

119



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Psicología

“La administración diaria de adrenalina como señal sincronizadora para los ritmos circadianos conductuales en la rata“.

T E S I S
Que para obtener el Título de:
Licenciado en Psicología
P r e s e n t a:
Jorge Ignacio Mendoza Camacho

Directora de Tesis: Dra. Carolina Escobar Briones

Sinodales: Dra. Matilde Valencia

Dr. Raúl Aguilar

Dr. Antonio Zainos

Mtra. Irma Yolanda del Rio



México, D. F.

2000

12/20/00



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS.

A mi Padre: por todo su apoyo y cariño a lo largo de estos 25 años, y por enseñarme a trabajar con amor y responsabilidad en la vida. (mil gracias Jefe).

A mi Madre: por la vida que me dio, por su cariño, su resistencia y tolerancia ante todo y por que siempre ha estado cuando la he necesitado. (gracias Madre).

A mis Hermanas: Laura, Rosalía, Fernanda, Stephanie. Creo que la vida con ustedes es de lo más divertida y agradable, no se que haría sin ustedes (gracias sisternas).

A mis Hermanos:

- Carlos (Tilín): Por compartir tu Ciencia con la mía y por aquellas inagotables pláticas en busca de la conquista de la felicidad, gracias por tu amistad (Todos somos monos).
- Manuel (Gordo): Mi hermano, por tu amistad, por todo siempre gracias.
- Edgar (Dorito): Por los Xibalbos, por todo lo que vivimos juntos y seguiremos viviendo, gracias.
- Alex (Güero): Que te puedo decir, por el simple hecho de ser mi hermano, gracias carnal.
- Héctor (Macaco): Por las incansables y profundas pláticas filosóficas que nos llevaron a poder entender un poco más el porqué de la nada.
- Roberto (Alaford): Por la música y tu gran amistad a lo largo de casi 17 años. ¡ y los que le faltan todavía !.

A la Dra. Carolina Escobar: *por su confianza, su amistad, su valioso apoyo para la realización de este trabajo y por permitirme ser parte de su equipo.*

Al Dr. Raúl Aguilar: *por todo su apoyo, por permitirme trabajar en su laboratorio y por sus acertados comentarios para la realización de este trabajo.*

A la Dra. Matilde Valencia, al Dr. Antonio Zainos y a la Mtra. Yolanda Del Río: *Por todos sus excelentes comentarios para esta tesis.*

A los camaradas del Instituto de Fisiología Celular y del Departamento de Anatomía: Chavez, Ivette, Alberto, Manuel, José, Mario porque de alguna manera son parte de este trabajo.

A los colegas de la Facultad de Psicología: Tania, Diana, Fusae, Ayleen, Cristina, Ranier, Adriana y a todos los que *no puede recordar en este momento*

A los delincuentes, a los ángeles caídos y a la banda de corazones solitarios del sargento pimienta, dondequiera que se oculten con todo y sus secretos.

INDICE.

RESUMEN.

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Ritmos Biológicos.	2
1.1.1. Ritmos Ultradianos.	5
1.1.2. Ritmos Infradianos.	5
1.1.3. Ritmos Circadianos.	6
1.2. El Sistema Circadiano.	8
1.2.1. El Núcleo Supraquiasmático como reloj biológico.	8
1.2.2. Vías de Sincronización al NSQ.	11
1.2.3. Transmisión del ritmo hacia los efectores.	12
1.3. El Proceso de Sincronización.	13
1.4. Sincronización no fótica.	15
1.5. Sincronización por alimento.	17
1.6. El Oscilador sincronizado por alimento.	20
1.7. El Sistema Nervioso Autónomo.	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	24
2.1. Justificación del problema.	24
3. OBJETIVOS.	25
3.1. General.	25
3.2. Específicos.	25
4. HIPÓTESIS.	25
4.1. Hipótesis de trabajo.	25
4.2. Hipótesis estadísticas.	26
4.2.1. Hipótesis nula.	26
4.2.2. Hipótesis alterna.	26
4.3. Variables.	26
4.3.1. Variable Dependiente.	26
4.3.2. Variables Independiente.	26

5.	MATERIALES Y MÉTODO.	27
5.1.	Animales y condiciones.	27
5.2.	Registro automatizado de conducta.	27
5.3.	Manipulaciones experimentales.	28
5.3.1.	Libre curso.	28
5.3.2.	Manipulación.	28
5.3.3.	Adrenalina.	28
5.3.4.	Vehículo.	28
5.4.	Análisis de datos.	28
5.4.1.	Procedimientos generales.	28
5.5.	Diseño experimental.	29
5.5.1.	Experimento 1.	29
5.5.2.	Experimento 2.	31
5.5.3.	Experimento 3.	33
6.	RESULTADOS.	34
6.1.	Experimento 1.	34
6.1.1.	Oscilador sincronizado por alimento (OSA).	34
6.1.2.	Especificidad de la adrenalina.	36
6.1.3.	Núcleo Supraquiasmático (NSQ).	40
6.2.	Experimento 2.	43
6.2.1.	Oscilador sincronizado por alimento (OSA).	43
6.2.2.	Núcleo Supraquiasmático.	45
6.3.	Experimento 3.	48
6.3.1.	Oscilador sincronizado por alimento (OSA).	48
6.3.2.	Núcleo Supraquiasmático (NSQ).	52
7.	DISCUSIÓN.	55
8.	CONCLUSIONES.	60
9.	REFERENCIAS.	61

RESUMEN.

En el sistema nervioso central (SCN) se ha identificado al núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo como principal oscilador o reloj circadiano, el cual se sincroniza a los cambios de luz-oscuridad. Por otro lado, se ha demostrado que estímulos de carácter no fótico pueden ser potentes sincronizadores en muchas especies. Por ejemplo, horarios restringidos de alimento provocan la aparición de un componente de activación conductual de 2 a 3 horas previas a la llegada del alimento conocido como actividad de anticipación al alimento (AAA). Este fenómeno considerado un ejemplo de sincronización no fótica, se ha estudiado ampliamente con el fin de poder identificar y caracterizar un oscilador independiente del NSQ. Se ha propuesto que el oscilador sincronizado por alimento (OSA) puede estar constituido por un sistema distribuido, conformado por estructuras centrales involucradas en el balance energético que responden a señales periféricas metabólicas implícitas en los procesos de balance energético tales como aquellas que regulan la función del hígado y la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA). Para explorar la participación del SNA y principalmente de su rama simpática en la ingestión de alimento, el propósito de este trabajo fue evaluar si la adrenalina genera actividad de anticipación al igual que el alimento y si el NSQ como principal oscilador circadiano puede ser afectado por la administración de adrenalina. Los resultados mostraron que la administración diaria y a la misma hora de adrenalina genera actividad de anticipación similar al alimento cuando la administración coincide con la fase de actividad del animal, así mismo dicha actividad de anticipación no se encontró por manipulación abdominal o por la administración de solución salina como vehículo. Por otro lado, la actividad de anticipación que se presenta por la administración de adrenalina, no se modifica por la secuencia u orden de administración y la intensidad en la conducta de anticipación no mostró dependencia de la dosis de adrenalina administrada. Por otra parte, la administración de adrenalina generó cambios de fase (principalmente retrasos) en el ritmo circadiano en libre curso, lo cual probablemente indique que la adrenalina tiene un efecto sobre el NSQ o sobre estructuras centrales que lo modifican. Estos resultados sugieren que la adrenalina participa como señal interna en la sincronización por alimento generando un fenómeno similar a la actividad anticipatoria; por otro lado, podría participar como un estímulo de carácter no fótico que afecta al NSQ generando cambios de fase en el ritmo circadiano en libre curso.

*Tú creaste la Luna para marcar el tiempo y el Sol
que sabe a qué hora ha de ponerse
Tú traes las tinieblas y es de noche, cuando rondan
las fieras de la selva. Rugen los leoncillos por su
presa y al Señor le reclaman su alimento.
Cuando el Sol aparece, se retiran y vuelven a
acostarse en sus guaridas.
Sale el hombre a su labor, y a su labranza hasta la
tarde.*

Salmos 104: 19-23.

*“La historia del desarrollo del sentido del tiempo
en el hombre a través de los siglos no es cuestión
de desarrollo cognoscitivo, sino de la invención de
relojes, calendarios y formas de llevar registros;
en otras palabras, de un medio ambiente que
registra el tiempo”.*

B. F. Skinner. (1981)

1. INTRODUCCIÓN.

A lo largo de la vida los organismos se encuentran en constante interacción con su medio ambiente el cual influye sobre sus procesos fisiológicos y conductuales, la conducta de estos a su vez podrá modificar el medio. Esto los ha llevado a desarrollar y evolucionar diversos mecanismos tanto conductuales como fisiológicos que les ayuden a mantener un equilibrio funcional con el medio en el que se encuentran.

La naturaleza se ha encargado de seleccionar características específicas en los organismos que los llevan a generar mecanismos para su supervivencia. Bajo la perspectiva de la evolución se ha denominado selección natural a dicho mecanismo, y el resultado de esta selección es el proceso de adaptación que han adquirido las especies.

Existe una gama inmensa de estímulos del medio que pueden afectar al organismo; las variables ambientales de temperatura, presión, humedad, cambios de día- noche, etc., son algunos de los cambios físicos que afectan la regulación de procesos internos de los organismos.

Gracias a la existencia de ciertos sistemas internos o estructuras (principalmente en el sistema nervioso central del organismo) que se encuentran relacionadas de manera importante con la organización de su conducta y sus procesos fisiológicos los organismos se adaptan ante las presiones del medio.

Desde un punto de vista fisiológico, los organismos cuentan con mecanismos que les ayudan a mantener la estabilidad de su medio interno. A los procesos por medio de los cuales los organismos mantienen un equilibrio constante del medio interno se le ha denominado *homeostasis* (Aguilar-Roblero y cols. 1997).

La idea de medio interno estable llevó a considerar que la funcionalidad general de los organismos dependía de la invariabilidad de sus procesos internos y que la variabilidad de dichos procesos es sinónimo de desequilibrio interno. Sin embargo, a diferencia de un medio interno estable algunos de estos procesos fisiológicos se presentan de manera periódica ayudando a mantener la adaptación de los organismos a un medio cambiante.

La existencia de fenómenos periódicos dentro de un sistema biológico como una estrategia adaptativa de los organismos ante las variaciones cíclicas del ambiente, se ha observado en sus procesos bioquímicos, metabólicos y conductuales, a estos fenómenos se les ha denominado ritmos biológicos.

Todos los organismos presentan fluctuaciones en procesos internos y conductuales durante intervalos de tiempo definidos, que les permite organizar sus actividades de acuerdo a los momentos óptimos del día, mes, año, etc. Al igual que la actividad conductual, ciertos cambios fisiológicos se presentan a intervalos periódicos de acuerdo a las variaciones cíclicas ambientales.

Una de las propiedades internas de los organismos, es la capacidad de poder responder a las señales ambientales que le indican el paso del tiempo, pero se ha demostrado que aún sin la existencia de estas señales indicadoras, los organismos regulan sus procesos fisiológicos y conductuales de una manera fluctuante.

1.1. Ritmos Biológicos.

Todos los organismos vivos desde las plantas hasta los animales incluyendo a los humanos, presentan fluctuaciones periódicas que varían a diferentes frecuencias, ya sea muy altas como la actividad cerebral o la tasa cardiaca, hasta frecuencias muy bajas como la hibernación.

Se ha considerado como ritmo biológico a todos aquellos eventos cíclicos de un organismo que se presentan en diferentes parámetros fisiológicos y conductuales. Como ya se mencionó estos procesos biológicos están asociados con los cambios cíclicos que se presentan en el medio ambiente físico (Aguilar-Roblero, 1993).

Por lo regular uno de los cambios ambientales cíclico de mayor influencia sobre los procesos rítmicos de los organismos es el ciclo luz-oscuridad (cambio día-noche), el cual está determinado por el movimiento de rotación de la tierra (Fig 1).

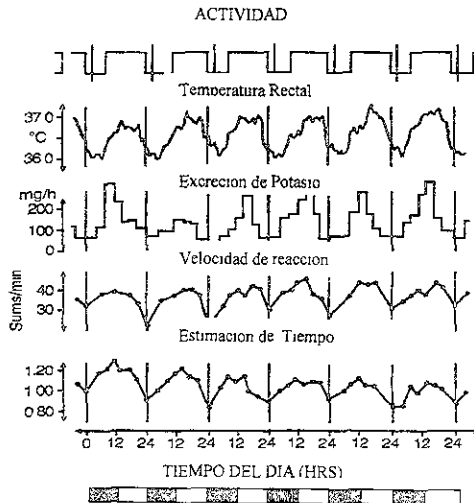


Figura 1. En el ser humano la actividad conductual así como ciertos procesos fisiológicos presentan características rítmicas que se sincronizan con el ciclo luz-oscuridad. Esta figura muestra los valores de diversos parámetros fisiológicos a lo largo de varios ciclos diurnos. Las barras muestran la fase de luz (blancas) y la fase de oscuridad (negras) del día (Tomada de Moore, 1998)

El estudio de los ritmos biológicos se remonta a la antigüedad. Durante muchos años se pensó que las variaciones cíclicas de los organismos tanto conductuales como fisiológicas, dependían solamente de los cambios cíclicos del medio ambiente (principalmente los cambios de luz-oscuridad, en los ritmos circadianos). Por lo tanto, se pensaba que los ritmos tenían únicamente un origen exógeno. Posteriormente, a principios del siglo XVIII un investigador francés J.J. De Marian, encontró que los cambios o variaciones rítmicas de algunas plantas persistía aún en ambientes de oscuridad continua, es decir sin señales externas de cambios medioambientales que indiquen el paso del tiempo. Con estas observaciones se propuso que los ritmos biológicos de los organismos no dependen sólo de señales externas, sino que tienen un origen endógeno que puede responder a señales ambientales (Aguilar-Roblero, 1993).

Se ha planteado que todos los organismos en un principio al encontrarse bajo las presiones de la naturaleza que imponía un cierto orden temporal, fueron evolucionando, y que esta organización temporal que antes había sido impuesta por el medioambiente, pasó a formar parte de la información genética de cada organismo, lo cual generaría el orden temporal de manera endógena (Pittendrigh, 1981) (Fig. 2)

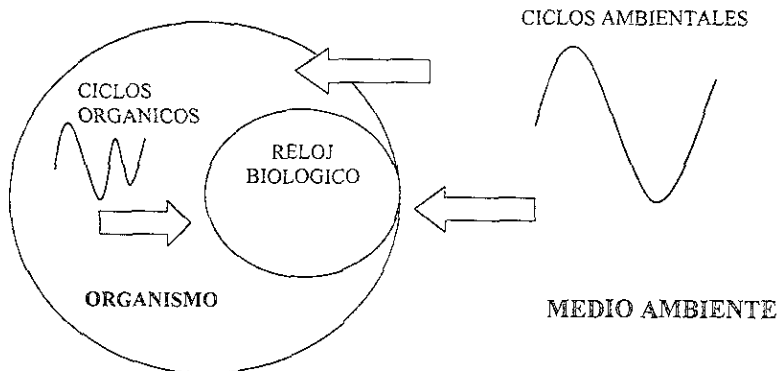


Figura 2. El origen de los ritmos biológicos bajo una perspectiva evolutiva. El medio ambiente determina la ritmicidad endógena de las especies a través de la presión temporal, los organismos adquieren su propia ritmicidad por mecanismos endógenos (Tomado de Aguilar-Roblero, 1993)

Bajo la idea del origen endógeno de los ritmos biológicos y desde una perspectiva evolutiva, todos los organismos tienen la capacidad de expresar ritmos biológicos por sí mismos. Los mecanismos fisiológicos por los cuales se genera dicha ritmicidad, dependen de la existencia de relojes biológicos que le imponen la organización temporal al organismo.

A principios de 1900 se pensaba que los organismos poseían una memoria temporal que se encargaba de generar cierta organización temporal en los procesos de los organismos. Posteriormente las investigaciones de Aschoff y Pittendrigh eliminaron la idea de una memoria temporal en los organismos demostrando la capacidad endógena que estos tienen para medir el tiempo, y por lo tanto la necesidad de un reloj biológico. Se considera reloj biológico al sistema con la capacidad de generar organización temporal en el organismo así como de imponer periodo y fase a los procesos orgánicos (Aschoff, 1981).

Los ritmos biológicos presentan diversas características que permiten diferenciarlos y evaluarlos: periodo, frecuencia y amplitud.

- El periodo de un ritmo biológico se refiere al intervalo entre dos puntos de referencia idénticos. Dicho periodo será impuesto por el reloj biológico que controla el ritmo en cuestión.
- La frecuencia es el número de ciclos que se repiten en una unidad de tiempo. La frecuencia de un ritmo biológico puede ser desde un ciclo por milisegundo para el potencial de acción, hasta un ciclo por año para procesos de migración y reproducción de algunas especies.
- La amplitud se define como la diferencia que existe entre el valor máximo y el valor mínimo de una oscilación.

Los ritmos biológicos se clasifican de acuerdo a su periodo o bien al estímulo geofísico que los sincroniza y que se relaciona directamente a su intervalo de oscilación (Tabla 1). Por su periodo se clasifican en ritmos ultradianos, los cuales se caracterizan principalmente por tener un periodo menor de 24 horas, ritmos circadianos con un periodo de aproximadamente 24 horas y ritmos infradianos con periodos mayores de 24 horas.

ESTÍMULO GEOFÍSICO	RITMO BIOLÓGICO
<i>Ciclo día - noche</i>	<i>Circadiano</i>
<i>Mareas</i>	<i>Circamareal</i>
<i>Ciclos lunares</i>	<i>Circalunar</i>
<i>Ciclos anuales (estaciones)</i>	<i>Circanual</i>

Tabla 1. Los ciclos geofísicos sincronizan a los ritmos biológicos de acuerdo a sus características de oscilación

1.1.1. Ritmos Ultradianos.

Los ritmos ultradianos presentan periodos que abarcan desde algunos minutos hasta algunas horas, tales ritmos se pueden observar en algunas manifestaciones conductuales, fases de sueño y la liberación de algunas hormonas. En ambientes naturales, especies con una organización social bien establecida presentan ritmos ultradianos en algunas de sus conductas, como la caza y la evitación de depredadores (Delgado-García y cols. 1976). También otras conductas de mayor complejidad, se han observado que tienen un carácter ultradiano, tal es el caso de la atención y el aprendizaje.

No existen evidencias de que los ritmos ultradianos sean regulados por un oscilador endógeno, sino por un proceso de retroalimentación fisiológica del cual dependen las oscilaciones del ritmo. Por otro lado, algunos ritmos ultradianos presentan oscilaciones circadianas superpuestas a su misma oscilación ultradiana.

El ritmo cardíaco así como el ritmo respiratorio son considerados como ejemplos de ritmos ultradianos, dependen de un sistema de retroalimentación en el cual el ritmo se puede modificar a partir de las necesidades fisiológicas del organismo, por ejemplo el ritmo cardíaco puede aumentar por la necesidad de mayor oxígeno, aparte de que muestra aumentos de frecuencia durante el día, evidenciando la existencia de un reloj biológico.

1.1.2. Ritmos Infradianos.

Los ritmos con periodos de oscilación mayores de 24 horas han sido denominados ritmos infradianos. Estos ritmos se encuentran en una variedad de organismos marinos, los cuales se sincronizan por ciclos semilunares (entre 14 y 15 días) y ciclos lunares (entre 28 y 30 días) y pueden manifestarse en procesos de desarrollo y actividades conductuales (Turek, 1994).

Los ritmos circalunares inciden sobre el ciclo de las mareas, el cual puede producir dos mareas máximas (luna llena y luna nueva) y dos mareas mínimas (cuartos lunares). Algunos ejemplos de ritmos circalunares se han observado en los ciclos reproductivos de invertebrados marinos (crustáceos principalmente) que viven en la costa. En algunos primates como los macacos se presentan ritmos menstruales de acuerdo al mes lunar, aunque el ciclo menstrual es evidente, otros procesos endocrinos, metabólicos y conductuales de estos primates también se presentan con una periodicidad infradiana (Turek, 1994).

Para todas las especies, los mecanismos adaptativos se generan a partir de los cambios ambientales que ocurren en su medio en ciclos de un año. En periodos de un año el medio ambiente presenta cambios muy considerables para cualquier organismo, tales como las bajas temperaturas que pueden llevar a la muerte a cualquier ser vivo, o la ausencia de alimentos durante el invierno. El desarrollo de estrategias como la hibernación vista como un mecanismo de adaptación, es un ejemplo de proceso cíclico que presenta ritmicidad circanual.

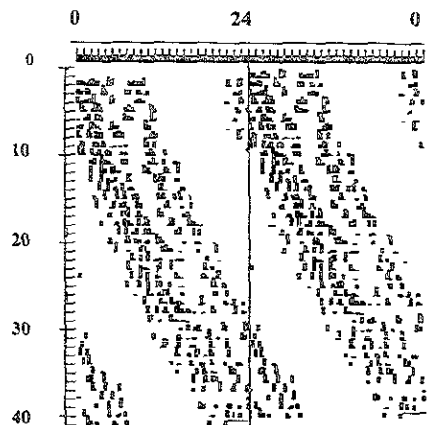
Algunos otros ciclos son circanuales como los reproductores. En los fenómenos de reproducción, las especies eligen el mejor momento para la procreación, dicha elección va a depender de factores ambientales como la disponibilidad de alimento y de las condiciones climáticas con el fin de asegurar que la cría nazca en la mejor temporada tanto para ella como para sus progenitores (Delgado-García y cols. 1976).

1.1.3. Ritmos Circadianos.

Los ritmos circadianos (con un periodo cercano a 24 horas), han sido los más estudiados debido a que se presentan en diversas funciones de los organismos y son de fácil acceso para su estudio. Los eventos ambientales de mayor relevancia para la expresión de los ritmos circadianos en los organismos son los que resultan de la rotación de la tierra sobre su propio eje, es decir el cambio de día-noche. Conductas como la ingestión de agua y de comida, actividad-reposo, procesos metabólicos y bioquímicos se coordinan con la alternancia entre el día y la noche (Aguilar-Roblero, 1993).

Anteriormente hemos mencionado que el origen endógeno de los ritmos biológicos y en particular de los ritmos circadianos, se debe a ciertos procesos evolutivos de organización temporal, y que estos ritmos se modifican o adecuan a las condiciones cíclicas ambientales que se le imponen al organismo. Para poder verificar la capacidad endógena de los organismos para generar ritmicidad biológica, bajo condiciones de laboratorio se aísla a los animales de toda señal ambiental (luz, temperatura, ruido, humedad, etc.) que pueda ser un indicador del paso del tiempo. Bajo estas condiciones la ritmicidad biológica persiste, con una ligera pero significativa variación en su periodo con respecto a las condiciones naturales. A este fenómeno se le ha denominado oscilación espontánea o libre curso (en inglés se le llama free running). La existencia de ritmos en oscilación espontánea con periodos cercanos a 24 horas, demuestra que dichos ritmos no dependen de los cambios geofísicos generados por la rotación de la tierra, sino de un reloj biológico endógeno (Fig. 3).

