03086

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

### "PAPEL DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR TALÁMICO EN LA SINCRONIZACION"

DOCTORADO EN: CIENCIAS FISIOLÓGICAS

PRESENTA: SALAZAR JUÁREZ ALBERTO







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.

| 1) INTRODUCCIÓN 2-10                                      |      |
|---|------|
| RITMOS CIRCADIANOS2-3                                     |      |
| ELEMENTOS DEL RELOJ BIOLÓGICO 3-5                         |      |
| SINCRONIZACIÓN5-6   |      |
| CURVA DE RESPUESTA DE FASE 6-7                            |      |
| SUSTRATO ANATÓMICO DE LA SINCRONIZACIÓN 7-10              |      |
| 2) ANTECEDENTES ESPECÍFICOS 10-12                         |      |
| 3) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 13                          | 2-13 |
| 4) HIPOTESIS Y OBJETIVOS 13-14                            | **   |
| 5) MATERIAL Y MÉTODO 15-20                                | )    |
| ANIMALES Y CONDICIONES GENERALES 15                       |      |
| REGISTRO CONDUCTUAL 15-16                                 |      |
| CURVA DE RESPUESTA DE FASE 17                             |      |
| LESIÓN ELECTROLÍTICA18                                    |      |
| IMPLANTACIÓN DEL ELECTRODO Y CANULA 18                    |      |
| ESTIMULACIÓN CON LUZ, QUIMICA Y ELECTRÍCA 18-19           |      |
| SINCRONIZACIÓN, RESINCRONIZACIÓN Y FOTOPERIODO ESQUELETO. | ., 1 |
| HISTOLOGÍA19-20   |      |
| ANÁLISIS Y ESTADISTICA 20                                 |      |
| 6) RESULTADOS 21  | -49  |
| Experimento 1 21-24                                       |      |
| Experimento 2   |      |
|   |      |
| Experimento 3.1 42-44                                     |      |
| Experimento 3.2 44-49                                     |      |
| 5) DISCUSIÓN 50-  | 57   |
| 6) CONCLUSIONES 58  |      |
| 7) BIBLIOGRAFÍA59-72                                      |      |

### INPEROIDUGEIÓNE ROMANDES CIRCADANOS

Las fluctuaciones periódicas en diversos parámetros fisiológicos son una propiedad general de la materia viva, cuando estas fluctuaciones ocurren a intervalos regulares son considerados como "ritmos biológicos" (Bunnig, 1973). Los ritmos biológicos son generados por un mecanismo endógeno del organismo (Aschoff, 1986).

Augusto Forel sugirió que los organismos poseían una memoria temporal o Zeitgedächtnis, con este término trató de explicar la naturaleza endógena de la ritmicidad biológica; sin embargo C.S. Pittendrigh y J. Aschoff demostraron la capacidad del organismo para medir el tiempo biológico. Estos autores desarrollaron el concepto de **reloj biológico**, el cual remplazó al término Zeitgedächtnis y eliminó la implicación de fenómenos de aprendizaje en el origen de la ritmicidad biológica.

Los ritmos biológicos se presentan en un amplio intervalo en frecuencias de oscilación, desde un ciclo por milisegundo a un ciclo por año. Por otra parte también el ambiente geofísico se caracteriza por la existencia de ciclos que se derivan de movimientos de la Tierra y la Luna con relación al Sol, estos ciclos ambientales o geofísicos son los días, las mareas, las fases lunares y las estaciones del año. Cuando la frecuencia de un ritmo biológico se aproxima a la de un ciclo ambiental se le denomina con el prefijo "circa" (Pittendrigh 1976; Rusak y Zucker, 1975); es así como a los ritmos biológicos cercanos a las 24 horas se les llama ritmos circadianos (Halberg, 1969).

Los ritmos circadianos representan uno de los rasgos adaptativos más ubicuos de los organismos, en los mamíferos representan un importante proceso a través del cual eventos del medio interno son organizados en una apropiada secuencia temporal que permite una máxima adaptación al medio externo (Rusak, 1979) Esta característica permite al organismo predecir y prepararse a cambios en el ambiente geofísico asociado con el día y la noche (Turek, 1994)



Para llevar a cabo este papel adaptativo los ritmos circadianos requieren que el sistema tenga la capacidad de medir el tiempo biológico, es decir que el ritmo circadiano sea generado endógenamente, y que se pueda ajustar al tiempo geográfico es decir que bajo condiciones ambientales usuales el periodo del oscilador se ajuste al periodo del ciclo ambiental (Pittendrigh, 1976).

El origen endógeno de la ritmicidad biológica se basa en el hecho de que en condiciones de aislamiento de señales ambientales temporales, la ritmicidad biológica persiste con una ligera pero significativa variación en el valor del periodo de la oscilación. Lo anterior indica que el ritmo observado no depende de fenómenos geofísicos cíclicos, sino que el ritmo que se mantiene bajo condiciones constantes refleja un proceso interno al organismo. Esta característica esencial de los organismos de ser capaces de mantener la ritmicidad circadiana aún en ausencia de señales ambientales periódicas es conocida como ritmo en oscilación espontánea o en corrimiento libre (free running).

Tau (τ) representa el periodo endógeno del marcapaso (periodo- es el tiempo requerido para completar un ciclo; Menaker, 1969); este valor varia poco entre individuos de una misma especie pero presenta diferencias significativas con respecto a individuos de otras especies. El que los ritmos de ciertas especies se caractericen por un cierto valor de periodo, indica que tau depende de la información genética.

Tau, a su vez, está compuesto por dos fracciones; un periodo de actividad llamado **alfa** y un periodo de reposo llamado **rho**. Alfa representa el intervalo que sucede entre el inicio y el término de la actividad bajo estudio, a su vez rho representa el intervalo de reposo o ausencia de la actividad en estudio, de modo que tau es igual a alfa más rho  $(\tau=\alpha+\rho)$ .

### ELEMENTOS DEL RELOJ BIOLÓGICO

En el término reloj biológico subyace el concepto de la existencia de mecanismos fisiológicos capaces de imponer un orden temporal sobre las funciones del organismo Estos mecanismos requieren la capacidad del sistema para oscilar con un periodo regular, así como la capacidad de usar dichas oscilaciones como una referencia interna que permita una interacción adecuada, en el dominio temporal, entre el organismo y su ambiente



Algunos autores como C.S. Pittendrigh, y J. Aschoff definen al reloj biológico como estructuras orgánicas que funcionan como marcapasos (entidad localizable y funcional capaz de generar oscilaciones autosostenidas), capaces de imponer periodo y fase a los procesos orgánicos. Otros autores como F. Halberg, lo definen como el resultado de la interacción de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios, en donde la participación de estructuras específicas se limita al ajuste de fase entre los diversos procesos (Aguilar-Roblero, 1987).

Los mecanismos fisiológicos encargados de generar y mantener la organización temporal del organismo (Pittendrigh, 1993), conforman lo que se llama el sistema circadiano. Los procesos que regula este sistema son: 1) la cronometría, que se refiere a la generación de las oscilaciones involucradas en la función de reloj biológico; (2) la sincronización de estas oscilaciones a los cambios cíclicos ambientales (zeitgebers), es decir los mecanismos que permiten el ajuste del periodo y la fase del reloj biológico a señales periódicas ambientales; 3) la transmisión de las oscilaciones a los sistemas efectores que expresan la ritmicidad; 4) acoplamiento entre los osciladores del organismo para lograr su funcionamiento coordinado (Figura 1).

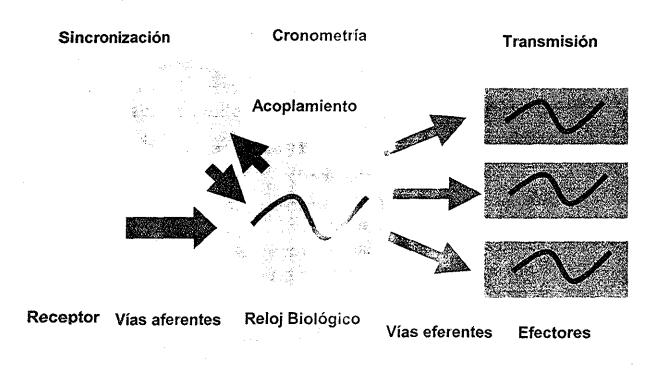


Figura 1. Diagrama que muestra los distintos componentes del sistema circadiano de la rata, en donde se señalan los procesos que median cada uno de los componentes del mismo.



En los mamíferos uno de los relojes biológicos está situado en el nucleo supraquiasmático (NSQ) (Moore,1994), puesto que la lesión electrolítica del NSQ y no de otras estructuras cerebrales, elimina diferentes ritmos circadianos conductuales, endocrinos y metabólicos. Esta arritmicidad se puede observar tanto en condiciones de oscilación espontánea como de sincronización, en una amplia variedad de especies de mamíferos incluyendo primates (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972; Van Den Pool y Powel, 1979 y Pickard y Turek, 1982b).

Además, el NSQ presenta ritmos endógenos circadianos tanto en la actividad eléctrica (Groos y Mason, 1978; Groos y Hendriks, 1982; Groos y Cols, 1983; Green y Guillete, 1982; Inouye y Kawamura, 1979; 1982) como en la de captura de 2-deoxiglucosa "in vitro" e "in situ" (Schwartz y Gainer, 1977; Schwartz y Cols, 1980; Schwartz y Cols, 1983; Newman y Hospod, 1986) en diferentes especies (Schwartz y Cols, 1983; Flood y Gibbs, 1982; Cassone, 1988; Schwartz y Crosby, 1985).

Por otra parte los transplantes de NSQ fetal a sujetos arrítmicos inducen la recuperación funcional de diferentes conductas rítmicas (Drucker-Colin y Cols, 1984; Sawaki y Cols, 1984; Ralph y Lehman, 1991; De Coursey, 1989; Ralph y Lehman, 1990; Aguilar y Cols, 1986,1992a; Boer y Griffioen, 1992; LeSauter y Silver, 1994). Cuando estos transplantes se realizan, entre un hámster de periodo normal y un mutante de periodo corto (llamado Tau; Ralph y Menaker, 1988), demostraron que el periodo del ritmo restaurado siempre reflejaba el periodo del genotipo del tejido donador (Ralph y Cols, 1990).

### SINCRONIZACIÓN

El sistema circadiano provee de información util al organismo, mediante la cual la fase y el periodo del ritmo transmitido pueden ser ajustadas a la fase de los cambios cíclicos ambientales; un proceso llamado sincronización.

Para demostrar que la oscilación de una variable ambiental actúa como una señal sincronizadora del sistema circadiano, deben ocurrir los siguientes eventos:

- 1) El periodo del ritmo circadiano se ajuste al periodo del ciclo ambiental (igualando su valor).
- 2) Que se establezca y se mantenga una relación de fase estable entre el ritmo y el sincronizador.
- 3) Que al retirarse la señal temporal el ritmo inicie su oscilación espontánea en la fase determinada por el ciclo ambiental y no por el ritmo previo a la sincronización.

El ajuste de tau sólo es posible dentro de ciertos límites de frecuencia del periodo del sincronizador (T), estos límites conforman el intervalo de sincronización para el marcapaso circadiano (de 21 hrs. a 28 hrs.). Sólo cuando la frecuencia de la señal temporal se encuentra dentro de este intervalo, es cuando esta puede ser efectiva y sincronizar a un ritmo biológico (Pittendrigh y Calderola, 1973; Pittendrigh y Minis,1972). Este efecto se incrementa cuando se aumenta la potencia del sincronizador, esta potencia afecta a la ritmicidad en dos parámetros: a) en la velocidad de los cambios de fase y b) en la estabilidad del control de la fase.

Debido a que el amanecer y el ocaso son los indicadores más precisos y confiables de los cambios diarios en el ambiente, no es sorprendente que la luz sirva como la señal temporal principal responsable de la sincronización del reloj circadiano a ritmos ambientales.

Los estímulos sincronizadores en algunas condiciones pueden producir una aparente sincronización del organismo a su ambiente, en estas circunstancias el estímulo actua directamente sobre los sistemas efectores de la ritmicidad sin afectar a los osciladores biológicos, fenómeno llamado enmascaramiento. La principal característica de este fenómeno es que aunque el ritmo ajuste su fase al estímulo ambiental, este último no afecta ni al periodo ni a la fase del reloj biológico.

### CURVA DE RESPUESTA DE FASE

Como se menciono anteriormente debido a su capacidad de sincronización los ritmos circadianos en oscilación espontánea pueden sufrir cambios en la velocidad de oscilación que se traducen en adelantos o retrasos del ritmo en estudio llamados cambios de fase. Un cambio de fase es el lesplazamiento gradual en la ocurrencia de una oscilación, la cual retorna a la establadad del periodo previa al estímulo en un intervalo mayor o menor dependiendo de las características del estímulo y el oscilador. Cuando esto ocurre la fase del remo endógeno se ajusta progresivamente; los ciclos durante los cuales ocurre el ajuste de fase al estímulo se denominan ciclos transitorios. El número de ciclos transitorios para alcanzar una nueva relación de fase se llama velocidad a percece endógeno del oscilador (Pittendrigh y Daan, 1976).



En los mamíferos el proceso de sincronización a diferentes fases del ciclo circadiano ha sido caracterizado a través del estudio de los efectos de la exposición a pulsos breves de luz, en animales mantenidos en condiciones de obscuridad continua. En este paradigma la magnitud y la dirección de los cambios de fase son dependientes del momento en que se presenta el estímulo con respecto a la oscilación en estudio, su representación gráfica se denomina curva de respuesta de fase (CRF). En dicha curva sé gráfica en la abscisa la fase del ciclo circadiano en la que se presenta el estímulo expresado en horas circadianas, y en la ordenada la magnitud del cambio de fase observado en el ritmo una vez alcanzado el estado estable, graficados en horas ó minutos como avances (valores positivos) o retrasos (valores negativos).

En la CRF cuando a un animal nocturno se le presentan pulsos de luz al inicio del periodo de actividad (noche subjetiva temprana) se observan retrasos de fase, si los estímulos se aplican al final del periodo de actividad (noche subjetiva tardía) o al principio del día subjetivo se observan avances de fase. Durante las horas de inactividad (rho, día subjetivo) los pulsos de luz no tienen efectos y a esta región se le denomina zona muerta.

Las características generales de la CRF son muy similares en todas las especies, sin embargo se encuentran diferencias en la forma de la onda, en la amplitud y en la relación entre los avances y los retrasos de fase. La CRF es una de las contribuciones más importantes para la comprensión de cómo los estímulos cíclicos ambientales sincronizan al reloj biológico; además de ser la principal estrategia experimental a través de la cual es posible estudiar las propiedades dinámicas del reloj biológico responsable de la generación de los ritmos circadianos.

### SUSTRATO ANATÓMICO DE LA SINCRONIZACIÓN

La información relacionada con el ciclo luz-obscuridad es transmitida al NSQ por dos vías distintas: 1) Una proyección monosináptica originada de las células ganglionares de la retina, (Moore 1972, Johnson 1988), el tracto retinohipotalàmico (TRH); y una vía indirecta a través del tracto geniculohipotalámico (TGH), el cual proyecta de neuronas localizadas en la hojuela intergeniculada (HIG), un componente del complejo geniculado lateral ventral (NGLv) que también recibe proyecciones de la retina (Moore 1994).

La eliminación del TRH por la enucleación bilateral (Rusak y Zucker, 1979) o por cortes selectivos de axones retinianos que innervan el NSQ (Johnson y Cols. 1988) producen la pérdida de la sincronización por luz y la persistencia del ritmo en oscilación espontánea.

El TRH es bilateral y se sobrepone con otras terminales aferentes concentradas en la región ventral del NCQ: las células ganglionares (del tipo de células W) que dan origen al TRH están ampliamente distribuidas a través de la retina y se especializan en integrar información sobre la intensidad luminosa. Esta proyección está compuesta principalmente por axones finos no mielinizados (Mason y Cols, 1977; Millhouse, 1977; Pickard, 1980—1982a); algunos de estos axones que inervan al NSQ mandan colaterales axenal s a la HIG (Pickard, 1985).

En løs roedores, la arborización terminal de esta aferencia retinal está siempre segregada dentro la región ventrolateral del núcleo y coexiste con la arborización terminal de aferencias visuales secundarias como la de la HIG. Las sinapsis entre las terminales ópticas y las células de esta region del NSQ son del tipo axosomática y axodendrítica (Tanaka y Cols., 1993); las células del NSQ que son inervadas por el TRH son inmunoreactivas para el pápti lo vasoactivo intestinal (VIP) y para la hormona secretora de gastrina (GRP) (Card y Cols, 1981; Stopa y Cols, 1988; Van Den Pol y Tsujimoto, 1985).

Estudios inmunocitoquímicos demuese an que las terminales axónicas del TRH en la porción ventral del NSQ contienen el los niveles de glutamato (Van Den Pol, 1991; Castel y Cols., 1993; De Vries y Cols., 1993), además se han localizado somas y axones de células ganglionares refine as inmunoreactivas al glutamato. Dos líneas de evidencia apoyan la participación de glutamato en la regulación de la fase circadiana por la luz. La administración de progonistas a los receptores a NMDA y no NMDA bloquean los cambios de fase indecidos por la luz en el ritmo de actividad locomotora (Colwell y Cols., 1990; 1901; De wall y Menaker, 1992; Vindlacheruvu y Cols, 1992; Rea y Cols, 1993), add marines antagonistas de los aminoácidos excitatorios inhiben la inducción de la progonistas a NMDA induce la expresión de Fos "in vivo" (Ebling y Cols., 1991) e in acción (Shibata y Cols., 1994). Además, la supresión de la melatonina por la luz rua. En bloqueada por la administración de antagonistas a los aminoácidos excitados sexitados sexitados sexitados a los aminoácidos excitados sexitados sexi



Además del glutamato, algunas otros neurotransmisores han sido localizados en las células ganglionares retinales, los cuales incluyen el factor secretor de corticotropína, el GABA, la substancia P y LANT-6 un péptido parecido a la neurotensina

La segunda aferente visual al NSQ involucra proyecciones del NGLv y de la HIG. Esta proyección, llamada TGH, es bilateral y cursa a través de los tractos ópticos hasta el NSQ. Las aferentes del TGH son confinadas al NSQ ventrolateral en estrecha relación con las aferentes retinales (Pickard, 1982a; Card y Moore, 1982; Moore y Card, 1994).

La proyección del complejo geniculado al NSQ fue inicialmente revelada como parte de un arreglo de proyecciones eferentes del NGLv (Ribak y Peters, 1975; Swanson y Cols., 1974; Cosenza y Moore, 1984). Sin embargo, análisis subsecuentes demostraron que las aferentes del geniculado al NSQ se originaban de una delgada lámina de neuronas que fue distinguida por su inmunoreactividad al neuropéptido Y (NPY) (Card y Moore, 1982, Harrington y Cols., 1985,1987; Moore y Cols., 1984; Pickard, 1982). Estas células están localizadas entre el NGLv y NGLd y se conocen como la HIG. La HIG es estructural y funcionalmente distinta del NGLv y NGLd, aún cuando sus bordes no son realmente muy aparentes, se sugiere que la región rostral de la HIG está confinada al área entre el NGLv y NGLd y la región caudal termina con la zona incierta lateral al lemnisco medio y tiene una extensión rostrocaudal de 2.2 mm de largo (Morin y Cols., 1992).

Además de células que contienen NPY, en la HIG también existe una población substancial de neuronas inmunoreactivas a encefalina, substancia P y GABA (Card y Moore, 1989; Takatsuji y Tohyama, 1989; Mantyh y Kemp, 1983).

