Fink y Ayer, 1974); mientras que en *M* los niveles de estradiol se elevan hasta alcanzar su mayor concentración durante el *P* y regresan a niveles basales al final del *E*. Por su parte, la progesterona presenta dos picos de secreción, uno durante el *M* y el *D*, y el segundo pico de mayor amplitud durante el *P*, el cual decae al llegar la fase de *E*. La ovulación comienza al inicio del *P* y concluye al final del *E* (Marcondes, Biachi y Tanno, 2002) y puede ser rastreada mediante los cambios en las células del epitelio vaginal, las cuales caracterizan a cada etapa. Los eventos de liberación hormonal y de los ovocitos, implicados en el ciclo, demandan una coordinación temporal que está estrechamente relacionada e influenciada por un control circadiano (figura 1).

El ciclo estral no es el único proceso durante la reproducción femenina en donde se presenta un control circadiano. En conejos, el amamantamiento ocurre aproximadamente cada 24 horas y en las crías se presenta

**Figura 1. Cambios hormonales, ováricos y del epitelio vaginal durante el ciclo estral, y su control circadiano en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario**



Diagramas que representan y resumen los eventos de liberaciones hormonales durante los días (representados con las barras blancas y negras en horas) que constituyen el ciclo estral en roedores (izquierda), así como los cambios celulares observados en las células del epitelio vaginal y el ciclo ovárico (diagrama de la izquierda, abajo). Además, también se puede observar la influencia del sistema circadiano en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario y el papel de tales estructuras como osciladores (diagrama de la derecha). GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona folículo estimulante; NSQ, núcleo supraquiasmático.

Fuente: McLean, Valenzuela y Bennett, 2012.

una conducta anticipatoria, lo cual también puede reflejarse en la secreción de oxitocina, hormona que se libera con el estímulo de succión en las glándulas mamarias durante la lactancia (González-Mariscal, 2006).

Previo a la ovulación, la hormona liberadora de gonadotropinas (*GnRH*) es liberada desde el hipotálamo en su modalidad pulsátil; estos pulsos son de baja amplitud y presentan una duración de aproximadamente 30 min. (Chappell, 2005). El *M* se caracteriza por presentar un patrón de secreción basal de *GnRH* suficiente para estimular la secreción basal de hormona luteinizante (*LH*) y hormona folículo estimulante (*FSH*) desde la hipófisis; ambas hormonas promueven la maduración de folículos en los ovarios. Durante el *D*, algunos folículos se diferencian y comienza la secreción de estrógenos (17-β estradiol) aumentando gradualmente su concen-

tración en la sangre. En el *P*, la secreción de estrógenos por parte de los folículos maduros presenta su máxima concentración durante la noche del proestro y estimula la cornificación de las células en el epitelio vaginal; mientras que durante el *E*, los ovarios liberan simultáneamente varios ovocitos, en respuesta al aumento de las concentraciones preovulatorias de *LH* y *FSH* en la rata (Domínguez, Chávez y Cruz, 1991).

El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (*HHG*) es controlado principalmente por la *GnRH*, la cual es un decapeptido secretado por neuronas hipotalámicas localizadas desde el área preóptica (*POA*) hasta el núcleo arcuato (*ARC*). Una vez liberada la *GnRH* a la eminencia media (*ME*) viaja hacia la hipófisis a través de una red de capilares localizada en el infundíbulo. La *GnRH* en hipófisis se une a las células gonadotropas que presentan receptores



acoplados a proteína G; evento que estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas *LH* y *FSH*. Una vez en circulación, estas hormonas llegan al ovario y se unen a sus receptores en las células de la teca o granulosa de los folículos, desencadenando procesos de crecimiento, maduración y diferenciación folicular; así como la síntesis y secreción de hormonas esteroides (estrógeno y progesterona), y la liberación de los ovocitos (Sikes, 2009).

En resumen, la secreción de *GnRH* se presenta de dos formas: una pulsátil caracterizada por pulsos de alta frecuencia y baja amplitud (Chappell, 2005) que ocurre cuando hay bajas concentraciones de estradiol, lo que ocasiona la inhibición de la secreción de *GnRH* y *LH*; y una cíclica caracterizada por presentar un pico conspicuo durante la fase preovulatoria, cuando las altas concentraciones de estradiol retroalimentan positivamente la secreción de *GnRH* y *LH*. Este aumento en la liberación masiva de *GnRH* es requerido para inducir un pico en los niveles de concentración de *LH* indispensable para desencadenar la ovulación (Schneider, 2004).

## EL SISTEMA CIRCADIANO EN MAMÍFEROS

Las señales ambientales cíclicas con periodo estable permiten que los organismos se adapten a ellas y se anticipen a cambios periódicos en la iluminación y en la temperatura. Los ciclos geofísicos regulares parecen haber ejercido una presión selectiva en los seres vivos, esta influencia se observa en la persistencia de los ritmos en condiciones constantes y su correspondencia de duración aproximada (*circa*) con la ritmicidad de algún ciclo ambiental, la cual se caracteriza por durar aproximadamente 24 horas. Los ritmos circadianos son generados por un reloj biológico determinado genéticamente, el cual es capaz de sincronizarse diariamente a los ciclos de luz-oscuridad (Pittendrigh, 1993). La sincronización de un reloj circadiano resulta de la interacción entre un oscilador endógeno y una variable cíclica ambiental, conocida con el nombre de *Zeitgeber* (término alemán que significa dador de tiempo) o sincronizador (Aschoff, 1960).

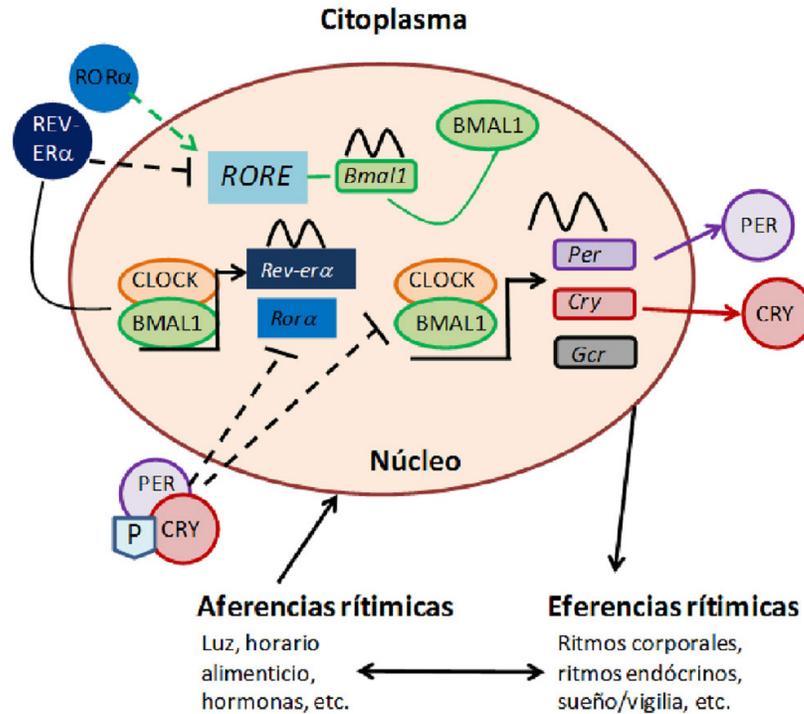
La sincronización es el proceso que ocurre cuando el periodo de un oscilador endógeno ( $\tau$ ) es ajustado y acoplado al periodo de un *Zeitgeber* ( $T$ ), por lo que se dice que  $\tau=T$ ; lo que establece una relación de fase ( $\Psi$ ) entre el oscilador circadiano y el *Zeitgeber* (Daan y Aschoff,

2001). Cuando se habla de tiempo del *Zeitgeber* (*Zeitgeber Time [ZT]* por sus siglas en inglés) se refiere al horario en condiciones artificiales en función al momento en que inicia la presencia de la luz. Cuando se habla de tiempo circadiano (*Circadian Time [CT]* por sus siglas en inglés), se refiere a 24 unidades horarias que se completan en el tiempo que constituye el periodo endógeno del oscilador biológico, usualmente son referidos a una conducta como el inicio de la actividad (Pittendrigh y Minis, 1964).