Figura 3. Actograma de doble-plot de la conducta de ingestión de agua de una rata en oscilación espontánea o libre curso (free running). La abscisa representa las horas del día, la ordenada representa los días de registro. El actograma es una forma de representar registros de actividad (locomotora, ingesta de agua) por varios días, consiste en una serie consecutiva de gráficas (cada línea en el eje de las y representa 1 día).



Conductualmente la organización circadiana se puede observar tanto en especies diurnas como nocturnas, en ambientes naturales algunas especies concentran su actividad hacia la noche y otras lo hacen hacia el día con fines adaptativos como el de evitar a sus depredadores naturales o de obtener recursos como alimento y resguardo (Tabla 2).

ESPECIE	TIPO	CONDUCTA
1. RATA	NOCTURNO	Locomoción, ingestión de agua y comida, conducta maternal, conducta sexual.
2. HAMSTER	NOCTURNO	Locomoción, ingestión de agua y comida, agresión.
3. RATÓN	NOCTURNO	Locomoción, agresión, anidar.
4. CONEJO	DIURNO	Locomoción, ingestión de agua y comida.
5. ARDILLA	DIURNO	Locomoción, ingestión de agua y comida.
6. PRIMATES NO HUMANOS	DIURNO	Locomoción, selección de alimentos.
7. HUMANO	DIURNO	Locomoción.

Tabla 2. La tabla 2 muestra algunas de las conductas con patrones circadianos que se han estudiado formalmente en especies nocturnas y diurnas. Los ritmos conductuales circadianos dependen de un oscilador endógeno y se sincronizan por el ciclo luz-oscuridad (Modificada de Rusak, en Aschoff, 1981).

Las actividades conductuales con carácter circadiano se ven acompañadas de procesos fisiológicos que también se presentan cada 24 horas, por ejemplo los cambios en la temperatura corporal tienen su mayor elevación en la fase de actividad de los organismos. Es así como en animales nocturnos el mayor incremento de la temperatura corporal se observa durante la noche, mientras que en animales diurnos se da durante el día. El ritmo de la temperatura corporal se encuentra relacionado a la actividad muscular de los organismos.

Otro parámetro fisiológico en donde se puede observar un ritmo circadiano intenso, es la concentración de corticosterona en plasma. el aumento en las concentraciones plasmáticas de corticosterona comienza al final de la fase de reposo y disminuye al final de la fase de actividad (Follenius y cols. 1982). También se ha demostrado en humanos que la secreción de hormona del crecimiento tiene un ritmo circadiano, presentando secreción máxima durante las primeras horas del sueño (Van Cauter y cols. 1992). Son diversos los fenómenos existentes en los organismos que presentan ritmicidad circadiana, los ejemplos conductuales y fisiológicos antes mencionados son sólo algunos de los más importantes para cualquier especie.

1.2. El Sistema Circadiano.

El sistema circádico en mamíferos comprende un grupo de estructuras neurales y endocrinas que funcionalmente proveen organización temporal para procesos fisiológicos y conductuales con fines adaptativos y de supervivencia. El sistema circádico consiste de vías aferentes de información hacia el reloj endógeno (vía de sincronización), de un oscilador o reloj circádico y de vías eferentes del reloj hacia órganos efectores que expresen la ritmicidad biológica (Fig 4).

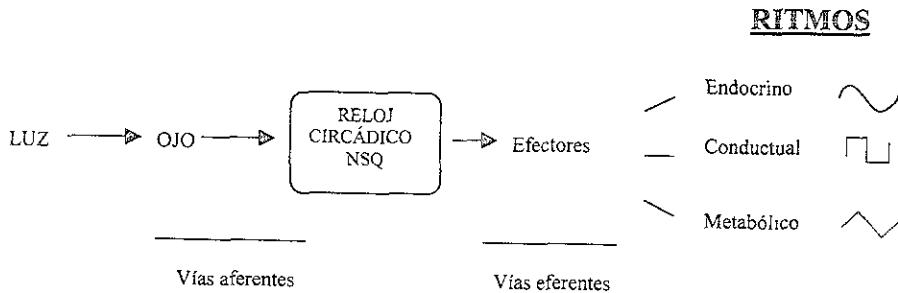


Figura 4. El sistema circadiano del mamífero se sincroniza principalmente por el ciclo luz-oscuridad. La luz estimula células ganglionares de la retina, las cuales se conectan con el oscilador circadiano por medio de la vía retino-hipotalámica, que lleva la información al NSQ, y éste a su vez tiene vías eferentes hacia órganos específicos que expresan la ritmicidad biológica

1.2.1. El Núcleo Supraquiasmático como reloj biológico.

EL núcleo supraquiasmático (NSQ) se encuentra en la parte anterior del hipotálamo por encima del quiasma óptico. Diversos estudios en busca del reloj biológico en mamíferos, llevaron a considerar a este núcleo como el principal oscilador o reloj endógeno de los ritmos circádicos sincronizados por el ciclo luz-oscuridad (Moore y Eichler, 1972).

El descubrimiento del NSQ como reloj circadiano, se demostró cuando Moore y Eichler (1972) encontraron que su destrucción eliminaba el ritmo de corticosterona. Simultáneamente Stephan y Zucker (1972) descubrieron que lesiones del NSQ eliminaban la ritmicidad circádica de actividad locomotora y de ingestión de agua (Fig. 5).

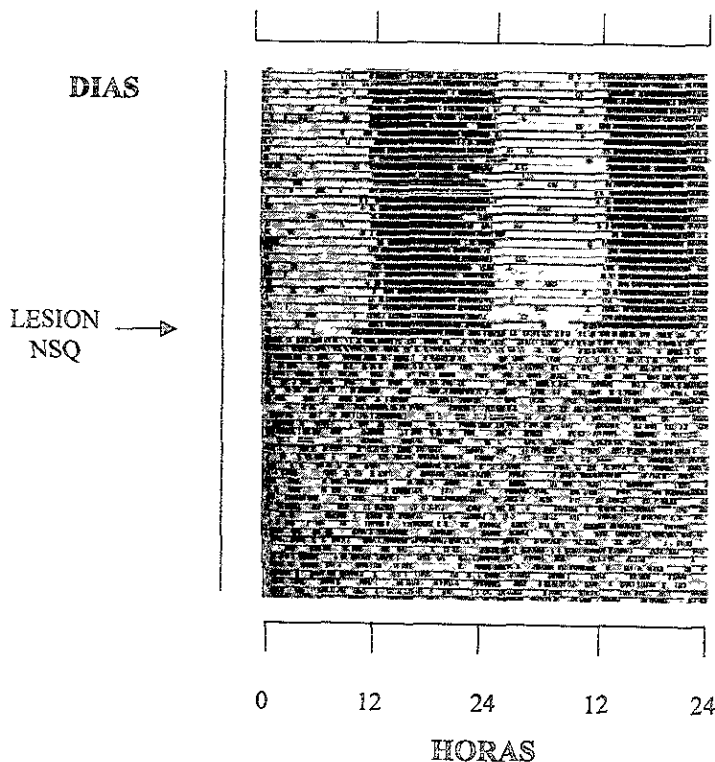
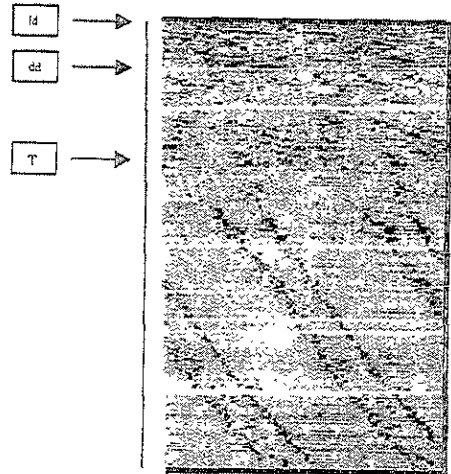


Figura 5. Actograma de la actividad locomotora de un hamster; Cada línea horizontal dentro del actograma representa un día (eje y), en el eje x se representan las horas de actividad. Antes de la flecha se aprecia la organización temporal de la conducta con un periodo de 24 horas. Los espacios en blanco muestran la fase de reposo y los espacios sombreados muestran la fase de actividad del hamster. La flecha indica el momento de la lesión del NSQ. Después de la flecha la organización circadiana que se observaba previa a la lesión se vuelve totalmente arrítmica, el animal distribuye su conducta de manera azarosa sin ninguna organización temporal (Tomada de Moore, 1998).

Otras evidencias experimentales que demostraron la capacidad del NSQ como reloj u oscilador circadiano, fue la restauración de ritmos conductuales de actividad locomotora después de trasplantes de tejido fetal hipotalámico en animales previamente lesionados (Aguilar-Roblero y cols. 1986) (Fig. 6).

Figura 6. Actograma de actividad locomotora de un hamster. El animal tenía una lesión del NSQ; La primera flecha (ld) muestra el ciclo de luz oscuridad en el que se encontraba el animal, en la segunda flecha (dd) se indica que el animal estaba en oscuridad constante, la tercera flecha (T) indica el momento en el cual el tejido fetal fue transplantado. Es notable que antes del trasplante el ritmo conductual del hamster se encontraba desorganizado debido a la lesión. Posteriormente por el trasplante el ritmo se recupera (Tomado de Aguilar Roblero y cols. 1994).



Por otro lado Aguilar-Roblero y cols. (1994) demostraron que en hamsters para que se pueda presentar una restauración de ritmos circadianos conductuales por trasplantes de tejido fetal del hipotálamo anterior, la localización del tejido transplantado no era importante para la recuperación. Los resultados indicaron además que la restauración también dependía de las neuronas del tejido que contuvieran polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), que es uno de los principales transmisores del NSQ.

El NSQ como reloj circadiano endógeno ha sido estudiado en diversas especies tanto diurnas como nocturnas que pueden presentar ritmicidad circadiana. El NSQ de roedores ha sido el que ha recibido mayor atención para el estudio de los ritmos circadianos. El NSQ de la rata contiene alrededor de 8000 neuronas en cada lado del cerebro, en la parte ventrolateral del NSQ hay neuronas que contienen VIP, mientras que las neuronas de la parte dorsomedial contienen vasopresina (VP) (Van den Pol y Tsujimoto, 1985).

En humanos no se ha podido estudiar experimentalmente el sistema circadiano. Debido a esto, los estudios en otras especies de primates no humanos como el macaco, ha ayudado a entender la organización del sistema circadiano en humanos. El NSQ de primates no humanos tiene la misma organización que la de otros mamíferos como los roedores, se encuentra en la parte dorsal del quiasma óptico y en la parte lateral del tercer ventrículo en el hipotálamo anterior. Al igual que en los roedores, el NSQ de primates se caracteriza por la presencia de neuronas con VIP y VP (Moore, 1993).

1.2.2. Vías de Sincronización al NSQ.

La luz como principal sincronizador de los ritmos circádicos establece tanto la fase como el periodo del ritmo al NSQ, estimula fotorreceptores retineales, los cuales se conectan con células ganglionares, y éstas a su vez proyectan la información a través del tracto retinohipotalámico (TRH) al NSQ. El TRH proyecta información fótica hacia el NSQ, principalmente en su división ventrolateral, pero también se ha demostrado que existen proyecciones adicionales hacia el área hipotalámica lateral, al hipotálamo anterior y al área retroquiasmática (Johnson y cols. 1988).

Las células ganglionares de la retina que proyectan hacia el NSQ a través del TRH, también proyectan información por una vía colateral hacia la hojuela intergeniculada (IGL) del núcleo geniculado lateral del tálamo, recibe inervaciones bilaterales de la retina y se caracteriza por tener neuronas que contienen neuropéptido Y y ácido aminobutírico (GABA). Las neuronas del IGL se proyectan hacia el NSQ por medio del tracto geniculohipotalámico (TGH) (Card y Moore, 1989) (Fig. 7)

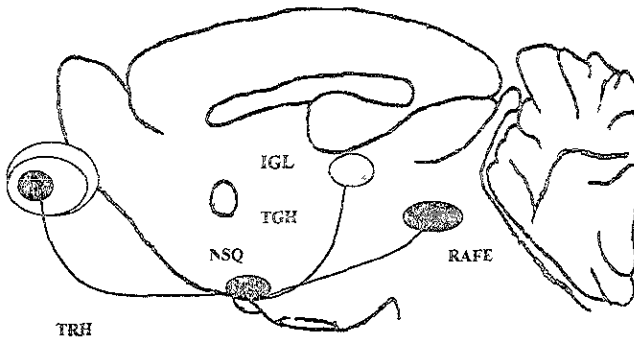


Figura 7. Corte sagital del cerebro de rata en el cual se indica la localización del núcleo supraquiasmático (NSQ), así como de sus proyecciones provenientes de la retina a través del tracto retino-hipotalámico (TRH), de la hojuela intergeniculada (IGL) a través del tracto geniculohipotalámico (TGH) y del núcleo dorsal del rafe

La estimulación del IGL o la infusión de neuropéptido Y en el NSQ produce cambios de fase en los ritmos de actividad locomotora, diferentes a los que se presentan por estímulos luminosos, teniendo avances de fase durante el día subjetivo y retrasos de fase durante la noche subjetiva (Moore y Card, 1990). Estos cambios de fase que se observan en la conducta de los animales, pueden ser mediados por el IGL y su proyección por el TGH, dichos resultados indican que el sistema IGL – TGH integra la información fótica y no fótica para modular la función del oscilador (Moore y Card, 1994).

El NSQ recibe entradas de otras áreas que se encuentran involucradas en la modulación y funcionamiento del oscilador circadiano, el núcleo medial del rafe proyecta largas vías hacia el NSQ, principalmente fibras serotoninérgicas, la lesión de estas vías, genera una alteración en el periodo del ritmo en libre curso (free running), así mismo la administración de serotonina dentro de NSQ modifica la fase del ritmo de actividad neuronal con una curva de respuesta de fase muy parecida a la que se presenta por la estimulación del TGH (Shibata y cols. 1992).

La importancia de las proyecciones de otras estructuras hacia el NSQ radica en la participación del NSQ como reloj maestro en la modulación circadiana de diversas funciones de los organismos. Esto nos indica que el NSQ no solamente participa en la sincronización fótica, sino que además puede ser afectado por estímulos de carácter no fótico a través de otras estructuras del sistema nervioso central.

1.2.3. Transmisión del ritmo hacia los efectores.

El NSQ tiene proyecciones hacia otras áreas cerebrales con las cuales transmite la modulación y regulación de ritmos circadianos ya sea bioquímicos o conductuales para todo el organismo. Las principales proyecciones que tiene el NSQ son hacia la zona subparaventricular (SPVZ), otras hacia el núcleo paraventricular talámico (PVT) y, como ya se había mencionado anteriormente, a la hojuela intergeniculada (IGL) (Fig. 8).

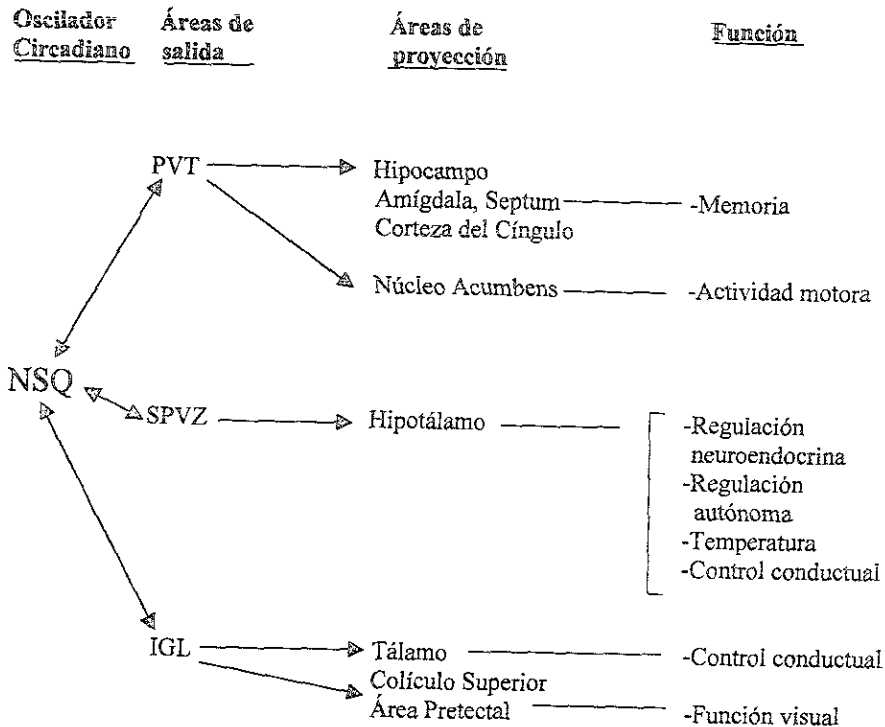


Figura 8 El NSQ tiene proyecciones hacia diversas áreas del sistema nervioso central con las cuales establece la transmisión del ritmo hacia diversas funciones. PVT Núcleo Paraventricular Talámico; SPVZ Zona Subparaventricular; IGL Hojuela intergeniculada (Modificada de Moore, 1995)

1.3. El Proceso de Sincronización.

Los procesos rítmicos se originan a partir de mecanismos endógenos en el organismo; por su relevancia adaptativa, dichos cambios periódicos deben coordinarse con el paso del tiempo de su medio ambiente externo. Al proceso por el cual las fluctuaciones endógenas se ajustan con señales externas específicas se ha denominado sincronización. Las señales que le indican al organismo el paso del tiempo en forma periódica son llamados sincronizadores (Pittendrigh, 1981). Cuando un ritmo se encuentra en libre curso (free running) y presenta un periodo mayor o menor pero cercano a 24 horas, puede llegar a expresar una ritmicidad con un periodo de 24 horas si se sincroniza con un fenómeno cíclico que presente dicho periodo. Así mismo también puede sincronizarse a fenómenos ambientales que presenten periodos ya sea mayores o menores de 24 horas (Fig. 9).

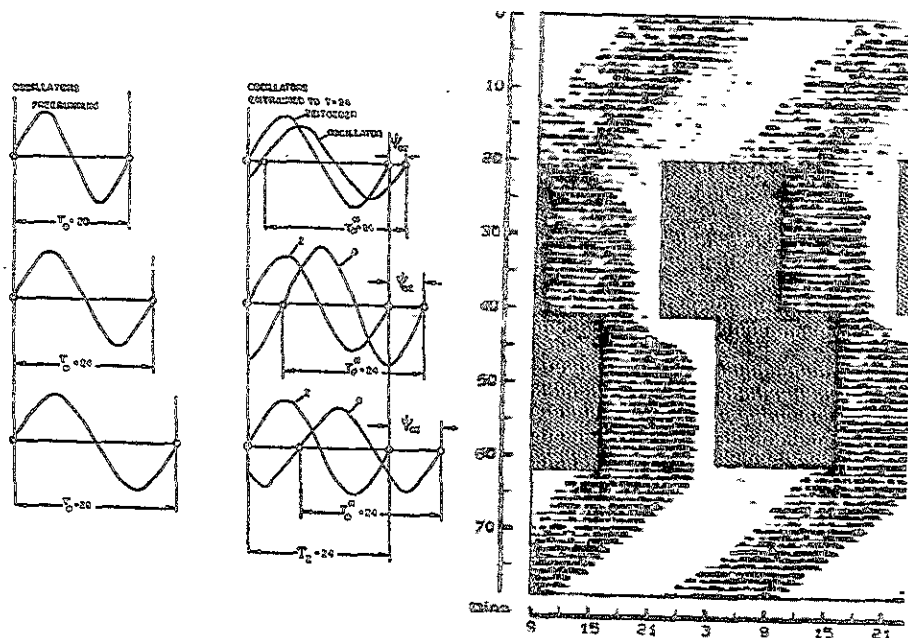


Figura 9. En la figura de la izquierda se muestran 3 oscilaciones en libre curso con un periodo distinto, las cuales posteriormente se exponen a un sincronizador con un periodo de 24 horas. Al sincronizarse comienzan a oscilar con un periodo de 24 horas y cada uno con una relación de fase distinta hacia el sincronizador. El actograma de la derecha muestra el ritmo de actividad locomotora de un mono ardilla en libre curso, las barras indican el momento en que se presentó el sincronizador y se observa un ajuste de fase y periodo (Tomada de Pittendrigh, en Aschoff 1981).

El mecanismo de sincronización fue propuesto por Pittendrigh en 1959; Pittendrigh argumentaba que la sincronización era la coordinación entre dos osciladores que presentan oscilaciones similares en donde se implica un control del periodo y de la fase del oscilador por el sincronizador. Cuando se presenta la sincronización la ritmicidad endógena ajusta su periodo y fase a la del sincronizador, es decir el sincronizador impone su fase y periodo al oscilador.

La influencia de un sincronizador sobre un reloj biológico sólo es efectiva cuando su periodo de oscilación es similar al del reloj (puede ser menor o mayor); Esto es, hay límites en el rango de sincronización, de manera que el ciclo día-noche sincroniza ritmos dentro de un rango circadiano, los ciclos lunares ritmos dentro de un rango mensual, y los ciclos anuales ritmos de rangos anuales.

La influencia en el ritmo de los cambios de luz-oscuridad es constante, por lo tanto el oscilador se ve afectado por el sincronizador de manera que acelera y desacelera su velocidad angular al estar ajustando continuamente. Desde el momento en que un sincronizador afecta al oscilador, éste empezará a ajustarse al periodo del sincronizador, pero dicho ajuste se irá presentando de manera gradual hasta adoptar la fase y periodo del sincronizador. A estos cambios graduales se les ha denominado ciclos transitorios (Escobar y cols. 1998).

Existen estímulos que pueden afectar la expresión de los ritmos pero sin modificar al reloj u oscilador circadiano; A este fenómeno se le ha denominado enmascaramiento (masking). La distinción entre el enmascaramiento y la sincronización radica en que un estímulo enmascarado sólo modifica la fase y el periodo del ritmo mientras se encuentra presente, y cuando se libera en oscilación espontánea o libre curso la fase y el periodo del ritmo regresan a la que tenían antes de que se presentara el estímulo enmascarador (Aschoff, 1988).

La sincronización de los ritmos circadianos depende de la existencia de un reloj circadiano, así como de vías sensoriales a través de las cuales los estímulos externos que pueden funcionar como sincronizadores modifiquen al reloj. En contraste, el enmascaramiento se presenta cuando los estímulos externos modifican la expresión rítmica a nivel de los efectores, sin modificar el reloj (Escobar y cols. 1998).

1.4. Sincronización no fónica.

El NSQ ha sido considerado como el principal oscilador circádico, sincronizado por el ciclo luz-oscuridad, es decir estímulos de carácter fónico. En ambientes naturales y en laboratorio existen otros estímulos que pueden cambiar la fase de un ritmo biológico y que por lo tanto tienen las características de un sincronizador. A este tipo de estímulos se les ha clasificado como no fónicos; algunos ejemplos son los sincronizadores sociales, la temperatura, los sonidos, los estímulos sexuales, la inducción forzada de actividad locomotora, tratamientos farmacológicos, y los horarios restringidos de alimentación. Estos estímulos no fónicos se han estudiado para determinar su capacidad para sincronizar ritmos biológicos (Fig. 10).