Las neuronas de la HIG pueden dividirse en tres grupos en base a su contenido peptidérgico y a sus proyecciones: 1) Las neuronas inmunopositivas a GABA y NPY que proyectan al NSQ; 2) Las neuronas inmunoreactivas a GABA y encefalina que proyectan a la HIG contralateral y al NSQ y 3) Un pequeño grupo de neuronas que proyectan al NSQ pero que no se ha caracterizado su transmisor (Moore y Card, 1994)

La microinyección de NPY dentro de la región del NSQ produce cambios de fase en la actividad locomotora y en la actividad neuronal de ratas y hamsters (Albers y Ferris, 1984; Albers y Cols, 1984); esta ocurre cuando se administra durante el día subjetivo (CT 3 y CT 9) (Shibata y Moore, 1993; Medanic y Guillete, 1993) y no

durante la noche subjetiva. Este efecto depende del NSQ ya que cuando se inyectan estos péptidos en él liquido cefalorraquideo, no se presenta ningún cambio. El patrón de cambio de fase producido por el NPY es similar a los producidos por pulsos de obscuridad en sujetos mantenidos en luz continua (Boulos y Rusak, 1982).

Por otra parte se ha superide que la EIO funciona como un integrador de la luminiscencia (Harrington y Rusak, 1990—1991) ya que su lesión disminuye la velocidad de resincronización el ciclo de iluminación ambiental y altera los efectos de la luz continua sobre la ritmicidad (Harrington y Rusak, 1986, 1988; Pickard y cols, 1987).

Una tercera vía aferente está representada por un sistema de fibras serotoninérgicas que se originala de nauronas del núcleo rafé medio (MNR) y rafé dorsal (DNR) las cuales son la fuente principal de terminales serotoninérgicas al NSQ (Nojyo y Sano, 1978; Azmitia y Segal 1978). El área de proyección de ésta en el NSQ se sobrepone a los campos terminales del TRH y TGH (Card y Moore, 1982; Moore, 1978), y realizan contactos sinápticos axesomáticos y axodendríticos sobre células inmunoreactivas a VIP (Besler y Beauder 1985; Francois-Bellan y Guy y Cols., 1987; Bosler, 1989).

Aunque la inervación serotoninérgica del MSO no es esencial para la expresión de los ritmos circadianos (Block y Zucker, 1976) la lesión de esta proyección (Szafarczyk y Cols, 1981; Levine y Cols, 1986; Smale y Cols, 1990; Morin y Blanchard, 1991 a y b), o esta manipulaciones farmacológicas de la síntesis y degradación de la serotonína (5-HT) (Szafarczyk y Cols, 1979; Honma y Cols, 1979;) alteran el periodo, el ángulo de fase y la respuesta de fase a la luz del NSQ en roedores.

Por otra parte se ha recortado recientemente que el núcleo paraventricular talámico (PVT) proyecta directimente el NS 2 de la rata (Moore y Moga 1995) y del ratón (Abrahamson y Moore 2003).

# ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

El PVT se localiza en los termados nucleos tarámicos médiales los cuales están compuestos por dos grupos de núcleos: 1) Un grupo dorsal, compuesto del no paraventricular, el nu paratenio del a recerante redicidal y el nu intermediodorsal; y 2) un grupo ventral, que consiste de la lacación de recentar de y reuniens (Groenewegen y Berendse 1994).



durante la noche subjetiva. Este efecto depende del NSQ ya que cuando se inyectan estos péptidos en él liquido cefalorraquideo, no se presenta ningún cambio. El patrón de cambio de fase producido por el NPY es similar a los producidos por pulsos de obscuridad en sujetos mantenidos en luz continua (Boulos y Rusak, 1982).

Por otra parte se ha superide que la EIO funciona como un integrador de la luminiscencia (Harrington y Rusak, 1990—1991) ya que su lesión disminuye la velocidad de resincronización el ciclo de iluminación ambiental y altera los efectos de la luz continua sobre la ritmicidad (Harrington y Rusak, 1986, 1988; Pickard y cols, 1987).

Una tercera vía aferente está representada por un sistema de fibras serotoninérgicas que se originala de nauronas del núcleo rafé medio (MNR) y rafé dorsal (DNR) las cuales son la fuente principal de terminales serotoninérgicas al NSQ (Nojyo y Sano, 1978; Azmitia y Segal 1978). El área de proyección de ésta en el NSQ se sobrepone a los campos terminales del TRH y TGH (Card y Moore, 1982; Moore, 1978), y realizan contactos sinápticos axesomáticos y axodendríticos sobre células inmunoreactivas a VIP (Besler y Beauder 1985; Francois-Bellan y Guy y Cols., 1987; Bosler, 1989).

Aunque la inervación serotoninérgica del MSO no es esencial para la expresión de los ritmos circadianos (Block y Zucker, 1976) la lesión de esta proyección (Szafarczyk y Cols, 1981; Levine y Cols, 1986; Smale y Cols, 1990; Morin y Blanchard, 1991 a y b), o esta manipulaciones farmacológicas de la síntesis y degradación de la serotonína (5-HT) (Szafarczyk y Cols, 1979; Honma y Cols, 1979;) alteran el periodo, el ángulo de fase y la respuesta de fase a la luz del NSQ en roedores.

Por otra parte se ha recortado recientemente que el núcleo paraventricular talámico (PVT) proyecta directimente el NS 2 de la rata (Moore y Moga 1995) y del ratón (Abrahamson y Moore 2003).

# ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

El PVT se localiza en los termados nucleos tarámicos médiales los cuales están compuestos por dos grupos de núcleos: 1) Un grupo dorsal, compuesto del no paraventricular, el nu paratenio del a recerante redicidal y el nu intermediodorsal; y 2) un grupo ventral, que consiste de la lacación de recentar de y reuniens (Groenewegen y Berendse 1994).



Estos núcleos, así como los intralaminares talámicos han sido considerados como parte del complejo nuclear "no especifico", el cual sirve de relevo a la formación reticular del tallo cerebral, y de esta forma influye a amplias áreas de la corteza cerebral. Sin embargo recientemente ha quedado claro que estos núcleos reciben aferentes específicas de la corteza infralimbica, del septum lateral, del área preóptica medial, así como de la corteza entorrinal y del hipocampo; por otro lado, proyectan a sitios específicos de la corteza cerebral y el estriado. La especificidad de estos núcleos está dada por el orden topográfico de sus conexiones aferentes y eferentes (Groenewegen y Berendse 1994).

El PVT proyecta a varios sitios del cerebro, estas proyecciones están organizadas topográficamente a lo largo del eje antero-posterior y dorso-ventral; dentro de estas proyecciones se encuentra una conexión con el NSQ.

El campo terminal de está proyección dentro del NSQ es único en algunos aspectos: en su densidad, en su inclusión dentro de las subdivisiones ventrolateral y dorsomedial y en la existencia de una de las pocas aferencias no visuales al NSQ El origen de ésta inervación es en su mayor parte del PVT anterior; el PVT posterior participa con un pequeño número de fibras, localizadas predominantemente a lo largo de la superficie ventricular del NSQ, esta región del PVT es el sitio a donde llegan principalmente las proyecciones provenientes del NSQ (Moore y Moga 1995). Por otro lado, el glutamato es el principal neurotransmisor de las neuronas del PVT que proyectan al NSQ (Moga, M.M. y Moore, R.Y. 1996). Esta proyección ha sido reportada tanto en especies diurnas como en nocturnas (Novak y Cols 2000).

El PVT de roedores diurnos, como el Arvicanthis nilotícus, presenta un ritmo diurno en la expresión de c-fos (Novak, C.M. y Cols. 2000); en la mayor parte del núcleo la expresión de c-fos es muy alta en el periodo de actividad de este animal, presentando la mayor inmunoreactividad en ZT1, cuando el sujeto inicia su vigilia; en cambio en el periodo de reposo (fase de obscuridad) no se observa inmunoreactividad alguna en el PVT. En el caso de los roedores nocturnos, la expresión de c-fos en el PVT, se incrementa durante la noche cuando las ratas son activas y muestran menos episodios de sueño. (Novak y Nuñez 1998; Peng y Cols. 1995). Debido a este patrón de expresión de c-fos se sugiere la posibilidad de que el PVT esté relacionado con el mantenimiento del inicio de la vigilia, pues la expresión máxima de c-fos se presenta al inicio del periodo de actividad y no a la mitad del mismo, en está parte del ciclo otras estructuras podrían ser las responsables del

PAPEL DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR TALÁMICO EN LA SINCRONIZACIÓN mantenimiento de la vigilia en a desto del periodo de actividad. (Novak, C.M. y Cols. 2000).

Recientemente se reportó una mayor inducción en la expresión de c-fos en el PVT posterior, después de que al animal se le sometió a 6 horas de deprivación de sueño, lo anterior confirma la participación del PVT en la vigilia (Semba y Cols. 2001).

Por otra parte, el PVT presenta una alta dansidad de sitios de unión a la melatonina (Ebling y Cols 1892), aunque estos sitios no presentan variaciones diurnas a lo largo del fotoperiodo. (Recio y Cols 1996).

La lesión electrolítica del PVT no impide la regresión testicular inducida por fotoperiodos cortos en hamster l'Ebling y Cols 1992'; otros estudios en esta especie demuestran que la microinyemión de melatopina dentro del PVT no inhibe la maduración gónadal, en las nemas dosis que fueron efectivas cuando se administró en el NSQ/(Badura y Goldman 1992). Esto segiere que el PVT no es necesario para las respuestas gónadales inducidas por fotoperiodos cortos y tampoco es necesario para la expresión de las adaptaciones invernales en el hamster (Purvis y Duncan 1997).

Otros estudios reportan que hamsters con lesiones extensas del PVT, muestran ritmos circadianos de actividad locomotora en obscuridad contínua (O:O), también muestran la misma valocidad de resincronización a un nuevo ciclo luzobscuridad que sujetos intactos (Ebling y Cols, 1992). En ratas enucleadas, la lesión del PVT modifica la ritmicidad circadiana, incrementando el periodo en oscilación espontánea y concentrando la actividad locomotora dentro de la noche subjetiva tardía (Moga y Moore 2000); esto sugil re que el PVT aunque no es esencial para la expresión circadiana en hamster y ratas, es una parte integral del sistema circadiano que puede estar interviniendo en la regulación de diferentes parámetros del mismo.

# PLANTEAMIENTO DE LE LA

Puesto que otras aferencias ai NSQ como las del TRH, del TGH y la proveniente de rafé, participan en el propeso de sincronización, se podría esperar que otras proyecciones a este nual de la composição de la projecciones reciendo estas proyecciones reciendo estas principales componentes del sistema circadiano, incluyendo el NSQ de acora subcaravantricular (Watts 1987) y la HIG



PAPEL DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR TALÁMICO EN LA SINCRONIZACIÓN mantenimiento de la vigilia en a desto del periodo de actividad. (Novak, C.M. y Cols. 2000).

Recientemente se reportó una mayor inducción en la expresión de c-fos en el PVT posterior, después de que al animal se le sometió a 6 horas de deprivación de sueño, lo anterior confirma la participación del PVT en la vigilia (Semba y Cols. 2001).

Por otra parte, el PVT presenta una alta dansidad de sitios de unión a la melatonina (Ebling y Cols 1892), aunque estos sitios no presentan variaciones diurnas a lo largo del fotoperiodo. (Recio y Cols 1996).

La lesión electrolítica del PVT no impide la regresión testicular inducida por fotoperiodos cortos en hamster l'Ebling y Cols 1992'; otros estudios en esta especie demuestran que la microinyemión de melatopina dentro del PVT no inhibe la maduración gónadal, en las nemas dosis que fueron efectivas cuando se administró en el NSQ/(Badura y Goldman 1992). Esto segiere que el PVT no es necesario para las respuestas gónadales inducidas por fotoperiodos cortos y tampoco es necesario para la expresión de las adaptaciones invernales en el hamster (Purvis y Duncan 1997).

Otros estudios reportan que hamsters con lesiones extensas del PVT, muestran ritmos circadianos de actividad locomotora en obscuridad contínua (O:O), también muestran la misma valocidad de resincronización a un nuevo ciclo luzobscuridad que sujetos intactos (Ebling y Cols, 1992). En ratas enucleadas, la lesión del PVT modifica la ritmicidad circadiana, incrementando el periodo en oscilación espontánea y concentrando la actividad locomotora dentro de la noche subjetiva tardía (Moga y Moore 2000); esto sugil re que el PVT aunque no es esencial para la expresión circadiana en hamster y ratas, es una parte integral del sistema circadiano que puede estar interviniendo en la regulación de diferentes parámetros del mismo.

# PLANTEAMIENTO DE LE LA

Puesto que otras aferencias ai NSQ como las del TRH, del TGH y la proveniente de rafé, participan en el propeso de sincronización, se podría esperar que otras proyecciones a este nual de la composição de la projecciones reciendo estas proyecciones reciendo estas principales componentes del sistema circadiano, incluyendo el NSQ de acora subcaravantricular (Watts 1987) y la HIG



PAPEL DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR TALÁMICO EN LA SINCRONIZACIÓN (Weiss 1992). Sin embargo la participación del PVT en el sistema circadiano no ha sido determinada.

Dentro de las posibles funciones del PVT en el sistema circadiano estaría la de participar como un componente aferente, es decir, formar parte de las vías de sincronización. Con relación a la luz esto sería posible debido a que el PVT recibe proyecciones de la HIG. PVT también podría estar relacionado con la sincronización a otros tipos de señales ambientales, pues recibe amplias proyecciones de distintas áreas cerebrales.

Para poder resolver este problema nosotros planteamos dos estrategias de estudio, las cuales implican la utilización de la curva de respuesta de fase como una herramienta que nos permite observar las respuestas del NSQ a diversos estímulos. La primera estrategia consiste en el uso de ratas con lesión electrolítica del PVT, lo que nos permitirá cuantificar las respuestas del reloj biológico a pulsos de luz sin la participación de esté núcleo. La segunda estrategia consiste en la cuantificación de las respuestas de fase del NSQ a la estimulación por pulsos eléctricos y químicos dentro del PVT.

### HIPOTESIS Y OBJETIVOS

**HIPOTESIS GENERAL:** Las aferentes al NSQ originadas en el PVT anterior participan en la sincronización a la luz de los ritmos circadianos.

### Hipótesis Específicas:

- 1. Si el PVT anterior participa en el proceso de sincronización a la luz, entonces su lesión electrolítica modificará las respuestas de fase inducidas por pulsos de luz, así como ocasionará alteraciones en el ajuste al fotoperiodo completo y fotoperiodo esqueleto (acción paramétrica y no paramétrica de la luz). La lesión selectiva de las zonas anterior y medial-posterior del PVT permitirán determinar si los efectos involucran las aferentes (PVT anterior) ó las eferentes (PVT posterior) del NSQ.
- 2.- Debido a que tanto la proyección del PVT anterior al NSQ, como el TRH utilizan el mismo neurotransmisor (glutamato), entonces la estimulación eléctrica del PVT anterior producirá respuestas de fase parecidas a las producidas por pulsos de luz en sujetos intactos

3.- Si los efectos producidos por la estimulación eléctrica son resultado de la activación de las neuronas del PYT anterior entonces la estimulación con glutamato de los receptores químicos localizados en las neuronas de PVT anterior ocasionará respuestas de fase parecidas a las producidas por pulsos eléctricos. En caso contrario, los efectos de la estimulación eléctrica serían atribuidos a la estimulación de fibras de paso.

#### **OBJETIVO GENERAL:**

1 --- Determinar el papel del FVT sobre el proceso de sincronización la la luz del ritmo circadiano de ingesta de agua de la rata en la pepa Wistar.

#### **Objetivos Específicos:**

- I --- Determinar la curva de respuesta de fase (CRF) a pulsos de luz de 60 minutos de duración.
- II--- Obtener las respuestas de fese para estimulos luminosos en tres puntos de la CRF en organismos con les ón electrolítica del PVT medial-posterior.
- III--- Obtener las respuestas de fase para estímulos luminosos en tres puntos de la CRF en sujetos con lesión electrolítica del PVT anterior
- IV--- Establecer el efiscio de la las un electrolítica del PVT anterior sobre la sincronización al fotoperiodi completo y la fintoperiodo esqueleto.
- V- - Determinar la velocidad de resincronización de sujetos lesionados del PVT anterior a un cambio de fase del fotoneriodo completo
- VI - Estimar la respues a de fase para estímulos eléctricos en el PVT anterior, en tres puntos de la CRF.
- VII - Caracterizar la respuesta de fase para estímulos químicos (glutamato) en el PVT anterior en tres puntos de la CEE.



### MATERIAL Y METODO.

#### **ANIMALES Y CONDICIONES GENERALES:**

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con un peso de 180-200 gr; antes del experimento los animales se mantuvieron bajo un ciclo de iluminación de 12 hrs de luz y 12 hrs de obscuridad (las luces se encendían a las 8 a.m., con una intensidad de 400 lux.) Los cuartos de registro estaban sonoamortiguados y la temperatura se mantuvo entre los 20° y 22° C La comida y el agua se administraron "ad libitum". Las jaulas para los animales se limpiaban cada semana.

#### REGISTRO CONDUCTUAL DE INGESTA DE AGUA:

Los sujetos fueron colocados en un cuarto sonoamortiguado bajo luz roja tenue, en cajas individuales de plástico transparente (50x30x35 cm), en donde se registro la conducta de ingesta de agua en forma continua (en diferentes condiciones experimentales). Las cajas tenían una placa de aluminio en el piso. Justo por encima de la placa se colocó un bebedero de acero inoxidable cubierto con un tubo de plástico que sobresalía 2mm. Para que el sujeto bebiera el agua era necesario que se parara sobre la placa del piso e introdujera la lengua dentro del plástico protector. Esto garantizaba que la rata sólo hiciera contacto con el bebedero cuando tomaba agua y no al realizar otras actividades. La placa y el bebedero se conectaron a un sensor, cada vez que la rata tocó el bebedero generó una señal eléctrica. Esta ultima se detectó y colectó en una computadora PC 386 y se almacenó en intervalos de 15 min. (figura 2).

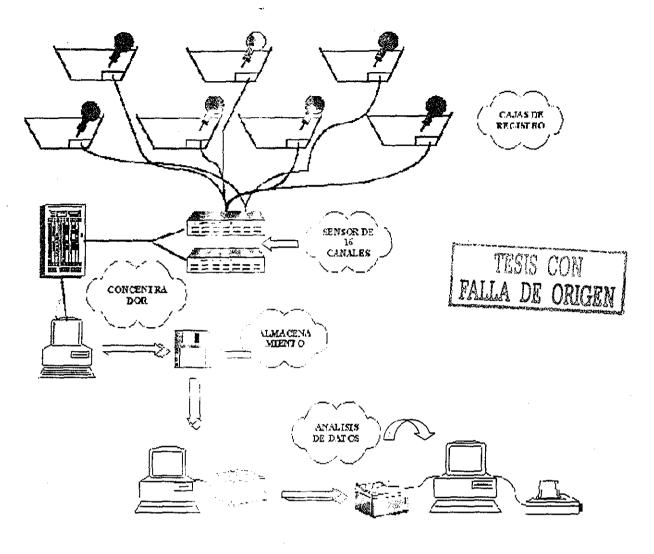


Figura 2 Diagrama que muestra las diferentes etapas del registro de la conducta de ingesta de agua, desde la captación de los mismos por parte del sistema de registro.

Los datos así obtenidos se utilizaron para su posterior graficación y análisis estadístico. Inicialmente los datos de graficaron como actogramas dobles. El actograma es un tipo de grafica de que coasiste de una serie de histogramas individuales ordenados secuencial actor, cada histograma representa en las abscisas los intervalos de tiempo de registro en que se dividió un día y en las ordenadas la intensidad de la variable estudiada, así como los distintos días de registro arreglados a manera de renglón.

#### **CURVA DE RESPUESTA DE FASE**

Al inicio de cada experimento, los sujetos fueron registrados de manera simultánea bajo luz roja tenue, (50 lux), a los diferentes sujetos se les asigno mediante un diseño aleatorio el tiempo circadiano a los cuales se les aplicó el pulso de luz (cada sujeto recibió más de un pulso de luz a diferentes horas circadianas).