Aquellas señales capaces de sincronizar a un oscilador biológico, tienen que ser previamente percibidas por alguna estructura del organismo. El sistema circadiano consiste en todos los elementos biológicos que interactúan para mantener un orden temporal interno; de tal forma que es conformado por las vías aferentes (usualmente son sistemas sensoriales) a un marcapasos central u oscilador endógeno, y las vías de salida (tejidos u órganos) para el ritmo manifiesto. Las aferencias o vías de entrada transmiten información de las señales ambientales hacia el oscilador o marcapasos central, éste, realiza la integración de la información recibida sobre las señales externas y lleva a cabo un ajuste sobre diversas funciones fisiológicas temporales, cuyas eferencias son los ritmos neuronales, hormonales y conductuales (Schibler y Sassone-Corsi, 2002).

El origen endógeno de la oscilación circadiana en un organismo, requiere un mecanismo a nivel celular y molecular que es controlado por asas de retroalimentación de transcripción-traducción (Moore y Eichler, 1972). La primera asa de retroalimentación es integrada por el factor de transcripción *BMAL1* (*Brain and muscle Arnt-like protein-1*) que forma dímeros con la proteína *CLOCK* (*Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*) mediante el dominio *PAS*, y activa la transcripción de los genes *Period* (*Per1* y *Per2*) y *Cryptochrome* (*Cry1* y *Cry2*). Una vez activados *PER* y *CRY*, forman heterodímeros que ingresan al núcleo celular, donde inhiben su propia activación. Por otra parte, los heterodímeros de *CLOCK-BMAL1* inducen la expresión de un receptor nuclear huérfano llamado *Rev-erb $\alpha$*  y *ROR* (*retinoid-related orphan receptor*). La segunda asa de la maquinaria se establece por las modificaciones post-traduccionales del dímero *PER-CRY*, que implica la fosforilación por las caseína cinasas (*CK1 $\epsilon$* ,  $\delta$ ), lo cual asegura un retraso adecuado (figura 2), de manera que la duración del ciclo completo es de aproximadamente 24 horas (Takahashi *et al.*, 2008; Mohawk, Green

**Figura 2. Representación de las principales aspas de transcripción-traducción de los genes reloj en las células del NSQ de mamíferos**



El heterodímero conformado por *CLOCK/BMAL 1* se une a la región promotora de los genes *Per* y *Cry* y otros genes controlados por reloj (*Gcr*) responsables de las vías eferentes del reloj. Las proteínas *PER* y *CRY* se acumulan en el citoplasma donde se fosforilan (*P*) y translocan para inhibir su propia transcripción. Las eferencias rítmicas son responsables de sincronizar los ritmos en los relojes periféricos e influir en procesos fisiológicos. Por otra parte, las aferencias rítmicas participan en la diafonía con el centro del reloj molecular mediante mecanismos de retroalimentación. Las líneas punteadas indican los mecanismos reguladores positivos (verdes) y negativos (negros).

Fuente: Stubblefield, Terrien y Green, (2012)

y Takahashi, 2012).

La maquinaria molecular del reloj circadiano está presente en todas las células, sin embargo, fuera del NSQ la autonomía en la oscilación es débil, por lo que se reconoce como oscilador circadiano periférico a los tejidos que manifiestan oscilación de maquinaria de reloj *in vitro*, pero que rápidamente se amortigua. El NSQ sincroniza la fisiología del organismo a los cambios diarios mediante la coordinación de los osciladores periféricos a través de vías neuronales y humorales (Schibler y Sassone-Corsi, 2002). Estudios previos han demostrado que una variedad de factores son capaces de reajustar a los osciladores periféricos, como los glucocorticoides (Balsalobre, Mar-

cacci y Schibler, 2000), los estrógenos (Nakamura *et al.*, 2005) y las prostaglandinas (Tsuchiya *et al.*, 2005) entre otros. Cuando los organismos están sincronizados a un ciclo de luz-oscuridad, se establece una relación de fase particular entre los osciladores periféricos con el NSQ en una relación temporal tejido-específica (Abe *et al.*, 2002).

En resumen, los ritmos circadianos: son endógenos, ubicuos y capaces de sincronizarse a señales ambientales. Aquellos ritmos biológicos que se presentan varias veces en 24 horas (alta frecuencia) se les llama ultradianos; mientras que aquellos que requieren varios días para completarse (baja frecuencia) se les conocen como infradianos; las bases de estas oscilaciones no son cla-

ras pero al parecer reciben una fuerte influencia de los mecanismos circadianos.

## REGULACIÓN DEL CICLO ESTRAL POR EL SISTEMA CIRCADIANO

Entre la regulación del eje neuroendocrino que controla el ciclo estral y la regulación circadiana dada por el núcleo supraquiasmático, se plantea la siguiente pregunta: ¿existe influencia del reloj circadiano sobre un ritmo biológico infradiano como el ciclo estral? Las primeras evidencias de esta relación se mostraron a principios de la década de los 70 en hembras de hámster y de rata, cuya ablación del NSQ generó una condición anovulatoria, caracterizada por un estro persistente (Stetson y Watson, 1976; Brown-Grant y Raisman, 1977). Por otra parte, cuando hembras de hámster son expuestas a condiciones constantes de luz durante un periodo prolongado, presentan una ovulación asincrónica y ciclos estrales irregulares (Alleva *et al.*, 1968) así como un deterioro en el ritmo circadiano de actividad locomotriz (Stetson, Watson-Whitmyre y Matt, 1977). Además, en roedores con lesión del NSQ se presenta arritmia en la actividad locomotriz, y al recibir trasplantes de NSQ fetal, se recupera en cierta medida la ritmicidad circadiana en la conducta (Ralph *et al.*, 1990) pero no en los ritmos endócrinos de estos animales (Meyer-Bernstein *et al.*, 1999).

También se observó que el NSQ regula el pico preovulatorio de LH durante el ciclo estral a través de sus aferencias hacia neuronas hipotalámicas encargadas de secretar GnRH (de la Iglesia y Schwartz, 2006). Se propone que la liberación pulsátil de las gonadotropinas desde la hipófisis es posiblemente regulada por la sincronización de múltiples osciladores celulares que ajustan su secreción en respuesta a los cambios de los secretagogos hipotalámicos (Bonnetfont, 2010) pues se ha demostrado en cultivo de células de la hipófisis, oscilaciones de *mPer1* durante varios días (Yoshikawa *et al.*, 2005). La coordinación cíclica de estas oscilaciones puede favorecer la expresión de genes controlados por reloj, entre los cuales se encuentran los que median la síntesis y liberación de LH y FSH, cuyo tejido diana es el ovario.

El ovario es un órgano formado principalmente de folículos en diferentes estados de desarrollo, así como

de cuerpos lúteos. El crecimiento y desarrollo de los folículos encaminados a la liberación de ovocitos fertilizables, depende en parte, del patrón de secreción de las gonadotropinas; ejemplo de ello es la FSH, encargada del desarrollo folicular, pues promueve la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa; mientras que el pico de LH es esencial para la ovulación y el consecuente proceso de luteinización (McGee y Hsueh, 2000).

La regulación circadiana de la ovulación ha sido observada desde hace más de medio siglo. En las hembras de rata, el pico de LH se da aproximadamente 2-4 horas después de haber apagado las luces (Everett y Sawyer, 1950) durante el atardecer del proestro, cuando una señal precisa circadiana se coordina con un ambiente esteroideo apropiado (Legan y Karsch, 1975). Si se lesiona el NSQ se genera una ovulación irregular (Wiegand y Terasawa, 1982). Se han demostrado proyecciones neuronales desde el NSQ hacia las neuronas secretoras de GnRH en la rata (Kalsbeek y Buijs, 2002) y los cambios en la duración de los periodos de luz-oscuridad que se integran en el NSQ alteran el momento del pico de secreción de gonadotropinas durante el ciclo estral (Goldman *et al.*, 2004).

De acuerdo a las evidencias generadas sobre la relación entre el sistema circadiano y el eje HHG, Sellix y Menaker (2010) proponen el siguiente paradigma: en lugar de responder a un sistema jerárquico lineal, eventos como la ovulación controlados por el HHG son organizados temporalmente por un sistema multi-oscilador que depende de la sincronización entre el acoplamiento de sus componentes (ver figura 4A).