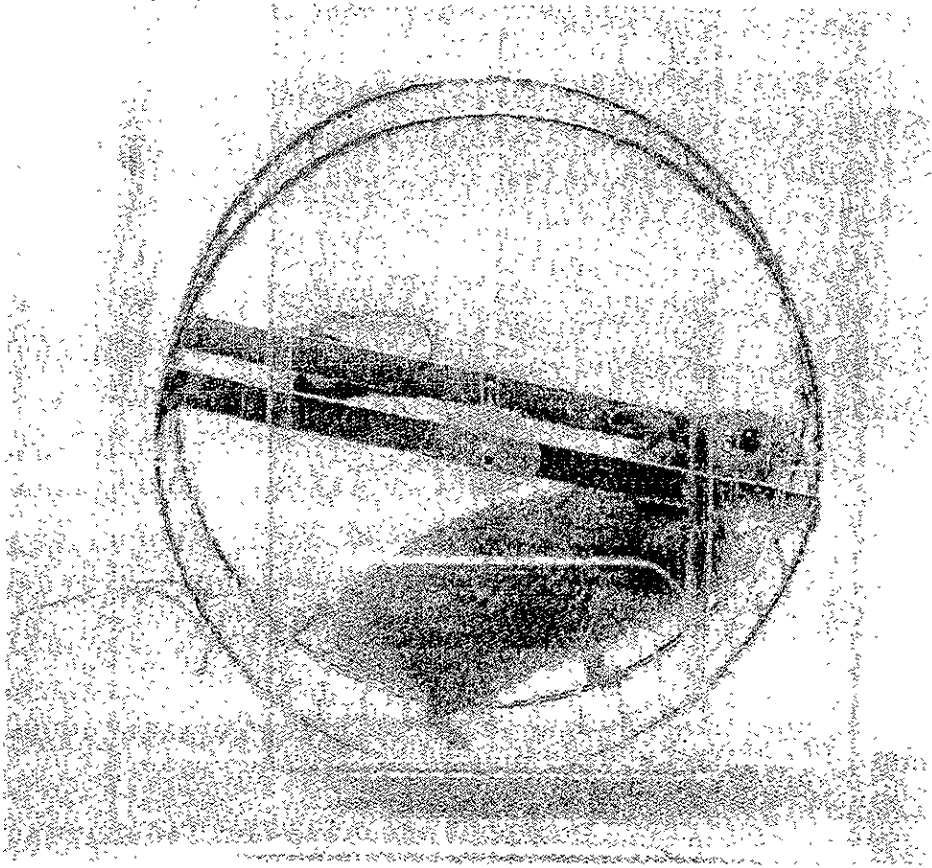


Figura 10. Rueda de ejercicio utilizada para la inducción de actividad locomotora forzada como sincronizador no fónico en hamsters. Los cambios de fase que se presentan por la sincronización no fónica se generan por pulsos de 3 horas de actividad forzada en la rueda de ejercicio (Tomada de Mrosovsky, 1995).

Los principales estudios de la sincronización no fótica, son con el interés de identificar los mecanismos neurales que subyacen a dicho proceso, principalmente el efecto que tienen sobre el NSQ. Mrosovsky y Salmon (1987) demostraron que en condiciones constantes, la inducción de actividad locomotora en una rueda de ejercicio en hamsters genera cambios de fase en ritmos circádicos conductuales. Otro de los experimentos hechos por Mrosovsky (1988), demostraron que el simple cambio de caja en hamsters, tiene la fuerza de sincronizador, así mismo 30 min. de interacción social con otros hamsters.

Por otro lado se ha demostrado que los cambios en la temperatura ambiental cambian los ritmos de actividad en monos (Aschoff y Tokura, 1986); los autores argumentaron que la sincronización depende de la acción que tiene la temperatura al alterar la conducta, y que ésta a su vez afecta al oscilador.

Los cambios de fase inducidos por estímulos no fóticos, son diferentes a los que se producen por estimulación fótica; Mientras que con pulsos de inducción de actividad en la rueda de ejercicio los retrasos de fase se presentan durante la noche subjetiva y los adelantos durante el día subjetivo, para los estímulos fóticos es de manera inversa (Mrosovsky, 1991).

La sincronización a pulsos de actividad forzada es similar entre animales diurnos y nocturnos. Hut y cols. (1999) demostraron que la sincronización por inducción de actividad en una rueda de ejercicio en especies diurnas (ardilla parda europea) se establece con una relación de fase entre el oscilador y el sincronizador, similar a la de especies nocturnas; Los cambios de fase que se presentan por la inducción de actividad dependen de la fase del oscilador más que de la fase del ciclo de actividad, tanto en especies diurnas como en especies nocturnas.

En estudios farmacológicos en donde se ha trabajado con triazolam (benzodiazepina) como sincronizador, se ha observado que los cambios de fase son similares a los que se presentan con la inducción de actividad en la rueda de ejercicio como sincronizador (Mrosovsky y Salmon, 1987). Las similitudes de los cambios de fase por triazolam con respecto a los pulsos de actividad han sido interpretadas por el efecto que tiene el triazolam en la inducción de hiperactividad en el hamster (Mrosovsky, 1995).

Se ha propuesto que la hojuela intergeniculada (IGL), puede ser un sitio por el cual los estímulos no fóticos tengan acceso al NSQ. La relación de IGL se ha demostrado a partir de experimentos en los cuales la administración de triazolam no produce cambios de fase en hamster con lesiones de IGL (Johnson y cols. 1988). En otro estudio se demostró una ausencia de sincronización por inyecciones diarias de solución salina en hamsters con lesiones de IGL (Maywood y cols. 1997).

Por otro lado se ha demostrado que los cambios de fase por manipulación o por cambiar al animal de su caja inducen la expresión de la proteína Fos en IGL (Janik y Mrosovsky, 1992), aunque estos experimentos demostraron que en el NSQ no había expresión de Fos, las interpretaciones sugirieron que el efecto de este tipo de manipulación que puede llevarse de IGL al NSQ no involucran la expresión de Fos.

Contradiendo estos trabajos, Edelstein y Amir (1995) demostraron que el cambio de caja e inyecciones intraperitoneales de solución salina pueden inducir la expresión de la proteína Fos en el NSQ y en el IGL. La expresión de Fos se encontró aumentada en el IGL durante la fase de luz en comparación con la expresión observada en la fase de oscuridad.

La comunicación de IGL con el NSQ es por medio del tracto geniculado-hipotalámico (GHT) (Morin y cols. 1992); El NSQ recibe neuropéptido Y de IGL por medio del GHT, la administración de NPY en el NSQ produce avances de fase del ritmo de actividad locomotora en hamsters (Mrosovsky, 1992). Estos resultados propusieron que la proyección de NPY del IGL al NSQ es el mecanismo a través del cual ciertos eventos no fóticos afectan el reloj circadiano en hamsters (Mrosovsky, 1995).

1.5. Sincronización por alimento.

La ingestión de alimento es un patrón conductual necesario para la supervivencia de todos los organismos, la disponibilidad del alimento puede variar de acuerdo al ambiente en el cual se encuentre cada organismo. A consecuencia de la restringida disponibilidad de alimento en la naturaleza, los organismos han desarrollado estrategias tanto conductuales y metabólicas que sean eficientes para la obtención de recursos. Algunos animales desarrollan habilidades espaciales de acuerdo al lugar en donde se encuentran los recursos, otros por medio del aprendizaje desarrollan estrategias en la conducta de búsqueda de comida, pero cuando la disponibilidad del alimento depende del tiempo más que del lugar, los organismos han desarrollado la capacidad de poder “medir” el tiempo de disponibilidad por medio de relojes u osciladores endógenos.

Las investigaciones en busca de un oscilador endógeno sincronizado por alimento comenzaron desde principio de siglo, cuando Richter en 1922 encontró que las ratas sometidas a una sola comida al día incrementaban su actividad locomotora horas previas a la llegada del alimento; Al parecer las ratas anticipaban la hora de disponibilidad de la comida. Pero no fue sino hasta hace unos años que se comenzó a considerar la existencia de un oscilador circádico asociado al alimento independiente del NSQ (Stephan, 1993). Dicha consideración surgió a partir de los estudios de F. Stephan, (1979) en donde demostró que animales con lesiones del NSQ y bajo condiciones constantes de iluminación se activaban en anticipación al alimento cuando se encontraban bajo horarios restringidos de alimentación, sugiriendo la existencia de un mecanismo endógeno para la estimación del tiempo.

En 1974 Krieger demostró que la restricción de alimento generaba una sincronización del ritmo de temperatura corporal así como de los niveles de corticosterona. En los experimentos de Krieger los picos máximos en la temperatura corporal y de corticosterona se presentaban horas antes de la llegada del alimento, mostrando un cambio de fase del ritmo fisiológico de la noche al día.

Una de las características más importantes para considerar que los organismos se sincronizaban a horarios restringidos de alimentación, fue la presencia de esta anticipación tanto conductual como metabólica por horarios restringidos, bajo condiciones constantes y ante la ausencia del NSQ. A este fenómeno se le denominó actividad de anticipación al alimento (AAA) (Mistlberger, 1994).

La AAA puede ser observada y medida a partir de diferentes parámetros conductuales, como por ejemplo ingestión de agua, actividad en rueda de ejercicio, presión de una palanca o en cajas de actividad general (Fig. 11).

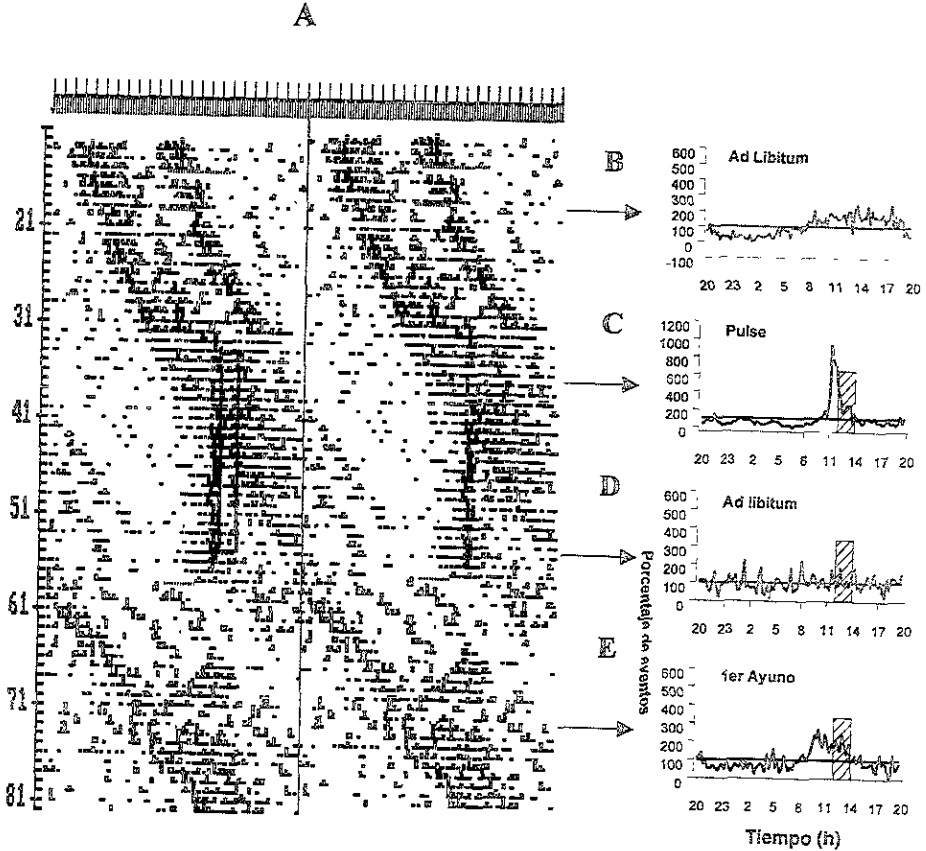


Figura 11. La AAA se presenta en un rango circadiano, en el actograma (A) se puede observar que cuando los animales se encuentran bajo horarios restringidos de alimentación (indicado por la barra blanca) presenman AAA, y que ésta persiste aún por algunos días después de la restricción de alimento (ad libitum). Posteriormente, cuando el animal se encuentra en ayuno, vuelve a aparecer el componente de AAA. En las figuras B, C, D, y E se muestra una gráfica del perfil de actividad de cada condición experimental.

Se ha sugerido que la AAA puede depender de un proceso de aprendizaje asociativo, en donde los organismos pueden anticipar el tiempo de llegada del alimento de acuerdo a señales ambientales tan sutiles como las variaciones de temperatura, la intensidad de la luz, un sonido, o cualquier otro estímulo externo que pudiera servir de señal de tiempo para el animal (Mistlberger, 1994). Se ha tratado de explicar la AAA, como una respuesta condicionada desencadenada por el apareamiento de dos estímulos, la fase circádica en la cual se encuentra el animal (estímulo condicionado) y la presentación del alimento (estímulo incondicionado). Aún considerando este paradigma, la estimación del tiempo para la fase circádica requiere de la existencia de un reloj.

Por otro lado, para poder argumentar la existencia de un proceso circadiano asociado al alimento, la AAA presenta ciertas propiedades que indican que el fenómeno depende de un reloj:

1. La AAA solamente se presenta por sincronización en un rango circadiano que es entre 19 y 31 horas (Stephan, 1981). Cuando la sincronización por alimento se presenta fuera de este rango circadiano los animales no presentan AAA. Mistlberger y cols. (1994) han demostrado que en ratas la AAA se presenta de manera más intensa cuando los horarios restringidos de alimentación son de 25 o 26 horas, mientras que si el horario es de 23 horas o menor la AAA se presenta de manera débil o simplemente no se presenta. Los resultados de estos experimentos indican que la AAA y en general la sincronización por alimento depende de un reloj interno con un periodo cercano a 24 horas.

2. La AAA persiste aún en ausencia del alimento. Se ha demostrado que la AAA persiste con la fase impuesta por el alimento alrededor de una semana después de haber sometido a los animales a horarios restringidos de alimentación. Aunque desaparece cuando los animales están en condiciones constantes (*ad libitum*), reaparece si se les somete a periodos de ayuno. Estas características indican la existencia de un componente de oscilación circadiano (Mistlberger, 1994).

3. La existencia de ciclos transitorios que se generan cuando se cambia de fase y periodo (Stephan, 1981).

4. El fenómeno de AAA no solamente se ve reflejado en la activación conductual del organismo previamente a la llegada del alimento en horarios restringidos de alimentación. Otros parámetros de carácter fisiológico se sincronizan con el alimento, entre ellos el ritmo de la temperatura corporal, el ritmo de corticoesteroides en plasma (Honma y cols. 1984), glucógeno hepático, ácidos grasos libres (Escobar y cols. 1998), insulina, motilina (Davidson A. y Stephan F. 1999) y a nivel central específicamente en el núcleo paraventricular del hipotálamo, la liberación de neuropéptido Y (Toshihiro y cols. 1996).

5. Para que el alimento funja como sincronizador, se requiere que sea un estímulo metabólicamente relevante para el organismo. Ratas sometidas a programas únicos de alimentación al día con alimento que contiene solamente un macronutriente como lípidos, proteínas o carbohidratos no presentan AAA, mientras que ratas sometidas a programas en donde se combinan más dos macronutrientes como proteínas y grasas o proteínas y carbohidratos sí presentan la AAA (Mistlberger y cols. 1990).

La importancia de los procesos metabólicos así como de los contenidos energéticos del alimento en la AAA, han llevado a desarrollar diversas investigaciones en busca del oscilador sincronizado por alimento, principalmente en estructuras centrales relacionadas con la ingestión de alimento.

1.6. El Oscilador Sincronizado por Alimento.

En el sistema nervioso central (SNC) aún no se ha podido identificar la estructura específica relacionada con la sincronización por alimento. Se ha hablado del papel de núcleos hipotalámicos que están involucrados en la regulación de la ingestión de alimento y que podrían ser parte de este reloj circádico.

En trabajos iniciales, lesiones del núcleo ventromedial hipotalámico (VMH) mostraron una pérdida de sincronización por alimento, de AAA y del ritmo de corticosterona, sugiriendo que el VMH pudiera ser el sustrato anatómico del oscilador sincronizado por alimento. Posteriormente se demostró que dicha AAA se restauraba después de un periodo de 3 a 5 semanas de recuperación a la lesión (Mistlberger y Rechtschaffen, 1984), con lo cual se descartó el VMH como posible oscilador. Por otro lado se han realizado también lesiones del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) sin resultados exitosos (Mistlberger y Rusak, 1988). Otras áreas cerebrales como el núcleo lateral hipotalámico, al ser lesionado no elimina la AAA, así mismo lesiones de hipocampo, amígdala o núcleo acumbens tampoco eliminan la AAA (Mistlberger y Mumby, 1992).

Debido a que lesiones de diversos núcleos del sistema nervioso central no alteran los ritmos sincronizados por el alimento, se ha considerado que el oscilador sincronizado por alimento puede estar constituido por un sistema multioscillatorio, en donde se involucre la participación de estructuras centrales importantes en la regulación de la ingestión de alimento y procesos metabólicos periféricos (Escobar y cols. 1998). La información metabólica relacionada con la ingestión de alimento, puede ser una señal para el sistema nervioso central en la sincronización por alimento. La participación de procesos fisiológicos a nivel periférico en el fenómeno de sincronización por alimento, ha llevado a tratar de buscar el oscilador circádico asociado al alimento en procesos digestivos y metabólicos y en su relación con el sistema nervioso central.

Comperatore y Stephan (1987) registraron la actividad eléctrica del estómago y del duodeno en animales restringidos de alimento, y encontraron que de 4 a 5 horas previas a la llegada del alimento se presentaba un incremento en la motilidad del duodeno. Conductualmente, pudieron observar que la motilidad del duodeno siempre precedió a la conducta de anticipación.

Considerando que el reloj circádico asociado al alimento puede encontrarse en la periferia, es posible que el hígado sea un candidato para dicha sincronización debido a su importante participación en el procesamiento de señales metabólicas asociadas al alimento. Los procesos metabólicos en el hígado pueden ser afectados por los horarios restringidos de alimento. se ha demostrado que existe un incremento en la síntesis de glucógeno hepático después de comer comparado con el incremento en animales ad libitum (Lima y cols 1982).

Escobar y cols. (1998) demostraron que animales bajo horarios restringidos de alimentación mostraban una importante depleción de glucógeno hepático pocas horas antes de comer en comparación con animales ad libitum, y un aumento en la oxidación de ácidos grasos.

El hígado es considerado como el sitio en donde se llevan a cabo todos los mecanismos necesarios para el aprovechamiento energético; Este argumento ha llevado a pensar que las señales que desencadenan hambre y posteriormente la búsqueda de comida se generen a partir de procesos de gluconeogénesis (formación de glucosa a partir de aminoácidos o grasas) o glucogenólisis (formación de glucosa a partir del glucógeno hepático), por lo tanto algunas investigaciones afirman que la reducción en la concentración de glucógeno hepático puede ser la señal que desencadene la conducta de ingestión de comida (Lima y cols. 1984).

En estudios recientes (Díaz-Muñoz y cols. 2000) se ha mostrado que bajo condiciones de restricción de alimento, el metabolismo hepático muestra sus ritmos circadianos asociados a la hora de alimentación, e inclusive muestra AAA. Esto último sugiere la posibilidad de que el hígado sea un oscilador circadiano. Por otro lado Yamazaki y cols. (2000) mostraron con una preparación de ratones transgénicos, que el hígado *in vitro* mantiene oscilaciones que se atenúan después de 5 a 7 ciclos. Ambos hallazgos llevan a considerar al hígado como un importante elemento del oscilador sincronizado por alimento.

El hígado y los procesos metabólicos y digestivos en la periferia que pueden participar para el oscilador sincronizado por alimento reciben aferencias del sistema nervioso autónomo (SNA), y principalmente de su rama simpática. Russek (1980) demostró que la adrenalina tiene efectos inhibitorios en la conducta de ingestión de comida, y que dicho efecto se debe a las acciones metabólicas de la adrenalina sobre el hígado. La actividad simpática (liberación de adrenalina) incrementa la glucogenólisis y posteriormente la producción hepática de glucosa, dicho efecto es mediado por los nervios simpáticos del hígado. Los procesos metabólicos antes mencionados que ocurren en el hígado debido a la actividad simpática, se correlacionan a ciertas situaciones en las cuales dicha actividad puede aumentar y con esto el metabolismo hepático. La producción de glucosa hepática puede aumentar en situaciones de actividad como el ejercicio o a causa de una hemorragia (Winder y cols. 1983). Por otro lado en situaciones estresantes también se ha observado una hiperglucemia por la actividad de la adrenalina sobre el hígado. Lautt y cols (1983) demostraron que esta hiperglucemia sólo puede ser suprimida por simpatectomía y adrenalectomía.

De manera que la actividad simpática (liberación de adrenalina) que se ejerce sobre los procesos metabólicos que suceden en el hígado después de la ingestión de alimento puede ser una señal interna relevante en la sincronización por alimento, así mismo el SNA podría participar como componente del oscilador circadiano del alimento regulando el balance energético que sucede en el hígado.

1.7. El Sistema Nervioso Autónomo.

El sistema nervioso autónomo o vegetativo (SNA) recibió este nombre ya que se consideraba independiente del sistema nervioso central (SNC); Inerva principalmente la musculatura lisa de todos los órganos, el corazón y las glándulas. Morfológicamente a nivel central las diferencias entre el SNA y el SNC no son del todo claras, principalmente en el tronco cerebral y en el hipotálamo, mientras que en la periferia se pueden diferenciar ambos sistemas fácilmente.

El SNA en la periferia se compone principalmente de dos ramas diferentes: la rama simpática y la rama parasimpática, la vía eefectora tanto simpática como parasimpática está constituida por una cadena de dos neuronas. La primera neurona (preganglionar) se localiza en el SNC y extiende su axón hacia la periferia hasta un ganglio vegetativo. Ahí hace sinapsis con una segunda neurona (postganglionar) que proyecta hacia el órgano blanco. El sistema parasimpático se origina en el tallo cerebral y en la médula espinal sacra, se denomina sistema craneosacral, mientras que el sistema simpático se origina en la médula espinal torácica y en los segmentos superiores de la médula espinal lumbar, por esto se denomina sistema torácico-lumbar.

La transmisión neurohumoral del SNA es distinta para sus dos componentes, para el sistema parasimpático la acetilcolina es el neurotransmisor que se libera en sus terminales tanto preganglionares como postganglionares; por otro lado en el sistema simpático el neurotransmisor de sus terminales postganglionares es la noradrenalina, y por lo tanto las neuronas simpáticas son denominadas neuronas adrenérgicas. La noradrenalina y la adrenalina pertenecen al grupo de las catecolaminas. Los órganos a los cuales llega la noradrenalina y la adrenalina contienen receptores adrenérgicos, estos pueden ser de dos tipos, los receptores α y β . (Schmidt y Thews, 1993).

La liberación de adrenalina y noradrenalina por la médula suprarrenal aumenta cuando el organismo se encuentra en situaciones de emergencia, como el estrés o en algún estado de esfuerzo físico extremo. Esta liberación de adrenalina por parte de la médula suprarrenal está controlada por la actividad del sistema simpático.

El papel del SNA también es importante en la ingestión de alimento, para la rama simpática la noradrenalina y adrenalina participan en la regulación de procesos metabólicos que ayudan al organismo en el aprovechamiento energético, en estados catabólicos promueven la movilización de ácidos grasos libres del tejido adiposo gracias a la acción adrenérgica, dichas acciones metabólicas se realizan mediadas por receptores β . En el hígado promueven glucogenólisis y oxidación de ácidos grasos.

Se ha demostrado que durante la alimentación estas catecolaminas tienen una función para el metabolismo de glucosa (Young y Landsberg, 1980). Ya hemos mencionado los trabajos de Lout (1983) en los cuales demostró que la actividad simpática incrementa la producción hepática de glucosa después de la ingestión de alimento.

Por otro lado los trabajos de Russek y Racotta (1980) y los de Rodriguez-Zendejas y cols. (1968), demostraron que la administración intraperitoneal de adrenalina produce una disminución de la ingestión de alimento. Los datos de ambos grupos han sugerido que el efecto de la adrenalina es sobre el hígado, ya que la administración de adrenalina intramuscularmente no inhibe la ingestión de alimento. Reafirmando los efectos de la adrenalina sobre el hígado Racotta y cols. (1972) demostraron la existencia de adrenalina y de células cromafines en el hígado. La relación que puede existir entre la adrenalina y el metabolismo hepático después de la ingestión de alimento se ha interpretado como un efecto de saciedad que genera la adrenalina al incrementar la producción de glucosa hepática (Russek y Racotta 1980).

Tanto en animales en condiciones libres de alimentación como en animales restringidos de alimento, existe una hiperglicemia después de comer, este efecto ha sido asociado a la acción de la adrenalina y noradrenalina sobre tejidos involucrados de manera importante en el control homeostático de glucosa como el hígado, el páncreas y el tejido graso (De Boer y cols. 1989).

De Boer y Gugten (1986) demostraron que las concentraciones de adrenalina en plasma presentan variaciones rítmicas a lo largo del día, encontrando que la mayor concentración de adrenalina se presenta en la fase de actividad en animales nocturnos, es decir durante la noche. El incremento de la actividad simpática y de la médula adrenal se encuentra correlacionada con el incremento en la actividad general de los animales, esto sugiere que el ritmo circádico de adrenalina es una respuesta fisiológica asociada con patrones conductuales de actividad circadiana como la actividad locomotora o la conducta de ingestión de comida.

En el paradigma de sincronización por alimento se observa en la AAA una activación general de los organismos a nivel conductual y fisiológico asociada a una situación estresante resultado de los horarios restringidos de alimentación, que pudiera estar mediada por un aumento de la activación simpática. Por otro lado, la influencia de las catecolaminas en procesos de balance energético, sobre todo en estados catabólicos sugiere la participación del sistema simpático y por lo tanto de la adrenalina como posible señal de sincronización a nivel periférico en animales mantenidos bajo horarios restringidos de alimento.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha propuesto que la sincronización por alimento involucra la actividad de estructuras hipotalámicas específicas del sistema nervioso central relacionadas con la conducta alimenticia, procesos metabólicos relacionados con el alimento, así como órganos y procesos periféricos tales como el tubo gástrico, el hígado o las señales humorales (Bray, 1991).

El sistema nervioso autónomo tanto en su vía simpática como parasimpática, mantiene una importante relación con órganos específicos como el hígado o el páncreas que participan en la ingestión de alimento. La adrenalina como hormona secretada por la médula suprarrenal debido a la actividad simpática, se ha relacionado con el estrés y así mismo con la conducta de alimentación. Trabajos realizados previamente, han demostrado que los niveles de adrenalina en plasma aumentan después de que un animal come con el fin de llevar a cabo ciertos procesos gástricos necesarios para el aprovechamiento energético (De Boer y cols. 1989). En la sincronización por alimento vista como una situación estresante para los animales debido a la privación de alimento, la presencia de un aumento en la actividad general de los organismos antes de la llegada del alimento (AAA), puede estar mediada por la actividad del SNA principalmente por su rama simpática (adrenalina). Por ello, resulta interesante evaluar si la adrenalina es la señal interna para iniciar la activación conductual. De ser así la administración diaria y a la misma hora de adrenalina debiera producir actividad locomotora posterior a la administración de adrenalina. Alternativamente la liberación de adrenalina subsecuente a la ingestión de alimento puede fungir como señal de sincronización interna, de ser así su inyección diaria produciría un fenómeno parecido a la sincronización por alimento, es decir anticipación a la administración de adrenalina

Por otro lado, debido a la importancia que tiene el reloj circadiano (NSQ) en la modulación de la sincronización no fótica, es importante evaluar si la adrenalina puede modificar un ritmo conductual en libre corrimiento, el cual depende del NSQ.

2.1. Justificación del problema.

No se tiene conocimiento de trabajos en donde se analice la participación de la adrenalina como señal interna en el fenómeno de sincronización por alimento, por lo que resulta de interés evaluar si es que la adrenalina juega un papel importante en dicho fenómeno. Por un lado puede ser causa de la activación conductual (AAA) que se observa previa al acceso de alimento. Por otro lado la adrenalina secretada posteriormente a la ingestión de alimento pudiera formar parte de la vía de sincronización interna hacia el oscilador sincronizado por alimento (OSA), de ser así la inyección diaria y a la misma hora de adrenalina producirá actividad de anticipación previa a la inyección. Estos datos permitirán identificar un elemento del OSA.

La importancia de evaluar la existencia de cambios en el periodo y en la fase del ritmo circadiano en libre curso de la conducta de ingestión de agua el cual depende del NSQ, permitirán determinar si la adrenalina es un estímulo no fótico que afecta al mecanismo del NSQ.

3. OBJETIVOS.

3.1. General.

1. Determinar el efecto sincronizador de la adrenalina sobre los ritmos circádicos conductuales de la rata.

3.2. Específicos.

1. Identificar si los animales presentan actividad de anticipación a la administración de adrenalina como se presenta en la sincronización por alimento.
2. Determinar el efecto de la adrenalina sobre el periodo y la fase del ritmo circádico de ingestión de agua de la rata el cual depende de la actividad del NSQ.
3. Determinar la especificidad de los efectos de la adrenalina sobre la conducta de los animales, así como sobre el periodo y la fase del ritmo, con respecto al efecto por simple manipulación o a la administración del vehículo (solución salina).
4. Determinar si los efectos sobre la conducta de anticipación, el periodo y la fase del ritmo dependen del orden o secuencia de la administración de adrenalina, con el fin de descartar un posible proceso de aprendizaje asociativo o de sensibilización.
5. Caracterizar la curva dosis-respuesta para los efectos de la adrenalina sobre los parámetros estudiados (conducta de anticipación, periodo y fase del ritmo).

4. HIPÓTESIS.

4.1. Hipótesis de Trabajo.

La adrenalina como mensajero humoral puede participar en el paradigma de sincronización por alimento como señal de sincronización interna para el ODA, de ser así:

1. La administración de adrenalina diaria y a la misma hora, producirá conducta de anticipación similar a la que se observa en la sincronización por alimento.
2. La administración de adrenalina genera cambios en el periodo y la fase del ritmo circádico conductual de la rata (ingestión de agua) dependiente del NSQ.
3. El efecto de la adrenalina es específico a la droga y no a la manipulación ni al vehículo.
4. El orden o secuencia de administración de la adrenalina y el vehículo no modifica los efectos específicos de cada tratamiento sobre la conducta de anticipación, el periodo y la fase del ritmo, por lo tanto no depende de la experiencia previa.
5. Las diferencias en la intensidad de la actividad de anticipación, en el periodo y en la fase del ritmo circadiano varían de acuerdo a las dosis de adrenalina administrada.

4.2. Hipótesis Estadísticas.

4.2.1. Hipótesis Nula (H₀).

1. La administración de adrenalina no genera actividad de anticipación en la rata.
2. La adrenalina no modifica el periodo ni la fase del ritmo circadiano conductual en libre curso de la rata.
3. El efecto de la adrenalina no es específico sobre la conducta de anticipación, el periodo y la fase del ritmo, y la misma respuesta se genera por manipulación o vehículo.
4. La respuesta a la adrenalina no se debe a la experiencia previa, la secuencia de administración de la adrenalina y el vehículo no producen cambios en la actividad de anticipación, el cambio de periodo y fase del ritmo circadiano en libre curso.
5. No existen diferencias significativas en la intensidad de la actividad de anticipación, en el periodo y en la fase del ritmo circadiano en libre curso de acuerdo a las dosis de adrenalina administrada.

4.2.2. Hipótesis Alterna (H₁).

1. La administración de adrenalina genera actividad de anticipación en la rata.
2. La adrenalina modifica el periodo y la fase del ritmo circadiano conductual en libre curso de la rata.
3. El efecto de la adrenalina es específico sobre la conducta de anticipación, el periodo y la fase del ritmo, y no se debe a la manipulación ni al vehículo.
4. La respuesta a la adrenalina se debe a la experiencia previa, la secuencia de administración de la adrenalina y el vehículo produce cambios en la actividad de anticipación, el cambio de periodo y fase del ritmo circadiano en libre curso.
5. La adrenalina genera diferencias significativas en la conducta de anticipación, en el periodo y en la fase del ritmo circadiano en libre curso de la rata de acuerdo a la dosis administrada.

4.3. Variables.

4.3.1. Variable dependiente

Como variable dependiente se utilizó el ritmo circadiano en libre corrimiento de la conducta de ingestión de agua en la rata; específicamente el periodo del ritmo, la fase (CT12) del ritmo circadiano antes y después de la administración y la intensidad de la conducta (anticipación).

4.3.2. Variable independiente

La variable independiente utilizada fue la administración de adrenalina en sus diferentes dosis (3.12µg, 6.25µg, 12.5µg, 25µg y 50µg), así como sus controles; la manipulación y la administración de vehículo (solución salina al 0.9%).

5. MATERIALES Y MÉTODO.

5.1. Animales y condiciones.

Se utilizaron 48 ratas macho de la cepa Wistar (obtenidas de la unidad de bioterio del Instituto de Fisiología Celular) con un peso entre 200-250 gr. al inicio del experimento. Los animales se alojaron individualmente en cajas de acrílico transparente (45cm X 30cm X 20cm) y se mantuvieron en un cuarto de registro conductual sonoamortiguado en condiciones de iluminación constantes (luz roja tenue 50 lux) con una temperatura de 22°C y con agua y comida (Purina chow) ad libitum.

5.2. Registro automatizado de conducta.

La conducta de ingestión de agua fue monitoreada individualmente con un dispositivo automatizado, que consiste en una caja de acrílico con una plataforma de metal y un bebedero conectado a un sensor y éste a su vez conectado a una computadora en donde se almacenan los datos. Cada vez que la rata bebe agua hace contacto con el bebedero y tierra con la plataforma de metal, esto genera que el circuito se cierre y mande una señal al sensor y que se registre en la computadora. Los datos se recolectan a intervalos de 15 minutos y se analizan con el programa DiSPAC (Aguilar-Roblero y Vega, 1993) (Fig. 12).

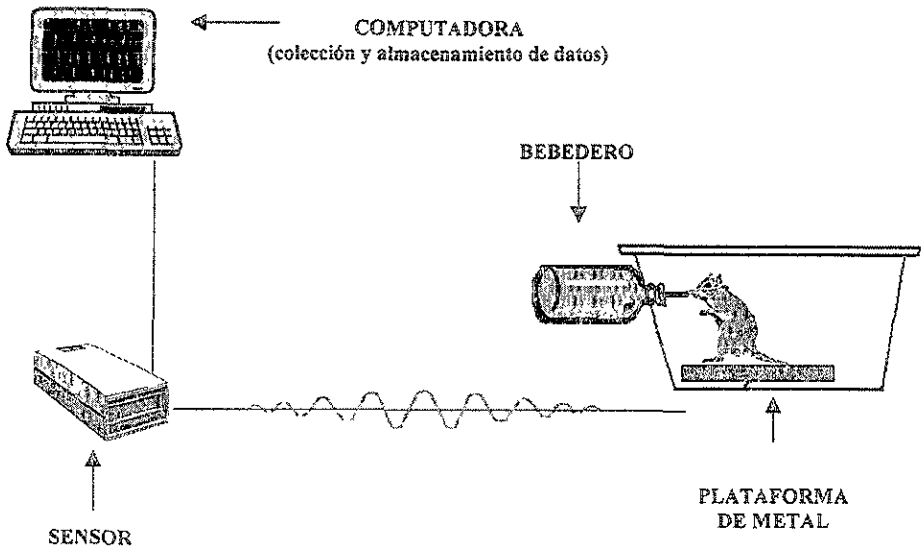


Figura 12. Sistema de registro conductual para el análisis cronobiológico. Cada vez que el animal bebe agua, al pisar la plataforma y tocar el bebedero manda una señal que será registrada en la computadora.

5.3. Manipulaciones experimentales.

El intervalo mínimo que duró cada una de las manipulaciones experimentales fue de 10 días. Para algunas manipulaciones se consideraron intervalos más largos para asegurar la consistencia de la respuesta.

5.3.1. Libre curso.- La conducta de ingestión de agua fue registrada bajo condiciones ambientales constantes y sin perturbaciones por un intervalo mínimo de 10 días, el cual se consideró importante para poder trazar las líneas de ajuste para determinar periodo y fase del ritmo.

5.3.2. Manipulación.- La manipulación consistió en sacar al animal de su caja y tocar delicadamente el área abdominal durante 1 minuto. Dicha manipulación tuvo como finalidad identificar las diferencias entre la administración de adrenalina y la propia manipulación. La manipulación es un grupo control para el experimento 1.

5.3.3. Adrenalina.- La adrenalina (Epinefrina hidrociorada, Sigma) fue inyectada intraperitonealmente, a un volumen de 1ml/kg de peso corporal para todos los animales. las concentraciones de adrenalina se especifican de acuerdo al experimento correspondiente.

5.3.4. Vehículo.- El vehículo consistió en inyecciones intraperitoneales de solución salina isotónica al 0.9% a un volumen de 1ml/kg de peso corporal. Las inyecciones de vehículo al igual que la manipulación fueron un control que nos ayudó a discriminar el efecto sincronizador de la adrenalina de los efectos de la manipulación y el piquete por la inyección.

5.4. Análisis de datos.

5.4.1. Procedimientos generales.

A) Actograma.

Para cada rata se obtuvo un actograma de su conducta de ingestión de agua, en el cual pudieron observarse todos los días comprendidos para el experimento correspondiente.

B) Perfil de actividad.

Para los intervalos de cada manipulación (adrenalina, vehículo o manipuación) se elaboraron perfiles de actividad. Estos se obtienen para cada sujeto experimental promediando y graficando la actividad de cada 15 minutos para 10 días de registro.

C) Porcentaje de cambio.

Para obtener este valor se determinó el promedio de la actividad de todo el ciclo, el cual se consideró el nivel basal o cero. El valor de cada hora antes o después del estímulo se comparó con el promedio de actividad del ciclo y se calculó el porcentaje correspondiente

D) Determinación de periodo y fase.

Para cada etapa de libre curso o manipulación se determinaron el periodo y CT12 (inicio de actividad). El inicio de actividad también conocido como CT12 se determinó visualmente por 2 observadores en el actograma.

Se consideró CT12 al momento en que aparecen componentes de actividad continuos con intervalos de inactividad menores de 30 minutos. El periodo se determinó por medio del ajuste de una línea por CT12 a lo largo de 10 días y por medio de un análisis de periodograma de χ^2 (DiSPAC), que detecta el intervalo en que se repite un fenómeno.

Los cambios de fase resultantes de las manipulaciones experimentales se determinaron comparando la hora geográfica correspondiente a CT12 antes y después de la manipulación.

5.5. Diseño experimental.

Con el propósito de determinar los diferentes objetivos del proyecto, el estudio se dividió en tres fases experimentales:

5.5.1. Experimento 1.

En este experimento se determinó el efecto de la administración de adrenalina sobre el ritmo circádico conductual, sobre el periodo y la fase del ritmo. También permitió la identificación de diferencias entre la administración de adrenalina, la manipulación y el vehículo.

Se registraron 16 ratas bajo las 3 manipulaciones experimentales con intervalos de 10 días de libre curso entre cada manipulación. El procedimiento fue el siguiente:

•**Libre curso 1.-** Para obtener una línea base de actividad, los animales fueron monitoreados por 14 días bajo condiciones de libre curso antes de las manipulaciones experimentales.

•**Manipulación.-** Después del periodo de libre curso, al inicio del día 15 las ratas fueron manipuladas durante doce días a la misma hora (11:00 am).

•**Libre curso 2.-** Se dejó a los animales en libre curso por un intervalo de 10 días.

•**Adrenalina.-** Las ratas recibieron por 16 días a la misma hora (1:00 pm.) inyecciones intraperitoneales de adrenalina. La adrenalina fue disuelta en solución salina al 0.9% para obtener una concentración de 12.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de masa corporal. (Russek y cols. 1991)

•**Libre curso 3.-** Los animales se dejaron en libre curso por un periodo de 10 días.

•Vehículo.- Durante 10 días a la misma hora (11:00 am.) los animales recibieron inyecciones intraperitoneales de solución salina (0.9%).

•Libre curso 4.- Los animales estuvieron en libre curso por 10 días finalizando así el experimento 1 (Fig. 13).

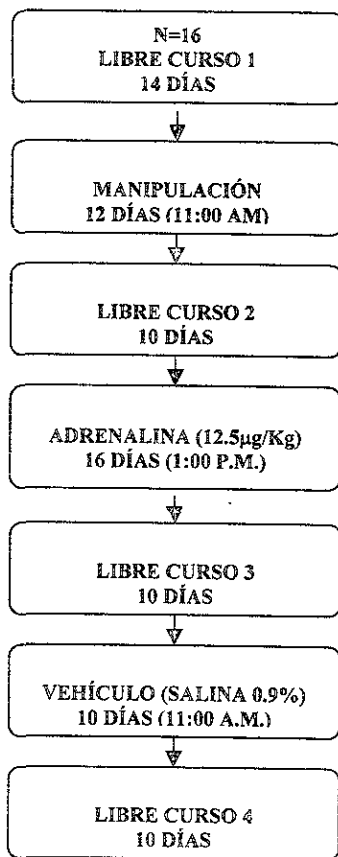


Figura 13. Diseño experimental para el experimento 1

Para determinar los efectos de las manipulaciones experimentales sobre el NSQ, se comparó el periodo durante libre curso antes y después de cada manipulación. También se determinaron posibles cambios de fase comparando CT12 antes y después de cada manipulación experimental. Para evaluar si el cambio de periodo es significativo estadísticamente se hizo un ANOVA de una vía, con respecto a los cambios de fase el análisis estadístico se llevó a cabo con una prueba de chi cuadrada (χ^2).

La influencia de la adrenalina como señal de sincronización asociada al oscilador del alimento se determinó inicialmente con una inspección visual del actograma y del perfil de actividad. Se clasificó a las ratas en tres categorías (respuesta de anticipación, respuesta y sin respuesta) de acuerdo a los resultados observados en actogramas y perfiles de actividad.

Para considerar significativa la anticipación (activación conductual previa a la administración de adrenalina) se comparó el promedio de actividad 1 y 2 horas antes del estímulo con la actividad esperada para esa fase del día en condiciones basales. Este valor se obtuvo de los intervalos de libre curso, promediando la actividad desplegada por la rata a la misma hora circádica equivalente en que recibía la inyección.

Para cada manipulación experimental se caracterizó el patrón de respuesta conductual por medio de la representación del actograma, el perfil de actividad correspondiente y una gráfica del porcentaje de cambio para las 3 horas previas y posteriores al estímulo. Para obtener la gráfica del porcentaje de cambio se calculó la actividad promedio de todo el ciclo. Este valor se consideró el nivel basal o cero, los valores de cada hora antes y después del estímulo se compararon con el promedio de actividad del ciclo y se calculó el porcentaje correspondiente.

Otra estrategia para caracterizar el patrón de respuesta de cada manipulación fue graficando el porcentaje de contribución de todos los sujetos una hora antes y una hora después de cada manipulación experimental. Este porcentaje se calculó sumando el número de toques en el bebedero del animal a lo largo de todo el ciclo de 24 horas. A este total se le considero el 100%, y a partir de este valor se calculó el equivalente en porcentaje de una hora antes y una hora después. Estos valores se graficaron y se compararon para cada condición con un ANOVA de una vía. Con este análisis se pudo constatar la especificidad de respuesta de cada manipulación.

5.5.2. Experimento 2.

El segundo experimento fue un diseño contrabalanceado, con el fin de determinar los efectos que pueda tener la secuencia o el orden de la administración de adrenalina y vehículo sobre el ritmo circádico conductual de las ratas, considerando que la experiencia previa pudiera ser determinante de las respuestas observadas. Se utilizaron 16 ratas y fueron monitoreadas de la misma manera que en el experimento 1.

◦**Libre curso 1.-** Las ratas fueron monitoreadas por 14 días bajo condiciones de libre curso.

◦**Adrenalina o Vehículo.-** los animales fueron seleccionados aleatoriamente a la administración de adrenalina (n=8) o a la administración de solución salina al 0.9% como vehículo (n=8) por 12 días a la misma hora geográfica (12:00 am). La concentración de adrenalina fue la misma que en el experimento 1 (12.5 µg/100g de masa corporal).

◦**Libre curso 2.-** Se dejó un intervalo de 10 días en libre curso antes de cambiar la manipulación experimental.

◦Vehículo o Adrenalina.- Las ratas cambiaron de manipulación experimental, es decir las que fueron inyectadas con adrenalina ahora recibieron solución salina y por el contrario las que recibieron antes solución salina, fueron inyectadas con adrenalina durante 12 días a la misma hora geográfica (1:30 pm).

◦Libre curso 3.- Al final del experimento las ratas permanecieron por 10 días en libre curso (Fig. 14).

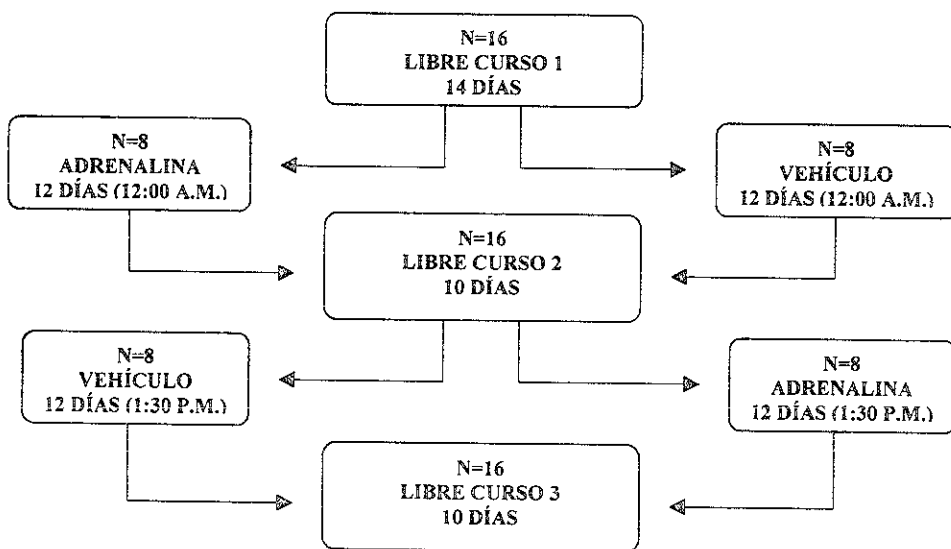


Figura 14. Diseño experimental para el experimento 2

En el experimento 2 la determinación de los periodos, de los cambios de fase así como la obtención de los perfiles de actividad se hizo de la misma manera que en el experimento 1, el análisis estadístico se realizó con un ANOVA y una prueba de chi cuadrada.

El objetivo del experimento 2 era evaluar si es que el orden de administración ya sea de adrenalina o vehículo era determinante tanto en el periodo y fase del ritmo y en la actividad de anticipación al estímulo, por lo tanto con un diseño contrabalanceado se evaluó la actividad de cada animal ante cada condición experimental (adrenalina o vehículo). Se comparó la respuesta 1 y 2 horas antes de la administración del fármaco entre el primer y segundo grupo (orden de administración) por medio de un ANOVA de una vía, con el fin de descartar que las respuestas se deben a la experiencia previa y no al efecto específico de la adrenalina o el vehículo.

5.5.3. Experimento 3.

Se utilizaron 16 ratas las cuales fueron monitoreadas de la misma manera que en los dos experimentos anteriores. El experimento 3 determinó la relación de diferentes dosis de adrenalina con la intensidad de sus efectos sobre la organización circádica de la conducta.

•**Libre curso 1.-** Las ratas fueron registradas por 12 días en condiciones de libre curso.

•**Adrenalina.-** Para la administración de adrenalina, los sujetos fueron asignados aleatoriamente a 4 grupos (n=4) en los cuales recibieron por 12 días a la misma hora geográfica (11:00 am) la administración de adrenalina a diferentes dosis con un volumen de 1ml/kg de peso corporal:

- Grupo 1. 3.12 µg/100g de peso corporal.
- Grupo 2. 6.25 µg/100g de peso corporal.
- Grupo 3. 25 µg/100g de peso corporal.
- Grupo 4. 50 µg/100g de peso corporal.

•**Libre curso 2.-** Se tomaron 10 días más de libre curso después de la administración de adrenalina (Fig. 15).

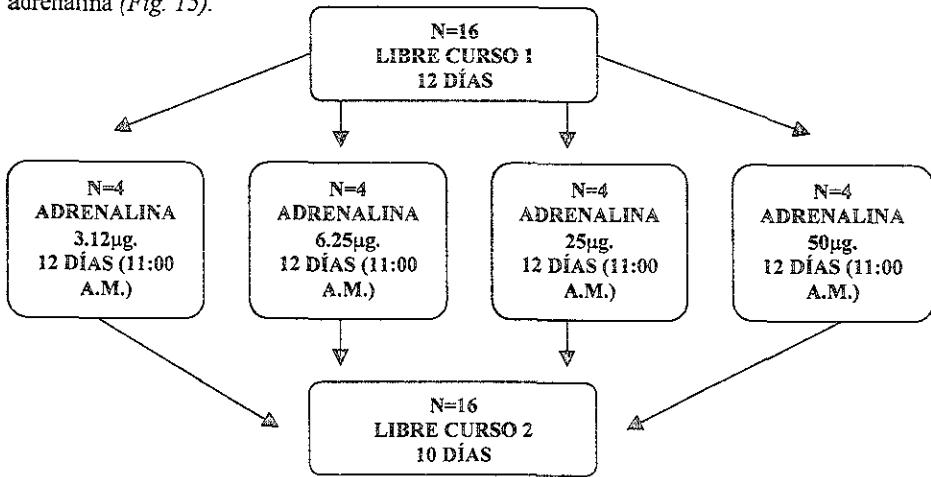


Figura 15. Diseño experimental para el experimento 3.

La determinación del periodo, la fase y el perfil de actividad de cada animal fue de la misma manera que en el experimento 1 y 2. Para el experimento 3 se compararon los cambios de periodo, cambios de fase y actividad de anticipación entre los cuatro grupos de animales de acuerdo a la dosis asignada (3.12µg, 6.25µg, 25µg y 50µg). Para la elaboración de una curva dosis-respuesta se tomaron aleatoriamente 4 animales del experimento 2 con dosis de 12.5µg y se obtuvieron los datos de las cinco dosis utilizadas a lo largo de los tres experimentos. Los efectos de las dosis sobre los diversos parámetros se compararon con un ANOVA de una vía.

6. RESULTADOS.

6.1. Experimento 1.

6.1.1. Oscilador sincronizado por alimento (ODA).

La administración de adrenalina como una señal que participa en la sincronización por alimento generó respuestas diferentes que mostraron dependencia de la fase en la cual se encontraba cada animal al momento de la administración del fármaco. La clasificación de las respuestas se realizó con los datos obtenidos en el perfil de actividad y la inspección visual del actograma de cada sujeto.

1. **Respuesta de Anticipación.**- 8 de los 16 sujetos (50%) mostraron una respuesta de anticipación a la administración de adrenalina de una a dos horas antes de la llegada del estímulo, con características similares a la respuesta anticipatoria que se observa en animales sincronizados por alimento. Esta anticipación consistió en un incremento de la actividad del animal por encima del promedio de la expresión espontánea esperada. Las condiciones para que la respuesta de anticipación se presente es que el animal se encuentre en su fase de actividad al momento de la administración. Dicha respuesta de anticipación se confirmó visualmente con los actogramas, en donde el incremento de la actividad se presenta antes de la administración de adrenalina (*Fig. 16*).

Para determinar si la respuesta anticipatoria es significativa se hizo un análisis estadístico con una prueba de Kruskal-Wallis en donde se comparó la actividad de cada animal 1 y 2 horas antes de la administración de adrenalina con la actividad en libre curso en una fase equivalente para cada sujeto sin la presencia de la adrenalina. Los resultados indicaron diferencias significativas entre las dos fases comparadas [$H(1,48) = 13.32; p < 0.0039$].

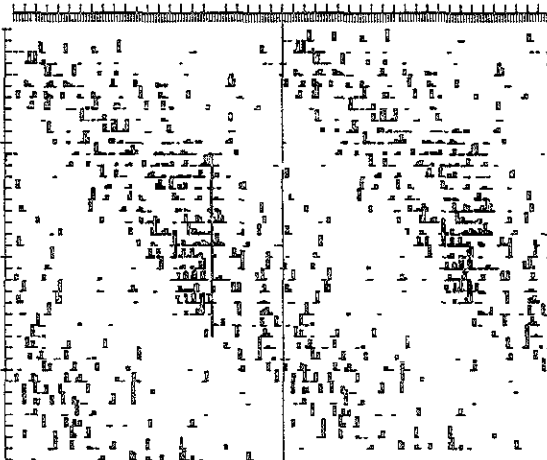


Figura 16. Actograma de la ingestión de agua de una rata a la cual se le administró adrenalina (12.5µg/100g) cada 24 horas, la línea vertical indica la hora en la cual se administró el fármaco. Antes de la línea se puede notar un incremento en la actividad como respuesta anticipatoria a la administración.

2. **Respuesta.**- 5 animales (31%) presentaron un componente de respuesta en su actividad inmediatamente después de la administración de adrenalina, pero ningún aumento de anticipación previo al estímulo. En este grupo se hizo el mismo análisis estadístico que en el grupo de respuesta de anticipación, comparando la conducta de cada animal con la actividad espontánea en libre curso en una fase equivalente. Las condiciones bajo las cuales la respuesta posterior al estímulo se presentó, fueron que los animales se encontraban en su fase de reposo al momento de la administración (Fig 17). Los resultados estadísticos no mostraron diferencias significativas para 1 y 2 horas antes de la administración con respecto al de libre curso [$H(1,24) = .01333$; $p < 0.9081$].

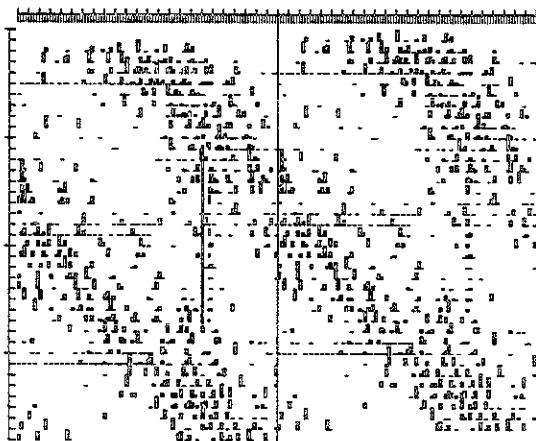


Figura 17. Actograma de ingestión de agua de un animal al cual se le administró adrenalina cada 24 horas. La línea vertical indica el momento de la administración. El animal responde inmediatamente después de la administración

3. **Sin respuesta.**- 3 animales (19%) no presentaron ningún tipo de respuesta a la administración diaria de adrenalina. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre la actividad de libre curso y la actividad asociada a la administración en fases equivalentes para cada sujeto [$H(1,24) = .1633$; $p < 0.6861$]. En este grupo la relación de fase no determinó la ausencia de respuesta (Fig. 18).

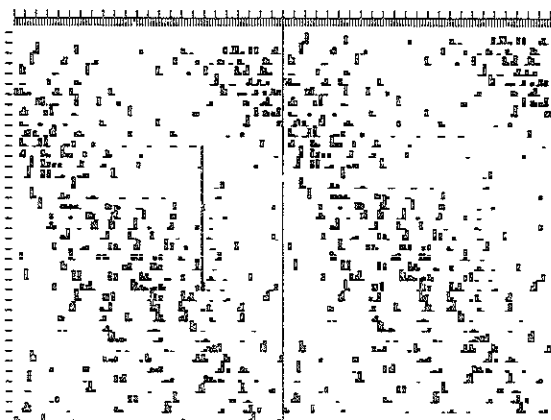
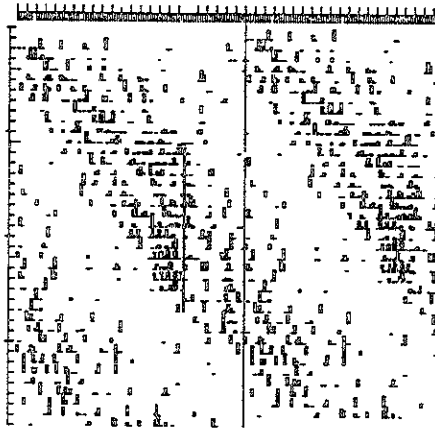


Figura 18. Actograma de ingestión de agua de una rata a la cual se le administró adrenalina por 24 horas. En este animal no se observó ningún tipo de respuesta a la administración. La línea vertical indica el momento de administración.

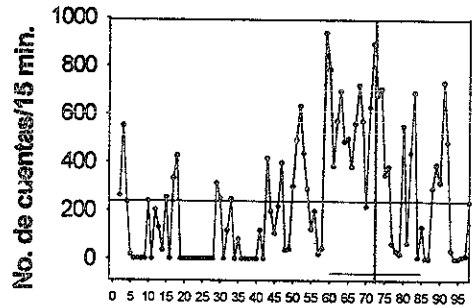
En los animales del experimento se observó un aparente efecto inhibitorio de la ingestión de agua posterior a la inyección de adrenalina, sin importar el tipo de respuesta de cada animal (anticipación o respuesta). Se hizo una comparación estadística con una prueba de Kruskal-Wallis de las tres horas posteriores a la administración con la actividad de la fase equivalente durante libre curso para determinar si el efecto inhibitorio era significativo. Los resultados no mostraron diferencias significativas [$H(1,95) = 2.706$; $p < 0.1000$].

6.1.2. Especificidad de la Adrenalina.

Tanto en los actogramas como en las gráficas de los perfiles de actividad, la comparación antes y después del estímulo, mostró una respuesta específica para cada condición experimental. La actividad de anticipación sólo se observó cuando se administró adrenalina (Fig. 20), mientras que para la manipulación y el vehículo no se observaron respuestas anticipatorias, sino solamente respuestas caracterizadas por un incremento en la conducta después del estímulo (Figs. 19-21)



A



B

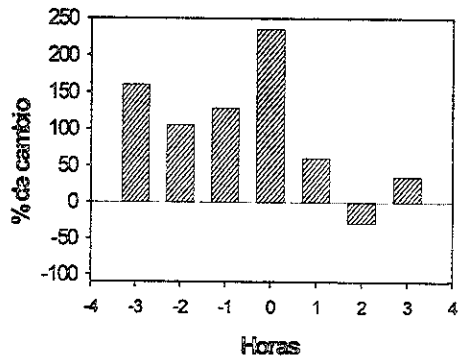
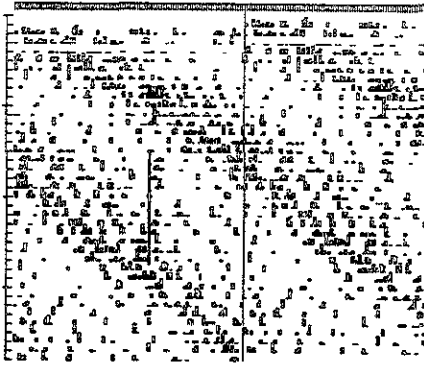
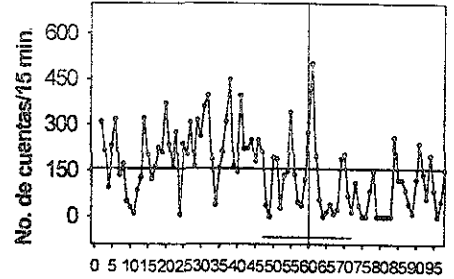


Figura 19. Actograma y perfil de actividad (A) de un animal al cual se le administró adrenalina. En el actograma y en el perfil de actividad la línea vertical indica la hora de administración, en éste último la línea horizontal indica el promedio de actividad del animal en 24 hrs. Nótese el incremento de actividad tanto en ambas figuras antes de la llegada del estímulo como anticipación. En la gráfica B se representa el porcentaje de cambio en la respuesta ante la administración de adrenalina, el cero en el eje x (equivale únicamente 30 minutos) indica el momento de administración, el porcentaje de actividad con respecto al control aumenta antes de la administración.



A



B

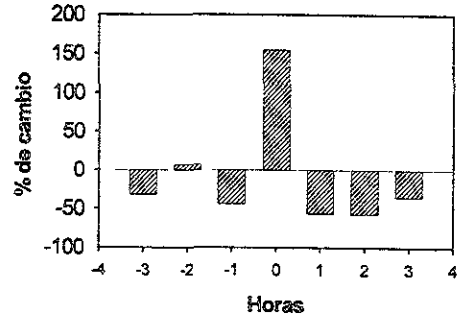
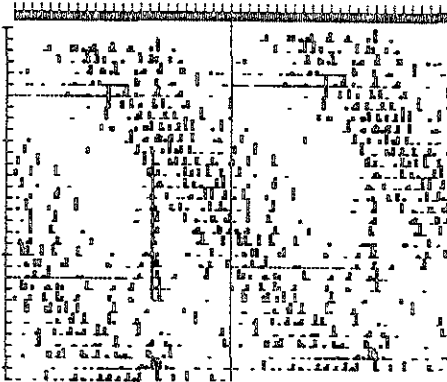
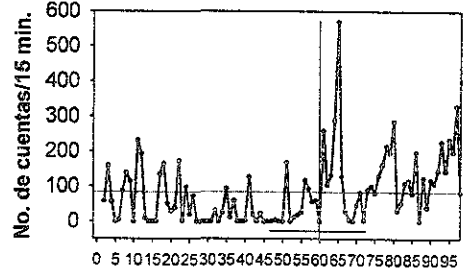


Figura 20. Actograma y perfil de actividad (A) de un animal manipulado en el área abdominal. En ambas figuras la línea vertical indica la hora de la manipulación; la línea horizontal en el perfil indica el promedio de actividad. En la gráfica B se representa el porcentaje de cambio ante la manipulación. La manipulación no parece modificar el ritmo ni la intensidad de la actividad. En algunos animales se observó un incremento de actividad como respuesta a la manipulación.



A



B

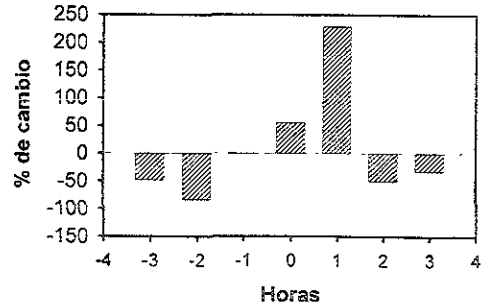


Figura 21. Actograma y perfil de actividad (A) de una rata a la cual se le administró como vehículo solución salina al 0.9 %. La línea vertical del actograma y de la gráfica indican la hora de administración de salina; la línea horizontal de la gráfica del perfil indica el promedio de actividad del animal. La gráfica B indica el porcentaje de cambio. Es evidente en las gráficas A y B un aumento de la actividad (200%) posterior a la inyección.

Para caracterizar los cambios de conducta periestímulo para cada manipulación experimental, se graficó el porcentaje de contribución a la actividad total del ciclo para la hora antes y la hora después de cada una de éstas. Estos valores se compararon con una prueba de Kruskal-Wallis por rangos.

En la condición de adrenalina, el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre la actividad 1 hora antes y 1 hora después de la administración, [$H(1, 32) = 15.3636$; $p < 0.0001$] indicando que es mayor la actividad antes de la administración de la adrenalina que después (Fig. 22).

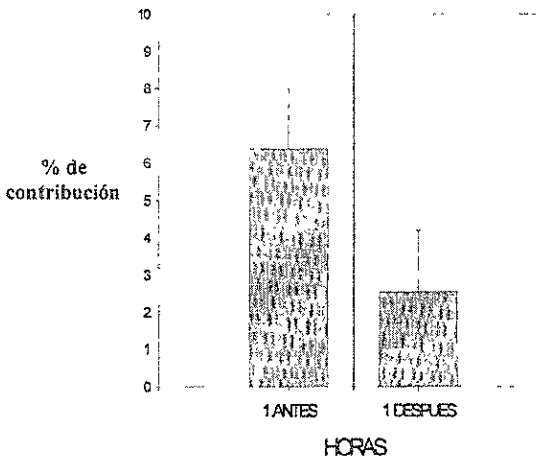


Figura 22. Porcentaje de contribución para la actividad del ciclo (\pm desviación estándar) de una hora antes y una hora después de la administración de adrenalina. La línea vertical entre las dos barras indica el momento de la administración. Existe una mayor actividad antes de la administración. La diferencia entre la respuesta antes y después de la adrenalina es estadísticamente significativa con una $p < 0.0001$.

Con este tipo de análisis se hizo evidente el efecto inhibitorio de actividad (ingestión de agua) producido por la administración de adrenalina, y en este caso comparando la actividad antes y después si se observó un efecto estadísticamente significativo. En esta gráfica no resultó tan evidente el aumento de actividad previo a la inyección de adrenalina debido a que se promediaron todos los sujetos experimentales independientemente del tipo de respuesta.

Para la manipulación el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre la actividad antes y después de que los animales fueran manipulados, [$H(1, 24) = .05333$; $p < 0.8173$] (Fig. 23).

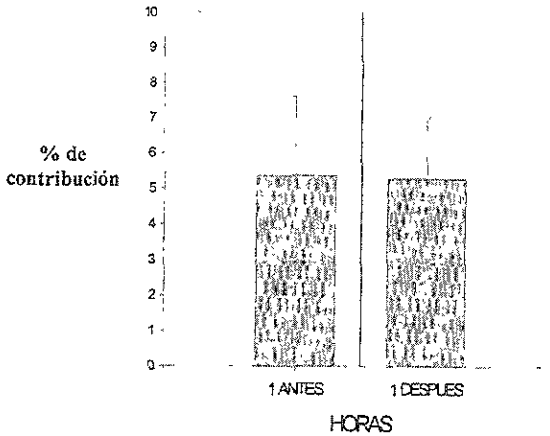


Figura 23. Porcentaje de contribución para la actividad del ciclo (\pm desviación estándar) de una hora antes y una hora después de animales manipulados. Con el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre la actividad antes y después de la manipulación ($p < 0.8173$). Con la manipulación los animales no presentaron actividad anticipatoria como sucede con la adrenalina.

La administración del vehículo produjo específicamente una respuesta de incremento de conducta. Se encontraron diferencias significativas entre la actividad antes y después de la administración de solución salina, [$H(1, 26) = 11.98$; $p < 0.0005$] mostrando mayor actividad después de la administración del vehículo. A diferencia de la adrenalina, los animales no anticipan sino que responden al estímulo (Fig. 24).

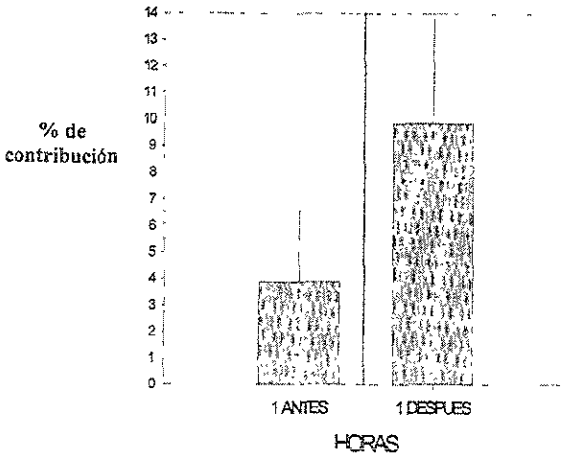


Figura 24. Porcentaje de contribución para la actividad del ciclo (\pm desviación estándar) de animales que recibieron solución salina al 0.9% como vehículo. En el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre la actividad antes y después de la administración del vehículo. ($p < 0.0005$). La respuesta de los animales al vehículo fue de gran intensidad pero posterior al mismo, a diferencia de la respuesta a la adrenalina, los animales no anticipan la llegada del estímulo, sino que responden a él.

6.1.3. Núcleo Supraquiasmático (NSQ).

Para determinar el efecto de la adrenalina, del vehículo y la manipulación sobre el NSQ, se obtuvo el periodo del ritmo circadiano de cada animal antes y después de cada fase experimental, así mismo los cambios de fase por alguno de los estímulos (Tabla 3-6).

Tabla 3. Periodos (τ) del ritmo circadiano antes y después de cada fase experimental.

SUJETO	MANIPULACION		ADRENALINA		VEHICULO	
	ANTES	(τ) DESPUES	ANTES	(τ) DESPUES	ANTES	(τ) DESPUES
33	24.52	24.51	24.51	---	---	---
34	---	---	24.57	24.49	24.49	24.52
35	25.09	25.10	25.10	24.59	---	---
36	24.48	24.52	24.52	24.40	24.40	24.31
37	---	---	24.49	24.49	24.49	24.49
38	25.02	25.02	25.02	24.54	24.54	24.55
39	24.41	24.43	24.53	24.41	24.41	24.46
40	24.54	24.56	24.56	24.47	24.47	24.42
41	24.54	24.56	24.56	25.02	25.02	24.56
42	24.69	24.59	24.59	24.51	24.51	24.44
43	24.69	24.53	24.53	24.57	24.57	24.49
44	24.92	25.02	25.02	25.00	25.00	25.00
45	24.59	24.48	24.48	24.41	24.41	24.41
46	24.28	24.41	24.41	24.43	24.43	---
47	24.55	24.52	24.52	24.47	24.47	24.44
48	24.55	24.45	24.45	24.45	24.45	24.54
\bar{x}	24.63	24.62	24.61	24.55	24.54	24.51
DS	± 0.23	± 0.23	± 0.21	± 0.19	± 0.20	± 0.16

El efecto de la adrenalina sobre el periodo del ritmo se analizó con un ajuste de líneas en CT12 y por un periodograma con el sistema DiSPAC. En 10 de los 16 animales el periodo es menor después de la administración de la adrenalina, el ANOVA de una vía demostró que los cambios no fueron significativos [$F(1,28)=0.403$; $p<0.3480$]. Así mismo los resultados de los periodos antes y después de la manipulación y del vehículo no muestran un cambio significativo estadísticamente que argumente algún efecto sobre el NSQ con un nivel de probabilidad de $p<0.9548$ y de $p<0.5336$ respectivamente.

Para los cambios de fase se hicieron los mismos ajustes de líneas en CT12 que se hicieron para determinar el periodo, antes y después del estímulo. La administración de adrenalina sí mostró cambios de fase estadísticamente significativos en 10 de los 13 sujetos [$p<0.01$ (gl: 1, $\chi^2=8.38$)] (Tabla 4). Todos los cambios fueron retrasos de entre 1 y 3 horas, predominando estos últimos.

Los cambios de fase se mostraron tanto si el animal se encontraba en la fase de actividad como en la fase de reposo, lo cual indica que el cambio de fase inducido por la administración de adrenalina no es dependiente de la fase circadiana en que se encuentre el animal (Fig. 25).

Tabla 4. Cambios de fase en el ritmo circadiano en libre curso por la administración de adrenalina (12.5 µg). La CT indica la hora circádica en que se encontraba cada animal al momento de retirar el estímulo (S/C = sin cambio). *Estos sujetos se eliminaron del análisis por deterioro del ritmo circadiano

Nº SUJETO	CT	DIRECCION	MAGNITUD
33	--	--	--
34	CT22	RETRASO	3 HORAS
35	--	--	--
36	--	--	--
37	CT10	RETRASO	3 HORAS
38	CT4	RETRASO	3 HORAS
39	CT17	RETRASO	1 HORA
40	CT11	RETRASO	3 HORAS
41	CT5	RETRASO	3 HORAS
42	CT11	RETRASO	3 HORAS
43	CT13	RETRASO	3 HORAS
44	CT17	S/C	--
45	CT22	RETRASO	1 HORA
46	CT5	S/C	--
47	CT20	S/C	--
48	CT18	RETRASO	2 HORAS

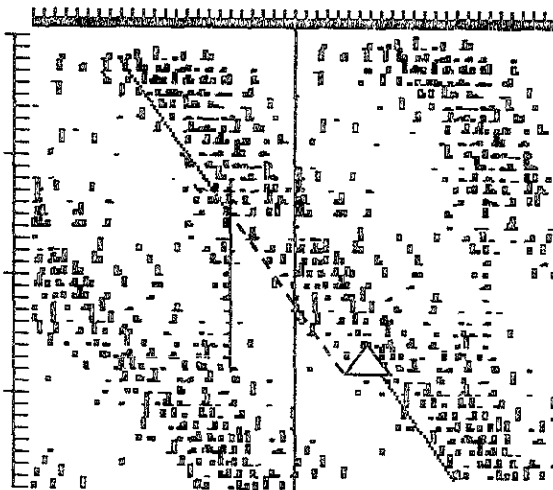


Figura 25. Actograma del ritmo circadiano en libre curso de la ingestión de agua. Las líneas ajustan el inicio de la fase de actividad antes, durante y después de la administración de adrenalina, nótese que la fase después de la administración, tiene un retraso de 3 horas. La línea punteada representa el inicio de actividad durante la hora de administración del fármaco. El triángulo blanco indica el cambio de fase después de retirar el estímulo (adrenalina)

La manipulación no produjo cambios de fase (Tabla 5), así mismo con la administración de vehículo sólo 2 sujetos mostraron un retraso de fase de una y dos horas (Tabla 6), estos retrasos ocurrieron cuando los animales se encontraban a la mitad de su fase de actividad. Los cambios de fase parecen indicar que la adrenalina posiblemente tenga un efecto sobre el núcleo NSQ, que no se observan por manipulación ni vehículo.

Tabla 5. Efectos sobre la fase del ritmo circadiano en libre curso por la manipulación

Nº SUJETO	CT	DIRECCION	MAGNITUD
33	CT8	S/C	--
34	CT23	S/C	--
35	CT20	S/C	--
36*	--	--	--
37	CT8	S/C	--
38	CT9	S/C	--
39	CT12	S/C	--
40	CT10	S/C	--
41	CT8	S/C	--
42	CT8	S/C	--
43	CT7	S/C	--
44	CT12	S/C	--
45	CT11	S/C	--
46	CT19	S/C	--
47	CT12	S/C	--
48	CT10	S/C	--

Tabla 6. Cambios de fase inducidos por la administración de solución salina al 0.9%.

Nº SUJETO	CT	DIRECCION	MAGNITUD
33*	--	--	--
34	CT5	S/C	--
35*	--	--	--
36*	--	--	--
37	CT16	RETRASO	2 HORAS
38	CT12	S/C	--
39	CT15	S/C	--
40	CT18	S/C	--
41	CT8	S/C	--
42	CT19	S/C	--
43	CT13	RETRASO	1 HORA
44	CT0	S/C	--
45	CT9	S/C	--
46*	--	--	--
47	CT6	S/C	--
48	CT0	S/C	--

6.2. Experimento 2.

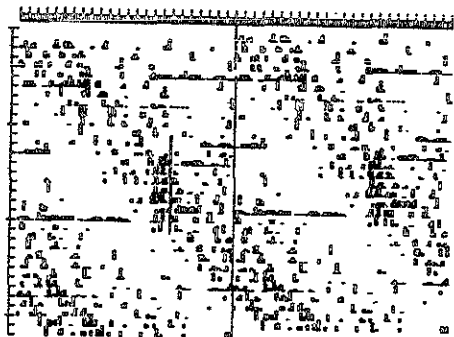
6.2.1. Oscilador sincronizado por alimento (OSA).

El objetivo del experimento 2 era evaluar si la experiencia previa determinaba el efecto de la adrenalina; si el orden de administración influye sobre la conducta de anticipación, el periodo y la fase del ritmo (Tabla 7).

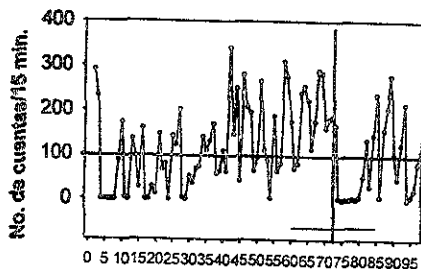
Tabla 7. Categoría de respuestas ante la administración de adrenalina. El grupo 1 representa el grupo de animales que recibió la administración en la primera parte del diseño contrabalanceado, el grupo 2 recibió la administración en la segunda parte.

RESPUESTA	GRUPO 1 (Nº de animales)	GRUPO 2 (Nº de animales)
Anticipación	3	5
Respuesta	4	2
Sin Respuesta	—	1

Los resultados obtenidos muestran que se presenta actividad de anticipación tanto en el grupo 1 como en el grupo 2. Los animales no responden de acuerdo a la experiencia previa, sino aun efecto específico de cada manipulación (adrenalina, vehículo) (Figs. 26 y 27).



A



B

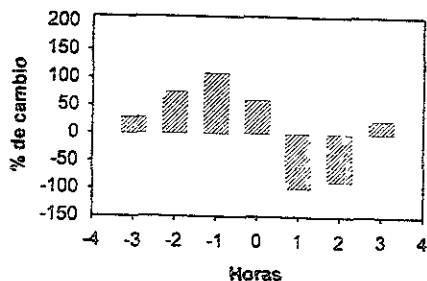
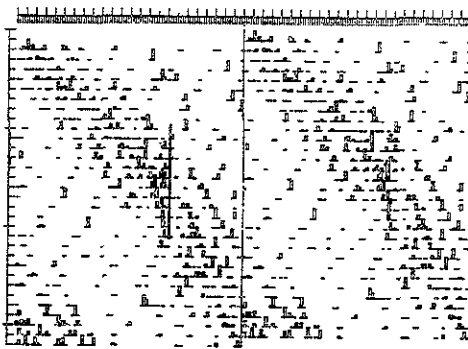
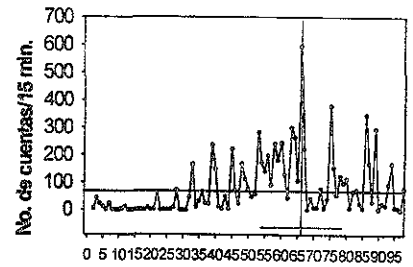


Figura 26. actograma de un animal del grupo 1 en el estudio contrabalanceado el cual recibió administración de adrenalina cada 24 horas. La línea vertical indica la hora de administración, nótese que existe un incremento de conducta previo al estímulo. En el perfil de actividad (A), la línea vertical indica el momento de la administración, la línea horizontal representa el promedio de actividad. La gráfica B indica el porcentaje de cambio ante el estímulo, el 0 representa la hora de administración, una hora antes la actividad aumentó 100%.



A



B

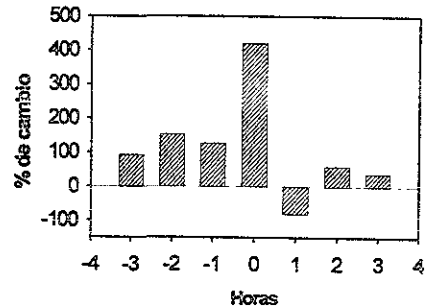


Figura 27. El actograma representa la actividad en libre curso de un animal del grupo 2 en el diseño contrabalanceado con administración de adrenalina. La línea vertical indica la hora de administración, la actividad antes del estímulo aumenta como una respuesta de anticipación. En la gráfica A se representa el perfil de actividad, la línea vertical indica la hora de administración de adrenalina, la línea horizontal indica el promedio de actividad del animal. En la gráfica B se observa el porcentaje de cambio antes y después de la administración, desde tres horas antes la actividad aumentó en promedio más del 100 % con respecto al promedio de actividad.

Para verificar si existen diferencias significativas entre los dos grupos a la administración de adrenalina se hizo un análisis estadístico con un ANOVA de una vía, en el cual se comparó la actividad 1 hora y 2 horas antes entre los dos grupos. Los resultados de la comparación de 1 hora antes no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos [$H(1,13)=0.08$; $p<0.7744$]. Para la comparación entre los grupos de dos horas antes, tampoco se encontraron diferencias significativas [$H(1,13)=0.067$; $p<0.7986$].

Así mismo se hicieron comparaciones estadísticas entre los dos grupos con respecto a la administración del vehículo, los resultados indicaron que no existen diferencias significativas entre la actividad de los grupos 1 hora antes [$H(1,13)=0.752$; $p<0.4014$] y dos horas antes [$H(1,13)=0.021$; $p<0.8857$]. Con estos resultados podemos afirmar que el orden de administración no determina la respuesta de cada animal ante la administración de adrenalina. La conducta de anticipación es específica a la adrenalina y no se debe a la experiencia previa.

6.2.2. Núcleo *Supraquiasmático (NSQ)*.

Al igual que en el experimento 1 se determinaron los efectos de la adrenalina y vehículo sobre el periodo del ritmo circadiano y los cambios de fase de cada animal. Los animales del canal 33 al 39 recibieron primero la administración de adrenalina y posteriormente el vehículo. Los animales de los canales 41 al 48 recibieron el tratamiento a la inversa (Tablas 8-10)

Tabla 8. Periodos (τ) del ritmo circadiano antes y después de la administración de adrenalina y vehículo.

SUJETO NUMERO	ADRENALINA		VEHICULO	
	ANTES (τ)	DESPUES	ANTES (τ)	DESPUES
33	24.64	24.92	25.14	24.64
34	24.69	24.69	25.42	24.69
35	24.69	25.14	24.92	24.69
36	24.69	24.41	24.69	24.69
37	25.14	25.64	25.14	25.14
38	25.14	25.42	25.14	25.14
39	24.92	24.75	24.92	24.92
40*	---	---	---	---
41	24.92	25.14	25.14	24.92
42	25.14	24.91	24.91	24.92
43	24.92	24.19	24.19	24.68
44	24.92	24.92	24.92	24.92
45	24.92	24.92	24.92	24.69
46	24.92	24.92	24.92	25.14
47	24.92	24.69	24.69	24.69
48	24.69	24.41	24.41	24.41
\bar{x}	24.88	24.87	24.89	24.81
DS	± 0.17	± 0.37	± 0.30	± 0.21

*El animal número 40 murió los primeros 5 días del experimento (no fue considerado en los resultados).

Tabla 9. Cambios de fase en el ritmo circadiano en libre curso por la administración de adrenalina (12.5 µg). La CT indica la hora circádica en la que se encontraba el animal al momento de retirar el estímulo.

Nº SUJETO	CT	DIRECCION	MAGNITUD
33	CT2	RETRASO	3 HORAS
34	CT4	RETRASO	2 HORAS
35	CT11	RETRASO	2 HORAS
36	CT4	S/C	--
37	CT12	RETRASO	3 HORAS
38	CT5	RETRASO	2 HORAS
39	CT20	RETRASO	1 HORA
40*	--	--	--
41	CT15	S/C	--
42	CT1	S/C	--
43	CT12	RETRASO	3 HORAS
44	CT15	RETRASO	3 HORAS
45	CT14	RETRASO	3 HORAS
46	CT11	RETRASO	3 HORAS
47	CT12	RETRASO	3 HORAS
48	CT18	RETRASO	3 HORAS

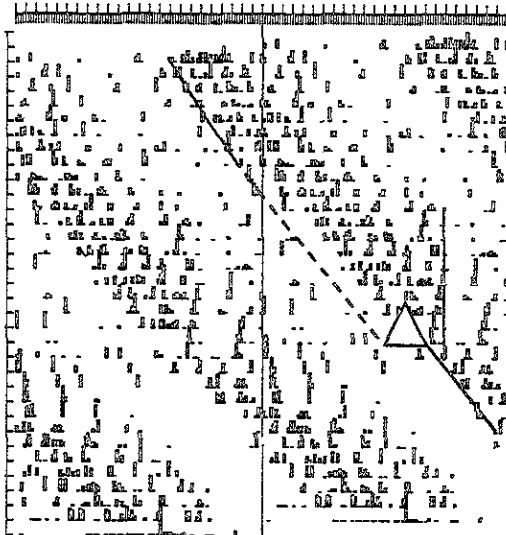


Figura 28. Actograma del ritmo circadiano de una rata en libre curso de la ingestión de agua. Las líneas ajustan el inicio de la fase (CT12) antes y después de la administración de adrenalina, la línea vertical indica la hora de administración, después de la línea puntuada (durante la administración de adrenalina) el cambio de fase se representa con el triángulo blanco y es de 2 horas.

Tabla 10. Cambios de fase en el ritmo circadiano en libre curso por la administración de vehículo (solución salina al 0.9%). La CT indica la hora circádica en que se encontraba cada animal al momento de retirar el estímulo (S/C = sin cambio).

Nº SUJETO	CT	DIRECCION	MAGNITUD
33	CT3	S/C	--
34	CT23	S/C	--
35	CT7	S/C	--
36	CT19	S/C	--
37	CT15	S/C	--
38	CT23	S/C	--
39	CT8	S/C	--
40*	--	--	--
41	CT23	S/C	--
42	CT3	S/C	--
43	CT23	S/C	--
44	CT22	S/C	--
45	CT16	S/C	--
46	CT17	S/C	--
47	CT23	S/C	--
48	CT23	S/C	--

La adrenalina no generó cambios en el periodo en ninguno de los animales, estadísticamente significativos [$H(1,28)=0.013$; $p<0.9071$]. El periodo se determinó con un ajuste de líneas en CT12 y por un periodograma con el sistema DiSPAC, el análisis estadístico se hizo con un ANOVA de una vía, comparando el periodo antes contra el periodo después de la administración de adrenalina al igual que en el experimento 1.

Los cambios de fase después de la administración de adrenalina se encontraron en 12 de los 15 animales (80%), todos los cambios fueron retrasos de fase de entre 1 y 3 horas y se presentaron independientemente de la fase en que incidiera el estímulo sobre el ciclo de cada sujeto (*Tabla 9- Fig. 28*). La administración de vehículo no produjo cambios de fase en el ritmo circadiano en libre curso (*Tabla 10*).

Los efectos observados de la adrenalina y del vehículo no variaron en relación al orden en que se administraron. En los dos grupos (canales 33-39 vs. canales 41-48) no se observaron cambios de periodo estadísticamente significativos con ambas manipulaciones (adrenalina, vehículo). Por otro lado el número de animales que mostraron cambios de fase con la adrenalina fue igual entre ambos grupos [$p<0.01$ (gl:1, $\chi^2=8.38$)].

6.3. Experimento 3.

6.3.1. Oscilador sincronizado por alimento (OSA).

En el experimento 3 se analizaron los perfiles de actividad de cada animal y los actogramas de acuerdo a las dosis correspondientes. Posteriormente se obtuvo un promedio de los animales por grupo (dosis administrada) y se obtuvieron las gráficas del perfil de actividad en promedio de cada dosis, así como el porcentaje de cambio. La conducta de anticipación se observó con diferencias en la intensidad para cada dosis (Figs. 29-33).

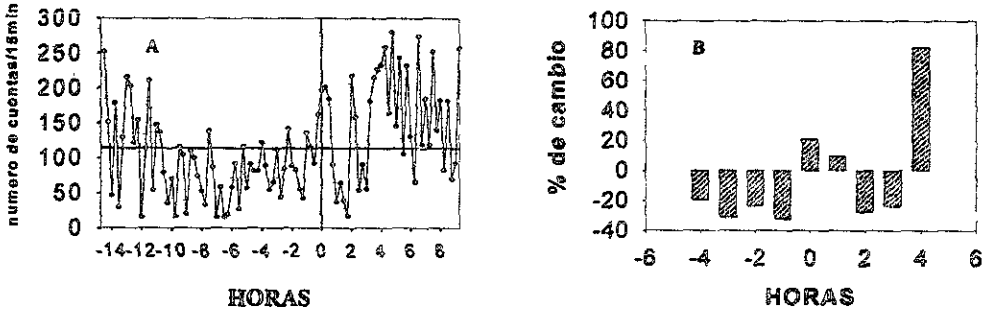


Figura 29. Promedio del perfil de actividad de los animales con dosis de 3.12 µg. En la gráfica A la línea vertical indica la hora de administración y la línea horizontal indica el promedio de actividad. En la gráfica B (% de cambio) el cero en el eje x representa la hora de administración. Cada barra representa el porcentaje de cambio por hora.

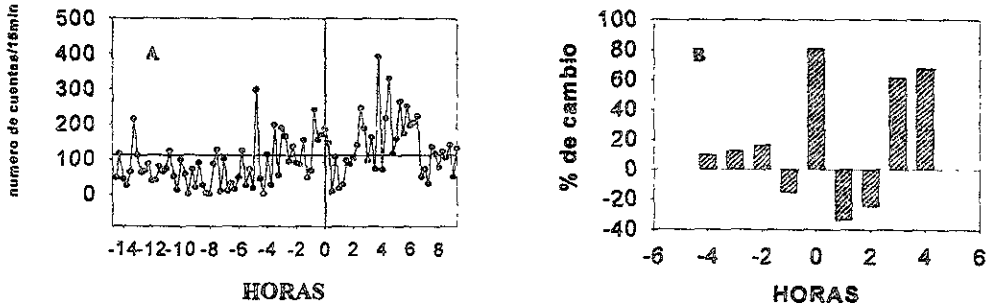


Figura 30. Perfil de actividad (A) y porcentaje de cambio (B) de animales con dosis de 6.25 µg. En la gráfica A la línea vertical representa el momento de la administración, en la gráfica B se representa con el cero.

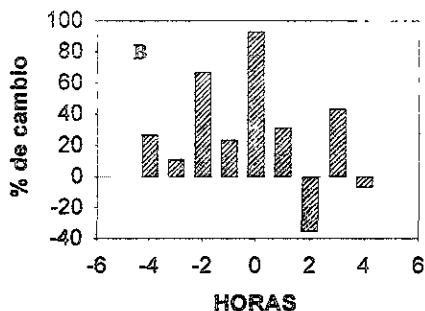
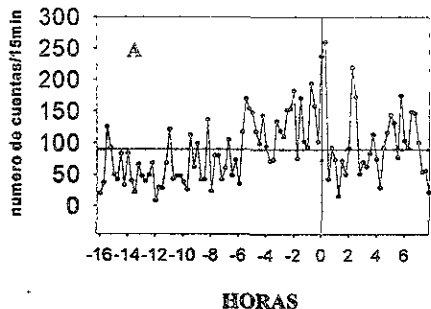


Figura 31. Perfil de actividad y porcentaje de cambio de animales con dosis de 12.5 µg. (tomados del experimento 2). La actividad de anticipación se presenta desde 4 horas antes de la administración de adrenalina, teniendo su mayor incremento 2 horas antes. En la gráfica A la línea vertical indica la hora de administración, en la gráfica B se representa con el cero (eje x).

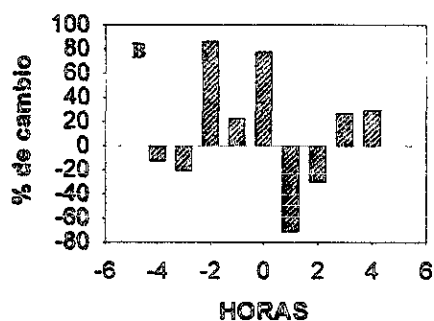
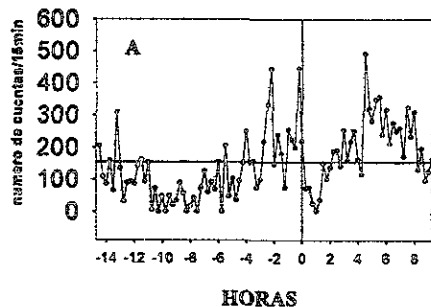


Figura 32. Los animales con dosis de 25 µg. presentaron un aumento en su actividad arriba del promedio desde 1 y 2 horas antes de la administración de adrenalina, teniendo el mayor aumento dos horas antes. Tanto en la gráfica A como en la gráfica B se puede observar dicho incremento.

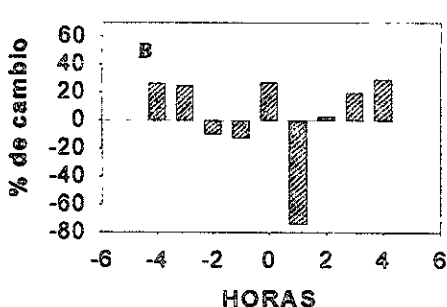
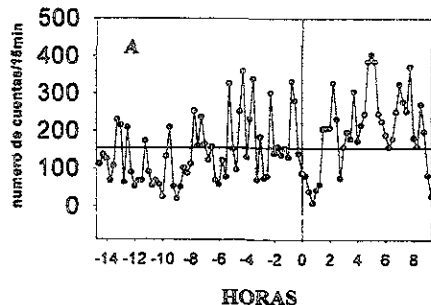


Figura 33. Perfil de actividad (A) y porcentaje de cambio (B) de animales con dosis de 50 µg. En la gráfica A se puede observar que antes de la administración la actividad incrementa 4 horas antes, mientras que en la gráfica B los promedios de cada hora indican que la activación conductual no ocurrió una y dos horas antes de la administración.

La actividad anticipatoria se encontró con mayor intensidad en los grupos de animales con dosis de 12.5 μg y 25 μg . En el grupo de animales de la dosis más baja (3.12 μg ; *figura 29*) la actividad de anticipación es mínima. Se presentó un pequeño aumento 1 hora antes en la gráfica A, mientras que en la gráfica B el promedio de actividad por hora no mostró ningún aumento en la actividad por arriba del promedio como respuesta anticipatoria.

En los grupos de 6.25 μg , 12.5 μg y 25 μg que fueron los grupos donde se encontró claramente el aumento de actividad antes de la administración de adrenalina, el incremento mayor fue 2 horas antes del estímulo, dicho incremento se puede observar tanto en la gráfica A como en la gráfica B de cada figura (*Fig. 30-32*) Por otro lado en el grupo de animales de la dosis de 50 μg la actividad de anticipación se puede observar en la gráfica A 1 hora antes del estímulo, mientras que en la gráfica B, el promedio de la actividad por horas, no muestra dicho incremento (*Fig. 33*).

Para evaluar las diferencias entre los 5 grupos con respecto a la actividad de anticipación, y caracterizar la curva dosis-respuesta del efecto de la adrenalina sobre la conducta de anticipación, se graficaron los porcentajes de cambio de 1 y 2 horas antes de la administración de adrenalina de cada grupo de acuerdo al promedio de actividad de cada uno (*Fig. 34*).

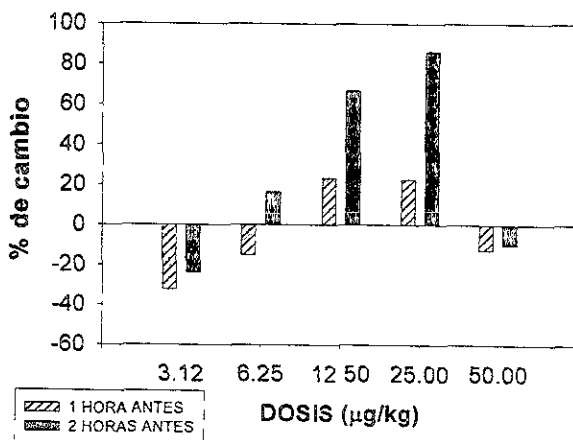


Figura 34. Porcentaje de cambio con respecto a la actividad media 1 y 2 horas antes de la administración de adrenalina en los 5 grupos de animales con diferentes dosis (3.12 μg , 6.25 μg , 12.5 μg , 25 μg , y 50 μg).

En la figura 34 se observa que el porcentaje de cambio aumentó progresivamente de acuerdo a la dosis de adrenalina administrada. La dosis de 3.12 μg fue inefectiva para generar actividad anticipatoria. En el grupo de animales de dosis de 6.25 μg 2 horas antes también se presenta un incremento del 18%, la actividad 1 hora antes presenta un cambio negativo que no implica actividad de anticipación.

El aumento de actividad antes de la administración de adrenalina se presentó con mayor intensidad 2 horas antes de la administración y en las dosis de 12.5 μg y 25 μg . El porcentaje de cambio fue mayor en estos grupos 2 horas antes de la administración de adrenalina, Este cambio fue de más del 60% y 80% respectivamente. Para el porcentaje de 1 hora antes de estos grupos, el cambio fue de más del 20%.

En el caso de la dosis de 50 μg el efecto fue inefectivo con respecto al porcentaje de cambio, se esperaba que por ser la dosis más alta generaría mayor actividad de anticipación, pero se encontró lo contrario. Al parecer la dosis de 50 μg es una dosis demasiado alta que no genera actividad de anticipación.

Los resultados del ANOVA de la comparación entre los 5 grupos de 1 hora antes no mostraron diferencias significativas con respecto a la actividad de anticipación [$H(1,13)=2.69$; $p<0.0778$]. La comparación de la actividad 2 horas antes tampoco mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de dosis [$H(1,13)=2.25$; $p<0.1186$].

6.3.2. Núcleo Supraquiasmático (NSO).

En el experimento tres se evaluaron los cambios de periodo y de fase de cada animal de acuerdo a la dosis de adrenalina administrada (Tablas 11 y 12). Los cambios de periodo antes y después de la administración de adrenalina y para las diferentes dosis se analizaron estadísticamente con un ANOVA de dos vías (periodo por dosis). Para el factor periodo no se encontraron diferencias significativas entre estos [$H(1,26)=0.1858$; $p<0.6699$]. En el segundo factor (dosis), el análisis tampoco encontró diferencias significativas entre estos [$H(4,26)=0.5097$; $p<0.7290$]. La interacción de ambos factores tampoco mostró diferencias significativas [$H(4,26)=0.1562$; $p<0.9584$].

Tabla 11. Periodos del ritmo circadiano antes y después de la administración de adrenalina ante diferentes dosis.

SUJETO	DOSIS	PERIODO (τ)	PERIODO (τ)
NUMERO	ADRENALINA	ANTES	DESPUES
33	50 μ g/100g	24.41	24.69
34	50 μ g/100g	25.14	24.69
37	50 μ g/100g	24.92	24.92
38	50 μ g/100g	24.47	24.47
39	25 μ g/100g	24.92	24.69
40	25 μ g/100g	24.19	24.41
41	25 μ g/100g	24.69	24.92
42	25 μ g/100g	24.41	24.69
41*	12.5 μ g/100g	24.92	25.14
42*	12.5 μ g/100g	25.14	24.91
43*	12.5 μ g/100g	24.92	24.19
44*	12.5 μ g/100g	24.92	24.92
44	6.25 μ g/100g	24.69	24.41
45	6.25 μ g/100g	24.75	24.75
46	6.25 μ g/100g	24.69	24.69
48	6.25 μ g/100g	24.19	24.41
106	3.12 μ g/100g	24.92	24.69
107	3.12 μ g/100g	24.41	---
109	3.12 μ g/100g	24.41	24.69
111 \circ	3.12 μ g/100g	---	---
	\bar{x}	24.69	24.68
	DS	± 0.29	± 0.23

* Los animales de la dosis de 12.5 μ g/100g fueron tomados del grupo de animales del experimento 2 aleatoriamente. \circ Este animal se eliminó antes de finalizar el experimento y no fue considerado en el análisis de los resultados.

Los cambios de fase que se presentaron en el experimento 3 fueron estadísticamente significativos [$p < 0.01$ (gl:1, $\chi^2 = 12.68$). Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dosis de adrenalina administrada con respecto al cambio de fase, [$p < 0.01$ (gl:1, $\chi^2 = 1.08$) lo que indica que el cambio de fase no depende de la dosis de adrenalina, con cualquier dosis se pueden presentar cambios de fase. En las dosis de 25 y 50 μg y prevalecieron los adelantos de fase, mientras que los retrasos en las dosis más bajas.

Los adelantos y los retrasos de fase no fueron dependientes de la fase al momento de la administración, por lo tanto la dirección del cambio no depende de la CT en que se encuentre el animal. Así mismo la dirección tampoco dependió de la dosis administrada, ya que se encontraron adelantos de fase en animales con dosis de 6.25 μg (Tabla 12- Fig. 35).

Tabla 12. Cambios de fase en el ritmo circadiano en libre curso con diferentes dosis de adrenalina. (3.12 μg , 6.25 μg , 12.5 μg , 25 μg y 50 μg). La CT indica la hora circádica en que se encontraba cada animal al momento de retirar el estímulo.

Nº SUJETO	DOSIS μg	CT	DIRECCION	MAGNITUD
33	50	CT16	S/C	--
34	50	CT7	ADELANTO	2 HORAS
37	50	CT8	ADELANTO	2 HORAS
38	50	CT15	ADELANTO	1.5 HORAS
39	25	CT8	ADELANTO	3 HORAS
40	25	CT15	ADELANTO	20 MIN
41	25	CT11	ADELANTO	2 HORAS
42	25	CT10	RETRASO	2 HORAS
41*	12.5	CT5	RETRASO	3 HORAS
42*	12.5	CT11	RETRASO	3 HORAS
43*	12.5	CT13	RETRASO	3 HORAS
44*	12.5	CT17	S/C	--
44	6.25	CT13	ADELANTO	3 HORAS
45	6.25	CT6	S/C	--
46	6.25	CT8	RETRASO	3 HORAS
48	6.25	CT16	ADELANTO	2 HORAS
106	3.12	CT5	S/C	--
107	3.12	CT1	RETRASO	3 HORAS
109	3.12	CT10	RETRASO	3 HORAS
111*	3.12	--	--	--

* Los animales de la dosis de 12.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ fueron tomados del grupo de animales del experimento 2 aleatoriamente. * Este animal se eliminó antes de finalizar el experimento y no fue considerado en el análisis de los resultados.

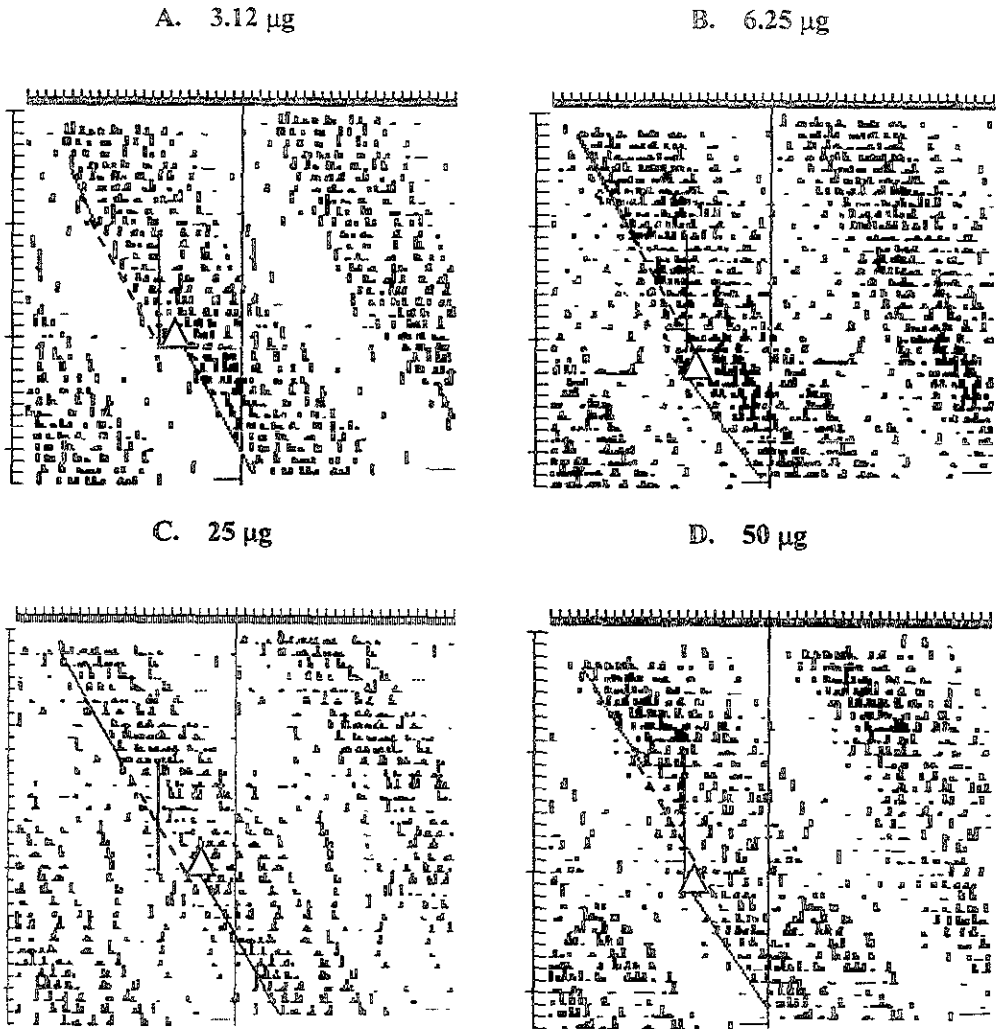


Figura 35. Los cuatro actogramas representan los cambios de fase inducidos por la administración de adrenalina a diferentes dosis. El actograma A representa un retraso de fase de 3 horas de un animal con una dosis de 3.12 μg de adrenalina. El actograma B es un adelanto de fase de 2 horas de un animal con dosis de 6.25 μg . El actograma C (25 μg) y D (50 μg) representan un retraso y un adelanto de fase de dos horas respectivamente. Las líneas inclinadas ajustan el inicio de actividad (CT12) de cada animal antes y después de la administración de adrenalina. La línea punteada representa el momento de la administración y el cambio de fase se indica con el triángulo.

7. DISCUSIÓN.

Con el experimento 1, se determinó que la administración de adrenalina intraperitoneal diariamente y a la misma hora produjo en la mitad de los animales un componente de activación conductual previo a la inyección similar a la conducta de anticipación al alimento. Este componente sólo se presentó cuando coincidió la inyección de adrenalina con la fase de activación del animal. En los casos en que coincidió la inyección con la fase de reposo se observó una activación como respuesta a la inyección, pero no se observó la anticipación.

Por otro lado se observó un efecto inhibitorio durante la primera hora posterior a la administración de adrenalina, que fue consistente en todos los animales independientemente del tipo de respuesta asociada a la inyección.

La expresión de anticipación observada previa a la inyección de adrenalina es muy similar a la que se observa bajo condiciones de sincronización por restricción de alimento. La relación temporal entre la administración de adrenalina y la anticipación sugieren que esta hormona pudiera estar involucrada en los procesos de sincronización del oscilador de alimento. Si la activación conductual hubiera aparecido como respuesta a la administración se hubiera concluido que la adrenalina fuera la señal para la activación del animal, sin embargo, los datos obtenidos mostraron que la activación se presenta antes de la administración indicando la presencia de un sistema de estimación del tiempo, que responde a señales diarias de adrenalina.

La inhibición conductual observada por la administración de adrenalina es consistente con trabajos previos en los cuales se ha demostrado que la administración de adrenalina inhibe la ingestión de agua y alimento (Russek y cols. 1991; Hinton y cols. 1987). Se ha discutido en estos estudios que la inhibición puede deberse a un efecto de las catecolaminas sobre el hígado, equivalente a una respuesta de saciedad, aunque también se ha considerado la posibilidad de que el malestar abdominal generado por la adrenalina produzca respuestas incompatibles con la ingestión de alimento y agua.

Se ha propuesto que la señal interna de sincronización al oscilador del alimento debe ser de índole humoral, ya que la deafferentación periférica no parece modificar la sincronización por alimento (Davidson, A. y Stephan, F., 1998). En especial se ha enfocado la atención sobre cambios humorales que se desencadenan por la ingestión de alimento y que pudieran señalar al sistema nervioso la llegada de energéticos. Entre las hormonas que se han considerado como posibles señales endógenas de sincronización se encuentra la adrenalina, que de acuerdo con diversos estudios, aumenta como consecuencia de la ingestión de alimento y ejerce un efecto de saciedad (Russek y Racotta, 1980). Los resultados de este estudio sugieren la participación de la adrenalina como una señal de sincronización, aunque ésta pudiera participar en asociación con otros cambios humorales o metabólicos desencadenados por el alimento. Estudios futuros tendrán que diseñarse para comprobar esta relación.

La participación del hígado como componente de un oscilador asociado al alimento se ha empezado a considerar a partir de trabajos recientes que muestran una adaptación en el metabolismo hepático bajo condiciones de horarios restringidos de alimento. Se ha observado que durante las horas de anticipación al alimento, el hígado está encargado de los requerimientos energéticos asociados al ayuno, y simultáneamente está acumulando energéticos (ATP) como una respuesta anticipatoria al momento de la llegada de digerir alimento. Este proceso de preparación del hígado sugiere la existencia de un mecanismo de estimación del tiempo local (Díaz-Muñoz y cols. 2000).

Otro estudio reciente demostró que en preparaciones *in vitro*, el hígado muestra oscilaciones hasta por 7 días en la expresión del gen *per*. Este último experimento sugiere que el hígado es un oscilador atenuado (Yamazaki y cols. 2000).

Los efectos de la administración de adrenalina fueron muy distintos de los observados por administración de vehículo y manipulación, con lo cual se descartó la posibilidad de que los efectos observados fueran consecuencia del estrés de la manipulación o del piquete de la inyección. Por otro lado la comparación entre la hora antes y la hora después de la inyección o manipulación mostraron que cada condición experimental produjo respuestas distintas y específicas. La adrenalina produjo una activación de anticipación seguida de una reducción en la actividad, el vehículo no mostró un efecto sobre la actividad previa, pero mostró una intensa respuesta posterior a su administración y la manipulación no produjo cambios.

Por otro lado con la administración de adrenalina se producen cambios de fase (en específico retrasos) del componente conductual en libre curso. Estos cambios no mostraron una relación con la fase en que se encontraba el animal al momento de la inyección de adrenalina. En la mayoría de los animales este retraso fue de 3 horas. Este efecto sobre la fase se produjo exclusivamente por la administración y no por la inyección de vehículo o la manipulación.

No podemos afirmar que los cambios de fase ocurridos en el ritmo circadiano en libre curso por la administración de adrenalina, se deban a un efecto específico de la adrenalina sobre el NSQ, ya que no existen evidencias experimentales de la existencia de receptores adrenérgicos en dicho núcleo.

Aunque se ha mencionado que el NSQ es hasta ahora el único oscilador circadiano, se ha propuesto que otras estructuras en el sistema nervioso central (hipotálamo) y en la periferia (hígado) pueden tener la función de osciladores circadianos. En estudios en diferentes especies (mamíferos, reptiles, aves) se ha observado un fenómeno de partición del ritmo denominado *splitting* (partición) el cual consiste en una partición del componente de actividad en dos componentes rítmicos con diferente periodo cuando el sujeto se expone a luz continua (Aguilar-Roblero y Vega, 1993), lo cual sugiere de la existencia de otros osciladores.

En el caso de la sincronización por alimento, se ha demostrado que la restricción en la disponibilidad de alimento genera un componente de actividad circadiano independiente del NSQ, ya que lesiones de dicho núcleo no eliminan tal componente (Stephan y cols. 1979).

La hipótesis acerca de la existencia de otros osciladores y su integración con el NSQ, como un fenómeno de acoplamiento entre osciladores en el cual un oscilador con periodo y fase propios (NSQ) tiene la capacidad de ajustar fase y periodo a otros osciladores, puede ayudar a entender el efecto de la adrenalina sobre el NSQ.

El NSQ tiene aferencias de diversos núcleos por los cuales puede llegar información ya sea neuronal o visceral y puedan afectar al oscilador circadiano (NSQ). El PVT (núcleo paraventricular talámico) principalmente su porción anterior, tiene una vía directa hacia el NSQ (Moga y cols. 1995), esta proyección ha sido considerada como un componente de las vías de sincronización. El PVT recibe aferencias de núcleos del tallo cerebral como el núcleo parabraquial y el núcleo del tracto solitario, estas aferencias sugieren la posibilidad de una vía de sincronización visceral, hacia el NSQ. Posiblemente la administración de adrenalina intraperitoneal tenga un efecto sobre el hígado, el cual manda información a través del nervio vago hacia el núcleo del tracto solitario y hacia el núcleo parabraquial, y éste a su vez hacia el PVT, el cual puede afectar al NSQ.

Si se ha planteado que el hígado puede ser un oscilador (Yamazaki y cols. 2000), el efecto de la adrenalina al generar cambios de fase en el ritmo circadiano en libre curso el cual depende de la actividad del NSQ, probablemente se deba a un desacoplamiento de osciladores mediado por las vías indirectas que tiene el hígado sobre el NSQ.

Trabajos previos han probado la potencia de fármacos que modifican el estado de alertamiento del animal tales como el triazolam, que es una benzodiazepina (Turek y Losee-Olson, 1986), dichos fármacos han sido considerados como posibles sincronizadores de los ritmos circadianos regulados por el NSQ. Estos trabajos a diferencia del presente estudio han probado el efecto de estímulos únicos y no de sincronización repetida por varios ciclos. En general, han concluido que se pueden producir cambios de fase intensos por dicha estimulación y principalmente avances de fase (Turek y Losee-Olson, 1986). Efectos similares se han descrito también para la sincronización no-fótica por manipulación, cambio de caja y estrés (Mrosovsky, 1988; Edelstein y Amir, 1995), pero en contraste se evitan estos cambios por restricción de movimiento del animal (Van Reeth y Turek, 1989). Por estos hallazgos se ha concluido que la sincronización no-fótica del NSQ está mediada por la activación locomotora del animal que producen las benzodiazepinas o los procedimientos de manipulación.

Los datos obtenidos en este estudio apoyan parcialmente estudios previos, ya que los efectos de anticipación se observaron cuando coincidió el estímulo sincronizador con la fase de actividad del animal. En contraste, por administración de adrenalina se observaron predominantemente retrasos de fase. Por otro lado en este estudio el vehículo y la manipulación sola no fueron capaces de producir cambios en el componente en libre curso a diferencia de los estudios de Edelstein y Amir (1995).

Esto puede deberse al parámetro utilizado para evaluar la conducta, ya que para este estudio se utilizó la conducta de ingestión de agua, la cual no forzosamente refleja la activación general del animal, en contraste otros estudios se han basado en el registro de la actividad locomotora (Biello y Mrosovsky, 1993).

El efecto del vehículo sobre la fase no queda del todo claro en la literatura, ya que al respecto existe controversia; algunos grupos han reportado importantes cambios asociados a la inyección de vehículo sobre la conducta locomotora y la expresión de c-Fos (Hastings y cols. 1992; Mead y cols. 1992), mientras que otros grupos no reportan efecto alguno (Sumova y cols. 1994). Esta respuesta parece depender del estado de alertamiento del animal al momento de la inyección.

Los resultados del experimento 2 mostraron que los efectos observados para cada manipulación fueron consistentes y replicables y no cambiaron como efecto del orden en que se presentaron. Este experimento permitió confirmar el efecto específico de la adrenalina sobre los cambios de fase y la relación de la anticipación con la fase de actividad. Con estos resultados descartamos que las respuestas observadas por la administración de adrenalina, no se deben a la manipulación previa, sino que son respuestas específicas.