El análisis y obtención de la hora circadiana se realizó de la siguiente manera: Por convención se buscó el inicio de la fracción de actividad como un punto de referencia identificable que llamamos, hora circadiana 12 (CT12). Se consideró que CT 12 ocurrió cuando el brote de actividad presentaba una amplitud de cerca del 80% de la actividad, que tuviera una duración de por lo menos 4 horas y que mostrara una relación de fase clara con los ciclos previos y sucesivos. Cuando el animal mostró un patrón bimodal, el primer brote de actividad es seguido por un lapso de cerca de tres horas de decremento de la intensidad, seguida por un incremento en la actividad de más de 2 horas para finalmente desaparecer. En otros animales la actividad permaneció constante por un intervalo de cerca de 8 horas y decrementó gradualmente hasta que el brote de actividad es sustituido por un lapso prolongado de inactividad.

Posteriormente se realizó una regresión lineal de varios puntos de referencia, el valor de la pendiente resultante fue el valor del periodo (tau); el valor de CT 12 del último día se usó para calcular los valores de las distintas horas circadianas a las cuales se estimuló, por ejemplo CT 6 y CT 23, en donde:

CT 6 = CT12 -( 6 x tau/24 hrs. Previo al inicio de actividad).

CT 23 = CT12 +( 11 x tau/24 hrs. Posterior al inicio de actividad).

Para obtener la CRF a pulsos de luz se utilizó el siguiente protocolo; al sujeto se le colocó en luz roja tenue por 10 días, posteriormente se estimó CT 12 y el valor del periodo, con base a estos datos se calculó el valor de la hora circadiana seleccionada, se colocó al sujeto en una cámara que contenía en su interior una lámpara fluorescente la cual suministró una intensidad de 400 lux. Está estimulación tuvo una duración de 60 min. Posteriormente los sujetos regresaron a sus sitios de registro, se registraron por 20 días más y finalmente se determinó la dirección y magnitud del cambio de fase, tal como se indica en la sección de análisis y estadística

#### LESIÓN ELECTROLÍTICA

Previo a la cirugía, cada animal fue anestesiado con hidrato de cloral (40mg/Kg) y colocado en un aparato estereotáxico (Kopf). El PVT se lesionó por el paso de 1mA de corriente directa durante 45 seg a través de un electrodo de acero inoxidable (totalmente aislado con epor excepto a 1mm. de la punta). El electrodo se colocó en las siguientes coordenadas: Para el PVT medial-posterior AP=-2.4 mm a Bregma, L=0 y V=-5.4 mm y para el PVT anterior AP=-1 0 mm a Bregma, L=0 y V=-5.8 mm. Al terminar la cirugía los animales retornaron a sus cajas y no recibieron ninguna otra manipulación hasta despuna de dos semanas.

Para las lesiones falsas el controdo fue introducido en las coordenadas mencionadas en el párrafo anterior, pero no se aplicó corriente eléctrica alguna

#### IMPLANTACIÓN DE ELECTRODOS Y OF LULAS

Los sujetos fueron anestesia.... con midrato de cloral (40mg/Kg), y se les implantó estereotáxicamente un electrodo bipolar de cromo-niquel (300 micras de grosor) o bien una cánula de apero inexidable (calibre (ga) 25, 5mm. de largo) en el PVT anterior (coordenadas AP= 10 m/g 3 agenta L=0 y V= -5.8 mm); el electrodo o la cánula fueron fijados al cránso con forflico dental y 4 tornillos. Al final se soldó un conector a cada polo del electro lo por la cital se stimuló al sujeto. En el caso de la cánula se le insertó un alambre de a con inoxidable (ga 27) para evitar que se tapara.

#### ESTIMULACIÓN CON LUZ, ELÉCTRO CON CONTROL

Para la estimulación con luz mi colocida todos los sujetos en luz roja tenue durante 10 días, para observar a conscilidad de ritmo en oscilación espontánea; se obtuvo CT 12 y al día siguiente a conscilidad a aplicó el estímulo luminoso (400 lux) durante 60 minutos a partir de la face asignada. Después de la estimulación cada sujeto retornó a su caja, dono escencio en en en os durante 2 semanas, después de las cuales se determinó en ambie de fase.

La estimulación eléctrica cona lió an canactar al sujeto a un estimulador Grass bajo luz roja tenue y se le aptiva la tran de astímulos eléctricos de 0.3mA con una duración de 10 mseg, a una fraca acidado 0.5 Hz por 30 minutos. Al finalizar el



m + 3

PAPEL DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR TALÁMICO EN LA SINCRONIZACIÓN pulso el sujeto se le colocó nuevamente en su sitio de registro. La estimulación falsa consistió en el mismo procedimiento sólo que no se aplicó estímulo eléctrico alguno.

Para la estimulación química, los sujetos fueron inyectados a las horas pertinentes con 1  $\mu$ l de glutamato (1.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) disuelto en buffer fosfato salino a una velocidad de 0.2  $\mu$ l/min , usando un inyector (calibre 27) conectado a una microjeringa Hamilton de 1  $\mu$ l. Al finalizar la inyección el sujeto se regresó inmediatamente al sistema de registro. Para los sujetos con inyección control se utilizó el procedimiento anterior, pero se administró 1  $\mu$ l de vehículo (buffer fosfato salino 0.1 M ph 7.2)

#### SINCRONIZACIÓN, RESINCRONIZACIÓN Y FOTOPERIODO ESQUELETO.

La sincronización consistió en colocar los sujetos bajo luz roja tenue por 10 días, el cual se cambió a las 20:00 horas a un ciclo de luz-oscuridad (12:12, 8:00-20:00) durante 20 días, con el fin de evaluar el número de días (latencia) que tardó en sincronizarse al fotoperiodo. Posteriormente el fotoperiodo se retrasó 6 horas durante 20 días y se determinó la latencia de resincronización.

Con respecto al fotoperiodo esqueleto, este consistió en colocar al sujeto en luz roja tenue por 10 días, posteriormente se aplicaron pulsos de luz de 30 minutos de duración, cada 12 horas (8:00-8:30 AM y de 20:00-20:30 PM) por 20 días y se determinó la latencia de sincronización

Se consideró a un sujeto sincronizado o resincronizado cuando la fracción de actividad mostró un periodo de 24 hrs, con un ángulo de fase constante entre el inicio de la actividad y el inicio de la obscuridad, mantenido durante 10 días consecutivos. En el caso del fotoperiodo esqueleto se consideró a un sujeto sincronizado cuando la fracción de actividad muestra un periodo de 24 hrs, con un ángulo de fase constante entre el inicio de la actividad del sujeto y alguno de los dos pulsos, mantenido durante 10 días consecutivos.

#### HISTOLOGÍA.

Al finalizar los experimentos los sujetos fueron anestesiados con 1 ml (65 mg/ml) de pentobarbital sódico, inyectado intraperitonealmente, y perfundidos transcardiacamente con 250 ml de solución salina (0.9 %) seguido por 250 ml de paraformaldehido lisina periodato (PLP) en buffer fosfato 0.1 M. (ph 7.4).

#### PAPEL DEL NÚCLEO PARAVENTARE EL REFACACIO O EN LA SINCRONIZACIÓN

Los cerebros fueron extinados in colouados en saccirosa al 10% (en buffer fosfato salino, PBS) seguidos por saccinsa-Filial 20 y 30 %, cada uno por lo menos por 24 horas. Después de la chapitateción en sacarosa los cerebros fueron congelados en hielo seco y cortinio para filiamente en cajas multipozos de cultivo y finalmente fueron montados en protocujetos actividades de gitatina y se les realizó la tinción de Nissi (violeta de cipsión indicamente bajo un cubreobjetos para su posterior revisión bajo un micros applicá con (Clympus).

Para la reconstrucción bi torogi o en etilicó un corte cada 160 micras, los cuales fueron dibujados con un filibe de abullo er riba a un microscopio Olympus.

### ANÁLISTS Y ESTADISTICA

El análisis de las respuer de la secución de estimulación se realizó mediante un proceda de logración de consiste en regresiones lineales del inicio de alfa (CT 12) en braques de 10 días consecutros antes y después de cada estimulación, la diferencia de la valor de la cada dos fineres trazadas correspondió al valor del cambio de fase en haca

Los parámetros a estudinha a concer a spuesta de fase son la magnitud y dirección de los cambios de fase (con pues compos), así memo el número de días (ciclos transitorios) que ocurre e entre el acción y el establecimiento de una nueva fase estable.

Para analizar el curso temas de la su pronización a un fotoperiodo se evaluó el número de días (transitorios) que to la el rujoto en sincronizarse al fotoperiodo. Se consideró a un sujeto sincro en consecuente de la contividad y el início de la obscuridad, mantenido durante en la contracta de la contividad y el início de la obscuridad, mantenido durante en la contracta de la contividad y el início de la obscuridad.

Los resultados de estar a displanta se compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la final conceptas coost hoc "(Tukey) La significancia estadística se ajus la la de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de varianza (ANOVA) de la compararon mediante la prueba análisis de la compararon mediante la prueba análismo de la compararon mediante la compararon mediant



### RESULTADOS

## Experimento 1

Determinar la curva de respuesta de fase (CRF) a pulsos de luz de 60 minutos de duración en la cepa de rata Wistar.

## Diseño Experimental

Los sujetos fueron asignados aleatoriamente a las distintas horas que conforman a un ciclo circadiano. Se utilizaron 48 animales machos los cuales se colocaron en el sistema de registro a los 60 días de edad y se le registró la conducta de ingesta de agua de manera contínua por un periodo de 6 meses bajo luz roja tenue. Cada animal recibió un pulso de luz en 4 distintas horas circadianas, de tal manera que la CRF se construyo con 24 puntos (1 cada hora) y cada punto lo conformaron 8 sujetos. Los datos fueron gráficados en actogramas dobles, los cuales fueron analizados visualmente, posteriormente se determinó la magnitud y dirección del cambio de fase mediante un procedimiento gráfico descrito en la sección de métodos.

### Resultados

La arquitectura del ritmo circadiano conductual en ratas presenta algunas características especiales en comparación con el hamster y el ratón; el inicio de la fracción de actividad (el cual es el índice de fase más común) de la conducta de ingesta de agua no es muy claro, principalmente por la presencia de brotes de actividad esporádicos durante la fracción de reposo. Aparentemente esta actividad es aleatoria, con amplitud variable y en episodios de corta duración en la fracción de reposo, o bien con componentes de actividad bien definidos inmediatamente antes del ínicio de la fracción de actividad (componente de fuga). Este componente de fuga presentó una duración promedio de 1 hora y es seguida por un intervalo de inactividad de aproximadamente la misma duración; el periodo de este componente es usualmente más corto que el periodo que caracteriza a la



fracción de actividad, pero en algunos casos llegó a ser igual o ligeramente mas largo.

En la figura 3 se muestran ejemplos de animales que recibieron un pulso de luz en tres horas circadicas características. La CRF para la cepa Wistar se muestra en la figura 4. Esta presentó una región con avances de fase muy pequeños y variables entre CT 1 y CT 7, lo cual corresponde a la zona muerta. El punto de transición a la región de los retrasos se encontró en CT 7-8. La región de los retrasos correspondió de CT 9 a CT 16 con cambios de fase de una magnitud de 90 a 120 minutos. En CT 17 ocurrió una transición abrupta de retrasos a adelantos de fase. La región de los avances se observó entre CT 17 a CT 0 con cambios de fase de 90-120 minutos.

Con base en estos datos se seleccionaron las fases de CT6, 12 y 23, como las representativas de cada zona de la curva de respuesta de fase a la luz.

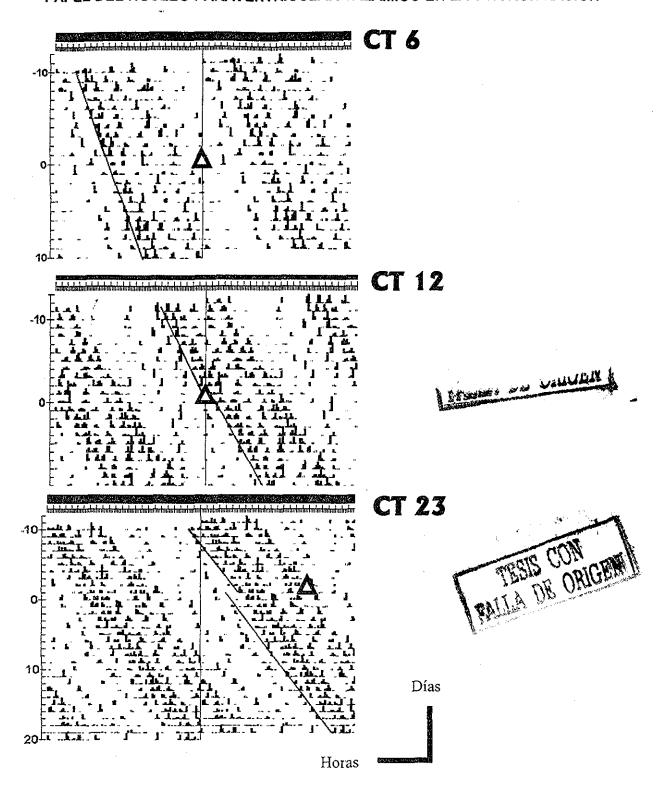


Figura 3 Actogramas representativos del registro de ingesta de agua de tres ratas que recibieron un pulso de luz en tres horas circadianas distintas. En el panel superior se aplicó un pulso de luz (400 lux-60 min.) en CT 6 (indicado por el triángulo) en donde no se observó cambio de fase alguno, en cambio en el panel de en medio y en el inferior se observó un retraso y un avance de fase respectivamente debido a que se aplicó un pulso de luz en CT 12 y CT 23.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

### Curva de Respuesta de Fase a la Luz en Rata

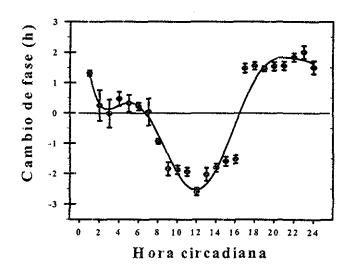


Figura 4. Curva de respuesta de fase a la luz (400 lux-60 min.) en la rata. Los avances se indican con valores positivos, los retrasos con valores negativos. En cada punto se indica la media ± error estándar, n=8. En esta gráfica se observan tres regiones, una región con avances de fase muy pequeños que correspondería a la zona muerta, una región en donde se observan retrasos de fase (CT 9-16) y una región con adelantos de fase que corresponderían a CT 17 a CT 0

#### Experimento 2

Experimento 2.1-- La primera etapa del experimente se realizó con el fin de obtener la respuesta de fase a estímulos luminosos en tres puntos de la curva de respuesta de fase en sujetos con lesión electrolítica del PVT medial-posterior y anterior.

## Diseño Experimental

Para la primera etapa se procedió a usar un diseño mixto, con grupos independientes y de medidas repetidas. Se utilizaron 27 ratas, las cuales fueron divididas en tres grupos; a) Con lesión del PVT medial-posterior, b) con lesión del PVT anterior, y c) con lesión falsa, cada grupo con una n=9. El estudio inició en luz roja tenue por un periodo de 10 días, posteriormente se les aplicó un pulso de luz (400 lux, 60 minutos) a la hora circadiana seleccionada (CT 6, 12 ó 23) en un orden aleatorio, y se registró por otros 20 días. De tal forma que cada sujeto recibió un pulso de luz en cada hora circadiana. La dirección y magnitud de los cambios de fase fueron medidas por un procedimiento gráfico (ver métodos).

### Resultados

El examen visual del registro de todos los sujetos antes y después del pulso de luz mostró una arquitectura del ritmo de ingesta de agua bien definida, presentándose varios componentes que se compactaban en un solo bloque de actividad que se mantuvo a lo largo de todo el registro.

La duración de alfa y de rho del ritmo de ingesta de agua en los días de registro (10 días) previa al pulso de luz fue muy estable entre los sujetos; después del pulso de luz, la duración de alfa fue ligeramente mayor que rho; esta arquitectura se mantuvo en todos los sujetos, tanto lesionados como con lesión falsa.

El análisis histológico reveló que de los nueve sujetos con lesión electrolítica del PVT medial-posterior seis presentaron lesión completa de esta región, y tres lesión parcial. De los sujetos con lesión completa del PVT medial-posterior en 3 de ellos la lesión fue extensa involucrando otras regiones del tálamo medial como el n. paratenial, el n. intermediodorsal, el n. habenular lateral y el n.

mediodorsal. En los sujetos restantes la lesión fue más localizada dañando la mayor parte del PVT medial-posterior, sin perjudicar el resto del tálamo medial. (Fig. 5)

Con respecto a los sujetos con lesión del PVT anterior, de los nueve sujetos lesionados sólo cinco presentaron la lesión completa de esta región, tres mostraron una lesión parcial y en un sujeto la lesión no abarcó un porcentaje considerable del núcleo. La lesión completa abarcó a núcleos como el paratenial, el paracentral, el centromedial, el medio dorsal, el anteromedial, el n. habenular medial y la estría terminalis. En algunos casos la lesión fue más limitada, abarcando al núcleo paratenial, al centromedial y al mediodorsal. Las lesiones parciales solo involucraron la región dorsal del PVT anterior (Fig. 6).

Todos los sujetos que presentaron lesión parcial se excluyeron del estudio, por lo tanto quedaron 6 sujetos para el grupo PVT medial-posterior y 5 para el grupo PVT anterior.

En los sujetos con lesión falsa, la estimulación con pulsos discretos de luz en el día subjetivo (CT 6) produjo pequeños cambios de fase de una magnitud de –6 67±5.65 min. En cambio cuando se presentaron estos pulsos en la noche subjetiva temprana (CT 12) o en la noche subjetiva tardía (CT 23) se produjeron retrasos (-102.50±5.60 min) y adelantos de fase (+98.33±5.92 min) respectivamente (Fig. 7).

Los sujetos con lesión completa de la región medial-posterior del PVT, respondieron a los pulsos de luz aplicados en CT 6 (12.50±6.02 min) y CT 12 (-86.66±4.59 min) con cambios de fase de magnitud similar a la de los sujetos con lesión falsa, sin embargo en CT 23 se produjeron adelantos de fase de magnitud significativamente mayor (+140.62±9.76. min F(8,51)=124.711;p<0.0001; Tukey p<0.01) que los sujetos con lesión falsa (Fig. 8).

La lesión de la región anterior del PVT, produjo respuestas de fase a pulsos de luz muy similares en CT6 (-13.50±7.64 min) y en CT12 (-109.75±6.71 min) a las de los sujetos con lesión falsa, en cambio en CT23 el pulso de luz produjo retrasos de fase (-113.50±22.06 min), en lugar de los avances esperados, siendo estos cambios significativos (F(8,51)=124.711;p<0.0001; Tukey p<0.001) (Fig. 9). Como era de esperarse se presentaron diferencias significativas en CT23 entre los grupos con lesión del PVT medial-posterior y anterior (F(8,51)=124.711;p<0.0001; Tukey p<0.001). Estos resultados se resumen en la figura 10.

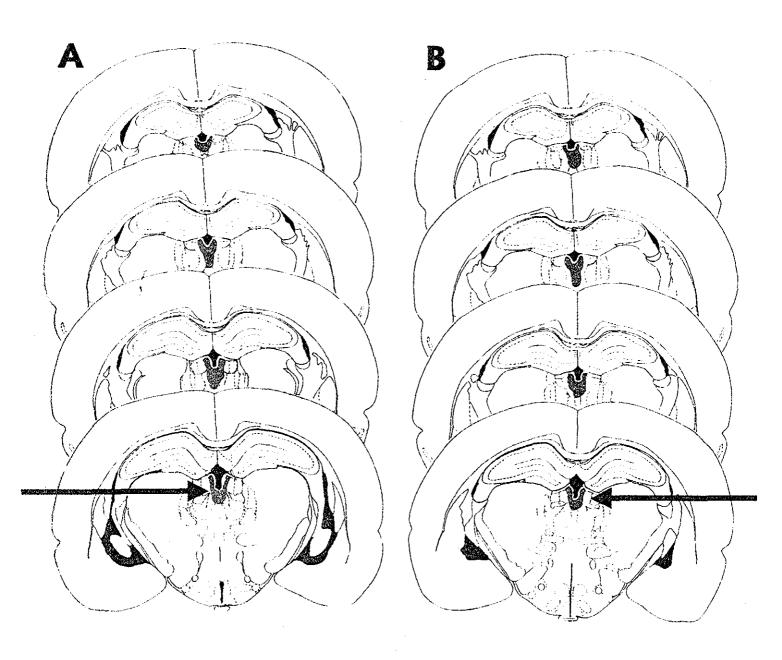


Figura 5 Reconstrucción histológica de cortes corónales del cerebro de 2 sujetos bien lesionados, los cuales recibieron una lesión electrolítica en el PVT medial-posterior. La región sombreada (indicado por la flecha) correspondió al sitio exacto de la lesión; en el panel A se muestra un sujeto con una lesión extensa del PVT medial-posterior; en el panel B se muestra un sujeto con una lesión menos extensa del mismo.