Los eventos reproductivos, a su vez, tienen efectos directos e indirectos sobre la organización circadiana de la conducta y la fisiología. Ejemplo de ello son los estudios sobre los cambios en los ritmos de actividad durante el ciclo estral; en los cuales se ha observado un adelanto de fase del inicio de la actividad locomotriz y un aumento de la amplitud de ésta durante el proestro; a lo que se le ha interpretado como una ganancia en el tiempo de interacción de la hembra con el macho para aumentar la probabilidad de la cópula (Morin, Fitzgerald y Zucker, 1977; Albers, Gerall y Axelsson, 1981). El ritmo de actividad locomotriz no es el único en el que ocurren cambios según la etapa estral, se ha reportado que el ritmo de temperatura corporal presenta un retraso de fase durante el proestro y un aumento en la amplitud durante el estro (Kent, Hurd y Satinoff, 1991).

El ciclo estral también cumple con la característica de ser un ritmo endógeno al igual que los ritmos circadianos, pero con origen y propiedades distintas (Stetson y Anderson, 1980). Desde el punto de vista de la cronobiología, la reproducción es un conjunto de ritmos agrupados dentro de otros ritmos de mayor periodicidad (de la Iglesia, 2006).

## EL OVARIO COMO OSCILADOR CIRCADIANO PERIFÉRICO

El ovario es un órgano encargado de la secreción de hormonas y de la liberación de los ovocitos para su posible fertilización. Las evidencias existentes sobre el ovario de roedores como oscilador circadiano periférico se sustentan en la expresión rítmica de genes de reloj en éste órgano. En extractos de ovario de ratas mantenidas en ciclos de LO 12:12, en las fases de P y E del ciclo estral, los mRNA de los genes *Per* (*Per1* y *Per2*) presentan un ciclo de expresión cada 24 horas aproximadamente, analizados con la técnica de la RT-PCR. En contraste, en oscuridad continua y sin definir la etapa del ciclo estral, la máxima amplitud del ciclo (acrofase) de *Per1* se presentó a las dos horas después de apagar la luz (ZT 14), mientras que *Per2* se presentó seis horas después (ZT18). Los cambios cíclicos en la expresión mRNA de *Per* se correlacionaron con un retraso de varias horas respecto al ciclo de las proteínas PER. Además, la localización *Per1* y *Per2* mediante el estudio de radio inmunohistoquímica indicó su presencia en células esteroideogénicas de folículos preantrales, antrales, preovulatorios y en el cuerpo lúteo; así como en tejido intersticial (Fahrenkrug *et al.*, 2006).

Estos estudios establecieron la primera evidencia concreta de que en el ovario de la rata existe un mecanismo molecular circadiano y permitieron reconsiderar la pregunta sobre si existe comunicación del núcleo supraquiasmático con el ovario ¿cómo sucede? La idea principal es que el ovario es un oscilador periférico, y como tal debe estar siendo regulado por señales neurohumorales reguladas desde el NSQ y por lo tanto, conformando parte del sistema circadiano. Bajo esta hipótesis general, Karman y Tischkau (2006), analizaron la expresión de *Per2* y *Bmal1* en el ovario y en el núcleo supraquiasmático de ratas hipofisectomizadas tratadas con gonadotropina coriónica humana (hCG). Sus resultados confirmaron

que la hormona luteinizante es un regulador del ritmo circadiano de algunos genes reloj presentes en el ovario. Como primera parte del desarrollo de la investigación corroboraron mediante *western blot* la presencia de las proteínas *BMAL1* (79kDa), *CLOCK* (91kDa), *Per1* (112kDa), *Per2* (90kDa) y *CRY1* (74kDa). Posteriormente se observó que el ovario tiene un ritmo diario del mRNA de *Per2* con una relación de fase con el NSQ de 8 horas; mientras que para *Bmal1*, la relación de fase es de 4 horas. El análisis de PER es congruente con otro estudio (Fahrenkrug *et al.*, 2006) en el cual se reportó a la acrofase en el ZT16, mientras que *BMAL1* está en antifase con respecto a *Per2*. La conclusión de este trabajo fue que la LH es la señal humoral que inicia la ritmicidad de los genes de reloj en el ovario de ratas (Karman y Tischkau, 2006). Las diferencias entre ambas investigaciones sobre la bati-fase (punto más bajo de la oscilación) de PER se deben posiblemente al momento del ciclo estral en el que se colectó el tejido, pues éste es capaz de cambiar las fases en diferentes tejidos (Nakamura *et al.*, 2010).

Una vez que se evidenció la participación de la LH para la generación del ritmo de *Per2* y *Bmal1* en el ovario de la rata (Karman y Tischkau, 2006), al año siguiente se reportó la expresión cíclica de *Per1* en células de la granulosa y células del cuerpo lúteo *in vivo*; así como el efecto de la FSH para promover durante un ciclo la oscilación de *Per2* y de la LH para mantenerlo; además de revelar que en ovarios inmaduros no existe un ciclo de *Per1*, mientras que en ovarios de ratas puberales sí se presenta un ciclo muy marcado en las células lúteas (He *et al.*, 2007); tal conclusión contrasta con el reporte anterior, ya que Karman y Tischkau (2006) reportan un ritmo expresado en células de la granulosa y de la teca para *Per2* y *Bmal1*. Si bien la LH tiene un efecto modulador sobre la maquinaria molecular en el ovario, también las señales de la FSH actúan como sincronizadores de genes de reloj en este tejido (He *et al.*, 2007). Con base en lo anterior, se continúa con el modelo en el cual las señales de las hormonas sexuales hipofisarias son requeridas para el establecimiento de las oscilaciones circadianas en el ovario y que, aunque el ovario presenta los elementos principales del reloj molecular, ésta expresión no es rítmica antes de la pubertad.

Los genes de reloj y sus transcriptos se expresan rítmicamente en el ovario de la rata y ésta expresión está presente en las células de la granulosa y de la teca que

conforman a los folículos, así como en el cuerpo lúteo (Karman y Tischkau, 2006; He *et al.*, 2007). El siguiente paso fue investigar si existía un control neural en la ritmicidad del ovario. Para ello Yoshikawa, *et al.* (2009) hicieron un experimento que consistió en quitar el nervio superior ovárico y el plexo ovárico en ratas transgénicas de la luciferasa en la región de regulación del gen *Per1* (*Per1-Luc*). Luego, las ratas fueron expuestas a cambios de horarios de iluminación por 6 horas, al final analizaron la bioluminiscencia de *Per1 in vitro* en un ovario denervado vs uno intacto de la misma rata. Tanto en el denervado como en el control no se observaron diferencias significativas en la fase de *Per1*; mientras que en cultivos de células de la granulosa los efectos de la *FSH* y la *LH* ocasionaron un cambio de fase de *Per1* dependiente de la dosis y del momento en que se aplicó, por lo que los grandes candidatos para ser las señales sincronizadoras en los genes de reloj en el ovario son las vías humorales y no las neurales; sin embargo, no se excluye del todo la posibilidad de que otro tipo de denervación influya sobre los procesos de ovulación.

Se ha reportado que la inervación del nervio vago juega un papel en la ovulación de ratas y que el efecto depende de la bilateralidad, pues al diseccionar el nervio vago izquierdo disminuye la tasa de ovulación; mientras que al diseccionar el del lado derecho, no hay efectos (Cruz, Chávez y Domínguez, 1986). Además, la inervación vagal modula la regulación estimuladora del inicio de la pubertad, pues al seccionar el nervio uni o bilateralmente los niveles séricos de estradiol disminuyen y se presenta un retraso de la apertura vaginal en ratas (Morales-Ledezma, Betanzos-García, Domínguez-Casalá, 2004). Por lo anterior, es importante no ignorar las conexiones del sistema nervioso autónomo que van desde el NSQ al ovario como probables vías de comunicación de señales circadianas.