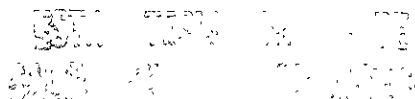
La dosis que se seleccionó para los 2 primeros experimentos (12.5 μg / 100 g de peso corporal) se reporta en la literatura como una dosis con efectos medianos cuando se administra como dosis única (Russek y cols.1991; Hinton y cols. 1987). Por tal razón, y considerando que para este estudio se contemplaban dosis repetidas, se seleccionó como dosis inicial. Una vez confirmada la efectividad de la adrenalina para producir anticipación, se decidió probar si esta propiedad era dosis dependiente.

En el experimento 3 se probaron dosis muy bajas e inefectivas de acuerdo a la literatura (Russek y cols. 1991; Hinton y cols. 1987) y dos dosis superiores, la última de ellas (50 μg / 100 g de peso corporal) con efectos muy potentes para inhibir la conducta de ingestión. Los resultados mostraron una tendencia fuerte a aumentar la anticipación en relación a la dosis empleada, aunque estadísticamente no se obtuvieron valores significativos. Es importante mencionar que cada grupo estuvo constituido por 4 animales y que posiblemente al aumentar el número de sujetos se enfaticen las diferencias entre grupos y se obtengan valores estadísticamente significativos. De acuerdo a estos datos preliminares las dosis óptimas para producir anticipación y por lo tanto para afectar al oscilador del alimento parecen ser las de 12.5 y 25 μg , mientras que la dosis de 50 μg mostró inhibir importantemente la actividad del animal, posiblemente por tratarse de una dosis muy alta. Estudios futuros tendrán que aumentar el número de sujetos por dosis para corroborar estadísticamente esta tendencia.

Hasta el momento, no ha sido posible establecer la identidad del oscilador asociado al alimento. Se ha propuesto que esté constituido por un asa de retroalimentación en la que participen estructuras centrales involucradas en la integración de balance energético, así como procesos periféricos involucrados en funciones digestivas y metabolismo (Escobar y cols. 1998) . Entre las estructuras posiblemente más involucradas con este paradigma se considera al hígado por su participación como integrador del metabolismo a nivel periférico. Ya hemos mencionado los trabajos de Yamazaki y cols. (2000) en el cual muestran la capacidad del hígado de oscilar por varios ciclos y los datos recientes de nuestro grupo que muestran actividad anticipatoria al alimento por procesos enzimáticos del hígado (Díaz-Muñoz y cols. 2000).

Los datos presentados en esta tesis apoyan la participación del hígado como posible constituyente del oscilador del alimento, ya que de acuerdo a Racotta y cols. (1986) las inyecciones intraperitoneales de adrenalina ejercen sus efectos selectivamente sobre el hígado produciendo respuestas de saciedad. El hígado a su vez señala cambios metabólicos hacia el SNC para que el organismo integre la llegada del alimento y la sensación de saciedad (Russek, 1971).

Estudios futuros habrán de complementar estos primeros resultados para determinar esta interacción de elementos periféricos en el oscilador del alimento.



8. CONCLUSIONES.

- La administración diaria de adrenalina genera actividad de anticipación en el ritmo circadiano conductual en libre curso de la rata, similar a la que se presenta en la sincronización por alimento. Dicha anticipación sólo se presenta cuando la administración de adrenalina coincide con la fase de actividad del animal. Cuando la administración coincide con la fase de reposo, la activación conductual se presenta como una respuesta a la adrenalina.
- La manipulación y el vehículo (solución salina al 0.9%) no generan actividad de anticipación como la adrenalina, lo que demuestra la especificidad de la adrenalina.
- La administración de adrenalina como estímulo no fótico, tiene un efecto sobre los ritmos en libre curso, generando cambios de fase (principalmente retrasos) en el ritmo circadiano conductual, dichos cambios no dependen de la fase en la cual se encuentre el animal al momento de la administración. Por otro lado la adrenalina no genera cambios en el periodo del ritmo circadiano.
- El orden de administración de la adrenalina no influye sobre la activación conductual como respuesta anticipatoria, lo que descarta posibles efectos de aprendizaje.
- La intensidad en la conducta de anticipación no depende de la dosis de adrenalina administrada; aunque las dosis de 3.12 μg y de 50 μg fueron inefectivas para generar la conducta de anticipación, la primera por ser una dosis pequeña y la segunda por ser una dosis muy alta. Las dosis de adrenalina con mayor efecto para generar actividad de anticipación fueron las de 12.5 μg y 25 μg .
- La adrenalina como señal interna pudiera participar en la sincronización por alimento al generar conducta de anticipación, esta anticipación posiblemente mediada por un efecto sobre el hígado (el cual participa como integrador de procesos metabólicos) produciendo una respuesta de saciedad similar a la que se presenta después de la ingestión de alimento.
- Los resultados aquí expuestos sugieren que la adrenalina es parte de un sistema de retroalimentación en el cual también participan otros procesos periféricos y procesos centrales relacionados con el balance energético que en conjunto forman parte del oscilador sincronizado por alimento.

9. REFERENCIAS.

- Aguilar-Roblero, R., García Fernández, F., Aguilar, R., Arankowsky-Sandoval, G. and Drucker-Colin, R. (1986). *Suprachiasmatic nucleus transplants functions as endogenous oscillator only in constant darkness*. Neuroscience Letters. 69:47-52.
- Aguilar-Roblero, R. (1993). *Teorías básicas de los ritmos biológicos*. Psiquis. 2 N° 6; 121-132.
- Aguilar-Roblero, R. and Vega-González A. (1993): *Splitting of locomotor circadian rhythmicity in hamsters is facilitated by pinealectomy*. Brain Res. 605: 229-236.
- Aguilar-Roblero, R. and Vega, A. (1993). *Signal analysis in chronobiology*. Presentado en 5to. Meeting. Society for Research on Biological Rhythms. Amelia Island, Jacksonville Florida.
- Aguilar-Roblero, R., Morin, L. and Moore, R.Y. (1994). *Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters*. Experimental Neurology. 130; 250-260.
- Aguilar-Roblero, R., Escobar, C., Torner, C., Granados, D., Salazar, A. y Caldeas, I. (1997). *Mecanismos generales de regulación fisiológica: acoplamiento de sistemas de oscilación*. Curso internacional precongreso en actualización en fisiología. Presentado en el XL congreso nacional de ciencias fisiológicas, Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. 241-254.
- Amir, S., Cain, S., Sullivan, J., Robinson, B. and Stewart, J. (1999). *Olfactory stimulation enhances light-induced phase shifts in free-running activity rhythms and Fos expression in the suprachiasmatic nucleus*. Neuroscience. 92. N. 4; 1165-1170.
- Aschoff, J. (1981). *Freerunning and entrained circadian rhythms*. Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4: Biological Rhythms. (Jurgen Aschoff, Ed.) New York: Plenum Press. 81-93.
- Aschoff, J. and Tokura, H. (1986). *Circadian activity rhythms in squirrel monkeys: entrainment by temperature cycles*. Journal of Biological Rhythms. 1; 91-99.
- Aschoff, J. (1988). *Masking of circadian rhythms by zeitgebers as opposed to entrainment*. En Hekkens JM, Gakerkhof y WJ Rietveld. Trends in Chronobiology. Pergamon Press, Oxford, New York, pp. 149-161.
- Biello, S. M. and Mrosovsky, N. (1993). *Circadian phase-shift induced by chlordiazepoxide without increased locomotor activity*. Brain Res. 622; 58-62.
- Bray, G.A. (1991). *Reciprocal relation between the sympathetic nervous system and food intake*. Brain Research Bulletin. Vol.27: 517-520.

- Card, J.P. and Moore, R.Y. (1989). *Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat*. Journal of Comp. Neurol. 284; 135-147.
- Comperatore, C. and Stephan, F.K. (1987). *Entrainment of duodenal activity to periodic feeding*. Journal of Biological Rhythms. 2: 227-242.
- Davidson, J. A. and Stephan F. K. (1998). *Circadian food anticipation persists in capsaicin deafferented rats*. Journal of Biological Rhythms. 13. N.5; 422-429.
- Davidson, J. A. and Stephan F. K. (1999). *Plasma glucagon, glucose, insulin and motilin in rats anticipating daily meals*. Physiology and Behavior. 66. N.2: 309-315.
- Davidson, J. A., Cappendijk, S. and Stephan, F. (2000). *Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats*. American Journal of Physiology. Regulatory Integrative Comp. Physiol. 278; R1296-R1304.
- De Boer S.F. and Van Der Gugten, (1986). *Daily variations in plasma noradrenaline, adrenaline and corticosterone concentrations in rats*. Physiology and Behavior. 40: 323-328.
- De Boer S.F., Koopmans, S.J., Slangen J.L. and Van Der Gugten. (1989). *Effects of fasting on plasma catecholamine, corticosterone and glucose concentrations under basal and stress conditions in individual rats*. Physiology and Behavior. 45: 989-994.
- Delgado García, J.M., Grau, C., De Freudis, P., Del Pozo, F., Jiménez, J.M. and Delgado, J.M.R. (1976). *Ultradian rhythms in the mobility and behavior of rhesus monkeys* Exp. Brain Research. 25; 79-91.
- Díaz-Muñoz, M., Vázquez, O., Aguilar-Roblero, R. and Escobar, C. (2000). *Anticipatory changes in liver metabolism, entrainment of insulin, glucagon and corticosterone in food restricted rats*. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.(MS RO 176-0-R2 aceptado agosto 2000 en prensa).
- Druker-Colín, R., R. Aguilar-Roblero, F. Garcia-Hernández, F. Fernández-Cancino, and F. Bermúdez-Rattoni. (1984). *Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: Diurnal rhythm recovery of lesioned rats*. Brain Research. 311: 353-357.
- Edelstein, K. and Amir, S. (1995). *Non-photoc manipulations induce expression of Fos in the suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the rat*. Brain Research. 690; 254-258.
- Escobar, C., Díaz-Muñoz, M., Encinas, F. and Aguilar-Roblero, R. (1998). *Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and entrainment by restricted feeding schedules in rats* American Journal of Physiology. 43: R1309-R1316.

- Escobar, C., Salazar, A., Granados, D. y Aguilar-Roblero, R. (1998). *La sincronización: características y mecanismos*. Bol. Soc. Mex. Cien. Fisiol. Vol. 5, N° 2: 8-13.
- Escobar, C., Hudson, R., Martínez-Gómez, M. and Aguilar Roblero R. (2000). *Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits*. J. Comp. Physiol. 186:33-38.
- Follenius, M., Brandenberg, G. and Hietter, B. (1982). *Diurnal cortisol peaks and their relationship to meal*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 55; 757-761.
- Friesen, W.O., Block, G.D. (1984). *What is a biological oscillator?* American Journal of Physiology. 246: R847-R851.
- Guillete, M., Marija, M., McArthur, A., Chen Liu, Ding, J., Faiman, L., Weber, E., Thomas, K., Tcheng and Gallman, E. (1995). *Intrinsic neuronal rhythms in the suprachiasmatic nuclei and their adjustment*. Ciba Foundation Symposium 183. John Wiley and Sohns Chichester England. pp. 134-153.
- Hastings, M., Mead, S., Vindlacheruvu, R., Ebling, F., Maywood, E. and Grosse, J. (1992). *Non-photic phase-shifting of the circadian activity rhythm of syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin*. Brain Res. 591; 20-26.
- Hinton, V., Esguerra, M., Farhooody, N., Granger, J. and Geary, N. (1987). *Epinephrine inhibits feeding nonspecifically in the rat*. Physiology and Behavior. 40; 109-115.
- Honma, K., Honma, S. and Hiroshige, T. (1984). *Feeding-associated corticosterone peak in rats under various feeding cycles*. American Journal of Physiology. 246: R721-R726.
- Hut, R., Mrosovsky, N. and Daan, S. (1999). *Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the european ground squirrel (spermophilus citellus)*. Journal of Biological Rhythms. 14. N.5; 409-419.
- Inouye SIT. (1982). *Ventromedial hypothalamic lesions eliminate anticipatory activities of restricted daily feeding schedules in the rat*. Brain Res. 250: 183-187.
- Janik, D. and Mrosovsky, N. (1992). *Gene expression in the geniculate induced by a nonphotic circadian phase shifting stimulus*. NeuroReport. 3; 575-578.
- Johnson, R.F. Smale, I., Moore, R.Y. and Morin, L.P. (1988). *Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift responses to a benzodiazepine*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85; 5301-5304.
- Latt, W. (1983). *Afferent and efferent neural roles in liver function*. Progr. Neurobiology. 21:323-348.

- Lima, F.B., Hell, N.S. and Timo-Iaria, C. (1984). *Carbohydrate metabolism and food intake in food-restricted rats. Relationship between the metabolic events during the meal and the degree of food intake.* Physiology and Behavior. 35: 695-700.
- Maywood, E., Smith, E., Hall, S. and Hastings, M. (1997). *A thalamic contribution to arousal-induced, non-photic entrainment of the circadian clock of the syrian hamster.* European Journal of Neuroscience. 9; 1739-1747.
- Mead, S., Ebling, F., Maywood, E., Humby, T., Herbert, J. and Hastings, M. (1992). *A non-photic stimulus causes instantaneous phase advances of the light-entrainable circadian oscillator of the syrian hamster but does not induce the expression of c-Fos in the suprachiasmatic nucleus.* J. Neuroscience. 12; 2516-2522.
- Mikkelsen, J.D., Vrang, N. and Mrosovsky, N. (1998). *Expression of Fos in the circadian system following nonphotic stimulation.* Brain Research Bulletin. 47. N. 4; 367-376.
- Mistlberger, R.E. and A. Rechtschaffen. (1984). *Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions.* Physiology and Behavior. 33: 227-235.
- Mistlberger, R.E. and Rusak, B. (1987). *Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: Dependence on meal size and nutrient content.* Physiology and Behavior. 41: 219-226.
- Mistlberger, R. and Rusak, B. (1988). *Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: Dependence on meal size and nutrient content.* Physiology and Behavior. 41: 219-226.
- Mistlberger, R.E., Houtp TA, and Moore-Ede MC. (1990). *Food-Anticipatory rhythms under 24-hour schedules of limited access to single macronutrients.* Journal of Biological Rhythms. 5: 35-46.
- Mistlberger, R.E. and Mumby DG. (1992). *The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies.* Behav Brain Res 47: 159-168.
- Mistlberger, R.E. (1994). *Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms.* Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 18: 171-195.
- Moga, M., Weis, R. and Moore R.Y. (1995). *Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat.* Journal of Comparative Neurology. 359: 221-238.
- Moore, R.Y. and Eichler, M.E. (1972). *Loss of circadian corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat.* Brain Research.42: 201-206.

- Moore, R.Y. and Lenn, N.J. (1972). *A retinohypothalamic projection in the rat*. Journal of Comparative Neurology. 146: 1-14.
- Moore, R.Y. and Card, J.P. (1990). *Neuropeptide Y in the circadian timing system*. Ann. NY Acad. Sci. 611; 247-257.
- Moore, R.Y. (1993). *Organization of the primate circadian system*. Journal of Biological Rhythms. 8; S3-S9.
- Moore, R.Y. and Card, J.P. (1994). *The intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex*. Journal of Comp. Neurol. 344; 403-430.
- Moore, R.Y. (1995). *Organization of the mammalian circadian system*. Circadian clocks and their adjustment. Ciba Foundation Symposium 183. John Wiley and Sohns Chichester England. pp. 88-106.
- Moore, R.Y. (1998). *Circadian Timing*: En Zigmond, Bloom, et.al. Fundamental Neuroscience. Academic Press. Cap. 45; 1189-1206.
- Morin, L., Blanchard, J. and Moore, R.Y. (1992). *Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster*. Visual Neurosci. 8: 219-230.
- Mrosovsky, N. (1988). *Phase response curves for social entrainment*. Journal of Comp. Physiol. A. Sens. Neural Behav. Physiol. 162; 35-46.
- Mrosovsky, N., Reeb, S. G., Honrado, G. and Salmon, P. (1989). *Behavioural entrainment of circadian rhythms*. Experientia 45: 696-702.
- Mrosovsky, N. and Salmon, P.A. (1990). *Triazolam and phase-shifting acceleration re-evaluated*. Chronobiology International., 7: 35-41.
- Mrosovsky, N. (1991). *Double-pulse experiments with nonphotic and photic phase-shifting stimuli*. Journal of Biological Rhythms. 6. N. 2; 167-179.
- Mrosovsky, N., Salmon, P.A., Menaker, M. and Ralph, M.R. (1992). *Nonphotic phase shifting in hamster clock mutants*. Journal of Biological Rhythms. 7; 41-49.
- Mrosovsky, N. (1995). *A non-photic gateway to the circadian clock of hamsters*. Circadian Clocks and their Adjustment. Ciba Foundation Symposium 183. John Wiley and Sohns Chichester England, pp 154-174.
- Pittendrigh, C. (1981). *Circadian systems: Entrainment*. Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4: Biological Rhythms. (Jurgen Aschoff, Ed.) New York: Plenum Press. 95-124.

- Pittendrigh, C. (1993). *Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher*. Ann. Rev. Physiol. 55: 17-54.
- Racotta, R., Vega, C. and Russek, M. (1972). *Liver catecholamines and preabsortive satiation (Abstract)*. Federation Proc. 31:309.
- Racotta, R., Ramírez, L. and Velazco, E. (1986). *Metabolic effects of chronic infusions of epinephrine and norepinephrine in rats*. American Journal of Physiology. 250; E518-E522.
- Racotta, I. S. y Racotta, R. (1991). *Catecolaminas hepáticas e ingestión de alimento*. An. Esc. Nac. Cienc. Biol., México. 36; 71-79.
- Reeb, S.G. and Mrosovsky, N. (1989 a). *Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of syrian hamsters: Entrainment and phase response curve*. Journal of Biological Rhythms. 4: 39-48.
- Reeb, S.G., Lavery, R.J. and Mrosovsky, N. (1989 b). *Large phase-shifts of circadian rhythms caused by induced running in a re-entrainment paradigm: The role of pulse duration and light*. Journal of Comp. Physiol. A. 165; 819-825.
- Reeb, S.G., Lavery, R.J. and Mrosovsky, N. (1989). *Running activity mediates the phase-advancing effects of dark pulses on hamster circadian rhythms*. Journal of Comp. Physiol. A. 165; 811-818.
- Rodríguez-Zendejas, A., Vega, C., Soto-Mora, L. and Russek M. (1968). *Some effects of intraperitoneal glucose and of intraportal glucose and adrenaline*. Physiology and Behavior. 3: 259-264.
- Rusak, B. (1981). *Vertebrate Behavioral Rhythms*. Handbook of Behavioral Neurobiology. Vol. 4: Biological Rhythms. (Jurgen Aschoff, Ed.) New York: Plenum Press. 95-124.
- Russek, M. (1971). *Hepatic receptors and the neurophysiological mechanisms controlling feeding behavior*. Neuroscience Research, Academic Press, Nueva York. Vol. 4; 213-282.
- Russek, M. and Racotta, R. (1980). *A possible role of adrenaline and glucagon in the control of food intake*. Frontiers of Hormone Research. Vol. 6; 120-137.
- Russek, M., Soto-Mora, L.M., Uriostegui T. and Racotta, R. (1991). *Effects of catecholamines on water intake in rats*. Physiology and Behavior. 49: 201-206.
- Santos A., Carpinelli A.R. and Curi R. (1987). *The effect of controlled feeding conditions on the metabolic characteristics of rats*. Physiology & Behavior. 45: 529-532.

- Sato, T. and Kawamura, H. (1984). *Circadian rhythms in multiple unit activity inside and outside the suprachiasmatic nucleus in the diurnal chipmunk (Eutamias sibiricus)*. *Neurosc. Res.* 1; 45-52.
- Schmidt, R.F. y Thews, G. (1993). *Fisiología humana*. 24.a Edición. Interamericana McGraw Hill. Madrid España.
- Shibata, S., Tsuneyoshi, A., Hamada, T., Tominaga, K. and Watanabe, S. (1992). *Effect of substance P on circadian rhythms of firing activity and the 2-deoxyglucose uptake in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro*. *Brain Res.* 642; 213-220.
- Stephan, F.K. and Zucker, I. (1972). *Circadian rhythms in drinking and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 1583-1586.
- Stephan, F.K., Swann, J.M. and Sisk, C.L. (1979). *Synchronization of circadian rhythms in the rat by restricted feeding schedules*. *Chronobiology* . 6: 159.
- Stephan, F.K., Swann, J.M. and Sisk, C.L. (1979). *Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus*. *Behavioral and Neural Biology.* 25: 346-363.
- Stephan, F.K. (1981). *Limits of entrainment to periodic feeding in rats with suprachiasmatic lesions*. *J. of Comp. Physiol.* 143: 401-410.
- Stephan, F.K. (1997). *Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator*. *Physiology and Behavior.* 62: 995-1002.
- Stephan, F.K. and Davidson AJ. (1998). *Glucose, but not fat, shifts the feeding-entrained circadian clock*. *Physiology and Behavior.* 65: 277-288.
- Sumova, A., Ebling, F. J., Maywood, E., Herbert, J. and Hastings, M. (1994). *Non-photic circadian entrainment in the syrian hamster is not associated with phosphorylation of the transcriptional regulator CREB within the suprachiasmatic nucleus, but is associated with adrenocortical activation*. *Neuroendocrinology.* 59; 579-589.
- Turek, F. W. (1994). *Circadian Rhythms*. Recent progress in hormone research. 49; 49-87.
- Turek, F. W. and Losee-Olsen, S. (1986). *A benzodiazepine used in treatment of insomnia phase shifts the circadian clock*. *Nature.* 321; 167-168.
- Van Cauter, E., Kerkhofs, M., Caufriez, N., Van Onderbergen, A., Thorner, M. and Copinschi, G. (1992). *A quantitative estimation of growth hormone secretion in normal man: reproducibility and relation to sleep and time of day*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74; 1441-1450.

- Van den Pol, A. and Tsujimoto, K. (1985). *Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens*. *Neuroscience*. 15; 1049-1086.
- Van Reeth, O. and Turek, F. W. (1989). *Stimulated activity mediates phase shifts in the hamster circadian clock induced by dark pulses or benzodiazepine*. *Nature*. 339; 49-51.
- Winder, W., Beattie, M., Piquette C. and Holman, R. (1983). *Decrease in liver norepinephrine in response to exercise and hypoglycemia*. *American Journal of Physiology*. 244: R845-R849.
- Yamazaki, S., Numano, R., Michikazu, A., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G., Sakaki, Y., Menaker, M. and Tei, H. (2000). *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats*. *Science*. 288; 682-685.
- Yoshihara, T., Honma, S. and Honma, K. (1996). *Effects of restricted daily feeding on neuropeptide Y release in the rat paraventricular nucleus*. *American Journal of Physiology*. 270: E589-E595.
- Young, J.B. and Landsberg, L. (1980). *Impaired suppression of sympathetic activity during fasting in the gold thioglucose-treated mouse*. *J. Clin. Invest.* 65: 1086-1094.
- Young, J.B., Rosa, R. and Landsberg, L. (1984). *Dissociation of sympathetic nervous system and adrenal medullary responses*. *American Journal of Physiology*. 247: E35-E40.