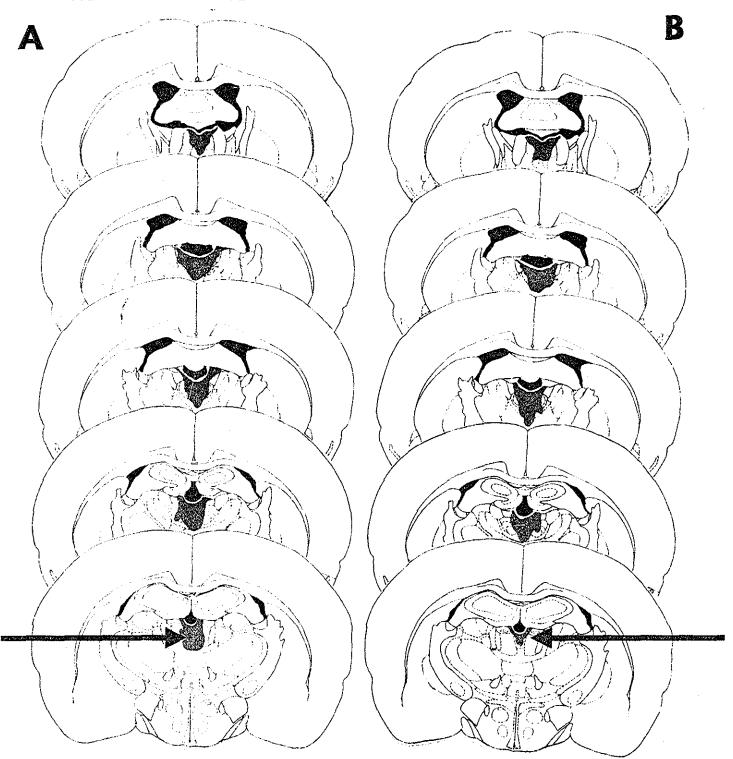


Figura 6 Reconstrucción histológica de cortes corónales del cerebro de 2 sujetos bien lesionados, los cuales recibieron una lesión electrolítica en el PVT anterior. La región sombreada (indicado por la flecha) correspondió al sitio exacto de la lesión; en el panel A se muestra un sujeto con una lesión extensa en el eje antero-posterior del PVT anterior; en el panel B se muestra un sujeto con una lesión menos extensa del mismo.



Experimento 2.2-- La segunda etapa del experimento se realizo, con el fin de establecer el efecto de la lesion electrolítica del PVII anterior sobre la sincronización a diversos fotoperiodos (completo y esqueleto), y determinar la velocidad de resincronización de estos sujetos ante un cambio de fase.

# Diseño Experimental

Para la segunda etapa se usaron dos grupos; a) Con lesión del PVT anterior y b) con lesión falsa, cada grupo con una n=9. Está inició en luz roja tenue por un periodo de 10 días, posteriormente a las 20 horas se inició el fotoperiodo 12:12; iniciando la fase de luz a las 8:00 a.m. y la fase de oscuridad a las 20:00 p.m.; se registró por otros 20 días; al final del mismo se determinó la latencia de sincronización al fotoperiodo por un procedimiento gráfico (ver métodos). Una vez que los sujetos estuvieron sincronizados se retrasó 6 horas el inicio del fotoperiodo, iniciando la luz a las 14:00 p.m. y la oscuridad a las 06:00 a.m. y se determinó nuevamente la latencia a la resincronización (ver métodos).

Finalmente a estos dos grupos, se les midió la conducta de ingesta de agua en luz roja tenue por un periodo de 10 días, posteriormente se sometieron a un fotoperiodo esqueleto, iniciando un pulso de luz de las 8:00 a.m. a las 8:30 a.m. y el otro pulso de las 20:00 p.m a las 20:30 p m, se registró por otros 20 días más y al final del mismo se medió la latencia de sincronización al fotoperiodo por un procedimiento gráfico (ver métodos). Finalmente sé perfundieron los sujetos y se realizó la histología con la tinción de Nissl, para identificar la región lesionada.

### Resultados

Al inicio del experimento los sujetos del grupo con lesión falsa presentaron un ritmo en oscilación espontánea, después de iniciado el fotoperiodo (L:O 12:12) algunos componentes se mantuvieron algunos días en fase transitoria antes de establecer una relación de fase estable entre el inicio de la actividad y el inicio de la oscuridad del fotoperiodo, siendo esto cada vez más preciso para finalmente mostrar una clara sincronización al fotoperiodo (Fig. 11 A).



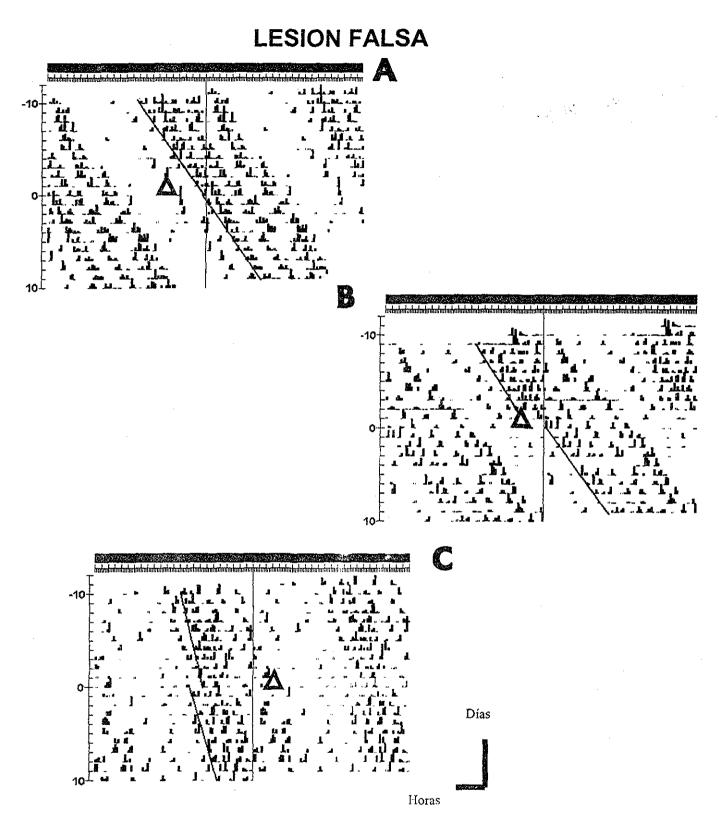


Figura 7. Registros representativos de la conducta de ingesta de agua de sujetos con lesión falsa del PVT. En el panel A se aplico un pulso de luz (400lux-60 min., Indicado por él triángulo) en CT 6, el cual no produjo cambio de fase alguno, sin embargo en CT 12 (B) y CT 23 (C) el pulso de luz, produjo cambios de fase típicos de estas horas circadianas.

### **LESION PVT MEDIAL**

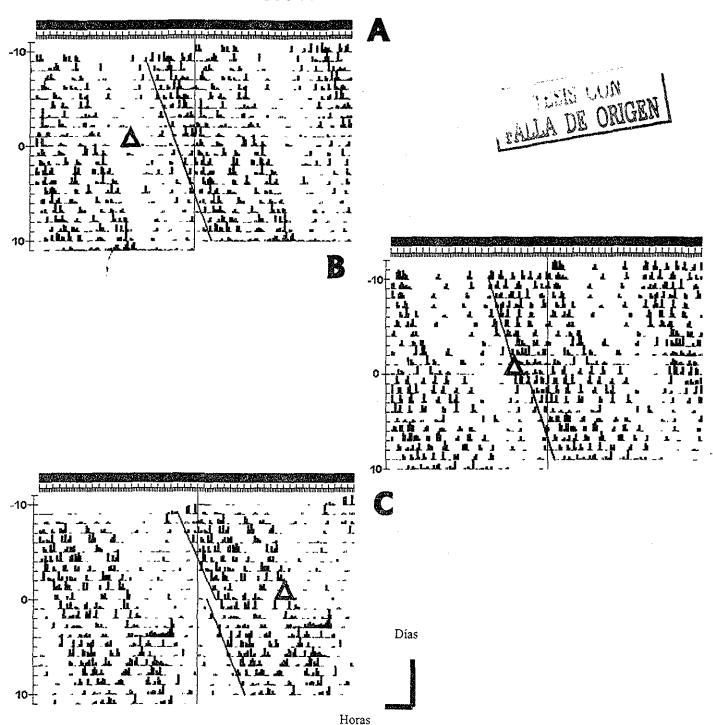


Figura 8 Actogramas representativos de sujetos con lesión electrolítica en el PVT medial-posterior. En el panel A se muestra un sujeto expuesto a un pulso de luz (indicado por él triángulo) en CT 6, el cual no produjo cambio de fase alguno, en el panel B se muestra un sujeto con un pulso de luz en CT 12, en el cual se observa un retraso de fase; en el panel C se muestra un adelanto de fase debido a la aplicación de un pulso de luz en CT 23

### **LESIÓN PVT ANTERIOR**

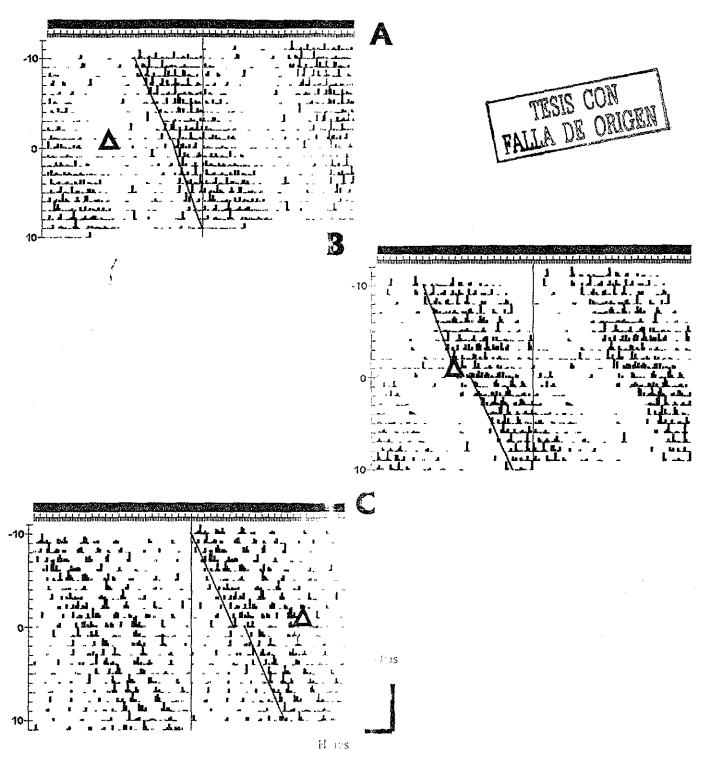


Figura 9 Actogramas representativos deble plot de sujetos con lesión electrolítica en el PVT anterior. En el panel A se muestra un sujeto enpuesto a un pulso de luz (indicado por él triángulo) en CT 6, el cual no produjo cambios de fase alguno, en el panel B se muestra un sujeto con un pulso de luz en CT 12, en el cual se observa un retraso de fase; en el panel C, en cambio el pulso de luz dado en CT 23 ocasionó un retraso de fase en lugar de los avances de fase esperados.

# Curva de respuesta de fase a la luz en sujetos con lesión del PVT

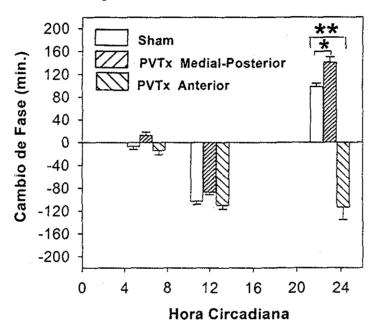


Fig. 10 Curva de respuesta de fase de sujetos con lesión falsa (n=9) y con lesión electrolítica del PVT medial-posterior (n=6) y anterior (n=5). Las barras representan el promedio± error estándar de cada grupo experimental, en donde se observa la presencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales en CT 23 (F(8,51)=124.711;p<0.0001; Tukey p<0.001) \* indica las diferencias entre el grupo con lesión del PVT medial-posterior y el grupo con lesión falsa; \*\* indica las diferencias entre el grupo con lesión del PVT anterior y el grupo con lesión falsa.

En los sujetos con lesión del PVT anterior, al inicio del fotoperiodo (12:12), la actividad del animal se separó en dos componentes, uno se ajustaba casi inmediatamente al inicio de la oscuridad, en tanto que el otro presentaba varios ciclos transitorios antes de estables, una relación de fase estable. En algunos sujetos se mantuvo un solo bloque de actividad, cuyo inicio se sincronizaba casi inmediatamente, pero el final de la actividad presentó varios ciclos transitorios antes de ajustar su fase en forma estable (Fig. 11 B)

El análisis de latencias reveló que en el caso de los sujetos con lesión falsa presentaron un valor promedio de 2.0±0.49 días para poder sincronizarse al fotoperiodo, en cambio los sujetos con lesión completa del PVT anterior presentaron un valor promedio de 2.33±0.47 días para sincronizar el primer componente de actividad (figura 13) La diferencia entre los dos grupos fue significativa (t=3.78, df=9, p<0.001). Estos detos hacen contemplar la posibilidad de un proceso de enmascaramiento en la respuesta de los sujetos con lesión del PVT anterior al fotoperiodo completo.

En la figura 13 se presentan las fases (CT 12) en las que se encontraban los sujetos justo el día en que se establació el fotoperiodo, en donde se pudo observar que ambos grupos se encontraban emy cerca del apagado de las luces (0°), por lo que las diferencias obser adas en el valor de latencias entre los dos grupos no son debidas a que el grupo experimental se encontraba cerca de los 0°.

Posteriormente se procedió a retrasar. 6 horas el inicio del fotoperiodo, en donde los sujetos con lesión falsa mostrara en na clara sincronización después de algunos ciclos transitorios, para finalmenta establecer una relación de fase estable entre el inicio de la actividad y el inicio de la actividad y el inicio de la actividad.

En cambio los sujetos lesionados presentaron una respuesta bifásica, primero respondían casi inmedia amente al retraso en el fotoperiodo, estableciendo una relación de fase de comente estable entre el inicio del fotoperiodo y la conducta del sujeto de comente el final de alfa pareció que en algunos sujetos tardaron varios clabas en mostrar una relación de fase constante con el nuevo fotoperiodo, a pesar de que di inicio de alfa se encontró sincronizado a la oscuridad (Fig. 14 B).

El análisis de latencias reselégia de la caso de los sujetos con lesión falsa presentaron un valor promedio de 3.70 d.35 días para poder sincronizarse al retraso en el fotoperiodo en carrollo de la caso de lesionados presentaron un valor promedio de 1.66+0.29 días para cintra de la caso de la fase de actividad (Fig. 15). Esta diferencia fue significativa (t=4.24 d=10, p<0.0007).



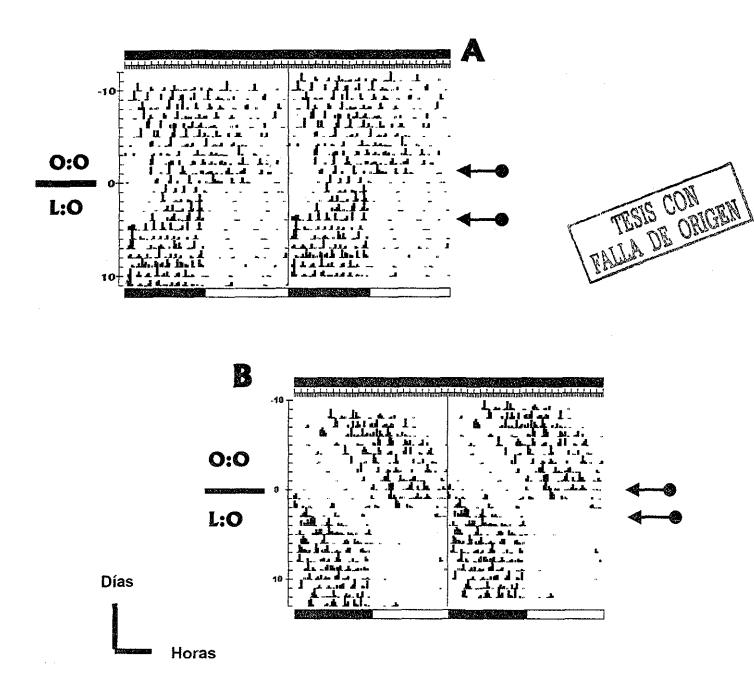


Figura 11 Actogramas representativos de sujetos con lesión falsa (A) y electrolítica (B) del PVT anterior, los cuales se encontraban los primeros días en O:O, posteriormente se inició un ciclo L:O (indicado por la barra) con el fin de sincronizar el ritmo de ingesta de agua; los días que tardó (latencia) en establecerse un estado sincronizado es indicado por las flechas

Finalmente se procedió a colocar a los sujetos en un fotoperiodo esqueleto con el fin de determinar si los sujetos con esión electrolítica del PVT anterior presentaban enmascaramiento a foto a sujetos.

estímulo, todos los sujetos con lesión talso mostraron un ritmo en oscilación espontánea; al iniciar el fotoperiodo esqueleto dichos sujetos mostraron un alargamiento en el periodo y varios croros transitorios antes de poder sincronizarse al fotoperiodo esqueleto (Fig 16 Apara to condicion una vez alcanzada, se mantuvo por el resto del registro. El análisis remisicade para este fotoperiodo los sujetos con lesión falsa requirieron de 11 16 ±0 10 d as imedia±es) para sincronizarse. En cambio los sujetos con lesión constato del PVT anterior, se presentaron variaciones en la fase de inicio de a forma del PVT anterior, se presentaron variaciones en la fase de inicio de a forma (CHO 40 días).

En la figura 17 se muestra la prema de la latencia (medida en días) a la sincronización a un fotoperiodo es plejeto. La qual muestra que los sujetos lesionados tardaron menos días en notacada que los sujetos con lesión falsa en sincronizarse al fotoperiodo esque oto plasta diferencia fue estadísticamente significativa. (t=2.54, df 8, p <0.001)

La fase en la que se encor ada dada sujeto al inicio del fotoperiodo esqueleto es presentada en la figura di canada se pudo observar que ambos grupos se encontraban muy decca da la color de se pulsos que se les aplicaron (0°), por lo que las diferencias obsenvante que allor de latencias entre los dos grupos no son debidas a que se pal jactoro experimental se encontraba cerca de alguno de dos pulsos(0°).



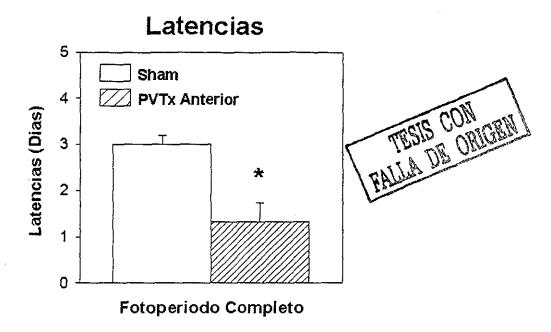


Figura 12 Promedio del número de días que tardó (Latencia) el ritmo de ingesta de agua en sincronizarse a un ciclo L:O en sujetos con lesión falsa (n=9) y electrolítica del PVT anterior (n=5). El asterisco indica las diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (T=3.78, df=9 p 0.001).