Hasta este punto, se ha conformado un modelo en donde el NSQ influye mediante mecanismos neuro-humorales sobre la fisiológica del ovario; sin embargo, también puede existir una comunicación que sea desde el ovario hacia el NSQ. Nakamura *et al.* (2010), reportaron los efectos de las hormonas esteroideas del ovario durante las cuatro fases del ciclo estral sobre la expresión cíclica de genes de reloj en el útero, hígado y el propio ovario. Los resultados indican que el ritmo de los genes de reloj del ovario sigue siendo congruente

entre los estudios anteriores (ver tabla 1). Sin embargo, es de resaltar que *Per1* cambia de fase y disminuye su amplitud durante el estro.

Debido a las variaciones encontradas en el útero, los investigadores decidieron analizar los efectos del estrógeno y la progesterona sobre la ritmicidad de *Per* mediante el uso de ratones *knock-in Per2-Luc* y observaron que la relación de fase existente entre la expresión de *Per2* en el ovario y el NSQ es de aproximadamente 4 horas, similar a lo reportado por Karman y Tischkau en 2006. La principal conclusión y aportación de éste trabajo es que las variaciones de las hormonas esteroideas de los ovarios controlan los cambios en la sincronización de los genes de reloj en ovario y útero; mientras que en hígado modulan la sincronización de la expresión de los genes de reloj (Nakamura *et al.*, 2010). Los resultados de ésta investigación aportan una contribución diferente, ya que, si bien el ovario es un oscilador periférico, las hormonas estrogénicas son capaces de ejercer efectos sobre otros osciladores periféricos, añadiendo más complejidad al mecanismo de comunicación entre el sistema circadiano y reproductivo.

En el 2011, Tischkau, Jaeger y Krager, analizaron mediante *RT-PCR* los ritmos de *Per2* y *Bmal1* en el ovario de ratón, pero esta vez bajo los efectos de la administración de una dioxina (*TCDD*), la cual es un compuesto que genera alteraciones a nivel de desarrollo folicular y la inhibición de la ovulación. Además de reportar un ritmo para *Per2* y *Bmal1* igual al del ovario de la rata, la aplicación de la dioxina interrumpe la expresión del ritmo de dichos genes interactuando a través del receptor aril hidrocarburo (*AhR*); indicando que un efecto tóxico capaz de inhibir la ovulación, también afecta el mecanismo oscilador circadiano del tejido.

Hasta el momento aún no es clara la forma en que se expresan los genes de reloj en los diferentes compartimentos y líneas celulares del ovario. Un estudio reportado por He *et al.* (2007) demostró por las técnicas de inmunohistoquímica y *RT-PCR*, que existe oscilación circadiana de *Per2* en células de la granulosa tanto maduras, como inmaduras; posteriormente Chu *et al.*, (2011) mediante *RT-PCR* y monitoreo en tiempo real en cultivos celulares, observaron ritmicidad de *Bmal1* en células lúteas pero no en células de la granulosa; así como la inducción de la expresión rítmica de *Per2* a consecuencia de la *FSH* durante el desarrollo, crecimiento y

**Tabla 1. Resumen de las investigaciones realizadas sobre la expresión rítmica en las proteínas y genes del reloj circadiano en el ovario de roedores.**

Año	Autor	Técnica	gen	proteína	Acrofase	Batifase	Ciclo estrol	Fotoperiodo	Modelo
2006	Fahrenkrug, et al.	RT-PCR en tiempo real	<i>Per1</i>		ZT14	ZT0-2	P- E	LO 12:12 OO	Rata Wistar
		RT-PCR en tiempo real	<i>Per2</i>		ZT18	ZT6	P- E	LO 12:12 OO	
		RIHQ		PER1	ZT12	ZT6	Sin definir	LO 12:12 OO	
		RIHQ		PER2	ZT16	ZT12	Sin definir	LO 12:12 OO	
2006	Karman y Tischkau	RT-PCR en tiempo real	<i>Bmal1</i>		ZT0/24	ZT12	Sin definir	LO12:12	Rata Sprague-Dawley
		RT-PCR en tiempo real	<i>Per2</i>		ZT16	ZT4	Sin definir	LO12:12	
		Hibridación <i>in situ</i>	<i>Bmal1</i>		ZT0	ZT15	Sin definir	LO12:12	
		Hibridación <i>in situ</i>	<i>Per2</i>		ZT15		Sin definir	LO12:12	
		Inmunotransferencia		BMAL1	ZT0/24	ZT12-16	sin definir	LO12:12	
		inmunotransferencia		PER2	ZT12-16	ZT24/0	Sin definir	LO12:12	
2007	He et al.	inmunofluorescencia		PER1	ZT12	ZT4	inmaduras	LO12:12	Rata Wistar
2010	Nakamura et al.	RT-PCR	<i>Per1</i>		ZT12 y ZT8	cambia	P, D,M, (E)	LO12:12	Rata Wistar
		RT-PCR	<i>Per2</i>		ZT12-16	ZT4	P,E, D,M	LO12:12	
		RT-PCR	<i>Bmal1</i>		ZT24/0	ZT12	P,E, D,M	LO12:12	
2011	TishkauJaeger y Krager.	inmunotrasferencia		PER2	CT12	CT0	Sin definir	LO 12:12	Ratón c57bl6J
				BMAL1	CT0	CT12	Sin definir	LO12:12	
2012	Gräs et al.	RT-PCR	<i>Per1</i>		ZT12	ZT24		LO12:12	Rata Wistar sin hipótesis
		RT-PCR	<i>Bmal1</i>		ZT24	ZT12		LO12:12	

En la tabla se muestra cronológicamente, las investigaciones sobre la ritmicidad de genes de reloj en el ovario; así como los puntos horarios máximos (acrofase) y mínimos (batifase) según la técnica molecular empleada. Se especifica si la investigación consideró o no la etapa del ciclo estrol en el modelo biológico usado. *RT-PCR*= reacción en cadena de la polimerasa con inversa transcriptasa. *RIHQ*= radio inmunohistoquímica. *LO 12:12* (condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). *OO*= oscuridad continua. En un ciclo de *LO12:12*, *ZT0* se refiere al encendido de las luces y *ZT12* al apagado. La escala subjetiva de tiempo dependiente de la actividad del animal *CT12* señala el comienzo de la actividad del animal en una especie nocturna.

Fuente: elaboración propia.

maduración de folículos ováricos inmaduros. Además, se observó que durante el proceso apoptótico *Bmal1* y *Clock* son inhibidos, mientras que los niveles de *Per2* perduran hasta por 4 días. Con base en estas demostraciones, el modelo del ovario como oscilador periférico ha comenzado a comprenderse como un mecanismo que presenta una regulación muy fina, pues la ritmicidad de cada elemento del reloj molecular es específica y dependiente de las hormonas *LH* y *FSH*, lo que involucra a los diferentes tipos de receptores a éstas hormonas según el compartimento ovárico.

Gräs *et al.*, (2012) reportaron que las gonadotropinas tienen influencia sobre la expresión de *Per1*; pues evi-

denciaron mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, la localización celular del ritmo de *Per1* en los diferentes compartimentos del ovario de rata, sugiriendo una correlación durante el desarrollo entre la adquisición de receptores de *LH* y el comienzo de los ritmos de los genes de reloj en células de la teca interna durante la foliculogénesis, bajo el supuesto de que los receptores funcionales de *LH* son expresados gradualmente en las células de la granulosa de folículos antrales en crecimiento y su expresión máxima se da durante el estado preovulatorio, justo antes del pico de *LH* (expresión rítmica de *Per1* en folículos preovulatorios). Así pues, el mecanismo oscilador del ovario esta compartimentado:

mientras que *LH* genera expresión rítmica de *Per1* en las células de la teca, *FSH* genera la de *Per2* en células de la granulosa; por lo que los elementos negativos del reloj molecular están presentes en los folículos, mientras que el elemento positivo, *BMAL1*, está presente en los cuerpos lúteos.

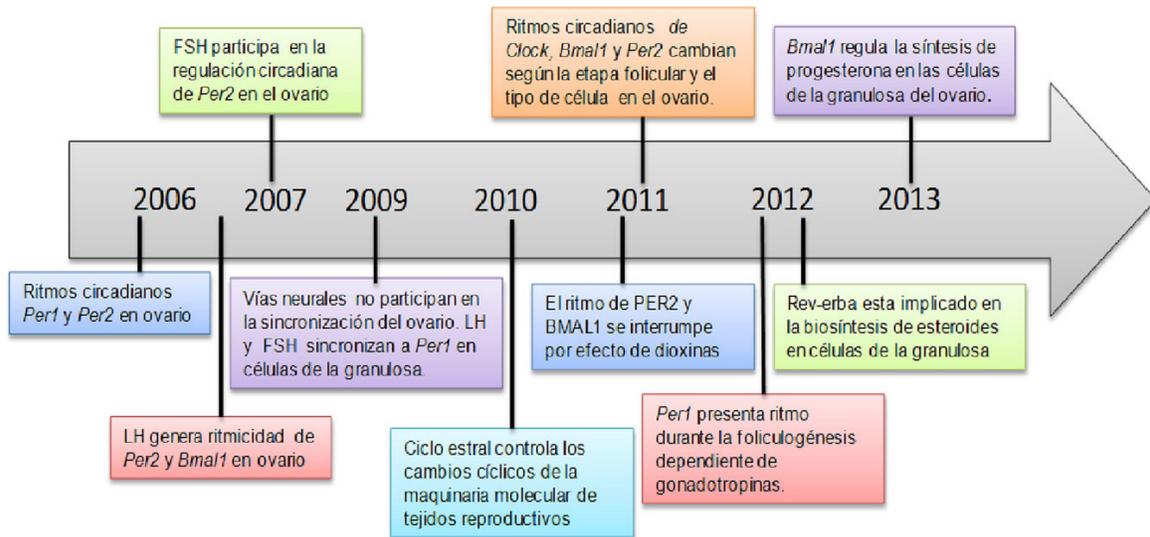
Sin embargo, recientemente se reportó que *Bmal1*, también está presente rítmicamente en células de la granulosa; pues al emplearse un agonista de Rev-erba, laglucógeno sintasa quinasa *GSK4112*, se suprimió la expresión de *Bmal1* en células maduras de la granulosa; lo que a su vez conlleva a un efecto en la regulación de la proteína reguladora aguda esteroidogénica (*StAR*), ya que Rev-erba puede inducir significativamente la expresión de *StAR* como un activador en dichas células. También se observó que *GSK* ejerce un cambio de fase en la oscilación de expresión de *Per2*, las técnicas empleadas fueron *RT-PCR*, monitoreo en tiempo real de cultivos celulares y *qPCR* (Chen *et al.*, 2012). Un siguiente estudio con las mismas técnicas y con *western blot*, Chen *et al.*, (2013) reportaron que la estimulación de *FSH* en células

de la granulosa en el ovario induce un avance de fase en la maquinaria del reloj y aumenta la amplitud de las oscilaciones de *Per2*; tal cambio probablemente sea mediado por uniones tipo gap, pues al ser bloqueada la amplitud de las oscilaciones de *Per2*, éstas disminuyen. Por lo que hasta el momento, se agrega al modelo, la participación de las uniones intercelulares en el mantenimiento de la ritmicidad circadiana en el ovario.

De esta forma, desde el 2006 hasta la fecha, se han fortalecido las investigaciones sobre el ovario como oscilador circadiano periférico y actualmente se cuentan con herramientas que permiten comprender mejor el papel de un control circadiano central en la fisiología de la reproducción (ver figura 3). Sin embargo, el detalle del mecanismo oscilatorio en el ovario aún está en vías de ser dilucidado por completo.

En 2013, Murphy *et al.*, reportaron la influencia del ciclo estral y la reducción de esteroides sobre la organización circadiana de ratas *Per1-Luc* cicladadas y ovariectomizadas (*OVX*). Los autores midieron la expresión relativa de *Per1-Luc* en *NSQ* y osciladores periféricos tales como

**Figura 3. Línea de tiempo sobre investigaciones que confirman al ovario como oscilador circadiano periférico.**



Línea de tiempo que muestra las investigaciones realizadas sobre oscilaciones de los elementos que constituyen la maquinaria del reloj molecular en el ovario de roedores; así como el papel de éstos en la fisiología del ciclo ovárico.

Fuente: elaboración propia.

hígado, pulmón, córnea, ovario y riñón, por medio de cultivos celulares. Sus resultados demostraron que la etapa del ciclo estral afecta la fase de expresión de *Per1* en forma de tejido-específica, pero el efecto más significativo fue en el hígado; tejido en el cual se lleva a cabo la degradación de hormonas esteroideas. Además, vieron el efecto de diferentes dosis (100 $\mu$ M, 500 $\mu$ M o 1 $\mu$ M) de estradiol (E2) y progesterona (P4) y la combinación de ambos sobre el ritmo de bioluminiscencia de *Per1* en cultivos de neuronas de NSQ. Los resultados son sorprendentes, pues aunque se ha comprobado mediante inmunohistoquímica que existen receptores alfa y beta a estrógenos en el NSQ de ratón (Vida *et al.*, 2008), los estrógenos por sí solos no tienen efectos sobre el periodo y/o la fase de la expresión de *Per1*; mientras que P4 ocasiona alargamiento del periodo en una dosis de 10 $\mu$ M; y desde 100 $\mu$ M al combinarse (E2+P4) presentando así, un efecto sinérgico. Pese a que los hallazgos de este experimento no demuestran que el estradiol por sí sólo tenga efectos directos sobre las neuronas del NSQ en la ritmicidad de *Per1*, no se debe dejar de lado a los otros genes participantes en las asas de traducción-transcripción del reloj molecular, pues existen interacciones de algunos genes reloj con el proceso de la esteroidogénesis (Li *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013).

Existen muchas dudas sobre el significado funcional de los genes de reloj dentro del ovario. Cada uno de los elementos de la maquinaria molecular circadiana representa un reto por analizar. Sin embargo, se sabe que las mutaciones en los genes *Clock* y *Bmal1* ocasionan deficiencias graves en el ciclo estral, en la fertilidad y durante el embarazo (Miller *et al.*, 2004; Dolatshad *et al.*, 2006); por lo que las alteraciones a nivel de la maquinaria molecular del reloj pueden tener un efecto negativo sobre los diversos aspectos de la fertilidad, como ejemplo, la ausencia de *BMAL1* en células esteroidogénicas del ovario impide la implantación, posiblemente debido a los bajos niveles de progesterona y prolactina asociados (Liu *et al.*, 2014).

## ¿CÓMO Y PARA QUÉ TENER UN RELOJ OVÁRICO?

El NSQ influye en la sincronización de la secreción de LH y FSH en la hipófisis a través de vías nerviosas. Una

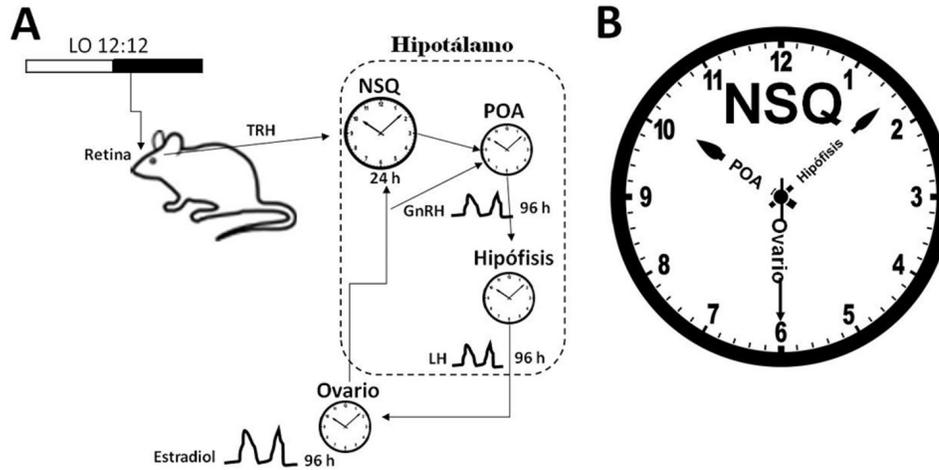
vez liberadas, las hormonas sincronizan a los osciladores circadianos en el ovario. Las neuronas del NSQ se sincronizan diariamente a los cambios de luz y otras señales no fóticas, sin embargo, durante el ciclo estral de los roedores, el pico de LH y FSH ocurre cada 4 días ¿Cómo es que ambos ciclos se coordinan? Es posible considerar la existencia de señales ambientales con periodos que son múltiplos de 24 horas capaces de sincronizar a los relojes circadianos (Goldman *et al.*, 2004). Es así como además de existir una “ventana temporal” desde el hipotálamo a la hipófisis para la secreción de LH, es probable que también exista una “ventana temporal” de sensibilidad en el ovario hacia el efecto de la LH. Estas *ventanas temporales* presentes en las estructuras del eje neuroendocrino sugieren que son controladas por una maquinaria molecular circadiana, las cuales a su vez, al conformarse por factores reguladores de transcripción, podrían estar teniendo un papel importante en la regulación de receptores; pues éstos son importantes para el efecto de las hormonas sobre sus tejidos diana.

El ciclo ovárico en roedores (según la especie) tiene una duración de entre 96 y 120 h. Es un ritmo infradiano, pero es posible comprenderlo a la luz de un control circadiano (figura 4). Existen tres hipótesis sobre la generación de ritmos endógenos con duración mayor a la de un día: *a*) por una secuencia de etapas enlazadas, *b*) por un oscilador autosostenido e independiente y *c*) por un mecanismo capaz de contar un número específico de ciclos de luz oscuridad, al cual se le llama la hipótesis de desmultiplicación de frecuencias (Mrosovsky, 1978). La relación del NSQ con HHG podría incluir a las tres hipótesis, la parte crucial es explicar esta interacción, pues el NSQ es sabido que es un oscilador autosostenido e independiente, mientras que tanto la hipófisis como el ovario podrían estar cronometrando cada 4, 5 ó 28 días la liberación de las hormonas, según la especie.

Por otra parte, no debe olvidarse el estudio de la influencia que tienen las hormonas ováricas sobre el NSQ, pues los resultados de algunos experimentos con roedores ovariectomizados afectan respuestas circadianas (Morin, Fitzgerald y Zucker, 1977; Morin y Cumming, 1982; Labyak y Lee, 1995; Iwahana *et al.*, 2008; Blattner y Mahoney, 2012; Royston *et al.*, 2014).

Se propone que el ovario funciona como un segundero dentro de la cronometría del HHG. El NSQ controla la sensibilidad para la liberación de las *GnRH*, lo que a su

**Figura 4. Diagrama que representa el modelo de los componentes y de la temporalidad en los eventos hormonales en el ciclo estral**



Modelo donde se enfatiza la existencia de osciladores circadianos en cada componente del eje neuroendocrino. Los cambios de las señales fóticas (barra negra y blanca) que son detectados por la retina, mandan esta información mediante el tracto retino-hipotalámico (TRH) hacia el NSQ. La sincronización entre las neuronas del NSQ, neuronas secretoras de *GnRH*, células de la hipófisis y del ovario es requerida para la organización temporal de los eventos controlados por el HHG. La desincronización entre los componentes podría generar efectos negativos en la fisiología reproductiva (basado en Sellix y Menaker, 2010). Se puede observar la influencia y retroalimentación del sistema circadiano dentro del eje neuroendocrino. Nótese cómo los estrógenos no sólo influyen sobre las neuronas secretoras de *GnRH* en el área media preóptica del hipotálamo (POA), sino que también ejercen un efecto (poco conocido) sobre el núcleo supraquiasmático (NSQ). B. Modelo propuesto en el que se representa un control circadiano en la temporalidad de la fisiología del ciclo estral, en donde las neuronas del POA podrían estar funcionando como la manecilla de las horas, la hipófisis como la del minutero y los eventos fisiológicos-temporales del ovario como la manecilla del segundero, al momento en el que coinciden las tres manecillas, se produce la ovulación.

Fuente: elaboración propia.

vez debe coincidir con el momento de mayor sensibilidad de la hipófisis para la liberación de *LH*, que a su vez tendrá su efecto sobre el ovario para la producción de hormonas y liberación de los ovocitos. De esta forma, el NSQ corresponde a la manecilla encargada de marcar la hora, la hipófisis estaría marcando los minutos bajo el efecto de las secreciones pulsátiles de *GnRH*, y el ovario los segundos. Cuando las tres manecillas se han alineado, como por ejemplo, cuando: un reloj analógico marca las 7:00 horas en punto, se genera un evento importante. Para los fines del tema, pensemos que la ovulación es el evento para lo cual la hembra está preparada fisiológicamente para la fecundación (ver figura 4B), pues coinciden las ventanas temporales de sensibilidad; es decir, NSQ genera aumento en la frecuencia de liberación de *GnRH*, que coincide probablemente con un mayor número de receptores a ésta hormona en hipófisis, lo que ocasiona la secreción masiva de *LH*, siendo el momento

más oportuno en el cual el ovario es capaz de responder, llevando a cabo la liberación de ovocitos y aumento de estrógenos.

Cuando la alineación en las manecillas no se cumple, se altera la función reproductiva en la hembra, tal como se cree que ocurre en mujeres cuando se presentan cambios de horario generados por vuelos y rotación de turnos en el trabajo (Lawson *et al.*, 2011; Gamble, Resuehr y Johnson, 2013); los cuales también alteran los horarios de ingesta de alimento y los ciclos de sueño-vigilia, lo que puede ocasionar obesidad y esto a su vez, impactar también sobre la reproducción femenina (Klenov y Jungheim, 2014). Volviendo al ejemplo del reloj analógico, lo que estaría ocurriendo es que la manecilla del reloj que marca las horas (NSQ) podría ser movida (producto de las señales fóticas alteradas) hacia delante, hacia atrás o incluso estancada, suscitando pérdida en la correcta cronometría e incluso la ausencia de la coincidencia en

un momento específico entre las manecillas del reloj, o sea, las 7:00 horas en punto podrían no marcarse y en consecuencia se tendría una pérdida en la ovulación, según el ejemplo supuesto.

Es importante tener en cuenta que el control homeostático de la fisiología reproductiva puede variar según la disponibilidad de machos y/o las presiones de las condiciones ambientales. Cabe destacar, que si bien gran parte de la información detallada sobre la cronobiología de la reproducción es y ha sido generada en modelos clásicos de roedores de laboratorio, la fisiología de la reproducción es muy variada entre las formas de vida que han evolucionado en el planeta y, que la selección natural moldea a la evolución, operando sobre los resultados y no sobre los mecanismos, por lo que es importante llevar estudios en modelos no clásicos.

Existen estudios en ratones silvestres que revelan diferencias inter-género en conductas circadianas (Carmona-Alcocer *et al.*, 2012); así como conductas implicadas en el establecimiento de la pareja para la reproducción. Tal es el caso de estudios realizados en laboratorio y en campo sobre el jerbo de Mongolia, el cual presenta monogamia en cautiverio, mientras que en campo no (Agreen, 1984). Otro ejemplo, es su conducta agresiva, proceso que está bajo un control hormonal, observado en laboratorio (Vázquez-Gaytán, 2007). En resumen, el valor de los estudios generados en modelos de mamíferos no tradicionales puede ayudarnos a comprender mecanismo neuroendocrinos que dan lugar a las diferencias individuales que ocurren naturalmente (Smale, Heideman y French, 2005).

## CONCLUSIONES

Con las investigaciones mencionadas en esta revisión, podemos concluir que el ovario en roedores es un oscilador circadiano desde la pubertad en mamíferos. Sin embargo, el desarrollo del NSQ en los roedores ocurre en el día 10 postnatal (Langraf, Koch y Oster, 2014), por lo que la sensibilidad del NSQ a las hormonas ováricas debe darse también a partir de la pubertad. La forma en que cambia el control circadiano sobre los procesos reproductivos a lo largo de la vida en las hembras también es de suma importancia, es por ello que resulta fundamental comprender mejor la relación funcional entre

estos dos ritmos biológicos, ¿cómo es la comunicación entre NSQ y ovario y qué implicaciones tiene en la regulación del eje HHG y con otros núcleos hipotalámicos involucrados en la reproducción?

Las funciones de los osciladores circadianos, tanto las del central como las de los periféricos, son ajustadas con los diferentes cambios ambientales, tales como, la información fótica y la alimentación (Kennaway, 2005); por lo que alteraciones metabólicas también contribuyen a una desincronización interna e impactan en la fisiología reproductiva. La pérdida del balance entre las hormonas metabólicas con las sexuales puede generar alteraciones a nivel de la maquinaria molecular del reloj en el ovario.

La coordinación precisa del tiempo dentro del eje HHG es esencial para la fertilidad en la hembra. La regulación de la reproducción por parte de un mecanismo circadiano lleva a pensar en las consecuencias de la desincronización circadiana sobre la reproducción. A nivel de salud humana, puede permitir comprender desde otra perspectiva algunos problemas de fertilidad asociados a la vida laboral de aquellas mujeres, cuyo trabajo implica rotación de horarios y/o viajes que producen descompensación horaria entre el reloj biológico y un nuevo horario (*jet lag*). Hay estudios que asocian éste tipo de actividad con el incremento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer de mama, infartos y desordenes reproductivos y de fertilidad (Mahoney, 2010).

En esta revisión nos limitamos a las investigaciones hechas en mamíferos, pero también existen estudios en donde se ha comprobado la existencia de genes de reloj en el ovario de aves e insectos (Nakao *et al.*, 2007; Bradshaw y Holzapfel, 2010). La regulación entre el sistema circadiano y el ciclo reproductivo son rasgos naturalmente seleccionados que representan algún beneficio adaptativo que actualmente tratamos de entender y no hay duda en que el correcto funcionamiento de la integración de las señales recibidas por el NSQ y la coordinación entre éste y los relojes periféricos es necesario para el mantenimiento homeostático en los vertebrados.

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



(CONACyT). Apoyado por PAPIIT UNAM IN212715

## REFERENCIAS

- Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, ... y Block, G. D. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *The Journal of Neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22 (1), 350-356.
- Agreen, G. (1984). Pair formation in the Mongolian gerbil. *Animal behavior*, 32 (2), 528-535.
- Albers, H. E., Gerall, A. A. y Axelson, J. F. (1981). Effect of reproductive state on circadian periodicity in the rat. *Physiology & behavior*, 26 (1), 21-25.
- Alleva, J. J., Waleski, M. V., Alleva, F. R. y Umberger, F. R. (1968). Synchronizing effects of photoperiodicity on ovulation in hamsters. *Endocrinology*, 82 (6), 1227-1235.
- Aschoff J. (1960). Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on quantitative biology*, 25, 11-28.
- Balsalobre, A., Marcacci, L. y Schibler, U. (2000). Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Current Biology*, 10 (20), 1291-1294.
- Beyer, C., Hoffman, K. L. y Gonzalez-Flores O. (2007). Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: Similarities and differences with the rat. *Hormones and Behavior*, 52 (1), 2-11.
- Blattner, M. S. y Mahoney, M. M. (2012). Circadian parameters are altered in two strains of mice with transgenic modification of estrogen receptor subtype 1. *Genes, brain and behavior*, 11 (7), 828-836.
- Bonnefont, X. (2010). Circadian timekeeping and multiple timescale neuroendocrine rhythms. *Journal of neuroendocrinology*, 22 (3), 209-216.
- Bradshaw, W. E. y Holzapfel, C. M. (2010). Circadian clock genes, ovarian development and diapause. *BMC Biology*, 8, 115-118.
- Brown-Grant, K. y Raisman, G. (1977). Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *Proceeding of the Royal Society of London - Biological Science*, 198 (1132), 279-296.
- Carmona-Alcocer, V., Fuentes-Granados, C., Carmona-Castro, A., Aguilar-González I., Cárdenas-Vázquez R. y Miranda-Anaya, M. (2012). Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon talstoni*. *Physiology & behavior*, 105 (3), 727-733.
- Chappell, P. E. (2005). Clocks and the black box: circadian influences on gonadotropin-releasing hormone secretion. *Journal of neuroendocrinology*, 17 (2), 119-30.
- Chen, H., Chu, G., Zhao, L., Yamauchi, N., Shigeyoshi, Y., Hashimoto, S. y Hattori, M. (2012). Rev-erba regulates circadian rhythms and StAR expression in rat granulosa cells as identified by the agonist GSK4112. *Biochemical and biophysical research communications*, 420 (2), 374-379.
- Chen, H., Zhao, L., Chu, G., Kito, G., Yamauchi, N., Shigeyoshi, Y...y Hattori, M. A. (2013). FSH Induces the development of circadian clockwork in rat granulosa cells via gap junction protein Cx43-dependent pathway. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 304 (6), 566-575.
- Chu, G., Kaoru, Y., Narahara, S., Uchikawa, M., Kawamura, M., Yamauchi N...y Hattori, M. A. (2011). Alteration of circadian clockwork during differentiation and apoptosis of rat ovarian cells. *Chronobiology international*, 28 (6), 477-487.
- Cruz, M. E., Chávez, R. y Domínguez, R. (1986). Ovulation follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vaginerves. *Revista de investigación clínica; órgano del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 38 (2), 167-71.
- Daan, S. y Aschoff, J. (2001). The entrainment of circadian systems. En J. S. Takahashi, F. W. Turck y R. Y., Moore, *Handbook of behavioral neurobiology circadian clocks*, Vol.12 (pp. 7-35). Nueva York: Kluwer Academic, Plenum Publishers.
- Darwin, C. (1859). *El origen de las especies por medio de la selección natural*. España: Alianza Editores.
- De la Iglesia, H. O. y Schwartz, W. J. (2006). Timely ovulation: circadian regulation of the female hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology*, 147 (3), 1148-1153.
- Dolatshad, H., Campbell, E. A., O'Hara, L., Maywood, E. S, Hastings, M. H, y Johnson, M. H. (2006). Developmental and reproductive performance in

- circadian mutant mice. *Human reproduction*, 21 (1), 68-79.
- Domínguez, R., Chávez, R. y Cruz, M. E. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En R. Domínguez, *Tópicos selectos de Biología de la Reproducción* (pp. 161-192). México: Miguel Ángel Porrúa.
- Everett, J. W. y Sawyer, C. H. (1950). A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*, 47 (3), 198-218.
- Fahrenkrug, J., Georg, B., Hannibal, J., Hindersson, P. y Gräs S. (2006). Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology*, 147 (8), 3769-3776.
- Fink G. y Ayer M. S. (1974). Gonadotrophin secretion after electrical stimulation of the preoptic area during the oestrous cycle of the rat. *The Journal of Endocrinology*, 62 (3), 589-604.
- Freeman, M. E. (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En E. Knobil y J. Neil. *The Physiology of reproduction* (pp. 2327-2388). Nueva York: Raven Press.
- Gamble, K. L., Resuehr, D. y Johnson, C. H. (2013). Shift work and circadian dysregulation of reproduction. *Frontiers in endocrinology*, 4, 92.
- Goldman, B., Gwinner, E., Karsch, F. J., Saunders, D., Zucker, I. y Ball, G. F. (2004). Circannual rhythms and photoperiodism. En J. C., Dunlap, J. J., Loros J. J. y P. J., DeCoursey. *Chronobiology biological timekeeping* (pp. 107-142). Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- González-Mariscal, G. (2006). Mother rabbits and their offspring: Timing is everything. *Developmental psychobiology*, 49 (1), 71-76.
- Gräs, S., Georg, B., Jorgensen, H. L. y Fahrenkrug, J. (2012). Expression of the clock genes *Per* and *BMAL1* during follicle development in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation and hypophysectomy. *Cell and tissue research*, 350 (3), 539-548.
- He, P. J., Hirata, M., Yamauchi, N., Hashimoto, S. y Hattori, M. (2007). Gonadotropin regulation of circadian clockwork in rat granulosa cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 302 (1-2), 111-118.
- Iwahana, E., Karatsoreos, I., Shibata, S. y Silver, R. (2008). Gonadectomy reveals sex differences in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. *Hormones and behavior*, 53 (3), 433-430.
- Kalsbeek, A. y Buijs, R. M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell and tissue research*, 309 (1), 109-118.
- Karman, B. N. y Tischkau, S. A. (2006). Circadian clock gene expression in the ovary: Effects of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*, 75 (4), 624-632.
- Kennaway, D. J. (2005). The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum reproduction update*, 11 (1), 91-101.
- Kent, S., Hurd, M. y Satinoff, E. (1991). Interactions between body temperature and wheel running over estrous cycle in rats. *Physiology & behavior*, 49 (6), 1079-1084.
- Klenov, V. E. y Jungheim, E. S. (2014). Obesity and reproductive function: a review of the evidence. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 26 (6), 455-460.
- Labyak, S. E. y Lee, T. M. (1995). Estrus and steroid induced changes in circadian rhythms in a diurnal rodent, *Octodon degus*. *Physiology & behavior*, 58 (3), 573-585.
- Landgraf, D., Koch, C. E. y Oster, H. (2014). Embryonic development of circadian clocks in the mammalian suprachiasmatic nuclei. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 143.
- Lawson, C. C., Whelan, E. A., Lividoti Hibert, E. N., Spiegelman, D., Schernhammer, E. S. y Rich-Edwards, J. W. (2011). Rotating shift work and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology*, 22 (3), 305-312.
- Legan, S. J. y Karsch, F. J. (1975). A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology*, 96 (1), 57-62.
- Li, S., Wang, M., Chang, A. K., Yang, C., Zhao, F., Bi, H., Liu Y...y Wu, H. (2013). CLOCK is a substrate of SUMO and sumoylation of CLOCK upregulates the transcriptional activity of estrogen receptor- $\alpha$ . *Oncogene*, 32 (41), 4883-4891.
- Liu, Y., Johnson, B. P., Shen, A. L., Wallisser, J. A., Krentz, K. J., Moran, S. M...y Bradfield, C. A. (2014). Loss of *BMAL1* in ovarian steroidogenic cells results in implantation failure in female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (39), 14295-14300.

- Mahoney, M. M. (2010). Shift work, jet lag, and female reproduction. *International journal of endocrinology*, 813764.
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. y Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phase of the rat: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology*, 62 (4a), 609-614.
- McGee, E. A. y Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21 (2), 200-214.
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S. y Bennett, S. A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments*, (67), 4389.
- Meyer-Bernstein, E. L., Jetton, A. E., Matsumoto, S. I., Marjuns, J. F., Lehman, M. N. y Bittman, E. L. (1999). Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology*, 140 (1), 207-218.
- Miller, B. H., Olson, S. L., Turek, F. W., Levine, J. E., Horton, T. H. y Takahashi, J. S. (2004). Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Current biology*, 14 (15), 1367-1373.
- Mohawk, J. A., Green, C. B. y Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neurosciences*, 35, 445-462.
- Moore, R. Y. y Eichler, V. B. (1972). Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain research*, 42 (1), 201-206.
- Morales-Ledezma, L., Betanzos-García, R. y Domínguez-Casalá, R. (2004). Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepuberal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Archives of medical research*, 35 (4), 279-283.
- Morin, L. P. y Cumming, L.A. (1982). Splitting of wheel running rhythms by castrated or steroid treated male and female hamsters. *Physiology & behavior*, 29 (4), 665-675.
- Morin, L. P., Fitzgerald, K. M. y Zucker, I. (1977). Estradiol shortens the period of hamster circadian rhythms. *Science*, 196 (4287), 741-749.
- Mrosovsky, N. (1978). Circannual cycles in hibernators. En L. C. H. Wang y J. W. Hudson. *Strategies in cold* (pp. 21-65). Nueva York: Academic Press.
- Murphy, Z. C., Pezuk, P., Menaker, M. y Sellix, M. T. (2013). Effects of ovarian hormones on internal circadian organization in rats. *Biology of reproduction*, 89 (2), 35-47.
- Nakamura, T. J., Moriya, T., Inoue, S., Shimazoe, T., Watanabe, S., Ebihara, S. y Shinohara, K. (2005). Estrogen differentially regulates expression of *Per1* and *Per2* genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. *Journal of neuroscience research*, 82 (5), 622-630.
- Nakamura, T. J., Sellix, M. T., Kudo, T., Nakao, N., Yoshimura, T., Ebihara, S...y Block, G. D. (2010). Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: Effects of fluctuating ovarian steroid hormones levels. *Steroids*, 75 (3), 203-12.
- Nakao, N., Yasuo, S., Nishimura, A., Yamamura, A., Watanabe, T., Anraku, T...y Yoshimura, T. (2007). Circadian clock gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles. *Endocrinology*, 148 (7), 3031-3038.
- Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annual review of physiology*, 55 (1), 16-54.
- Pittendrigh, C. S. y Minis, D. H. (1964). The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *The American Naturalist*, 48, 261-294.
- Ralph, M. R., Foster, R. G., Davis, F. C. y Menaker, M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247 (4945), 975-8.
- Royston, S. E., Yasui, N., Kondilis, A. G., Lord, S.V., Katzenellenbogen, J.A. y Mahoney M. M. (2014). ESR1 and ESR2 differentially regulate daily and circadian activity rhythms in female mice. *Endocrinology*, 155 (7), 2613-2623.
- Schneider, J. E. (2004). Energy balance and reproduction. *Physiology & behavior*, 81 (2), 289-317.
- Schibler, U. y Sassone-Corsi, P. (2002). A web of circadian pacemakers: *Cell*, 111 (7), 919-922.
- Sellix, M. T. y Menaker, M. (2010). Circadian clocks in the ovary. *Trends in endocrinology and metabolism*, 21 (10), 628-636.

- Sikes, H. E. (2009). *Circadian clock gene involvement in the regulation of the reproductive neuroendocrine axis. Tesis para obtener el grado de doctor en filosofía*. EE.UU.: UMI dissertation Publishing.
- Smale, L., Heideman, P. D. y French J. A. (2005). Behavioral neuroendocrinology in nontraditional species of mammals: things the "knockout" mouse CAN'T tell us. *Hormones and behavior*, 48 (4), 474-483.
- Stetson, M. H. y Anderson P.J. (1980). Circadian pacemaker times gonadotropin release in free-running female hamsters. *The american journal of physiology*, 238 (1), R23-27.
- Stetson, M. H. y Watson-Whitmyre, M. (1976). Nucleus suprachiasmaticus: the biological clock in the hamster? *Science*, 191 (4223), 197-99.
- Stetson, M. H., Watson-Whitmyre, M. y Matt, K. S. (1977). Circadian organization in the regulation of reproduction: Timing of the 4-day estrous cycle of the hamster. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 8 (3-4), 350-352.
- Stubblefield, J. J., Terrien, J. y Green, C. B. (2012). Nocturnin: at the crossroads of clocks and metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism*, 23 (7), 326-333.
- Takahashi, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H y McDearmon, E. L. (2008). The genetics mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature reviews. Genetics*, 9 (10), 764-75.
- Tischkau, S. A., Jaeger, C. D. y Krager, S. L. (2011). Circadian clock disruption in the mouse ovary in response to 2, 3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-Dioxin. *Toxicology letters*, 201 (2), 116-22.
- Tsuchiya, Y., Minami, I., Kadotani, H. y Nishida, E. (2005). Resetting of peripheral circadian clock by prostaglandin E2. *EMBO reports*, 6 (3), 256-261.
- Vázquez-Gaytán, B. (2007). *Conducta paterna, agresión y niveles de testosterona en el gerbo de Mongolia Meriones unguiculatus* (tesis de licenciatura). Recuperado de: <http://132.248.9.195/pd2008/0624112/Index.html>
- Vida, B., Hrabovszky, E., Kalamatianos, T., Coen, C. W., Liposits, Z. y Kallo, I. (2008). Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones. *Journal of neuroendocrinology*, 20 (11), 1270-1277.
- Wiegand, S. J. y Terasawa, E. (1982). Discrete lesions reveal functional heterogeneity of suprachiasmatic structures in regulation of gonadotropin secretion in the female rat. *Neuroendocrinology*, 34 (6), 395-404.
- Yoshikawa, T., Sellix, M., Pezuk, P. y Menaker, M. (2009). Timing of the ovarian circadian clock is regulated by gonadotropins. *Endocrinology*, 150 (9), 4338-4347.
- Yoshikawa, T., Yamazaki, S. y Menaker, M. (2005). Effects of preparation time on phase of cultured tissues reveal complexity of circadian organization. *Journal of biological rhythms*, 20 (6), 500-512.