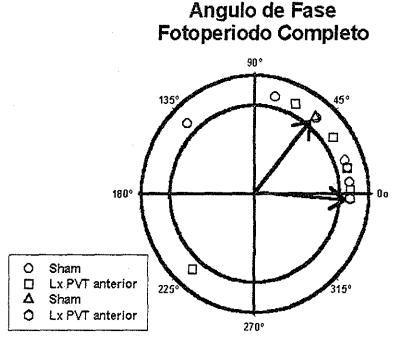
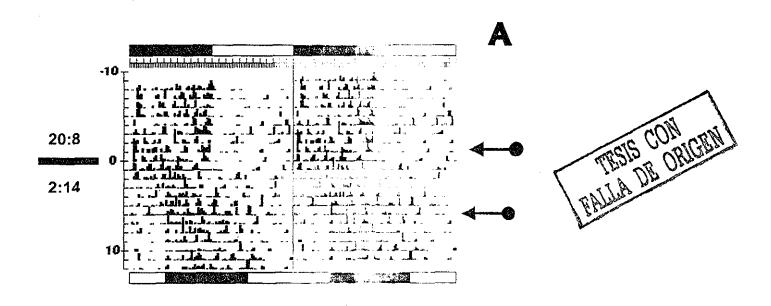


Fig. 13 Gráfica que indica la distribución a lo largo de un ciclo del inicio de la fracción de actividad (dada en grados) de cada sujeto en cada grupo experimental en el momento de iniciar el fotoperíodo completo, así como su promedio (indicado por las flechas), en donde se observa que ambas poblaciones de sujetos se encontraban muy cerca al pulso al que se sincronizaron (0°)



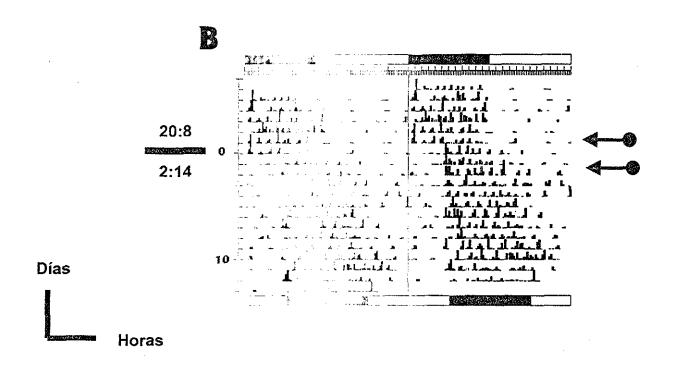


Figura 14 Registros representati os de se expusión falsa (A) y electrolítica (B) del PVT anterior, a los cuales se les expusión del fotoperíodo completo (indicado por la barra), las flechas indican los del confidencia del fotoperíodo completo (indicado por la barra), las flechas indican los del confidencia del fotoperíodo completo (indicado por la barra).

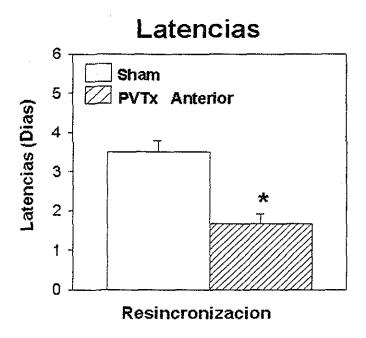


Figura 15. Gráfica que representa la media del número de días (barras) que tardó en sincronizarse cada grupo experimental (n=9 y n=5), cuando se le expuso a un retraso en el inicio del fotoperiodo El asterisco indica las diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (T=4.24, df=9 p 0.0001)

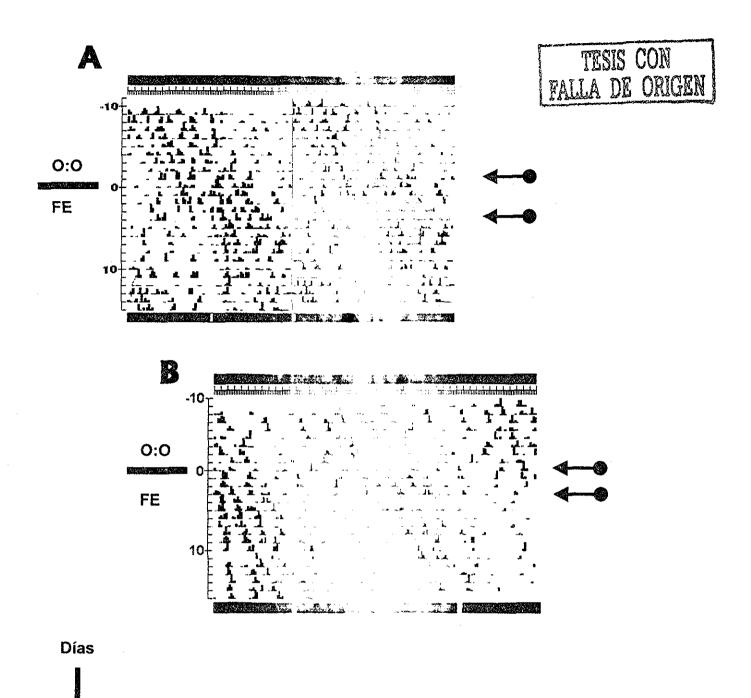


Figura 16 Actogramas representations de la filia del filia de la filia de la filia de la filia del filia de la fil

Horas

# Latencias

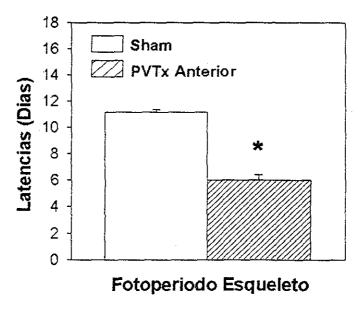


Figura 17. Gráfica del número de días que tardaron los sujetos de cada grupo experimental en sincronizarse a un fotoperiodo esqueleto. El asterisco señala las diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (t=2.54, df 8, p <0.001)

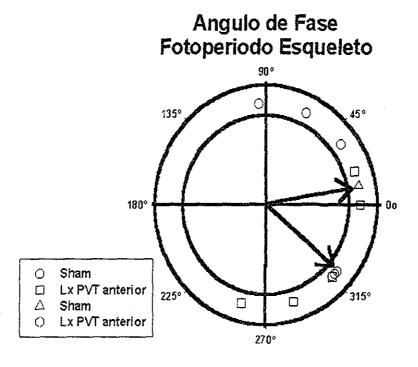


Figura 18. Gráfica que indica la distribución a lo largo de un ciclo del inicio de la fracción de actividad (dada en grados) de cada sujeto de cada grupo experimental en el momento de iniciado el fotoperiodo esqueleto, así como su promedio (indicado por las flechas), en donde se observa que ambas poblaciones de sujetos se encontraban muy cerca al pulso que se sincronizó cada rata

# Conference (Conference

Experimento 3.1 - La primera etapa del experimento consistió en estimar la respuesta de fase, para estimulos electricos en el PVT anterior, en tres puntos de la curva de respuesta de fase

# Diseño Experimental

Se uso un diseño de muestras repetidas, en donde se utilizaron 9 ratas machos, a las cuales se les implantó un electrodo en el PVT anterior. El estudio inició en luz roja tenue por un periodo de 10 días, posteriormente se le aplicó un pulso de corriente eléctrica, y se registró por otros 20 días; al final del mismo la dirección y la magnitud del cambio de fase fueron medidas por un procedimiento gráfico (ver métodos). El protocolo se repitió, de tal forma que cada animal recibió un pulso eléctrico en cada hora circadiana (CT 6, 12 y 23) y un pulso falso. Posteriormente sé perfundieron los sujetos y sé realizó la histología para la tinción de Nissl, finalmente se elaboró la reconstrucción histologica de la región implantada.

# Resultados

La arquitectura del ritmo circadiano de ingesta de agua fue el mismo que los sujetos de los experimentos anteriores

La histología demostró que el electrodo se localizó en la región dorsal del PVT anterior en 8 de 9 animales, en este último la localización del electrodo se encontró a un costado del mismo, este sujeto no se utilizó para ningún análisis posterior. (Fig. 19)



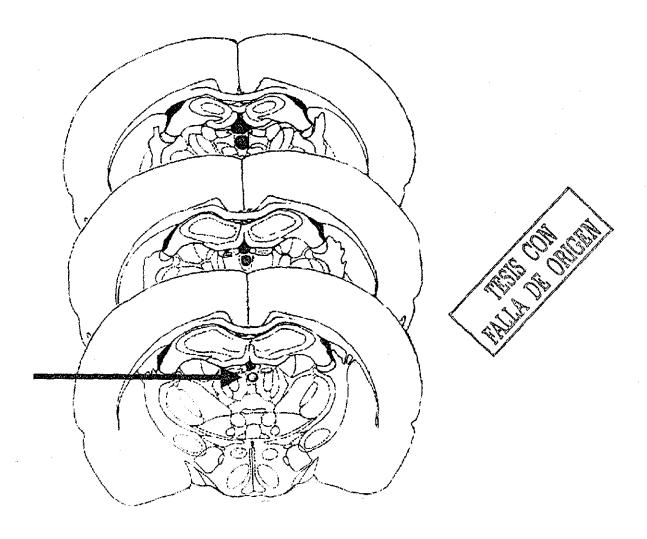


Figura 19 Reconstrucción histológica de cortes corónales del cerebro de una rata con un electrodo implantado en el PVT anterior. El círculo (indicado por la flecha) corresponde al área en la que se encontraron los electrodos

En la figura 20 se muestran ejemplos conductuales representativos de sujetos a los cuales se les aplicó el estímulo eléctrico en las horas circadianas estudiadas.

La manipulación sin estimulación eléctrica no produjo cambios de fase en las horas circadianas utilizadas; la estimulación eléctrica que se aplicó en CT 6 no causó una evidente respuesta de fase, cuando la estimulación se aplicó en CT 12 y 23 se presentaron cambios de fase similares a las producidas por pulsos de luz; el retraso de fase fue de -97 50±5 66 y los adelantos de fase de +112 50±19 43 min, estás respuestas de fase fueron estadísticamente significativas (F(3,28) =58.222, p<0 0001; Tukey) p<0 0001; figura 21)

**Experimento 3.2--** La segunda etapa del experimento consistió en caracterizar la respuesta de fase para estímulos químicos (glutamato) en el PVT anterior en tres puntos de la curva de respuesta de fase

# Diseño Experimental

Este consistió en un diseño de grupos independientes, en donde se utilizaron 27 ratas machos, las cuales fueron divididas en tres grupos dependiendo de las horas circadianas utilizadas (CT 6, 12 y 23), cada grupo tuvo una n=9 El estudio inició en luz roja tenue durante un período de 10 días, posteriormente se le aplicó una inyección intracerebral de glutamato y se registró por otros 20 días; al final del mismo se midió la dirección y la magnitud del cambio de fase por un procedimiento gráfico (ver métodos). Posteriormente a cada animal nuevamente se le aplicó una inyección de vehículo y se registró por otros 20 días. Finalmente sé perfundieron los sujetos y sé realizó la histología con la tinción de Nissl, para elaborar la reconstrucción histológica de la región implantada.



# Resultados

La reconstrucción de la zona de inyección reveló que para el grupo de CT 6 de los 9 animales implantados sólo 7 se encontraron en la región del PVT anterior, en los otros 2 sujetos la cánula quedó a un costado del sitio de inyección, en el caso de CT 12 y 23 de los nueve animales implantados sólo en un animal la cánula quedó fuera de nucleo (Fig. 22); los sujetos que se localizaron fuera de la región de estudio fueron eliminados de análisis posteriores.

En la figura 23 se muestran ejemplos representativos de la conducta de ingesta de agua de sujetos con inyección de glutamato

La inyección de vehículo no produjo respuesta de fase en las tres horas circadianas utilizadas. Por otro lado la estimulación con glutamato en CT 6 indujo una ligera respuesta de fase (-10.714±9 091) en cambio en CT 12 y 23 se presentaron cambios de fase evidentes, siendo, el retraso de una magnitud de – 60.00±18.028 min y los adelantos de fase de +91 667±5.27 min; estas respuestas fueron estadísticamente significativas (F(5,41)=23.77;p<0.0001; Tukey p<0.001). Fig. 24).



Figura 20 Actogramas representativos de sujetos con un electrodo implantado en el PVT anterior a través del cual se estimulo eléctricamente a este nucleo en tres horas circadianas. En el panel A se muestra un sujeto al cual se le aplicó un estímulo eléctrico (0.3 mA. cada 2 mseg./30 min.) indicado por él triangulo en CT 6, en el panel B y C se presentan sujetos con un pulso eléctrico en CT 12 y 23 en donde se observó un claro retraso y adelanto de fase respectivamente.

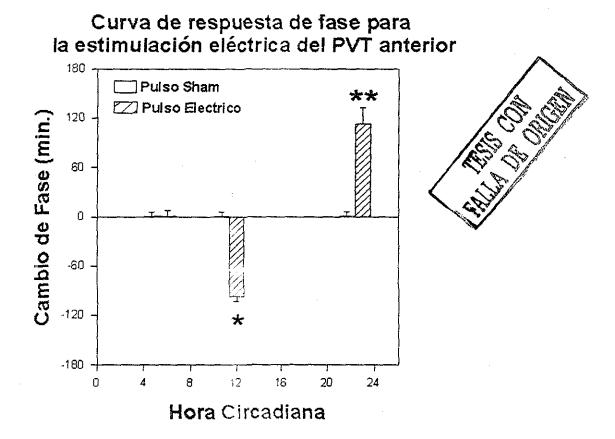


Fig. 21 Representación gráfica del promedio de la respuesta de fase de sujetos con un electrodo implantado en el PVT anterior n= 9, en donde se observa que los pulsos eléctricos producen una CRF similar a la de la luz, en donde CT 6 no produce cambios de fase, en CT 12 retrasos y en CT 23 adelantos de fase significativos (F(3,34) =58.222, p<0.0001; Tukey p<0.0001).

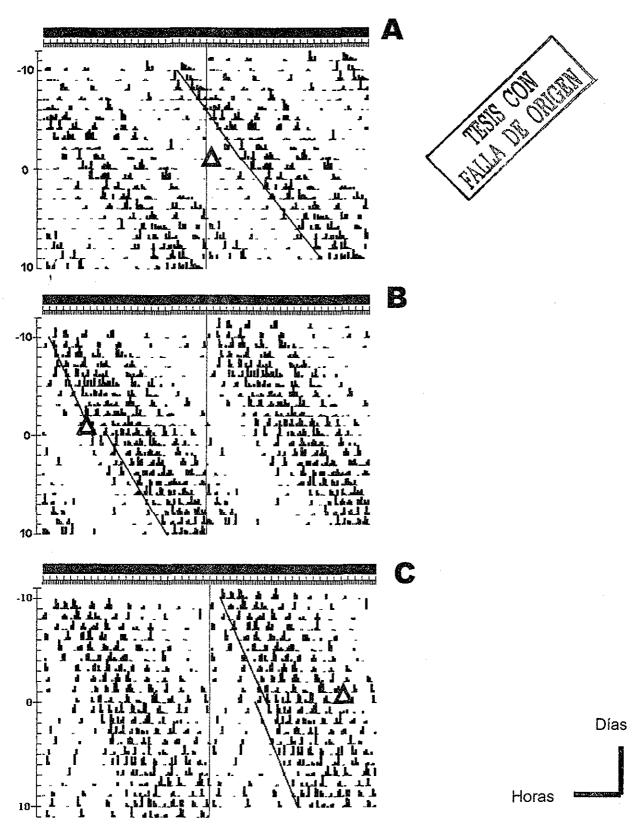


Fig. 23 Registros representativos de sujetos con una cánula implantada en el PVT anterior a través del cual se les inyectó glutamato (1ul) en tres horas circadianas, indicado por él triángulo La inyección dada en CT 6 no produjo ningún efecto, en cambio la inyección dada en CT 12 ocasiona evidentes retrasos de fase y en CT 23 adelantos de la misma.

# Curva de respuesta de fase para pulsos de glutamato en el PVT anterior

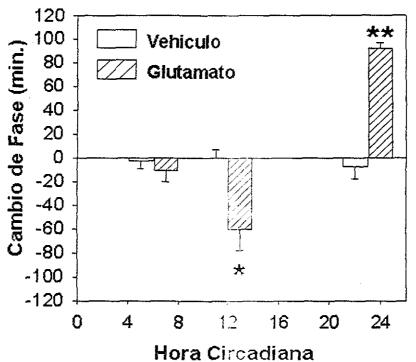


Fig. 24 Representación gráfica del promedo de la respuesta de fase de sujetos con una cánula implantada en el PVT anterior, en donde se observó que las inyecciones de glutamato también producen una CRF sin llar a la de la luz, en donde CT 6 (n=9) no produjo cambios de fase; en CT 12 (n=9) no retrasos y en CT 23 (n=9) adelantos de fase (F(5,41)=23.19;p<0.0001; Tukey p<0.001).

# TESIS CON LILA DE ORIGEN

# DESCRIPTION

Los resultados del presente trabajo demostraron que el PVT es un componente integral de los circuitos neurales que median los efectos de la luz sobre el sistema circadiano en la rata. El papel del PVT parece ser complejo ya que tanto los cambios de fase como la sincronización a un ciclo L:O son afectados por la lesión.

La lesión del PVT anterior alteró la dirección de las respuestas de fase del reloj biológico en respuesta a pulsos de luz aplicados en la noche subjetiva tardía (CT 23); la alteración en la respuesta de fase depende de la región del PVT que se lesionó no encontrándose efectos cuando se lesionaba el PVT medial-posterior.

De esta forma cuando se lesionó la región medial-posterior del PVT y se aplicó un pulso de luz (400 lux, 60 min.) en CT 23 se presentó un aumento significativo en los avances de fase con respecto al grupo con lesión falsa, en cambio cuando se lesionó la región anterior del PVT y se aplicó el estímulo luminoso, la dirección del cambio de fase se invirtió, obteniendo retrasos de fase de una magnitud similar a cuando se estimulaba en la noche subjetiva temprana (CT 12), este efecto sobre la dirección no se ha reportado en la lesión de otra estructura relacionada con el sistema circadiano; siendo que cuando se lesiona electrólíticamente la HIG o el NRD por administración de 5,7DHT en hamster y se aplican pulsos de luz en la noche subjetiva tardía, se observa disminución en la magnitud de los avances de fase (Pickard y Cols. 1987), pero no se presentan cambios en la dirección de la respuesta de fase. Por otro lado, el efecto de la lesión del PVT sobre la región de retrasos de fase (noche subjetiva temprana) fue nulo en ambas regiones del PVT, estos resultados coinciden con los reportes que indican que la lesión de la HIG no presenta efectos sobre la magnitud de los retrasos de fase (Harrington y Rusak, 1986), sin embargo otros reportes, que involucran la lesión de la HIG (Pickard y Cols. 1987) y del MRN (Morin y Blanchard, 1991) muestran que la lesión de estas estructuras aumenta la magnitud de los retrasos de fase

Estos resultados sugieren que el PVT modula las respuestas de fase del NSQ a la luz, de manera diferente a como las modulan la EEG o el NRD. El aumento en la magnitud o el cambio en la dirección de los avances de fase podría ser debido a que la sensibilidad del reloj biológico a la luz en la noce el subjetiva tardía se ve alterada por la lesión del PVT.

La alteración en la sensibilidad del reloj biológico podría estar relacionada con eventos que están involucrados en el proceso de sincronización, como podría ser la activación de las diferentes vías intracelulares de señalización, como los segundos mensajeros, necesarios para reinstalar la fase del reloj biológico. Se ha determinado que la activación de estas vías intracelulares está restringidas a ciertas fases del ciclo o dominios temporales (Gillete y Prosser, 1988; Prosser y Gillette, 1989; Gillette, 1996). Estos dominios están relacionados con las fases del ciclo en las que el reloj biológico es susceptible a cambiar su fase por estímulos luminosos y con periodos de sensibilidad a sistemas específicos de neurotransmisión. Estos cambios en la sensibilidad del marcapasos van a permitir que la información sea filtrada temporalmente para que pueda tener acceso a los mecanismos intrínsecos del reloj y modificar su fase (Gillette et al. 1995).

Durante el día subjetivo el NSQ expresa una sensibilidad bien caracterizada a tratamientos que afectan a las vías reguladas por el AMPc; la aplicación de análogos del AMPc a la mitad del día subjetivo estimula a una proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc lo cual causa adelantos de fase del ritmo de actividad neuronal (Gillette y Prosser, 1989; ; Prosser y Gillette, 1989).

Cuando se inicia la noche subjetiva la sensibilidad del NSQ a estímulos que reinicien la fase cambia notablemente, la sensibilidad a la estimulación vía AMPc disminuye (Prosser y Cols, 1989) y simultáneamente el NSQ aumenta su sensibilidad a elementos que responden a la estimulación a agonistas glutamatérgicos; como se señaló previamente el glutamato es el principal neurotransmisor del TRH y se ha encontrado que en el NSQ se expresan varias formas de receptores ionotrópicos a glutamato, como los NMDA y no NMDA (Hastings et al. 1996; Mikkelsen et al. 1995). La aplicación intracerebral de antagonistas glutamatérgicos que interactuan con ambos tipos de receptores ionotrópicos bloquean las respuestas de fase inducidas por luz (Colwell y Menaker, 1992), in vitro la aplicación de glutamato produce cambios de fase en el ritmo de actividad eléctrica del NSQ similares a los producidos por pulsos de luz (Ding et al 1994; Shirakawa y Moore, 1994). Por lo que se considera al glutamato como el primer evento de la cascada de señales que llevan a la regulación de la fase del marcapasos en mamíferos.

Al parecer los elementos que participan en esta vía de señalamiento intracelular en el NSQ son diferentes para que pueda ser inducido un retraso o un avance de fase por la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva.

En el caso de los retrasos de fase, la vía de transducción de señales es iniciada con la liberación de glutamato, lo cual induce la activación de canales intracelulares de ryanodina (RyR) en el NSQ a través de los cuales se libera calcio (Ca<sup>2+</sup>) de los depósitos intracelulares para producir un retraso de fase. El paso

intermedio entre el glutamato y RyR aún no se conoce, pero se considera que un posible candidato sea el oxido nítrico (NO) el cual a su vez estimularía la vía que involucra a la ribosil ciclasa (ADR), o bien que actue directamente sobre RyR. Por lo que se sugiere que la activación de RyR contribuye a car la dirección en el cambio de fase expresado por el marcapasos (Diaz-Niuñoz y 1999; Ding y cols. 1999).

Por otra parte, la administración de pulsos breves de luz durante la noche subjetiva tardía, fase en la que se inducen adelantos de fase conductuales, se produce la liberación de glutamato de las proyecciones de TRH, y la unión de éste al receptor NMDA en el NSQ produce la entrada de caso (Ca2+) extracelular (Bading et. al. 1993, 1995) que a su vez produce la activación 🕾 🗈 oxido nítrico sintetasa (NOS) que sintetiza al oxido nítrico (NO) el cual es una cesal parácrina gaseosa que se difunde libremente fuera de la célula que lo sintetiza como a células circundantes (Brendt y Snyder, 1992). Esta puede ser la señal a finaria que media él reinicio del reloi. A su vez el NO activa a la quanilil ciclase pre que aumentan los niveles de cGMP, este aumento induce la activación de la comeína quinasa dependiente de GMPc (PKG).

Las acciones posteriores a la activación de estos elementos incluyen la activación de la proteína de unión de elementos que responden al Ca2+/AMPc (CREB) (Ginty y Cols, 1993); la fosforilación de esta factor de transcripción es un modo común de las vías de señalización intracelurar múltiple activadas por señales extracelulares que inducen la transcripción de se es (Hunter, 1995); la luz, el alutamato y el NO inducen fosforilación de CREB solo en la noche subjetiva (P-CREB) (Ginty y Cols, 1993 y Ding et. al. 1995 i esta etaba de la vía de señalización intracelular involucra la activación de la calmodulina musio, que a su vez activa a una MAP quinasa y otras quinasas que fosferban a 1 -3B esto a su vez induce la expresión de genes via elementos de respuesta al MAMPc (Ca/CRESs) (Gillette, y Tischkau, 1999; Obrietan y Cols. 1998).

Recientemente se ha determinado e meneris no molecular del reloj biológico. el cual consiste de la interacción de asas de latimam entación negativas de procesos transcripcionales/traduccionales; el asa ce petro untación negativa abarca la regulación dinámica de los tres genes per le Per la y de dos genes cryptocromo (mCry1 y mCry2), la transcripción rítmica de estas grandas es conducida por factores de transcripción, CLOCK y BMAL1, los cuales e modimerizan y aumentan la transcripción a través de elementos de la calcala de la ca la transcripción, traducción y modificaciones en conales, las proteínas de los genes mPER y mCRY forman complejos arreada núcleo; en el núcleo las proteínas mCRY como reguladores negativos interactuando directamente con CLOCK to Building con el fin de inhibir la

s que son transportados al



transcripción de los genes mPer y mCry, al mismo tiempo mPER2 contribuye a la transcripción rítmica de Bmal1 formando una vía de protoalimentación (feedforward), ya que la disponibilidad de BMAL1 presumiblemente promueve la heterodimerización de CLOCK:BMAL1 necesario para iniciar nuevamente la transcripción de los genes mper/mcry.

La luz puede afectar este mecanismo, ya que tanto mPer1 como mPer2 son regulados por la luz en la noche subjetiva, en donde la expresión de mPer3 no se ve afectada; la expresión de mPer1 es muy rápida y va ligeramente retrasada de la inducción de c-fos, pero es suficientemente rápida para demostrar que la proteína FOS no regula a mPer1; por otro lado mPer1 es directamente regulada por P-CREB actuado vía un elemento CRE, el cual se localiza en la región 5' del gen mPer1.

La expresión del gen mPer2 también es inducida por la luz, esta ocurre predominantemente durante la noche subjetiva temprana, con poca respuesta durante la noche subjetiva tardía (Shearman y cols., 1997; Zylka y cols., 1998), éste gene también presenta un elemento CRE en su extremo 5'; a través de este mecanismo es probable que la luz induzca cambios de fase.

Por otro lado, recientemente se ha reportado que ratones mutantes del gene mPer1 no presentan avances de fase inducidos por pulsos de luz, pero si presentan retrasos de fase similares a los normales, en cambio los ratones mutantes del gene mPer2 presentan adelantos de fase muy robustos pero no presentan retrasos de fase evidentes (Albrecht, U., y Cols. 2001), lo cual confirma que probablemente en el NSQ existan dos vías separadas para expresar los cambios de fase. Es posible que el PVT este involucrado específicamente con la vía de activación intracelular de los adelantos de fase.

Es probable que a través de esta vía intracelular específica el PVT module las respuestas del reloj en la noche subjetiva tardía, ya que este usa al glutamato como nuerotransmisor (Moga, y Moore, 1996) y una disminución de liberación del glutamato junto con otro neurotransmisor, coliberado con el glutamato, debido a la lesión del PVT, en la hendidura sináptica ocasionaría una alteración del movimiento de calcio extracelular lo cual alteraría las vías de señalización intracelular, dando como resultado respuestas de fase conductuales anómalas.

En nuestros datos también encontramos que tanto el valor promedio de la fracción de actividad como la de reposo, no se vieron afectadas con la lesión del PVT (datos no mostrados). En otros reportes, la lesión de la HIG tampoco afecta a ninguna de las dos fracciones (Harrington, M.E. y Rusak, B 1986); sin embargo cuando se lesiona el MRN aumenta la fracción de actividad y su ajuste de fase se adelanta al inicio de la obscuridad (Meyer-Bernstein, E.L. y Morin, L.P.1996; Smale, L. Y Cols. 1990).

Por otro lado también se reportó que la la del PVT alarga el periodo endógeno del ritmo de actividad locomotora e loga y Moore, 2000), en este estudio no se encontró efecto de la lesión sobre el diferencia entre estos dos estudios radica en la la Moore (2000) sufrieron una enucleación bilateral es manipulación experimental por si sola alarga el periodo endógeno del relo; biene a mai y Cols, 1994), por lo que esta preparación obscurece los posibles esfertados sobre el periodo endógeno...

La lesión de las otras aferencias al planta de la HIG, acorta el periodo endógeno en L:L y lo alarga en O:O en habiste in ri-1986; Pickard, G.E. 1994, Pickard, G.E. y Colembia entras que en otro estudio la lesión no afécta el periodo endógeno en las a la de iluminación antes citadas (Harrington, M.E. y Rusak, B. 1986). La lesió and alarga el periodo en L:L en hamster (Morin y Blanchard, 1991) y no se recent cambios en O:O en ratón y hamster (Morin y Blanchard, 1991, Mistles and Cols. 1998); finalmente la bulboctomía también alarga el periodo en establica de la (Possidente y Cols. 1990).

Estos resultados sugieren que el efecto de la lesión meriodo endógeno de la lesión de las aferentes al NSQ dependen del cicle de la monomen que se encuentren los sujetos en el estudio o bien del tipo de es maio de la use, ya que los efectos más dramáticos de la lesión en estos núcleos en la lesión en lesión en la lesió que responde fuertemente a la luz, por otra del responde estudiado el efecto de la lesión del PVT en L:L.

Los ritmos circadianos son usualmenta e presentados a factores ambientales como el ciclo L:O; un cambio en la fase de inicia de la do L:O, induce que los ritmos circadianos sé resincronizen al nuevo ciclo de la seconda de la circadianos sé resincronizen al nuevo ciclo de la circadianos se ciclo de la circadiano de la ciclo de la circadiano de la circadiano

Se ha reportado que la lesión electricado corto (Ebling, F.J. y Cols. 1992); en nues to PVT anterior afecta la velocidad de sincronización de se cambia a los sujetos de condiciones constantes a un ciclo L.C. resincronización a un retraso en el inicio de la companion de sujetos respondían casi inmediatamente resultados coinciden con reportes, en anticolo de la HIG disminuye la velocidad de resincronización al ciclo de iluminario de 

odo (datos no mostrados). La sujetos del estudio de Moga y Hesión electrolítica del PVT

Harrington, M.E. y Rusak, B.

de un intervalo de tiempo.

/T en hamster, no altera la contramos que la lesión del ién afecta la velocidad de to, en algunos casos estos ion del fotoperiodo. Nuestros liental y a cambios en el inicio **F** )



Lo anterior indica, que la lesión del PVT produce que el sistema circadiano responda atípicamente a fotoperiodos completos, ya sea por que el sistema circadiano en estas condiciones no censé adecuadamente la intensidad de iluminación, o bien que los efectos observados sean un efecto del ciclo de iluminación sobre los efectores del sistema circadiano (enmascaramiento).

Con respecto al primer punto, los sujetos con lesión del PVT anterior podrían asemejarse a sujetos pinealectomizádos los cuales presentan respuestas robustas a la iluminación continua, ya que en estos sujetos aparentemente se incrementa la sensibilidad del sistema a la luz (Aguilar-Roblero, R. y Vega-Gonzalez, A., 1993). Por otro lado se ha reportado la presencia de receptores a melatonina en el PVT (Ebling, F.J. y Cols. 1992; Recio, J. y Cols. 1996), sin embargo su participación en el sistema circadiano no ha sido determinada. Cabe mencionar que la melatonina es una hormona esencial para las adaptaciones biológicas de los sujetos al invierno; la lesión del PVT no altera las respuestas a fotoperiodos cortos (Purvis, C. y Duncan, M. 1997) lo cual indica que los receptores a la melatonina contenidos en el PVT no participan en la medición del largo del fotoperiodo.

La glándula pineal es considerada como un transductor neuroendócrino que traduce una señal de tipo nerviosa acerca de las condiciones ambientales de obscuridad y de luz a una señal hormonal, la melatonina; los niveles de esta hormona constituyen una señal sincronizada al fotoperiodo, y le indica al organismo el largo del fotoperiodo. Se ha determinado que la melatonina podría participar en las respuestas de fase a la luz, ya que ratas pinealectomizadas presentan una atenuación de las respuestas de fase a la luz (Salazar-Juárez, A y Aguilar-Roblero, R. 1992).

Por otro lado las células del NSQ presentan un dominio temporal caracterizado por una alta sensibilidad a la melatonina, durante el cual el mecanismo del reloj es insensible a AMPc, GMPc, al NO y al flujo de Calcio. Este dominio se localiza en el amanecer y en el anochecer (final de la noche subjetiva tardía y final del día subjetivo) (Guillete, 1996). Podemos especular que a través de su sensibilidad a la melatonina el PVT pueda influenciar el mecanismo del reloj. Envrando información relevante al NSQ con respecto a ciertas características del fotopaciodo, como puede ser la intensidad de la luz.

Con respecto al segundo punto, el enmascaram ento es usado para describir los efectos directos e inmediatos ejercidos por ris as ambientales sobre un ritmo, la diferencia más importante entre el enmascaram ento a la sincronización es la relativa al intervalo de tiempo de resincronización de la comparación al ambiental; cuando se sufre enmascaramiento en curso temporal es muy similar a la sincronización pero la transición entre los dos astadas conductuales es abrupta como



el cambio ambiental. En cambio cuando et an partirio oscilador interno la transición conductual extendis sin 

Este efecto se observa en los sujetos de la estos responden inmediatamente al foto a la companione de actividad del animal.

Un método para separar los componentes a sincronizado por la luz es proveído por el formado acbreves de luz son presentados cada día en en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados de luz son presentados cada día en la composição de luz son presentados d ocurre bajo un ciclo de L:O normal; si los esta de parte, el estímulo produce un fotoperiodo escribirario efectos sincronizadores del ciclo L:O 12:1? Proceso

La lesión del PVT anterior disminued de la lesión del PVT anterior disminued del lesión del l ingesta de agua con respecto al grupo con la la la la con lesión electrolítica del PVT no se anticipa de luminosos, ya sea modulando las respuestas en el tipo no paramétricas como paramétricas.

Esto sugiere que el sistema circadiaca por el la luz, después de la lesión del PVT, en outre de la por lo tanto aumenta la potencia del sincron medica

Por otro lado, la estimulación eléctrica de la ritmo de actividad locomotora de ratas y ha mana a como de luz. Además la estimulación eléctrica de la companya de la comp induce una CRF con retrasos de fase dura te de la de fase durante la noche subjetiva tardica de la dicualitativamente similar a la CRF para la comintactos (De Vries y cols, 1993) y a pulsos and la estimulación eléctrica de la HIG y del NE oscilación espontánea que mimetizan a la como H.E. y Cols., 1992;

La estimulación eléctrica del PVT in de agua en ratas en obscuridad continue obtenida con pulsos de luz. Sin embargo cerebro induce respuestas por la liberación las neuronas de dicho sitio, o bien refiele región estimulada. Ya que las fibro neurotransmisores, la estimulación con equ

ua como sincronizador de un opta y la coincidencia entre el

del PVT anterior, en donde 🗦 si la luz enmascarara la

enos y exógenos de un ritmo - squeleto en el cual dos puisos el cual la transición de la luz con presentados 12 horas a 12 horas el cual mimetíza los Minis, **1964)**..

de sincronización del ritmo de e cual indica que los sujetos no que se sincronizan más guada respuesta a estímulos

umentada la susceptibilidad a as sujetos perciben más luz y

causa cambios de fase en el a CRF similar a la de pulsos otico en rebanadas también aubietiva temprana y avances Hoore, 1993) y su forma es del nervio óptico en animales ashi y Cols, 1984). A su vez nambios de fase de ritmos en ne nos de obscuridad (Albers,

de fase de ritmos de ingesta CRF es muy similar a la electrica de cualquier sitio del smisor en las terminales de mon de fibras de paso en la no tienen receptores a um mansmisores es un método



más específico para estimular las neuronas del núcteo en estudio. Las neuronas del PVT contienen receptores glutamatérgicos (Lourenco Neto E. Y cols. 2000) por lo que estas pueden ser activadas por glutamato. La insección de glutamato en PVT induce cambios de fase similares a los observados por la estimulación eléctrica del PVT. Lo que indica que los efectos de la estimulación electrica del PVT se deben a la activación de las neuronas del núcleo.

Mediante el estudio del transporte retragrado axonal del <sup>3</sup>H-d-aspartato inyectado en el NSQ, se ha demostrado que las gravecciones del PVT a este núcleo contienen EAAs (Moga y Moore, 1996). Ya que las cambios de fase inducidos por luz se deben a la liberación de EAA's por las te maies del TRH en el NSQ, no es i sorprendente que la estimulación del PVT produzca cambios de fase similares a los producidos por pulsos de luz.

Recientemente se encontró que decire del NSO existe una población específica de neuronas que responden a la estimulación eléctrica del PVT, y otra población que responde á la estimulación estimulación del PVT (Granados-Fuentes, 2000). Estos hallazgos complementan nuestras observaciones de que la estimulación de PVT produzca cambios de fase similares a los inducidos con pulsos de luz, al accitac evidencia electrofisiológica de la funcionalidad de las proyecciones del PVT al NS a



Los resultados del presente trabajo indican que el PVT es un componente integral de los circuitos neurales que median los efectos de la luz sobre el sistema circadiano en la rata. El papel del PVT parece ser complejo ya que tanto los cambios de fase como la sincronización a un ciclo L:O son afectados por la lesión.

- El PVT anterior modula los adelantos de fase a pulsos de luz posiblemente a través de la coliberación en el NSQ del glutamato con algún otro neurotransmisor, aun no identificado. En forma alternativa la lesión del PVT podría inducir una alteración en la respuesta del reloj biológico a la luz en la noche subjetiva tardía, que podría estar relacionada con la activación de las diferentes vías intracelulares de señalización, como los segundos mensajeros, necesarios para reinstalar la fase del reloj biológico.
- El PVT anterior participa en la sincronización a un fotoperiodo completo posiblemente a través del aumento en la sensibilidad de las células del reloj biológico a la luz.
- La estimulación de las células del PVT produce una CRF similar a la inducida por pulsos de luz debido a la liberación de glutamato de sus terminales en el NSQ; esto sugiere que las células del NSQ responsables de la sincronización a la luz no diferencian del glutamato liberado por el RHT que el liberado por el PVT.



# **BIBLIOGRAFIA**

- ABE, H.; RUSAK, B. and ROBERTSON, H.A. Photic induction os fos protein in the suprachiasmatic nucleus is inhibited by the NMDA receptor antagonist MK-801. Neuroscience Letters 127:9-12 1991.
- ABE, H.; RUSAK, B. and ROBERTSON, H.A. NMDA and non-NMDA receptor antagonists inhibit photic induction of fos protein in the hamster suprachiasmatic nucleus. Brain Research Bulletin 28:831-835 1992.
- AGUILAR-ROBLERO, R., GARCIA-HERNANDEZ, F.,AGUILAR, R.,ARANKOWSKY-SANDOVAL,G. AND DRUCKER-COLIN,R. Suprachiasmatic nucleus transplants fuction as an endogenous oscillator only in constant darkness. Neuroscience Letters 69:47-52,1986.
- AGUILAR-ROBLERO,R. AND DRUCKER-COLIN,R. The role of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of circadian rhythms in mammals. Boletin de Estudios Medicos y Biologicos 35:35-51,1987.
- AGUILAR-ROBLERO,R., SHIBATA,S., SPEH,J.C., DRUCKER-COLIN,R. AND MOORE,R.Y. Morphological and functional development of the suprachiasmatic nucleus in transplanted fetal hypothalamus. Brain Research, Brain Research 580:288-296, 1992.
- AGUILAR-ROBLERO,R., DRUCKER-COLIN,R. AND MOORE,R.Y. Behavioral and morphological studies of fetal neural transplants into SCN- lesioned rats. Chronobiology International 9:1-19, 1992.
- AGUILAR-ROBLERO,R: AND VEGA-GONZALEZ, A. Splitting of locomotor circadian rhythmicity in hamster is facilitated by pinealectomy. Brain Research 605:229-236, 1993.
- ALBERS, H.E. Y FERRIS, C.F. Neuropeptide Y: Role in light- dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. Neuroscience Letters 50:163-168, 1984.
- ALBERS, H.E. and Cols. Avian pancreatic polypeptide phase shifts hamster circadian rhythms when microinjected into the suprachiasmatic region. Science 223:833-835, 1984.
- ALBERS, H.E. and Cols. Neurochemistry of circadian timing. In Suprachiasmatic Necleus. The mind's clock edt. Moore, R.Y. Oxford university press. 1992.
- ALBRECHT, U., ZHENG, B., LARKIN, D., SUN, Z. AND LEE, CH. mPer1 and mPer2 are essential for normal resetting of the circadian clock. J. Biological Rhythms 16:100-104, 2001.
- AMIR, S., ROBINSON, B. Ultraviolet light entrains rodent suprachiasmatic nucleus pacemaker. Neuroscience 69:1005-1011, 1995.
- ARECHIGA, H. Circadian Rhythms Current Opinion in Neurobiology 3:1005-1010 1993.
- ARGAMASO, S.M., FROEHLICH, A.C., MCCALL, M.A., NEVO, E., PROVENCIO, I. AND FOSTER, R.G. Photopigments and circadian system of vertebrates. Biophys Chem. 56:3-11, 1995.
- ARMSTRONG, S.M. AND REDMAN, J.R. Melatonin administration: Effects on rodent circadian rhythms. In: Evered D. Clark S, eds. Photoperiodism, melatonin and the pineal. London: Pitman, p-188-207, 1985.
- ASCHOFF, J. AND WEVER, R. Human circadian rhythms: A multioscillatory system. Fed Proc. 35:2326-2332, 1976.
- ASCHOFF, J. A survey on biological rhythms. In biological Behavior. (eds) Aschoff, j. pag. 3-10, 1986.

- BADURA, L.L. AND GOLDMAN, B.D. Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamster. Brain Research 598:98-106, 1992.
- BARRINGTON, J. JARVIS, H., REDMAN, J.R. AND ARMSTRONG, S.M. Limited effect of three types of daily stress on rat free-running locomotor rhythms. Cronobiology International 10:410-419, 1993.
- BAUER, M.S. Irradiance responsivity and unequivocal type-1 phase responsivity of rat circadian activity rhythms. Am. Journal of Physiol 263:R1110-1114, 1992.
- BHATNAGAR, S. AND DALLMAN, M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. Neuroscience 84:1025-1039, 1998.
- BHATNAGAR, S. AND DALLMAN, M. The paraventricular nucleus of the thalamus alters rhythms in core temperature and energy balance in a state-dependent manner. Brain research 851:66-75, 1999.
- BERK,L.M. AND FINKELSTEIN, J.A. An autoradiographic determination of the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. Brain Research 226:1-13, 1981/.
- BIELLO, S.M.; HARRINGTON, M.E. Y MASON, R. Geniculohypothalamic tract lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in syrian hamsters. Brain Research 552:47-52 1991
- BLOCK, M. AND ZUCKER, I. Circadian rhythms of rat locomotor activity after lesions of the midbrain raphe nuclei. J. Comp. Physiol. 109: 235-247, 1976.
- BOER, G.J.; GRIFFIOEN, H.A. and SAEED, P. Grafted fetal suprachiasmatic nucleus cells survive much better in tissue pieces than in suspension. Restorative Neurology & Neuroscience 4:261-269 1992.
- BOSLER, O. and BEAUDET, A. VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in rat suprachiasmatic nucleus: a combined radioautographic and immunocytochemical study. J. Neurocytology 14:749-763 1985.
- BOSLER, O. Ultrastructural relationships of serotonin and GABA terminals in the rat suprachiasmatic nucleus. Evidence for a close interconnection between the two afferent systems. J. Neurocytology 18:105-113 1989.
- BOULOS, Z. and RUSAK, B. Circadian phase response curves for dark pulses in the hamster. J. Comp. Physiol. 146:411-417 1982.
- BREDT, D.S. AND SNYDER, S.S. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron 8:3-11, 1992.
- BUNNING, E. The physiological clock. English University Press, London, p-258, 1973.
- CAHILL, G.M. AND MENAKER, M. Kyanuretic acid blocks suprachiasmatic nucleus responses to optic nerve stimulation. Brain Research 410: 125-129 1987
- CAHILL, G.M. AND MENAKER, M. Effects of excitatory amino aciod receptor antagonist and agonist on suprachiasmatic nucleus responses to retinohypothalamic tract volleys. Brain Research 479:76-82 1989
- CARD, J.P., BRECHA,N., KARTEN,H.J. AND MOORE, R.Y. Inmunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: Light and electron microscopic analysis. Journal of Neuroscience 1: 1289-1303, 1981.
- CARD, J.P. AND MOORE, R.Y. Ventral geniculate nucleus efferents to the rat suprachiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polypeptide-like inmunoreactivity. Journal Comparative Neurology 206: 390-396,1982.

- CARD, J.P., BRECHA, N. AND MOORE, R.Y. Inmunohistochemical localization of avian pancreatic polypeptide-like inmunoreactivity in the rat hypothalamus. Journal of Comparative Neurology 217: 123-136, 1983.
- CARD, J.P. AND MOORE, R.Y. The suprachiasmatic nucleus of the golden hamster: Inmunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. Neuroscience 13: 415-431,1984.
- CASSONE, V.M.; ROBERTS, M.H. and MOORE, R.Y. Effects of melatonin on 2-deoxy-[1-14C]glucose uptake within rat suprachiasmatic nucleus. Am. J. Physiol. 255:R332-R337 1988.
- CASTEL, M.; COHEN, B.S.; OTTERSEN, O.P. and STORM-MATHISEN, J. Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. European Journal Neuroscience 5:368-381 1993.
- CHALLET, E. AND MALAN, A. Lesion of the serotonergic terminals in the suprachiasmatic nuclei limits the phase advance of body temperature rhythm in food-restricted rats fed during daytime. J. Biological Rhthms 12:235-244, 1997.
- CHALLET, E. PEVET, P. AND MALAN, A. Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed duri daytime. Neuroscience Letters 216:214-218, 1996.
- CHASTRETTE, N., PFAFF, D.W. AND GIBBS, R.B. Effects of daytime and nighttime stress on fos-like immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, the habenula, and the posterior paraventricular nucleus of the thalamus. Brain Research 563:339-344, 1991.
- COLWELL, CH.S.; RALPH, M.R. and MENAKER, M. Do NMDA receptor mediate the effects of light on circadian behavior? Brain Research 523:117-120 1990.
- COLWELL, CH.S.; FOSTER, R.G. and MENAKER, M. NMDA receptor antagonist block the effects of light on circadian behavior in the mouse. Brain Research 554:105-110 1991.
- COLWELL, CH.S. and MENAKER, M. NMDA as well as non-NMDA receptor antagonist can prevent the phase shifting effects of light on the circadian system of the golden hamster. J.Biol. Rhythms 7:125-136, 1992.
- COLWELL, CH S. and FOSTER, R.G. Photic regulation of fos- like immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus of the mouse. J. Comp. Neurol 324:135-142 1992.
- COLWELL, CH.S.; KAUFMAN, C.M. and MENAKER, M. Photic induction of fos in the hamster suprachiasmatic nucleus is inhibited by baclofen but not by diazepam or bicucullin. Neuroscience Letters 163:177-181 1993.
- COMPENTATORE C.A. AND STHEPHAN,F.K. Effects of vagotomy on entrainment of activitry rhythms to food accesss. Physioilogy and Behav. 47:671-678, 1990.
- COSENZA, R.M. and MOORE, R.Y. Afferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the rat: an HRP study. Brain Research 310:367-370 1984.
- DAVIS, F.C. Ontogeny of circadian rhythms. In Handbook of Behavioral Neurobiology. vol. 4, Edit. Aschoff, j. Plenum press. New York and London. pp.257-270, 1984.
- DAVIDSON A.J. AND STHEPHAN, F.K. Circadian food anticipation persist in capsaicindeafferented rats. J. Biological Rhythm. 13:422-429, 1998.
- DAVIDSON A.J. AND STHEPHAN,F.K Feeding-entrained circadian rhythm in hipophysectomized rats whith suprachiasmatic nucleus lesions. Am. J. Physiology 277:R1376-R1384, 1999.
- DAVIDSON A.J. CAPPENDIJK, S. AND STHEPHAN,F.K. Feeding-entrained circadian rhythms are attenuated by lesions of the parabrachial region in rats. Am. J. Physiology 278:R1296-R1304, 2000.

- DAAN,S. AND BERDE,C. Two coupled oscillators: Simulations of the circadian pacemaker in mammalian activity rhythms. J. Theor. Biol. 70:297-313, 1978.
- DE COURSEY, P.J. AND BUGGY, J. Circadian rhythmicity after neural transplant to hamster third ventricle: Specifity of suprachiasmatic nuclei. Brain Research 500:263-275,1989.
- DIAZ-MUÑOS, M. AND COLS. Circadian modulation of the ryanodine receptor type 2 in the SCN of rodents. Neuroreport 10: 481-486. 1999.
- DING, J.M.,AND COLS. Resetting the biological clock: Mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. Science 266:1713-1717, 1994.
- DING, J.M., AND COLS. A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. Nature 394: 381-384. 1998.
- DONALDSON, J.A. AND STEPHAN, F.K. Entrainment of circadian rhythms: retinofugal pathways and unilateral suprachiasmatic nucleus lesions. Physiology and behavioural 29:1161-1169, 1982.
- DRUCKER-COLIN,R., AGUILAR-ROBLERO,R., GARCIA-HERNANDEZ,F., FERNANDEZ-CANCINO,F. AND BERMUDEZ, F.R. Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: Diurnal rhythm recovery of lesioned rats. Brain Research 311:353-357,1984.
- EBLING, F.J., STALEY, K., MAYWOOD, E.S., HUMBY, HANCOCK, D.C., WATERS, C.M., EVAN, G.L. AND HASTINGS, M.H.T.The role of NMDA-type glutamatergic neurotransmission in the photic induction of inmediate-early gene expression in the suprachiasmatic nuclei of the syrian hamster. J. Neuroendocrinol 3:641-652, 1991.
- EBLING, F.J., MAYWOOD, E.S., AND HUMBY, T., Circadian photoperiodic time measurement in male syrian hamsters following lesions of the melatonin-binding sites of the paraventricular thalamus. J. Biological Rhythms. 7:241-254, 1992.
- EDELSTEIN, K. AND AMIR, S. The role of the intergeniculate leaflet in entrainment of circadian rhythms to a skeleton photoperiod. J. Neurosci. 19:372-380, 1999.
- ESKIN,A. Identification and physiology of circadian pacemakers. Federation Proceedings 38:2570-2572, 1979.
- FELONG,M. Anat. Rec. 184: 400-401,1976. FLOOD,D.G. AND GIBBS,F.P. Species difference in circadian (14 C) 2-Deoxiglucose uptake by suprachiasmatic nuclei. Brain Research 232: 200-205,1982.
- FLOOD, D.G. and GIBBS, F.P Species difference in circadian [14C]2-deoxyglucose uptake by suprachiasmatic nuclei. Brain Research 232:200-205 1982.
- FOSTER, R.G., PROVENCIO, I., HUDSON, D., FISKE, S., DE GRIP, W. AND MENAKER, M. Circadian Phtoreception in the retonally degenerate mouse (rd/rd). J. Com. Physiology 169:39-50, 1991.
- FRANCOIS-BELLAN, A.M. and BOSLER, O. Convergent serotonin and GABA innervation of VIP neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrated by triple labeling in the rat. Brain Research 595:149-153 1992.
- FUCHS,J.L. AND MOORE R.Y. Development of circadian rhytmicity and light responsiveness in the rat suprachiasmatic nucleus: A study using the 2-Deoxy(1-14 C)glucose method. Proc. Natl. Acad Sci. USA. 77:1204-1208,1980.
- GANNON, R.L. Y REA, M.A. Glutamate receptor immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. Brain Research 622:337-342 1993.
- GARCIA-FERNANDEZ, J.M., JIMENEZ, A.J. AND FOSTER, R.G. The Persistence of cone photoreceptors within the dorsal retina of aged retinally degenerate mice (rd/rd): implications for circadian organization. Neuroscience Letters 187:33-36 1995.

- GILLETTE, M.U. AND PROSSER, R.A. Circadian rhythm of the rat suprachiasmatic brain slice is rapidly reset by daytime application of cAMP analogs. Brain Research 474: 348-352, 1988.
- GILLETTE, M.U., MEDANIC, M., McARRTHUR, A.J., LIU, C., DING, J.M, FAIMAN, L.E. WEBER, E.T., TCHENG, T.K. AND GALLMAN, E.A. Electrophysiology of the SCN clock:Intrinsic neuronal rhythms and their adjustment. In J. Waterhouse (Ed) Ciba Fundation Symposium: Circadian Clocks and Their adjustment. Wiley. Chichester, 134-153, 1995
- GILLETTE, M.U. Circadian actions of melatonin at the suprachiasmatic nucleus. Behav. Brain Research, 73:135-139, 1996.
- GILLETTE, M.U. AND TISCHKAU, S.A. Suprachiasmatic nucleus: the brain clocks. Rec. Prog. Hormone Res. 54:33-59 1999.
- GOEL, N., LEE, T.M. AND PIEPER, D.R. Removal of the olfactory bulbs delays photic reentrainment of circadian activity rhythms and modifies the reproductive axis in male Octodon degus. Brain Research 792:229-236, 1998.
- GREEN, D.J. AND GILLETTE, R Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice Brain Research 245: 198-200, 1982.
- GROENEWEGEN, H.J. Organization of the afferen connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. Neuroscience 24:379-431, 1988.
- GROOS, G. AND MASON, R. Maintained discharge of rat suprachiasmatic neurons at different adaptation levels. Neuroscience Letters 8:59-64,1978.
- GROOS, G. AND HENDRIKS, J. Circadian rhythms in electric discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. Neuroscience Letters 34: 283-288, 1982.
- GROOS, G., MASON, R. AND MEIJER, J. Electrical and Pharmacological properties of the suprachiasmatic nuclei. Federation Proc. 42:2790-2795, 1983.
- GULDNER, F.H. Synaptology of the rat suprachiasmatic nucleus. Cell Tissue Res. 165: 509-544,1976.
- GULDNER, F.H. Number of neuron and astroglial cells in the nucleus suprachiasmatic of male and famela rats. Exp. Brain Res. 50: 373-376,1983.
- GUY, J. and Cols. Morphological correlates of serotonin- neuropeptide y interactions in the rat suprachiasmatic nucleus: Combined radioautographic and immunocytochemical data. Cell Tissue Res. 250:657-662 1987.
- GINTY, D.D. AND COLS Regulation of CREB phosphorylation in suprachiasmatic nucleus by light and circadian clock. Science 260:238-241 1993.
- HALBERG,F. Chronobiology. Ann. Rev. of Physiol. 31: 675-725,1969.
- HARRINGTON, M.E., DWIGHT, M.N. AND RUSAK, B. Double-labeling of neuropeptide Y inmunoreactive neurons which project from the geniculate to the suprachiasmatic nuclei. Brain Research 410: 275-282, 1987.
- HARRINGTON, M.E. Y RUSAK, B. Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. J. Biol. Rhythms 4:309-325, 1986.
- HARRINGTON, M.E. Y RUSAK, B. Ablation of the geniculohypothalamic tract alters circadian activity rhythms of hamsters housed under constant light. Physiol. Behav. 42:183-189 1988
- HARRINGTON, M.E. Y RUSAK, B. Photic responses of geniculohypothalamic tract neurons in the syrian hamsters. Visual Neuroscience 2:367-375, 1989.

- HARRINGTON, M.E. Y RUSAK, B. Luminance coding properties of intergeniculate leaflet neurons in the golden hamster and the effects of chronic clorgyline. Brain Research 554:95-104 1991.
- HONMA, K. AND KATABAMI, F. AND HIROSHIGE, T. A phase response curve for the locomotor activity rhythm of the rat. Experientia 34:1602-1603, 1978.
- HONMA, K., WATANABE,K. AND HIROSHIGE, T. Effects of phenylalanine and 5,6-dihydroxytryptamine on the free running rhytms of locomotor activity and plasma corticosterone in the rat exposed to continuous light. Brain Research 169:531-544, 1979.
- HONMA, K., HONMA, S. AND HIROSHIGE, T. Response curve, free-running period, and activity time in circadian locomotor rhythm of rats. Japanese J. Physiology 35:643-658, 1985.
- HONMA, K. AND COL. Roles of paraventricular catecholamines in feeding-associated corticosterone rhythm in rats. Am. J. Physiology 262:E948-E955, 1992.
- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the tyin and yang of protein phosphorilation and signaling. Cell 80:225-236 1995.
- IBATA, Y. and Cols. Vasoactive intestinal peptide (VIP)- like immunoreactive neurons located in the rat suprachiasmatic nucleus receive a direct retinal projection. Neuroscience Letters 97:1-5 1989.
- IBUKA,N. AND KAWAMURA, H. Loss of circadian rhythm in sleep wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. Brain Research 96: 76-81,1975.
- IBUKA,N., INOUYE,S. AND KAWAMURA,H. Analilysis of sleep- wakefulness rhythms in male rats after suprachiasmatic nucleus lesion and ocular enucleation. Brain Research 122: 33-47,1977.
- IFFT, J.D. J. Comp. Neurol. 144: 193-204, 1972.
- INOUYE, S.T. Ventromedial Hypothalamic lesions eliminate anticipatory activies of restricted daily feeding schedules in the rat. Brain Research 250:183-187, 1982.
- INOUYE,S.T. AND KAWAMURA,H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic island containing the suprachiasmatic nucleus. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5962-5966,1979.
- INOUYE, S.T. AND KAWAMURA, H. Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. J. Comp. Physiol. 146:153-160, 1982.
- KISS, J.; LERANTH, C. and HALASZ, B. Serotoninergic endings on vip-neurons in the suprachiasmatic nucleus an on acth-neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. A combination of high resolution autoradiography and electron microscopic immunocytochemestry. Neuroscience Letters 44:119-124 1984
- JANIK, D AND MROSOVSKY, N. Intergeniculate leaflet lesion and behaviorally induced shifts of circadian rhythms. Brain Research 651:174-182. 1994.
- JOHNSON, R.F.; SMALE, L.; MOORE, R.Y. Y MORIN, L.P. Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift response to a benzodiazepine. Proc. Natl. Acad Sci. 85:5301-5304 1988.
- JOHNSON, R.P. MORIN, L.P and MOORE, RY.Retinohypothalamic projection if the hamster and rat demostrated using cholera toxin Brain Research 462:301-312 1988.
- KAWAL K., YOKOTA, N. AND YAMAWAKI, S. Effect of chronic tryptophan depletion on the circadian rhythm of wheel-running activity in rats. Physiology and Behav. 55:1005-1013, 1994.
- KIM, Y I. Y DUDEK, F.E. Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: Excitatory synaptic mechanisms. J. Physiol 444:269-287. 1991.

- KITA, H.,SHIBATA, S., OOMURA, Y. AND OHKI, K. Excitatory effects on the nucleus suprachiasmatic on the ventromedial nucleus in the rat hypothalamic slice. Brain Research 235: 137-141, 1982.
- KITA, H., SHIBATA,S. AND OOMURA, Y. Circadian rhythmic changes of SCN neuronal activity in the rat hypothalamic slice. Neuroscience Abstracts. 7:858, 1981.
- KROUT, K E. AND LOEWY, A.D. Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. J. Comp. Neurology 428:475-494, 2000.
- KUBOTA,A., INOUYE,S. AND KAWAMURA, H. Reversal of multiunit activity within and outside the suprachiasmatic nucleus in the rat. Neuroscience Letters 27:303-308, 1981.
- KUCERA, P. AND FAVROD, P. Suprachiasmatic nucleus projection to mesencephalic central grey in the woodmouse. Neuroscience 4: 1705-1715, 1979.
- LEHMAN,M.N., SILVER,R., GLADSTONE, W.R., KAHN,R.M., GIBSON,M. AND BITTMAN,E.L. Circadian rhythmicity restored by neural transplant Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the hostbrain. Journal of Neuroscience 7(6): 1626-1638, 1987.
- LENN,N.J., BEEBE,B AND MOORE,R.Y. Posnatal development of the suprachiasmatic hypothalamic nucleus of the rat. Cell Tissue Res. 178: 463-475, 1977.
- LeSAUTER, J. and SILVER, R. Suprachiasmatic nucleus lesions abolish and fetal grafts restore circadian gnawing rhythms in hamsters. Restorative Neurology and Neuroscience 6:135-143 1994.
- LEVINE, J.D., ROSENWASSER, A.M., YANOVSKI, J.A. AND ADLER, N.T. Circadian activity rhythms in rats whit midbrain raphe lesions. Brain Research 384:240-249, 1986.
- MANTYH, P.W. and KEMP, A. The distribution of putative neurotransmitters in the lateral geniculate nucleus of the rat. Brain Research 288:344-348 1983.
- MASON, C.A., SPARROW, N. AND LINCOLN, D.W. Structural features of the retinohypotalamic projection in the rat during normal development. Brain Research 132: 141-148, 1977.
- MATHUR,A., GOLOMBEK, D.A. AND RALPH, M.R. cGMP dependent protein kinase inhibitors block light-induced phase advanced of circadian rhythms in vitro- Am. J Physiol. 15:R1031-R1036, 1996.
- MEDANIC, M. Y GILLETTE, M.U. Suprachiasmatic circadian pacemaker of rat shows two windows of sensitivity to neuropeptide Y in vitro. Brain Research 620:281-286 1993.
- MEIJER, J.H.; VAN DEN ZEE, E. and DIETZ, M. Glutamate phase shifts circadian activity rhythms in hamster. Neuroscience Letters 86:177-183 1988
- MEIJER, J.H. AND RIETVELD, W.J. Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. Physiological Reviews 69: 671-707, 1989.
- MEIJER, J.H.; ALBUS, H.; WEIDEMA, F. and RAVESLOOT, J-H. The effects of glutamate on membrane potential and discharge rate of suprachiasmatic neurons. Brain Research 603:284-288 1993.
- MENAKER, M. Special topic: Circadían rhythms. Ann. Rev. Physiol. 55:657-659 1993.
- MENAKER, M. Biological clocks. BioScience 19:681-689 1969.
- MENAKER, M., TAKAHASHI, J.S. AND ESKIN, A The physiology of circadian pacemakers. Ann. Rev. Physiol. 40: 501-526, 1978.
- MEERLO, P. VAN DEN HOOFDAKKER, R.H., KOOLHAAS, J.M. AND DAAN, S. Stress induced changes in circadian rhythms of body temperature and activity in rats are not caused by pacemaker changes. J Biological Rhythms 12:80-92, 1997.

- MEYER, E.L.; HARRINGTON, H.E. Y RAHMANI, T. A phase- response curve to the benzodiazepine chlordiazepoxide and the effect of geniculohypothalamic tract ablation. Physiology & Behavior 53:237-243 1993.
- MEYER-BERENSTEIN, E.L. AND MORIN, L.P. Differential serotonergic innervartion of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. J. Neuroci. 16:2097-2111, 1996.
- MEYER-BERENSTEIN, E.L., BLANCHARD, J.H. AND MORIN, L.P. T he serotonergic projection from the median raphe nucleus to the suprachiasmatic nucleus modulates activity phase onset, but not other circadian rhythm parameters. Brain Research 755:112-120, 1997.
- MIKKELSEN, J.D. AND COLS. Gating of retinal inputs through the suprachiasmatic nucleus: role of excitatory neurotransmission. Neurochem. Int. 27:263-272, 1995.
- MILLHOUSE, O.E. Optic chiasm collateral afferent in the suprachiasmatic nucleus. Brain Research 137: 351-355 1977.
- MILLER, J.D. On the nature of the circadian clock in mammals. Am. J. Physiol. 264:R821-R832 1993.
- MISTLBERGER, R.E AND RECHTSCHAFFEN, A Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial. Physiology and Behavior 33:227-235, 1984.
- MISTLBERGER, R.E AND RUSAK B. Food-anticicipatory circadian rhythms in rats with paraventricular and lateral hypothalamic ablations J. Biological Rhythms. 3:277-291, 1988.
- MISTLBERGER, R.E. Circadian food-anticipatory Activity: formal models and physiological mechanisms. Neurosci Biobehav Rev. 18:171-195, 1994.
- MISTLBERGER, R.E AND MUMBY, D.G. The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat:Ablation and dopamine blocking studies. Behav Brain Research 47:159-168, 1992.
- MISTLBERGER, R.E., BOSSERT, J.M., HOLMES, M.M. AND MARCHANT, E.G. Serotonin and feedback effects of behavioral activity on circadian rhythms in mice. Behav. Brain Research. 96:93-99, 1998.
- MORIN L.P. AND BLANCHARD, J.H. Depletion of bragin serotonin by 5,7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. Brain Research 566:173-185, 1991.
- MORIN, L.P.; BLANCHARD, J. and MOORE, R.Y. Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. Visual Neuroscience 8:219-230 1992.
- MORIN, L.P. The circadian visual system. Brain Research Rew. 67:102-127 1994.
- MOGA M.M. AND MOORE, R.Y. Putative excitatory amino acid projections to the suprachiasmatic nucleus in the rat. Brain research 743: 71-177, 1995.
- MOGA M.M. AND MOORE, R.Y. Paraventricular That mus lesions alter circadian period and activity distribution in the blinded rat. Biological Rhythm Research 31:212-219, 2000.
- MOORE, R.Y. AND LENN, N.J. A retinohypothalamic projection in the rat. J. Comp. Neurol. 146: 1-14, 1972.
- MOORE, R.Y. AND EICHLER, V.B. Loss of circagian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. Brain research 42: 201-206, 1972.
- MOORE, R.Y. Suprachiasmatic nucleus, secundary symphomizing stimuli and the central neural control of circadian rhythms. Brain Research 16 of 13-28, 1980.
- MOORE, R.Y. Organization and function of a central regrous system circadian oscillator: The suprachiasmatic hypothalamic nucleus. Federation Proc. 42: 2783-2789, 1983.



- MOORE, R.Y., GUSTAFSON, E.L. AND CARD, J.P. Identical immunoreactivity of afferents to the rat suprachiasmatic nucleus with antisera against avian pancreatic polypeptide, molluscan cardioexcitatory peptide and neuropeptide y. Cell Tissue Res. 236: 41-46, 1984.
- MOORE, R.Y. and CARD, J.P. The intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. J Comp. Neurol. 344:403-440 1994
- MOREIRA, A.C. AND KRIEGER, D.T. The effects of subdiaphragmatic vagotomy on circadian corticosterone rhythmicity in rats with continuos or restricted food access. Physiol and Behav 28: 787-790,1982.
- MOSKO,S. AND MOORE, R.Y. Neonatal suprachiasmatic nucleus ablation: Absence of functional and morphological plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75: 6243-6246, 1978.
- MOSKO,S. AND MOORE, R.Y. Retinohypothalamic tract development: Alteration by suprachiasmatic lesions in the neonatal rat Brain Research 164: 1-15, 1979a.
- MOSKO, S. AND MOORE, R.Y. Neonatal suprachiasmatic nucleus lesion effects on the development of circadian rhythms in the rat. Brain Research 164: 17-38, 1979b.
- NAGAI,K., ETAL. Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food-intake. Brain Research 142:384-389, 1978.
- NEWMAN, G.C. AND HOSPOD, F.E. Rhythm of suprachiasmatic nucleus 2-Deoxiglucose uptake in vitro. Brain Research 381: 345-350, 1986.
- NOJYO, Y. AND SANO, Y. Ultrastructure of the serotonergic nerve terminals in the suprachiasmatic and interpeduncular nuclei of rat brain. Brain Research 149: 482-488, 1978.
- NOVAK, C.AND NUNEZ, A. Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. Am. J. Physiol 275:R1220-R1226, 1998.
- NOVAK, C.,HARRIS, A.J., SMALE, L. AND NUNEZ, A. Suprachiasmatic nucleus projection to the paraventricular thalamic nucleus in the nocturnal rats (Rattus norvegicus) and diurnal nile grass rats (Arvicanthis niloticus). Brain Research 874:147-157, 2000.
- NOVAK, C., SMALE, L. AND NUNEZ, A. Rhythms in Fos expression in brain areas related to the sleep-wake cycle in the diurnal Arvicanthis niloticus. Am. J. Physiol. 278:R1267-R1274, 2000.
- OBRIETAN, K., IMPEY, S. AND STORM, D.R. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. Nat. Neurosci. 8:693-700 1998
- OHI, K., TAKASHIMA, M., NISHIKAWA,T. AND TAKAHASHI, K. M-Methyl-D-aspartate receptor participes on neuronal transmission of photic information through the retinohypotalamic tract. Endocrinology 53:344-348,1991.
- PASQUIER,D.A and VILLAR, M.J. Specefic serotonergic projections to the lateral geniculate body from the lateral cell groups of the dorsal raphe nucleus. Brain Research 249: 142-146 1982.
- PAXINOS,G. AND WATSON,C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press NY. 1982.
- PENG, Z.CH., GRASSI-ZUCCONI, G. AND BENTIVOGLIO, M. Fos-related protein expression in the midline paraventricular nucleus of the rat thalamus:basal oscillation and relationship with limbic efferents. Exp. Brain Research 104:21-29, 1995.66
- PICKARD, G.E. Morphological characteristics of retinal ganglion cell projecting to the suprachiasmatic nucleus: A horseraddish peroxidase study. Brain Research 183: 458-465, 1980.

- PICKARD, G.E. The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. Journal Comp. Neurol. 211: 65-83, 1982a.
- PICKARD,G.E. AND TUREK,F.W. Splitting of the circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesion of the suprachiasmatic nuclei. Science 215: 1119-1121, 1982b.
- PICKARD, G.E. AND TUREK, F.W. The suprachiasmatic nuclei: two circadian clock? Brain Research 268: 201-210, 1983.
- PICKARD, G.E. Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatine nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. Neuroscience Letters 55:211-217 1985.
- PICKARD, G.E.; RALPH, M.R. Y MENAKER, M. The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. J Biol. Rhythms 2:35-56 1987.
- PICKARD, G.E. Entrainment of the circadian rhythm of wheel-running activity is phase shifted by ablation of the intergeniculate leaflet. Brain Research 494:151-154, 1989.
- PICKARD, G.E. Intergeniculate leaflet ablation alters circadian rhythms in the mouse.
   Neuroregort 5:2186-2188, 1994.
- PITTENDRIGH, C.S. and MINIS, D.H. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. Am. Naturalist 98:261-291 1964
- PITTENDRIGH, C.S. and MINIS, D.H. Circadian systems: longevity as a function of circadian resonance in Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. 69:1537-1539 1972...
- PITTENDRIGH, C.S. and CANDAROLA, P.C. A differential effect of heavy water on temperature-dependent and temperature- compensated aspects of the circadian system of Drosophila pseudoobscura. Proc. Natl. Acad. Sci. 70: 2037-2041 1973.
- PITTENDRIGH, C.S. AND DAN,S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. (I-IV). J. Comp. Physiol. 106: 223-355, 1976.
- PITTENDRIGH, C.S. Circadian Systems: General Perspective. In Handbook of Behavioral Neurobiology. vol.4 Edit. Aschoff, J. Plenum Press. New york and London. pp. 57-77, 1984. Pittendrigh, C. Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. Ann. Rev. Physiol. 55:15-54, 1993.
- POSSIDENTE, B., LUMIA, A.R., McGINNIS FRANCE TEICHER, M.H. deLEMOS, E., STERNER, L. AND DEROS, L. Olfactory bulb control of circadian rhythm in mice. Brain Research 513:325-328, 1990.
- POSSIDENTE, B. AND LOBOCKI, C.A. Olfactory bulk extomy lengthens circadian period of locomotor activity in golden hamster. Am. J. Physych. pt 231:R973-R978, 1991
- PROSSER, R.A. AND GILLETTE, M.U. The machinalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP ! New Decience 9:1073-1081, 1989.
- PROSSER, R.A. AND GILLETTE, M.U. cGiven induces phase shifts of a mammalian circadian pacemaker at night, in antiphase to the effects. Proc. Natl. Acad. Sci. 86:6812-6815, 1989.
- PURVIS, C.CH. AND DUNCAN, M.J. Districts to hamid Jesions attenuate winter adaptations and increase body weight. Am. J. Physiology 273:R226-R235, 1997.
- RALPH, M.R. Y MENAKER, M. GABA regulation of circadian responses to light. Involvement of GABAa-benzodiazepine and GABAD repeter. J. Neuroscience 9:2858-2865-1989.
- RALPH,M.R. AND LEHMAN,M.N. Transplantation in new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. Transform in Neuroscience 14 (8): 362-366, 1991.



- RALPH, M.R. and MENAKER, M. A mutation of the circadian system in golden hamsters. Science 241:1225-1227 1988.
- RALPH, M.R.; FOSTER, R.G.; DAVIS, F.C. and MENAKER, M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. Science 247:975-978 1990.
- REA, M.A.; BUCKLEY, B. and LUTTON, L.M. Local administration of EEA antagonists blocks light-induced phase shifts and c-fos expression in hamster SCN. Am. J. Physiol. 265;R1191-R1198 1993.
- REA, M.A. and Cols. Daily profile of the extracellular concentration of glutamate in the suprachiasmatic region of the siberian hamster. P.S.E.B.M. 204:104-109 1993.
- RECIO, J., PEVET, P., VIVIEN-RORLS, B., MIGUEZ, J.M. AND MASSON-PEVET, M. Daily and photoperiodic melatonin binding changes in the suprachiasmatic nuclei, paraventricular thalamic nuclei and pars tuberalis of the female siberian hamster. J. biological rhythms 11:325-332 1996.
- RIBAK, C.E. AND PETERS, A. An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. Brain Research 92:341-368, 1975.
- RICHARDSON,G.S. Circadian rhythms and aging. Handbook of the biology of aging. Cap., 13: 275-305, 1990...
- RIETVELD, W.J. The central control and ontogeny of circadian rhythmicity. European Journal of Morphology 28 (2-4): 301-307, 1990.
- RUBY, N.F., ZUCKER, I., LICHT, P. AND DARK, J. Olfactory bulb removal lengthens the period of circannual rhythms and disrupts hibernation in golden-mantled ground squirrels. Brain research 608:1-6, 1993.
- RUSAK,B. AND ZUCKER, I. Biological rhythms and animal behavior. Ann. Rev. Psychol. 12:137-171, 1975.
- RUSAK,B. Neural mechanisms for entrainment and generation of mammalian circadian rhythms. Federation Proc. 38:2589-2595,1979a.
- RUSAK,B. Neural regulation of circadian rhythms. Physiological Reviews 59: 449-526,1979b.
- RUSAK,B. AND GROOS, G. Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodents circadian rhythms. Science 215: 1407-1409, 1982.
- RUSAK, B.; MEIJER, J.H. Y HARRINGTON, M.E. Hamster circadian rhythms are phase-shifted by electrical stimulation of the geniculo-hypothalamic tract. Brain Research 493:283-291 1989.
- SAWAKI, Y., NIHONMATSU,I. AND KAWAMURA, H. Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesion. Neuroscience Research 1: 67-72, 1984.
- SCHWARTZ, W.J. AND GAINER, H. Suprachiasmatic nucleus: Use of 14C labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. Science 197: 1089-1091, 1977.
- SCHWARTZ,W.J., DAVIDSEN, L.C. AND SMITH, C.B. In vovo metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. J. Comp. Neurol. 189: 157-167,1980.
- SCHWARTZ,W.J., REPPERT, S.M., EAGAN,S.A. AND MOORE-EDE, M.C. In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic neclei: A comparative study Brain Research 274: 184-187, 1983.
- SCHWARTZ, W.J. an OSBY, G. Local cerebral glucose utilization in the homozygous brattleboro rat. Neurosci, ice Letters 58:171-176, 1985.

- SELIM, M.; GLASS, J.D.; HAUSER, U.E. and REA M A. Serotonergic inhibition of light-induced fos protein expression and extracellular glutan ate in the suprachiasmatic nuclei.
  Brain Research 621:181-188 1993.
- SEMBA, K., PASTORIUS, J., WILKINSON, M. AND RUSAK, B. Sleep deprivation-induced c-fos and junB expression in the rat brain: effects of duration and timing. Behavioural Brain Research 120:75-86, 2001.
- SHEARMAN, L.P., AND COLS. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. Neuron 19:12: 1-1269, 1997.
- SHIBATA,S.,OOMURA,Y., KITA,H. AND HATTORI, a Circadian rhythmic changes of neural activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. Brain Research 247:154-158,1982.
- SHIBATA,S., OOMURA,Y., HATTORI,K. AND KITA Responses of suprachiasmatic nucleus neurons to optic nerve stimulation in rat. hypothalamic slice preparation. Brain Research 302: 83-89, 1984.
- SHIBATA, S. and MOORE, R.Y. Neuropeptide Y and optic chiasm stimulation affect suprachiasmatic nucleus circadian function in vitro. Brain Research 615:95-100 1993.
- SHIBATA,S., WATANABE, A., HAMADA, T., ON O. M. AND WATANABE, S. N-methyl-D-aspartate induces phase shifts in circadian rhythm of neuronal activity of rat SCN in vitro. Am. J. Physiol. 267:R360-R364, 1994.
- SHINOHARA, K.; TOMINAGA, K.; ISOBE, Y. AND INDUYE S.T.I. Photic regulation of peptides located in the ventrolateral subdivision of the apprachiasmatic nucleus of the rat: daily variations of vasoactive intestinal polypeptide gastrin releasing peptide, and neuropeptide Y. J. Neuroscience 13:793-800 1993
- SHIRAKAWA, T. and MOORE, R.Y. Responses of resuprachiasmatic nucleus neurons to substance P and glutamate in vitro. Brain Research . 42:213-220 1994.
- SMALE, L., MICHELS, K.M., MOORE, R.Y. AND MORING L.P. Destruction of the hamster serotoninergic system by 5,7-DHT: effects on circadian rhythm phase, entrainment and response to triazolam. Brain Research 515: 9-19-18-90
- SOFRONIEW,M.V. AND WEINDL, A. Projections from the darvocellular vasopressin and neurophysin-containing neurons of the suprachiasmatic nucleus. Am. J. Anat. 153: 391-430, 1980.
- STEPHAN, F.K. AND ZUCKER,I. Circadian rhv. ims in drinking behavior and locomotoractivity of rats are elimited by hypothalamic listens. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 1583-1586,1972.
- STEPHAN, F.K., BERKLEY,K.J. AND MOSS. F.L. Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus. Neuroscience 6: 2625-3641 381
- STEPHAN, F.K. Calories affect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator Physiol. Behav 62:995-1002, 1997
- STOPA, E.G. and Cols. Localization of vasoactive into-inal ceptide and peptide histidine isoleucine immunoreactivity and mRNA within the rest in order as matic nucleus. Molecular Brain Research 4:319-325, 1988.
- SWANSON, L.W., COWAN, W.M. AND JONE Better the total actional study of the efferent connections of the ventral lateral general lateral gener
- SWANSON, L.W. AND COWAN, W.M. The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. J. Comp. Neurol 190: 1-11275
- SWANSON, L.W. An autoradiographic study of the effect connections of the preoptic region in the rat. J. Comp. Neurol. 160:227-240 (1973)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN