

03086

3
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO

MODELO DEL RITMO CIRCADIANO BASADO EN LA ACTIVIDAD
ELECTRICA DEL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

T E S I S
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A

LIMEI ZHANG

México, D. F.

Julio, 1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE

RESUMEN

I.	INTRODUCCION	1
I.1	Los ritmos circadianos, Generalidades	1
I.2	Perspectivas históricas	6
I.3	El marcapaso circadiano en mamíferos, El Núcleo Supraquiasmático	10
I.3.1.	Organización anatómica y funcional del Núcleo Supraquiasmático	10
I.3.2.	Evidencias que demuestran que el Núcleo Supra- quiasmático es el marcapaso circadiano	15
I.3.3.	Evidencias de múltiosciladores acoplados	17
I.4.	Electrofisiología del Núcleo Supraquiasmático	20
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	25
III.	MATERIAL Y METODOS	27
III.1.	Animales	27
III.2.	Sistema de registro electrofisiológico	27
III.3.	Procedimientos Experimentales	30
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION	34
IV.1.	Caracterización de las fluctuaciones circadianas de cada núcleo supraquiasmático	34
IV.1.1.	Resultado Experimental	34
IV.1.2.	Discusión del experimento anterior	36

IV.2 Caracterización electrofisiológica del núcleo supraquiasmático	40
IV.2.1. Resultados Experimentales	40
IV.2.2. Discusión del Experimento	50
IV.2.3. Modelo Teórico	52
IV.2.4. Discusión de la relación del modelo teórico con los resultados del experimento No. 2	61
IV.2.5. Comentarios sobre las características y las limitaciones del modelo teórico.	66
V. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES	71
VI. REFERENCIAS	75
VII. APENDICE	84

RESUMEN.

Esta tesis reporta el desarrollo y resultados de dos experimentos separados de registros electrofisiológicos extracelulares unitarios en rebanadas *in vitro* del núcleo supraquiasmático (NSQ) del cerebro de la rata. El primer experimento consiste en un muestreo estadístico de registros obtenidos de dos grupos de animales: uno mantenido an un ciclo de luz-oscuridad (LO) y el otro mantenido en oscuridad continua (OO). El estudio fue hecho separando los registros de los NSQ's contralaterales (derecho e izquierdo). Se observó una variación circadiana de la actividad eléctrica de las neuronas registradas, y hubo una diferencia significativa, tanto en forma como en fase, de las curvas de distribución temporal de frecuencias entre ambos lados. Estos resultados apoyan a resultados anteriores que sugieren que los dos NSQ podrían actuar como dos unidades oscilatorias independientes.

El segundo experimento trata de una nueva clasificación de los diferentes tipos de disparo en las neuronas del NSQ, basada en el análisis de los diferentes patrones observados en la distribución de intervalos entre espigas. En este análisis se encontró un nuevo tipo de patrón que presenta disparos a frecuencias que son múltiplos de una frecuencia fundamental, por lo tanto se bautizó como "tipo armónico". La abundancia de este tipo de patron fue de 16%, comparable con la de los patrones regulares ("tipo entonado") que fue de 18%. El resto presentaron distribuciones al azar ("tipo irregular") que comprenden también a las células que disparan en ráfagas. Estos resultados sugieren que existe un tipo de relación funcional entre los diversos patrones, que tiene por objeto la obtención de neuronas entonadas que son osciladores infradianos, que eventualmente podrían participar en los mecanismos para crear el reloj. Consecuentemente, un modelo fue diseñado, que tomara en cuenta estos resultados experimentales y que fuera capaz de predecir la existencia de los diferentes tipos de patrones. El modelo es una descripción simple de la interferencia de señales que provienen de células que disparan al azar y que a través de una red neuronal arbitraria, dichas señales se filtran, resultando en el paso de una sola frecuencia de disparo.

La relación entre los resultados experimentales y el modelo se discute en la parte final de la tesis con énfasis en tratar las virtudes y limitaciones del modelo. Se tomó especial cuidado en relacionar las predicciones del modelo con sus posibles consecuencias biológicas. La tesis concluye con algunos comentarios sobre trabajos al futuro y sobre la relevancia del reloj circadiano para la salud y el bienestar del ser humano.

I. INTRODUCCION

I.1 Los Ritmos Circadianos, Generalidad

Un patrón recurrente dentro de cierto margen de regularidad se define como ritmo. El ritmo es esencial para la música, la poesía, y muchas otras cosas con las que tenemos contacto en nuestra vida cotidiana. Aquí, nos concentramos en los ritmos biológicos. La fluctuación temporal de un fenómeno dentro de un sistema biológico con intervalos más o menos iguales se considera como un ritmo biológico. La ritmicidad es una propiedad fundamental de la materia viva, desde los organismos unicelulares hasta los animales complejos. Innumerables estructuras y funciones exhiben cambios periódicos de sus formas e intensidades.

Dentro de los muchos ritmos biológicos que existen en los organismos, los mas prominentes son los circadianos. Estos ritmos están estrechamente relacionados con la rotación de la Tierra alrededor de su eje, es decir, el ciclo solar de luz y oscuridad. En los mamíferos, los ritmos circadianos expresan una organización temporal de procesos fisiológicos y conductuales para una óptima adaptación al medio ambiente. Esto es porque los ritmos circadianos ayudan a sincronizar el organismo con las fluctuaciones periódicas en el medio externo, y facilitan la integración del medio interno del individuo. Parafraseando a Aschoff (1964): "los ritmos circadianos establecen un espejo que refleja los cambios del mundo exterior

al medio interno, por lo tanto preparan al organismo para los cambios programados o predichos del medio ambiente".

Un aspecto importante de los ritmos circadianos es el **Corrimiento Espontáneo**. No todos los ciclos biológicos de 24 horas son circadianos. Algunos períodos se deben a las fluctuaciones ambientales regulares de temperatura, humedad, luz. Estos ciclos desaparecen cuando los cambios ambientales se vuelven constantes. En cambio, los definidos como ritmos circadianos persisten bajo condiciones constantes con un período cercano, pero no exactamente de 24 horas. Este fenómeno se llama **corrimiento espontáneo** (*free running*). Este fenómeno demuestra la naturaleza endógena de los ritmos circadianos.

A pesar de la naturaleza endógena de los ritmos circadianos, los marcapasos endógenos se ajustan constantemente por el ciclo de luz - oscuridad. Este proceso se llama **sincronización**. Las vías visuales son las principales responsables del proceso de la sincronización. Una característica importante de este proceso es que un ritmo circadiano en corrimiento espontáneo puede alargar o acortar su período en uno o varios ciclos, dependiendo de la fase¹ en donde se presentan los pulsos de luz. Un pulso de luz estandar puede causar uno de los tres siguientes efectos sobre

¹Fase: Estado instantáneo de una función periódica con respecto a un punto fijo de la misma función.

la fase de ritmo circadiano: sin cambio, retraso y avance. La magnitud y la dirección del cambio de fase depende de la fase del ritmo en la cual se aplica el estímulo luminoso. Esta relación se grafica en la curva de respuesta de fase como la ilustrada en la Figura 1.1. En hamsters, el comienzo de la actividad se usa como referencia para la fase y se define como tiempo circadiano (TC) 12:00. El hamster es activo durante la noche subjetiva (de 12:00 a 24:00 TC) e inactivo durante el día subjetivo (de 0:00 a 12:00 TC). La curva de respuesta de fase tiene tres características generales: 1) La zona muerta, cuando no ocurren cambios de fase después de que se aplican los pulsos luminosos durante del día subjetivo, 2) El retraso de fase ocurre cuando los pulsos se aplican durante la noche subjetiva temprana y 3) El avance de fase cuando los pulsos se aplican durante la noche subjetiva tardía. El retraso de fase causa un alargamiento del período y el avance de fase causa un acortamiento del período. Aunque la curva de respuesta de fase se obtiene por medio de las mediciones de la función rítmica expresada, ésta refleja las propiedades temporales de los osciladores circadianos responsables de esta función. (Pittendrigh & Daan, 1976).

El sistema circadiano consiste de los siguientes componentes importantes (Takahashi y Zatz, 1982): 1) vía de entrada para la sincronización; 2) marcapaso circadiano para generar la oscilación; 3) vía de salida para transmitir la información a los efectores en los que expresan los ritmos que medimos. (Fig. 1.2).(Moore, 1992)

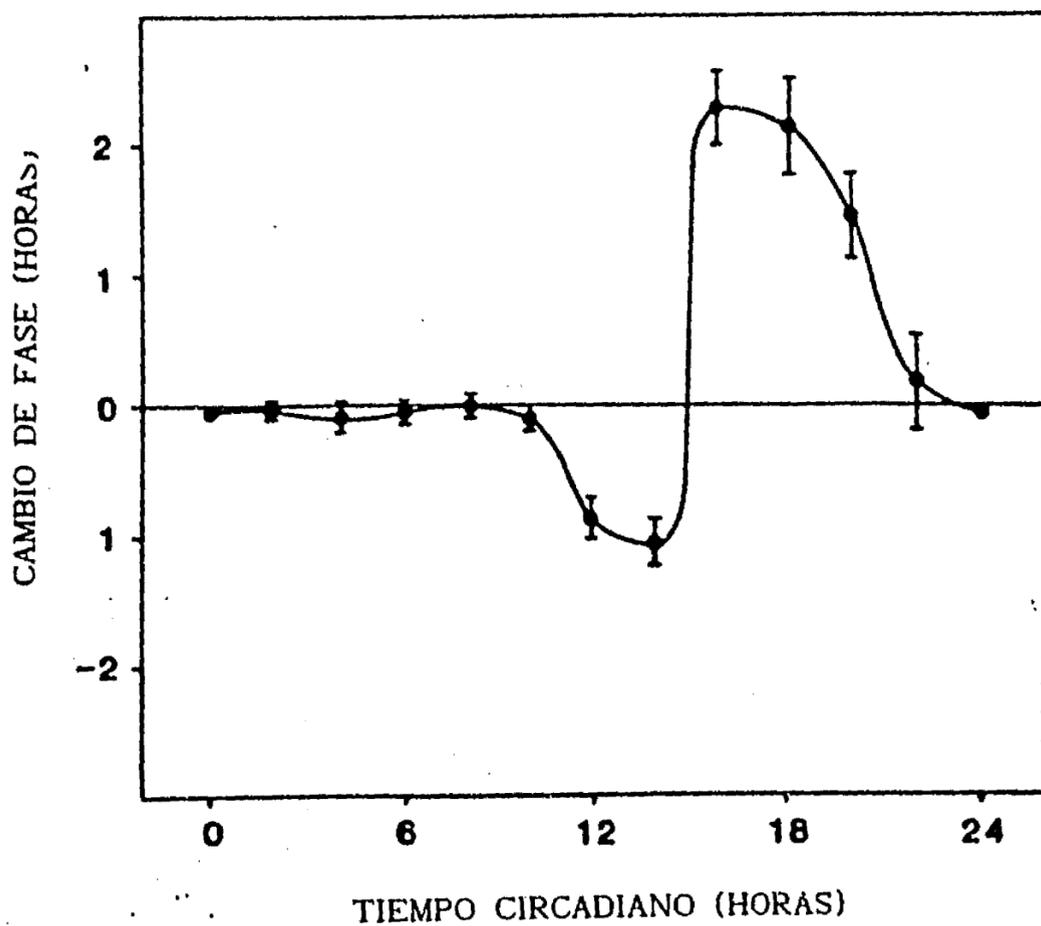


Fig. 1. 1 Curva de respuesta de fase ilustrando el efecto de pulsos de luz (60 minutos) aplicados en diferentes tiempos circadianos de la actividad rítmica locomotora del hámster. El avance de fase es graficado como positivo y el retraso de fase como negativo. (Ver texto). (Tomada de Takahashi & Zatz, 1982)

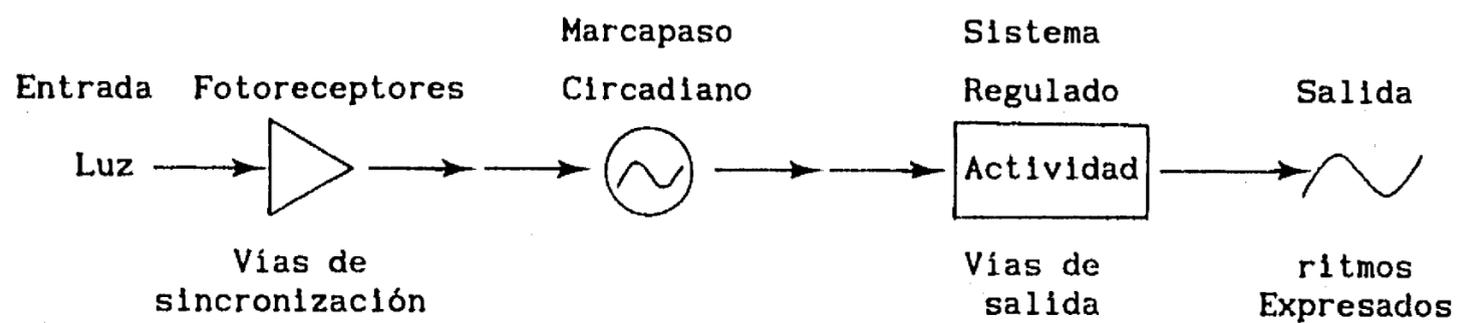


Fig. I. 2 Diagrama que muestra los componentes del sistema circadiano.

I.2 Perspectivas Históricas

¿Desde cuándo tiene el hombre conciencia sobre los ritmos de 24 horas en actividades de plantas, animales y de sí mismo? El escrito más antiguo que se ha encontrado es del siglo cuarto, de la época de Alejandro Magno, donde se documentaron los movimientos diarios de las hojas de plantas y los pétalos de flores. Andróstenes reportó que el árbol de tamarindo (*Tamarindus indicus*), muy conocido en ese entonces por sus frutas laxantes, abría sus hojas durante el día y las cerraba durante la noche (Bretzl, 1903). Sin embargo, en estos escritos antiguos sólo se consideraban a estos ritmos como respuestas pasivas al ciclo solar. La afirmación de la rítmicidad circadiana como una propiedad del organismo vivo se debe principalmente a los fisiólogos de los siglos XVIII y XIX. Sus estudios permitieron concluir que, por lo menos algunos ritmos biológicos de 24 horas no sólo se debían al ciclo ambiental sino que también tenían un origen endógeno. En 1729, Jean Jacques d'Ortois de Mairan, un astrónomo francés, publicó en una comunicación corta de *L'Academie Royale des Sciences* de París (Fig. 1.3) su estudio de los movimientos de las hojas y pedículos de una planta heliotrópica (probablemente *Mimosa pudica*). Esta planta abría sus hojas y pedículos durante el día y los doblaba durante la noche. Cuando de Mairan movió esta planta a un sitio donde no podía llegar la luz solar, la planta seguía abriendo y cerrando sus hojas y pedículos durante el día y durante la noche respectivamente (Fig. 1.4). Éste fue el primer experimento publicado que demostró la persistencia del ritmo circadiano en ausencia de

OBSERVATION BOTANIQUE.

ON sait que la Sensitive est *heliotrope*, c'est-à-dire que ses rameaux & les feuilles se dirigent toujours vers le côté d'où vient la plus grande lumière, & l'on sçait de plus qu'à cette propriété qui lui est commune avec d'autres Plantes, elle en joint une qui lui est plus particulière, elle est Sensitive à l'égard du Soleil ou du jour, les feuilles & leurs pétiocles se replient & se contractent vers le coucher du Soleil, de la même manière dont cela se fait quand on touche la Plante, ou qu'on l'agite. Mais M. de Mairan a observé qu'il n'est point nécessaire pour ce phénomène qu'elle soit au Soleil ou au grand air, il est seulement un peu moins marqué lorsqu'on la tient toujours enfermée dans un lieu obscur, elle s'épanouit encore très-sensiblement pendant le jour, & se replie ou se relève régulièrement le soir pour toute la nuit. L'expérience a été faite sur la fin de l'Été, & bien répétée. La Sensitive sent donc le Soleil sans le voir en aucune manière; & cela paroît avoir rapport à cette malheureuse délicatesse d'un grand nombre de Malades, qui s'aperçoivent dans leurs Lits de la différence du jour & de la nuit.

Il seroit curieux d'éprouver si d'autres Plantes, dont les feuilles ou les fleurs s'ouvrent le jour, & se ferment la nuit, conserveroient comme la Sensitive cette propriété dans des lieux obscurs; si on pourroit faire par art, par des fourneaux plus ou moins chauds, un jour & une nuit qu'elles sentissent; si on pourroit renverser par là l'ordre des phénomènes du vrai jour & de la vraie nuit, &c. Mais les occupations ordinaires de M. Mairan ne lui ont pas permis de pousser les expériences jusque-là, & il se contente d'une simple invitation aux Botanistes & aux Physiciens, qui pourront eux-mêmes avoir d'autres choses à suivre. La marche de la véritable Physique, qui est l'Expérimentale, ne peut être que fort lente.

E ij

M. Marchant a lu la Description
De l'*Althoea Diose.* & Plin. C. B. Pin. 315.
Guilmone, avec la Critique des Auteurs Botanistes sur cette Plante.
De la *Mitella Americana, forum folis fimbriatis.* Inst. Rall Herb. 242.
Et de la *Sanicula, seu Cornisa Americana, altera, flore minuto, fimbriata.* Hort. Reg. Par.



Fig. 1.3 La comunicación original de Jean Jacques d'Ortous de Mairan, donde documentó la persistencia de ritmos circadianos en los movimientos de hojas de la planta en condiciones constantes. Esta comunicación fue reportada en *L'Academie Royale Sciences* en Paris en 1729. (Tomada de Moore-Ede et al, 1982).

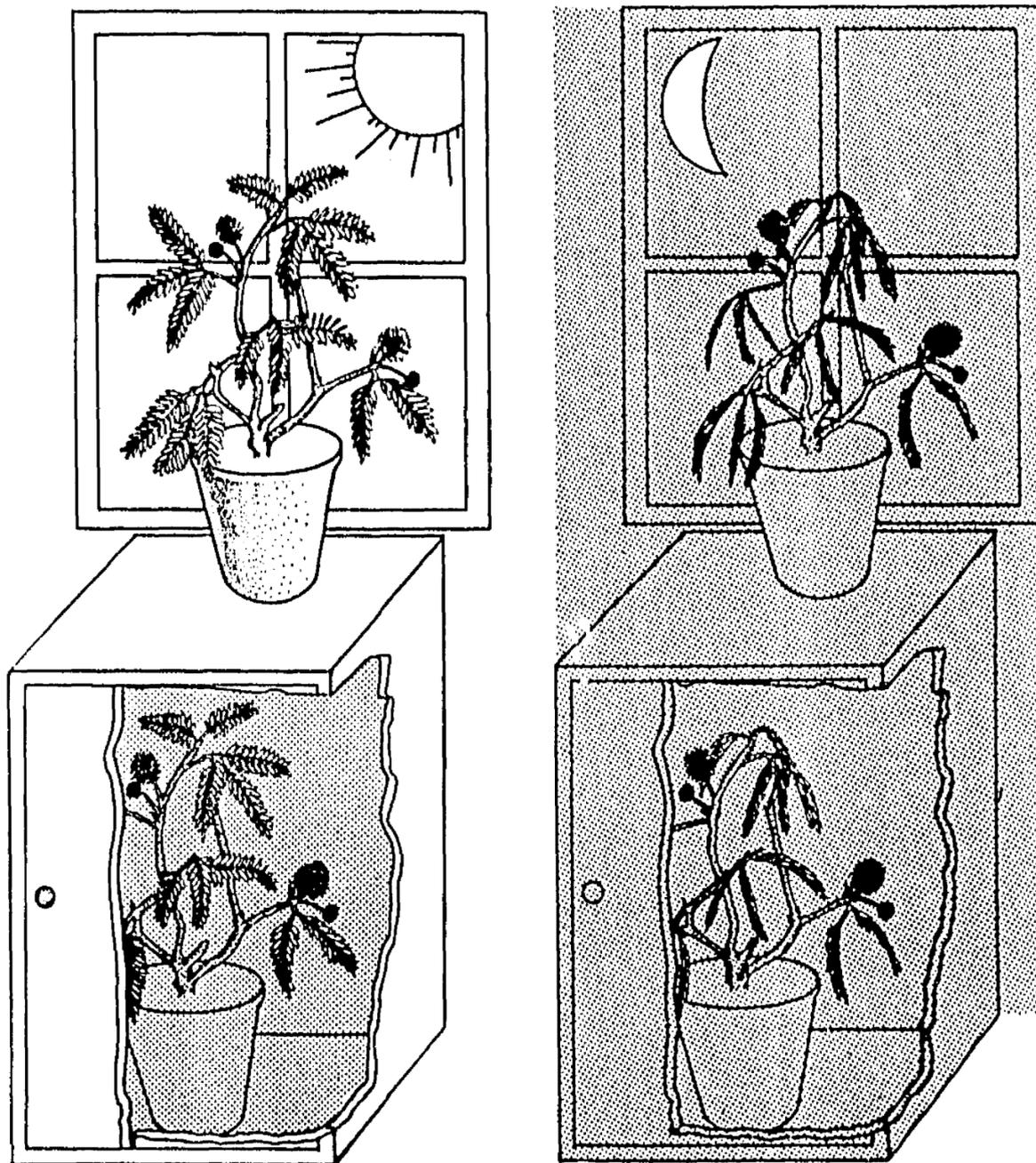


Fig. I.4 Representación del experimento original de de Mairan. Superior izquierda: las hojas se abrían durante el día con luz solar; superior derecha: las hojas se cerraban durante la noche. De Mairan demostró, con el siguiente experimento, que la luz solar no es indispensable para estos movimientos de las hojas. Puso la planta en oscuridad total y observó que la planta seguía abriendo sus hojas durante el día (inferior izq.) y cerrándolas durante la noche (inferior der.). (Tomada de Moore-Ede et al,1982).

señales del tiempo externo. En 1832, Augusto de Candolle repitió el experimento de de Mairan sobre la *Mimosa pudica* en oscuridad continua. Se dió cuenta de que las hojas se abren una o dos horas antes cada día. Por lo tanto, concluyó que el movimiento diario de las hojas tiene un período de 22 a 23 horas. Ésta fue la primera demostración de que el reloj circadiano podría acortar su período con respecto al ciclo de 24 horas cuando las señales sincronizantes no están presentes. Este fenómeno se denominó corrimiento espontáneo (*free running*) (Para una revisión, ver Moore-Ede et al, 1982). Richter es uno de los primeros que observó la persistencia de los ritmos circadianos conductuales en ratas bajo oscuridad continua (Richter, 1922). Johnson es otro de los primeros que reconoció el origen endógeno de los ritmos circadianos (Johnson, 1926, 1939). Él no solamente mostró que los ratones (*Peromyscus leucocus*) mantenían una actividad rítmica en oscuridad continua, sino también observó que el período de estos ciclos se desviaba un poco de 24 horas. Concluyó entonces que la actividad rítmica no dependía directamente de la fluctuación diaria de las condiciones ambientales y era una expresión de un ritmo fisiológico interno. En 1939, Johnson sugirió que "el animal tiene un reloj fisiológico que es excepcionalmente durable, auto-regulable y auto-regenerable cuyos mecanismos necesitan ser descubiertos" (Johnson, 1939, p. 326).

¿Dónde está este reloj y cómo funciona? Desde los 1920's hasta los 1960's, hubo varias investigaciones aisladas sobre los ritmos circadianos, pero no se lograron progresos importantes para contestar estas preguntas.

El concepto que formuló Johnson sobre un reloj endógeno se mantuvo hipotético durante más de tres décadas. En 1972, dos grupos de investigación identificaron independientemente una estructura en el hipotálamo anterior del cerebro de la rata que parece ser esencial para mantener los diversos ritmos circadianos (Moore & Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). La localización de este reloj fue guiada por la suposición de encontrar conexiones neurales entre el reloj y las vías ópticas, ya que este reloj es susceptible a la luz. Siguiendo este razonamiento se empezaron a lesionar selectivamente estructuras conectadas a las vías ópticas, hasta encontrar el núcleo supraquiasmático (NSQ). Las lesiones de dicho núcleo en rata eliminaban los ritmos circadianos (tales como los ritmos de sueño y vigilia, de ingesta de agua, de la actividad locomotora, y de la secreción de la melatonina por la glándula pineal).

Desde ese entonces surgieron tres importantes cuestionamientos para los neurocientíficos interesados en los ritmos circadianos: 1) ¿cómo se sincronizan los ritmos circadianos por el ciclo externo de luz oscuridad? 2) ¿cómo genera el NSQ los ritmos circadianos? 3) ¿cómo es que el NSQ controla la gran variedad de los ritmos circadianos?

1.3 El Marcapaso Circadiano en Mamíferos, El Núcleo Supraquiasmático

1.3.1 Organización anatómica y funcional del Núcleo Supraquiasmático

Los núcleos supraquiasmáticos son un par de grupos neuronales

bilaterales con alta densidad celular que se localizan en el hipotálamo ventral anterior, en la base del tercer ventrículo, y justamente arriba del quiasma óptico. La forma del NSQ difiere mucho entre diferentes especies, pero aquí nos concentramos en el de la rata (Fig. 1.5). En cada NSQ de la rata hay aproximadamente 10^4 neuronas (Güldner, 1976, Van Den Pol, 1980). En la parte medial del NSQ las células están más densamente empaquetadas que las de la parte dorsolateral y anterior. Esto hace difícil definir con precisión la frontera entre el NSQ y el tejido hipotalámico subyacente (Güldner, 1976, Van Den Pol, 1980). El volumen total del NSQ es de aproximadamente 0.1 mm^3 (estimado por Güldner, 1976) o de 0.32 mm^3 (estimado por Van Den Pol, 1980). (Estas diferencias pueden deberse a los diferentes criterios para definir la frontera).

Las neuronas del NSQ son extremadamente pequeñas (Güldner, 1976, Van Den Pol, 1980). El diámetro promedio de las neuronas dorsomediales es de $7.8 \mu\text{m}$ y de las laterales es de $9.6 \mu\text{m}$. Estas neuronas se separan por axones, por dendritas, o por células gliales en razón de una neurona por seis células gliales. Sin embargo, en la parte dorsomedial, muchas células, sean neuronas o glías, hacen contactos pericariales (aposisiones soma-somáticas) y se observan también cadenas de células (Van Den Pol, 1980).

La mayoría de los axones en el NSQ son cortos y no mielinizados. Ellos comienzan y terminan dentro del NSQ. Estos axones forman los llamados

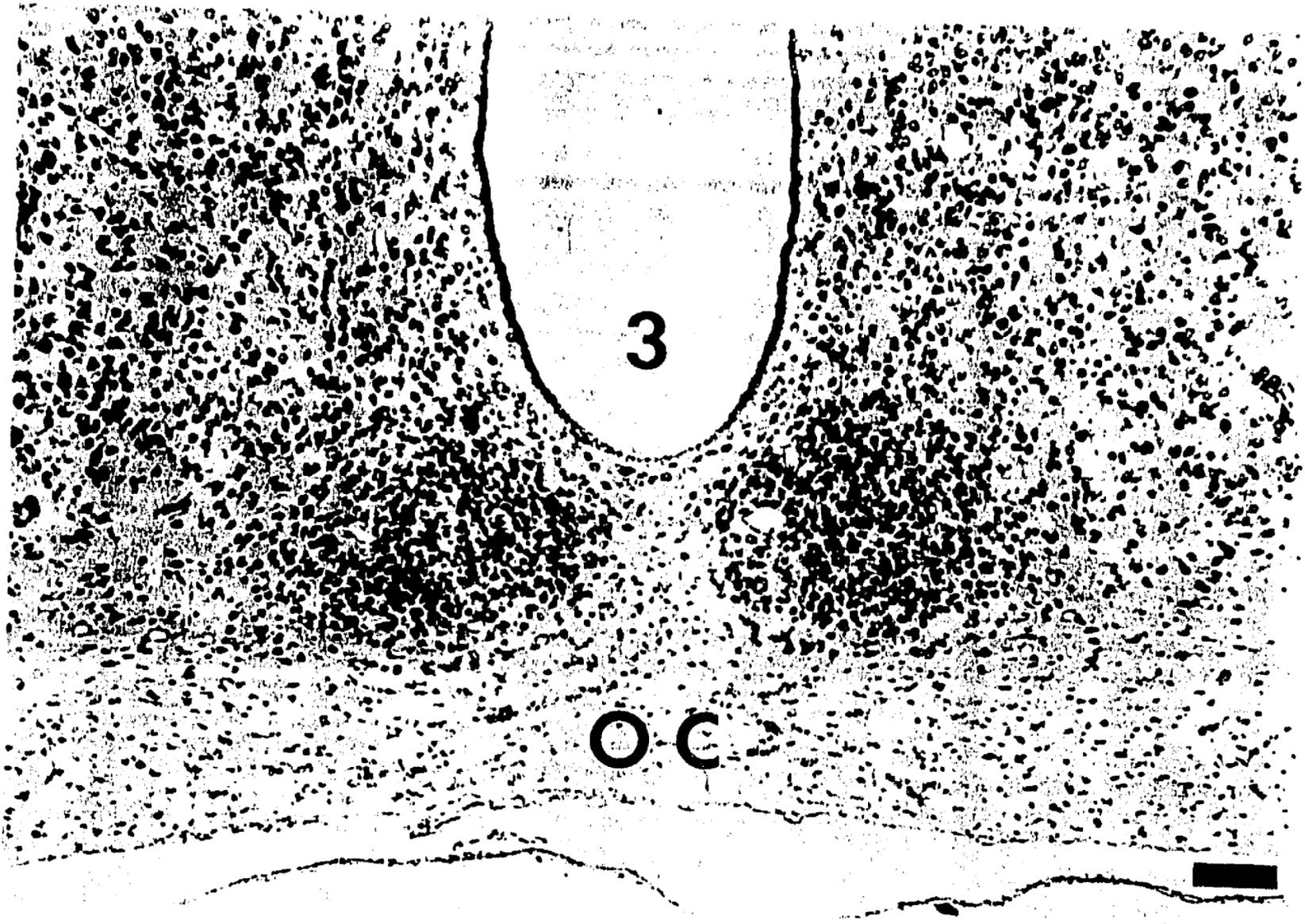


Fig. 1.5 Fotografía de la sección coronal del NSQ de la rata. Los núcleos se presentan como dos masas celulares compactas situadas inmediatamente arriba del quiasma óptico (OC) y lateralmente del tercer ventrículo (3).

circuitos locales. Las dendritas que están dentro del NSQ son también relativamente cortas. Van Den Pol (1980) hizo una clasificación de 5 tipos de neuronas del NSQ, basado en el número y las formas de las dendritas: 1) bipolares simples con dos dendritas, se localizan principalmente en el lado dorsal del quiasma óptico cerca de la línea media; 2) células monopolares con una sola dendrita; 3) bipolar rizo con dos dendritas mas complejas, 4) multipolar radial con tres a cinco dendritas primarias y 5) neuronas espinosas con soma redondo y dendritas muy variadas. Las astroglias tienen más o menos el mismo tamaño que las neuronas del NSQ con 5 a 15 ramificaciones que se proyectan a los vasos sanguíneos cercanos (Moore, 1983).

Los tipos de contactos sinápticos que existen dentro del NSQ son los de Gray-tipo I y Gray-tipo II. El Gray-tipo I (asimétrico) se caracteriza por una alta densidad postsináptica y se piensa que es excitatorio. El Gray-tipo II carece de densidad postsináptica y es inhibitorio. La mayoría de las sinápsis en el NSQ son de Gray-tipo II. Ambos tipos de sinapsis se han descrito también en las terminales del nervio óptico aferente al NSQ (Güldner, 1978).

Inmunohistoquímicamente el NSQ se divide en dos regiones, según su contenido de péptidos: la región dorsomedial y rostral se caracteriza por la presencia de vasopresina (VP) y la región ventrolateral por la presencia del péptido intestinal vasoactivo (VIP). Neuronas que contienen somatostatina se

presentan en todo el núcleo. (Moore, 1983). Además de la vasopresina, VIP y somatostatina existen otros neurotransmisores sintetizados dentro del núcleo, tales como la neurofisina, el ácido gama-aminobutírico (GABA), la bombesina, y el péptido liberador de gastrina. (Van den Pol & Tsujimoto, 1985).

La luz incrementa la actividad metabólica (Fuchs & Moore, 1980) del NSQ. Usando técnicas inmunohistoquímicas se observan proyecciones directas desde la vía visual a los NSQs. Estas proyecciones salen del quiasma óptico en el lado dorsal y terminan en las regiones ventrolaterales de los NSQ's. Estas proyecciones se conocen como tractos retino-hipotalámicos (RHT) (Moore & Lenn, 1972; Hendrickson *et al*, 1972). Glutamato y aspartato podrían ser los neurotransmisores del RHT (Liou, *et al*, 1986). Las proyecciones visuales indirectas provienen del lado ventral del núcleo geniculado lateral (vLGN) y de la hojuela intergeniculada (IGL) (Moore, 1983). Estas proyecciones se denominan tractos geniculo-hipotalámicos (GHT). La presencia de neuropéptido Y (NPY) en el NSQ parece ser originada en estas proyecciones (Liou *et al*, 1986). Las otras aferencias importantes del NSQ provienen de las áreas hipotalámicas anterior, retroquiasmática y de varios núcleos del hipotálamo tuberal, particularmente del núcleo ventromedial y del núcleo raquídeo dorsal del mesencéfalo. Las conexiones eferentes del NSQ proyectan a otras áreas del hipotálamo, a los núcleos septales y al tálamo (hojuelas periventriculares, dorsomediales e intergeniculadas) (Moore, 1983). Los NSQ contralaterales se

conectan entre sí por una serie de proyecciones topográficamente muy organizadas en la parte anteroventral de cada NSQ (Fig. 1.6) (Moore, 1983).

1.3.2 Evidencias que demuestran que el NSQ es el marcapaso circadiano

El NSQ es el principal marcapaso circadiano en mamíferos. Tres grupos de evidencias apoyan esta conclusión:

a) Estudios con lesiones del NSQ. Después de la destrucción bilateral del NSQ en ratas y hamsters mantenidos en oscuridad continua o luz continua, muchos ritmos circadianos desaparecen o están severamente dañados (Ver revisiones Rusak y Zucker, 1979; Aguilar-Roblero y Drucker Colín, 1987). Abolición del NSQ en ratas neonatales eliminan permanentemente los ritmos de actividad locomotora y de ingesta de agua. Esto sugiere que otras regiones del cerebro no tienen la capacidad de reorganizar y suplir la función que desempeña el NSQ (Mosko & Moore, 1979).

b) Oscilación intrínseca en el NSQ. Estudios de aislamiento del NSQ demuestran que éste puede mantener una oscilación intrínseca. Inouye y Kawamura (1979, 1982) observaron ritmo circadiano de actividad multiunitaria en muchas regiones cerebrales de ratas en libre movimiento. Ellos hicieron después una "isla" hipotalámica que contenía al NSQ. Esta isla estaba separada del resto del cerebro por un corte con navaja. El ritmo circadiano de las regiones fuera de la isla desapareció, mientras que persistió dentro de la isla. Poco después de los estudios de Inouye y Kawamura, varios grupos

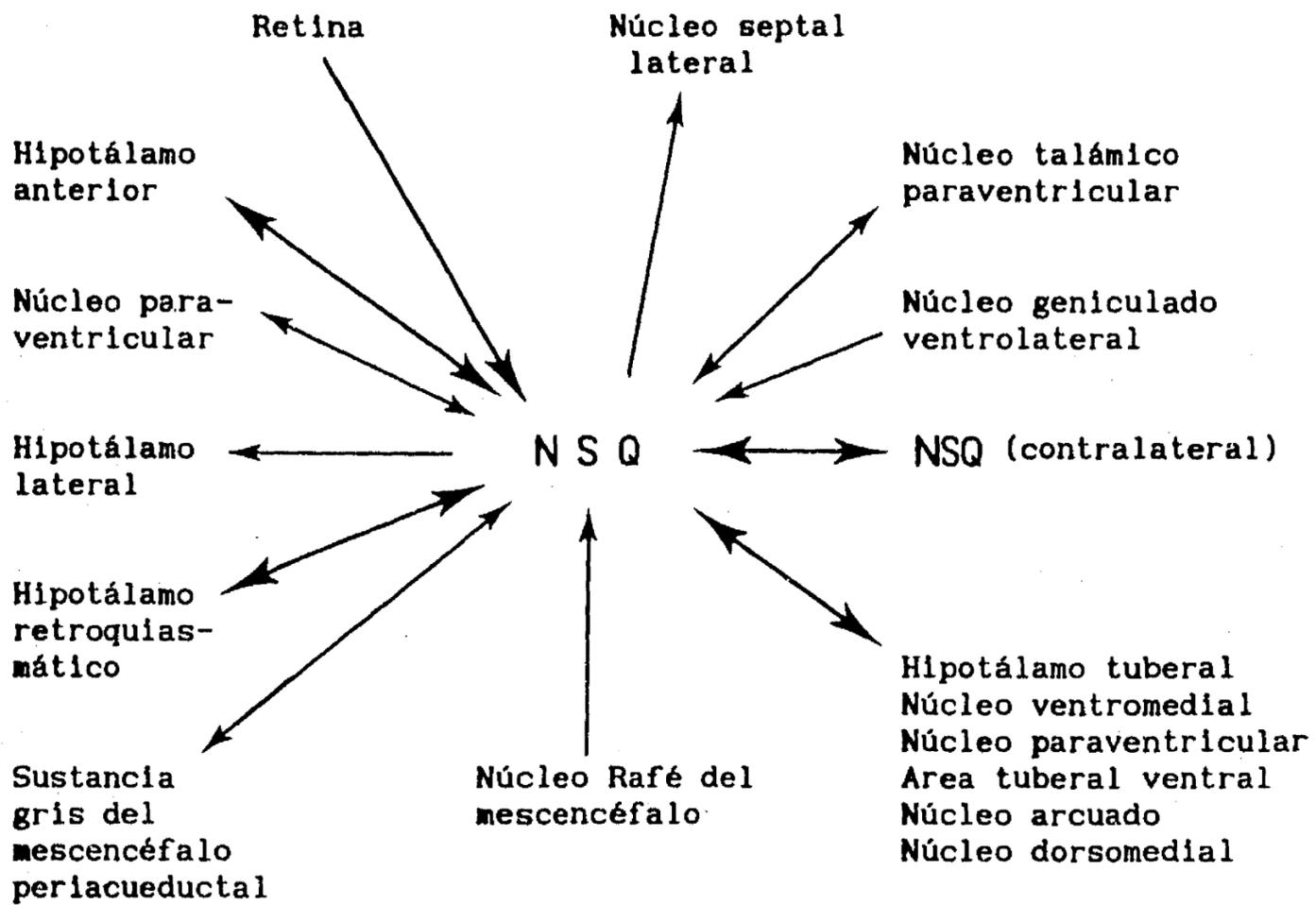


Fig. I.6 Representación diagramática de las conexiones del núcleo supraquiasmático que han sido demostradas experimentalmente. (Ver texto). (Tomado de Moore, 1983)

de investigación demostraron la persistencia del ritmo circadiano de la actividad unitaria *in vitro* en rebanadas hipotalámicas que contienen NSQ (Groos y Hendricks, 1982; Green y Gillette, 1982; Shibata, *et al.*, 1982). Estos estudios demuestran que la oscilación circadiana es intrínseca dentro del NSQ, negando la posibilidad de que el NSQ sea la conexión entre los ritmos expresados y el marcapaso localizado en otra parte.

c) Estudios con trasplante. Animales arrítmicos debido a lesiones del NSQ recuperan los ritmos circadianos después del trasplante de hipotálamo anterior fetal. En cambio, este efecto no sucede en trasplantes de otras áreas del cerebro fetal (Drucker-Colín *et al.*, 1984; Sawaki *et al.*, 1984; Lehman *et al.*, 1987; Aguilar-Roblero *et al.*, 1986; 1992a; 1992b).

Aunque ha sido demostrado que el NSQ es el marcapaso circadiano principal en los roedores, no se puede excluir la posibilidad de la existencia de otros marcapasos circadianos fuera del NSQ. Sobre este aspecto se discutirá en la siguiente sección

1.3.3 Evidencias de multiosciladores acoplados

Con base en las extensas descripciones de los ritmos circadianos en mamíferos, en particular en roedores y seres humanos, los modelos teóricos y matemáticos sugieren que la porción cronométrica del sistema circadiano consiste de más de un oscilador circadiano (Pittendrigh *et al.*

1959; Winfree, 1967; Kabato y Susuki 1980). Estos modelos suponen que existen varios osciladores circadianos que generan una variedad de ritmos sincronizados en condiciones normales, como la del ciclo de luz-obscuridad natural. Estos osciladores posiblemente se acoplan cuando las señales sincronizantes inducen ajustes periódicos de fase mediante mecanismos no bien establecidos. Evidencias que apoyan estos modelos incluyen las siguientes observaciones:

a) Desincronización interna espontánea. El ciclo de sueño y vigilia y el ritmo de temperatura corporal en seres humanos tienen períodos similares con una relación de fase constante en condiciones normales de luz-obscuridad. Estudios realizados después del corrimiento espontáneo muestran períodos diferentes para estos ciclos. Esto puede interpretarse como resultado de un desacoplamiento entre diferentes osciladores para cada ritmo medido (Aschoff & Wever, 1984).

b) Desincronización interna pasajera. Muchos de nosotros hemos experimentado este tipo de desincronización por "Jet lag". Si salimos de la Ciudad de México a las 10:00 de la mañana y volamos hacia Tokio, catorce horas después llegamos a Tokio, zona de tiempo con 15 horas de diferencia. A esta hora en México acaba de pasar la medianoche y en Tokio es la mitad de la tarde. Gracias a los vuelos comerciales podemos trasladarnos a otro lado de la Tierra en pocas horas, pero el sistema cronométrico endógeno requiere varios días para resincronizarse al nuevo tiempo local. Lo interesante es que

diferentes ritmos fisiológicos muestran diferentes velocidades de resincronización. El estado de desorden temporal después del cambio de zona de tiempo y antes de que todos los ritmos regresen a su relación de fase original se denominan desincronización interna pasajera. (Moore-Ede, et al, 1977).

c) Desincronización interna forzada. También es posible separar los ritmos poniendo a los sujetos en días artificiales con períodos diferentes de (pero cercanos a) 24 horas sin que ellos se den cuenta de este cambio (Moore-Ede et al, 1982).

d) Fenómeno de desdoblamiento. Cuando algunos roedores nocturnos se exponen constantemente a luz brillante por intervalos de tiempo largos, el ritmo circadiano de la actividad motora, que normalmente sólo presenta una componente, muestran una disociación en dos componentes. Al iniciarse este desdoblamiento, cada componente del ritmo presenta un período diferente, sin una relación de fase constante entre ellos. Después de algún tiempo, las dos componentes del ritmo establecen una relación de fase constante. Esto se ha interpretado como resultado de un desacoplamiento de diferentes osciladores subordinados a un mismo ritmo (Pittendrigh & Daan, 1976).

¿Es el NSQ el único marcapaso circadiano en los mamíferos? En experimentos de lesión total de ambos NSQs de rata no se elimina el ritmo de temperatura corporal, sugiriendo la existencia de

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

otro(s) oscilador(es) fuera del NSQ. (Satinoff & Prosser, 1988). También se han reportado posibles marcapasos adicionales en el ojo de los roedores con los cuales inducen los ritmos sensibles a la luz (Terman & Terman, 1985). Pero existe mucha discusión sobre la localización de los sustratos anatómicos involucrados en estos posibles osciladores.

Existen evidencias que indican que los NSQs podrían funcionar como un sistema multioscilario. Picard y Turek (1982) reportaron que se podía suprimir el desdoblamiento del ritmo locomotor en hamsters lesionando unilateralmente uno de los NSQs. Después de destruir uno de los NSQs, desaparecía un componente de este ritmo. Una interpretación de estos resultados es que los NSQs funcionan como dos osciladores circadianos acoplados (uno en cada lado). Hay otra evidencia que apoya esta hipótesis. Después de lesionar un NSQ, se presenta un pequeño cambio de período en el corrimiento espontáneo. (Ebihara & Kawamura, 1981; Picard & Turek, 1983; Takahashi & Menaker, 1982).

I.4 Electrofisiología del Núcleo Supraquiasmático

Las células del NSQ presentan actividad eléctrica espontánea. En varios estudios hechos *in vivo* en ratas se han reportado diferentes intervalos de frecuencia de disparo en el registro eléctrico unitario: entre 0.2 a 2.2 Hz (Meijer *et al.* 1986); entre 2 a 8 Hz (Nishino y Koizumi, 1977) y entre 0.1 a 11 Hz (Miller *et al.*, 1987; Glotzbach *et al.* 1987). En todos

estos estudios *in vivo*, los patrones de descarga son irregulares y el promedio de la frecuencia de descarga varía considerablemente en diferentes horas (Meijer, *et al*, 1986; Miller *et al*, 1987).

Registros eletrofisiológicos *in vitro* revelan características diferentes sobre la frecuencia de disparo espontáneo del NSQ. El intervalo de frecuencias de disparo es de 3 a 9 Hz en la mayoría de los reportes en la literatura. (Green & Gillette, 1982; Gillette, 1986; Groos & Hendricks, 1982; Shibata *et al.*, 1982, 1984a, 1984b; Thomson, 1984; Thomson *et al.*, 1984). Este intervalo de frecuencia es comparable con el de estudios *in vivo*, aunque las frecuencias menores a 1 Hz no se reportan. Sin embargo, se han visto neuronas con disparos espontáneos a intervalos regulares. Groos y Hendricks (1979) fueron los primeros que caracterizaron este patrón de disparo neuronal. Dichas células presentaban una distribución de intervalos entre espigas (DIEE) de tipo Gausiana con un pequeño coeficiente de variación. Las células con coeficiente de variación <0.2 se clasificaron como tipo regular. Este patrón de disparo podría considerarse como un oscilador ideal. De acuerdo con este criterio, 16% de las células registradas fueron regulares. Las células restantes fueron de tipo irregular o disparaban en ráfaga (Tipo I, II, y III según Shibata *et al*, 1984a). Groos y Hendricks también hicieron registros eléctricos del NSQ *in vivo*. Siguiendo el mismo criterio se encontraron que sólo 2 de los 397 registros se podían clasificar como regulares. Por lo tanto la probabilidad de ocurrencia de este patrón es mucho más frecuente en estudios *in vitro* que en animal

intacto. Esta diferencia podría deberse a la aplicación de anestésicos durante los registros en animal intacto. Thomson *et al.* (1984) mostraron la destrucción del patrón regular registrado *in vitro* mediante la administración de uretano o pentobarbital en el medio.

El promedio de la frecuencia de disparo registrado en rebanadas de NSQ *in vitro* presenta fluctuaciones circadianas. Este aspecto ya se mencionó en la sección 1.2.2.

¿Qué papel juegan los potenciales de acción en la generación de la ritmicidad? Esta pregunta es un tema de discusión. La tetrodotoxina (TTX) es un bloqueador de los canales de sodio voltaje-dependientes. La administración de TTX en la preparación de rebanadas del NSQ abole los potenciales de acción de las neuronas del NSQ (Sugimori *et al.*, 1984). Schwartz *et al.* (1987) perfundieron TTX en NSQ de ratas en libre movimiento por catorce días. Los ritmos circadianos expresados desaparecieron. Esto indica que los potenciales de acción son necesarios para la expresión de la actividad rítmica conductual. Cuando terminaron de perfundir TTX los ritmos reaparecieron. Lo interesante es que la fase del ciclo circadiano que reapareció continuó la misma pendiente del corrimiento espontáneo observado antes de la perfusión. Así se podría deducir que el oscilador endógeno había continuado corriendo durante la administración de TTX, a pesar de que los potenciales de acción fueron abolidos. Sobre esta cuestión se discutirá con detalle más adelante.

Se ha estudiado también el papel de los iones de calcio sobre los potenciales de acción en el NSQ *in vitro*. Como ya se mencionó en la sección 1.2.2, la actividad eléctrica del NSQ en la preparación de rebanadas presenta un ritmo circadiano. En la preparación con solución libre de calcio, este ritmo desaparece y también desaparece el patrón neuronal de disparo regular. (Shibata, *et al*, 1984b). El calcio es esencial para la transmisión sináptica de las neuronas del NSQ (Shibata, 1984c). Así pues se infiere que la transmisión sináptica es muy importante para la generación de los disparos neuronales de tipo regular del NSQ. Sobre cómo podría participar el calcio en la generación de ritmicidad, o en la expresión del ritmo circadiano de la actividad eléctrica, se discutirá más adelante.

El registro electrofisiológico *in vitro* es un método muy importante que proporciona información útil sobre la frecuencia de disparo y el patrón de descarga neuronal en el NSQ. Pero para lograr mayor información electrofisiológica se requieren registros intracelulares o técnicas de *patch-clamp*.

Debido a que los tamaños de las neuronas del NSQ son extremadamente pequeños, poco se han estudiado las propiedades eléctricas intracelulares. Wheal y Thomson (1984) hicieron registros intracelulares en rebanadas hipotalámicas que contenían NSQ. En 22 células registradas el intervalo de potencial de reposo era de $-50 \mu\text{V}$ a $-68 \mu\text{V}$. Estas células

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

tenían una resistencia de entrada alta (72 - 260 M Ω), y una constante de tiempo pequeña de la membrana (3.0 - 15.5 ms). Los potenciales de acción también eran de duración corta (0.6 - 1.0 ms en la amplitud media) y casi siempre presentaban una hiperpolarización post-potencial de acción de 10 a 20 mV. La amplitud de los potenciales de acción (\pm desviación estandar, SD) fue de 83.8 ± 12.6 mV y el umbral del potencial de acción (\pm SD) fue de -47.8 ± 2.2 mV. Células con potencial de membrana menor que -60 mV presentaban actividades espontáneas. La frecuencia de los disparos dependía de la negatividad del potencial de membrana. De tal manera que entre más negativo era el potencial de membrana menor era la frecuencia de disparo. Células silenciosas podían activarse con pulsos despolarizantes. La despolarización podía introducir actividades regulares, irregulares ó en ráfaga.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

A partir de las observaciones anteriores podemos obtener un panorama general del elemento cronométrico del sistema circadiano, pero estudios que indaguen los mecanismos por los cuales se genera la ritmicidad y se trasmite a los efectores son aun insuficientes. Por ejemplo, aunque el promedio de la frecuencia de disparo de las neuronas del NSQ presenta una fluctuación circadiana (ver la sección I.3.2), se sabe muy poco de la razón por la cual los patrones de disparo difieren tanto entre las células de una misma zona en el mismo lapso de tiempo. Tampoco se ha estudiado sistemáticamente si ambos NSQs funcionan como una unidad oscilatoria única, o son mas bien un conjunto de osciladores acoplados.

Este estudio tiene por objetivo indagar las propiedades electrofisiológicas del NSQ mediante experimentos *in vitro* y realizar un análisis teórico de cómo podrían participar estas propiedades en la generación de los ritmos circadianos. En concreto, vamos a examinar las siguientes preguntas:

- 1.- ¿Podrían funcionalmente considerarse a los núcleos supra-quiasmáticos contralaterales como dos unidades oscilatorias independientes?
- 2.- ¿Existe alguna relación funcional entre los diferentes patrones de disparo de las neuronas del NSQ?

OBJETIVOS

Para tratar la primera pregunta se propone:

- 1.1. Determinar la relación de fase con respecto a la oscilación de la actividad eléctrica unitaria entre ambos NSQs bajo diferentes condiciones experimentales. Esto ayudaría a apoyar la conclusión de que cada NSQ actúa como una unidad oscilatoria independiente, que emana de experimentos de lesión unilateral del NSQ cuando desaparece el desdoblamiento del ritmo (Picard y Turek, 1982).

Con respecto a la segunda pregunta, proponemos:

- 2.1. Caracterizar detalladamente los patrones de disparo de las neuronas del NSQ mediante registros extracelulares unitarios.
- 2.2. Elaborar un modelo de redes neuronales para explicar la existencia de estos patrones de disparo.

III. MATERIAL Y METODOS

III. 1 Animales

Se utilizaron 30 ratas machos de la cepa Wistar (de 150g a 200g de peso corporal). Se colocaron los animales en un bioterio con alimento y agua *ad libitum*. La temperatura ambiental y la humedad fueron más o menos constantes. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz - oscuridad 12:12 horas durante dos semanas. Después, 14 animales se colocaron en un cuarto con luz roja tenue constante de 30 lux (grupo OO). El resto de los animales se mantuvieron en condiciones iniciales (grupo LO).

III. 2 Sistema de Registro Electrofisiológico

La Fig. III.1 muestra los componentes básicos del proceso de registro electrofisiológico. El sistema de registro eléctrico y el sistema *in vitro* fueron montados al inicio de este proyecto. Se hizo la distribución espacial del cuarto de electrofisiología *in vitro*. También se hicieron la cámara de Faraday y el amplificador para análisis de señales en la computadora. Este amplificador fue diseñado por el departamento de cómputo del Instituto de Fisiología celular. La cámara de registro es de acrílico transparente, circular con un diámetro de 1.5 cm y una profundidad de 1 cm. En el fondo de la cámara se puso una capa de esponja de poliestireno para disminuir la turbulencia causada por la corriente de la solución Krebs. Una malla de nylon se colocó a la mitad de la profundidad de la cámara, para

Limel Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

mantener las rebanadas inmersas en la solución. En la cámara de registro se circuló la solución Krebs previamente calentada a la temperatura de 36.8 a 37.2 °C y burbujeada con 95% de oxígeno y 5% de CO₂ con pH de 7.2 a 7.4. La velocidad de perfusión fue de 3 ml por minuto. Esta velocidad fue determinada por varios experimentos para lograr una óptima condición para la rebanada y facilitar el registro. La solución de Krebs fue la sugerida por Yamamoto (1972), y tiene la siguiente composición (en milimolar): NaCl 124, KCl 5, KH₂PO₄ 1.24, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2.4, NaHCO₃ 26², glucosa 10. La actividad eléctrica neuronal se registró extracelularmente mediante micropipetas de vidrio usadas como electrodos. Las pipetas se llenaban con una solución de NaCl de 2M saturada de azul de pontamina con el fin de tener una referencia visual. La resistencia de los microelectrodos fue de 4 a 10 MΩ. Se colocaron los microelectrodos bajo control visual con la ayuda de un microscopio de disección Nikon SMZ-1B y un micromanipulador Narishige. La iluminación de la preparación se hizo a través de un sistema iluminador de fibra óptica. Las señales eléctricas se hicieron pasar por un preamplificador y un amplificador de la marca Grass. Los registros fueron monitoreados por un osciloscopio Tektronix 2213 A de 60 MHz. Los registros se grabaron mediante una grabadora de FM Hewlett Packard.

²Se ajustó el pH a 7.28 para la temperatura deseada, variando la concentración de NaHCO₃, y la osmolaridad se mantuvo a 300 mOsmol modificando la proporción de NaCl.

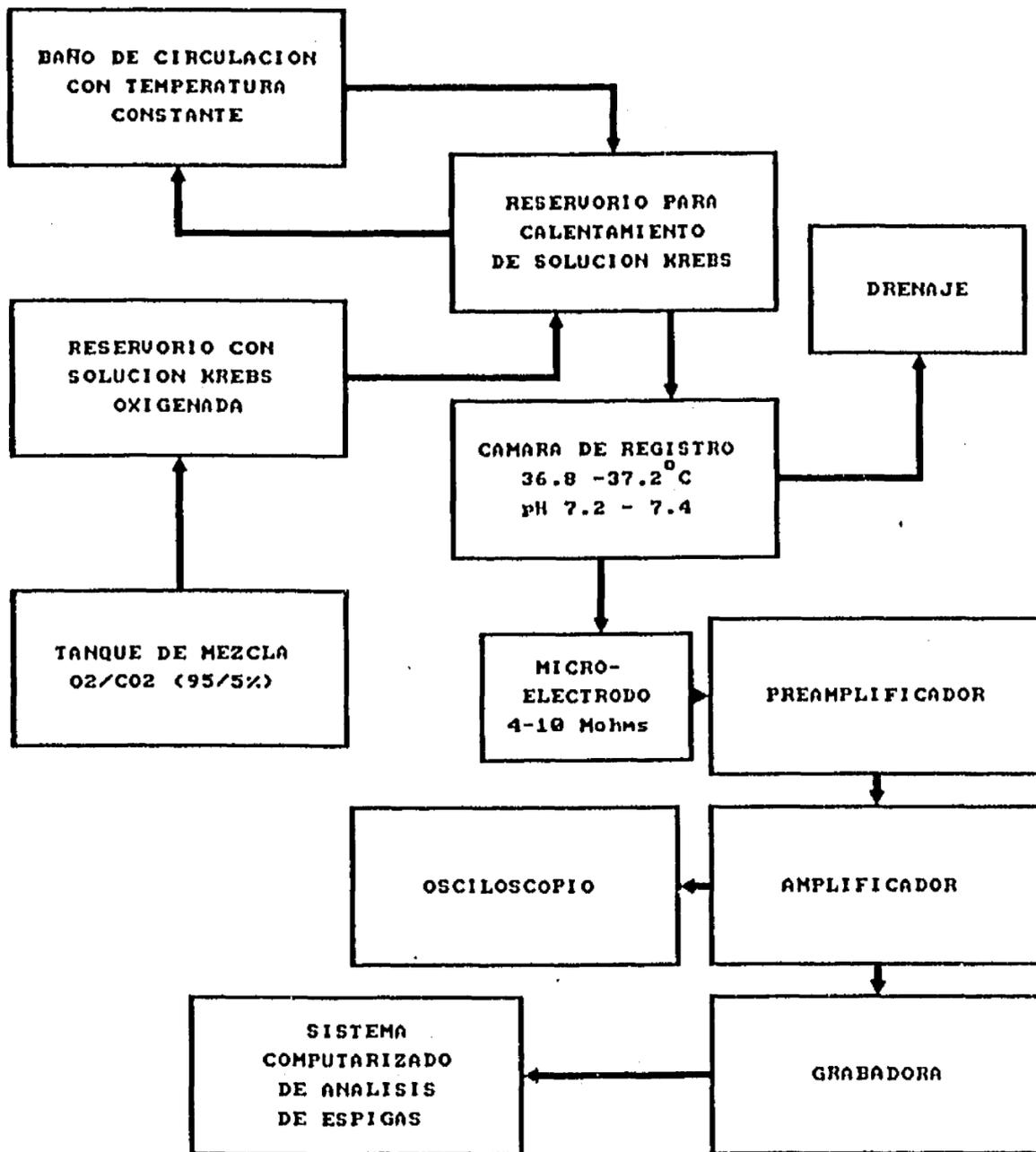


Fig. III.1 Componentes básicos del sistema de registro electrofisiológico.

Procedimientos Experimentales

Se desnucaban los animales y se decapitaban en diferentes tiempos circadianos, bajo las condiciones de luz correspondientes. Se removieron los cerebros y rápidamente se colocaron en una caja de petri que contenía solución de Krebs a 4°C. Usando un bisturí se quitó el resto de cerebro dejando un bloque de 0.5cm x 0.5cm x 1.0cm que contenía el hipotálamo y el quiasma óptico. Se rebanó este bloque en el plano coronal a 400µm con un rebanador de tejido. Se identificaron las rebanadas que contenían el NSQ visualmente y se trasladaron a la cámara de registro. Se tomó cuidado especial sobre los lados derecho e izquierdo originales de la rebanada. Se asignaron los lados con la dirección rostro-caudal hacia abajo. Este procedimiento normalmente se hacía en menos de 5 minutos. Una vez estando en la cámara de registro con medio oxigenado y pH y temperatura deseados, las rebanadas fueron incubadas por 30 minutos antes de iniciar el registro (la técnica de la preparación de la rebanada cerebral se basa en el estudio de Hatton *et al*, 1980). Se registró la actividad eléctrica extracelular unitaria principalmente por la capa superficial de la rebanada. Se bajaba el electrodo con el micromanipulador hasta encontrar las señales deseadas, con el fin de evitar posibles micro-cortes provenientes del electrodo por

defecto del micromanipulador³ y lograr mayor duración de la rebanada viva sólo se registraba por la capa superficial (menos de 100 μm de profundidad). Las profundidades de las rebanadas no dan más información, ya que corresponden a mismas coordenadas del NSQ para cada caso. Cada célula fue monitorizada en el osciloscopio por 5 minutos antes de grabar la señal, asegurando la estabilidad de la actividad eléctrica registrada. Se grabó cada registro por lo menos dos minutos en audiocinta de carrete. Para obtener un muestreo estadístico amplio y no polarizado, se movía el electrodo con un paso de más o menos 50 μm en el plano horizontal y en cada posición se dejaba por lo menos 5 minutos, antes de moverlo a la siguiente posición. Este procedimiento permitió registrar las células que estaban silenciosas al colocar el electrodo por primera vez en una posición. No se registraron las localizaciones de cada neurona registrada en el NSQ porque nuestra hipótesis inicial es suponer cada NSQ funciona como una unidad oscilatoria y estudios previos habían demostrado que las lesiones en diversas partes del NSQ no abolían ritmos sólo hasta destruir 100% de un lado y 75 % de otro lado (Van den Pol y Powley, 1979; Mosko y Moore, 1979). Estas evidencias sugieren que el marcapaso no localiza en alguna parte particular del NSQ. Con este sistema de registro, la duración máxima de registros eléctricos en una rebanada fue de 23 horas con 30 minutos, aunque

³El micromanipulador que se usó en este experimento fue adaptado para este sistema de registro *in vitro*. Tiene el defecto de que los movimientos verticales del electrodo y del cuerpo del micromanipulador no están en el mismo ángulo.

sólo se tomaron los registros de las primeras 8 horas a partir de la hora de colocar la rebanada en la cámara con el fin de asegurar que las señales bioeléctricas no estuvieran alteradas. Se registraron de un promedio de 15 células por rebanada. Como resumen de este procedimiento experimental ver la Fig. III.2.

Se analizaron los registros mediante un sistema computarizado desarrollado en el departamento de cómputo del Instituto de Fisiología Celular. Este sistema de análisis puede discriminar entre las señales bioeléctricas y el ruido de fondo y digitalizar las espigas, elaborar histogramas de frecuencia y de distribución de intervalos entre espigas (DIEE). Se usó la prueba de Scheffe para la comparación múltiple de valores. Este análisis fue realizado con el paquete estadístico SPSS/PC. Para analizar la correlación de las curvas temporales de los NSQs contralaterales se usó la función de correlación cruzada⁴ (Cooper et al, 1980).

⁴En este caso la correlación cruzada es el método de análisis adecuado ya que compara dos funciones oscilatorias mientras las otras correlaciones no son convenientes en este caso. Por ejemplo, la correlación de Pearson sólo es adecuada para comparar dos funciones lineales .

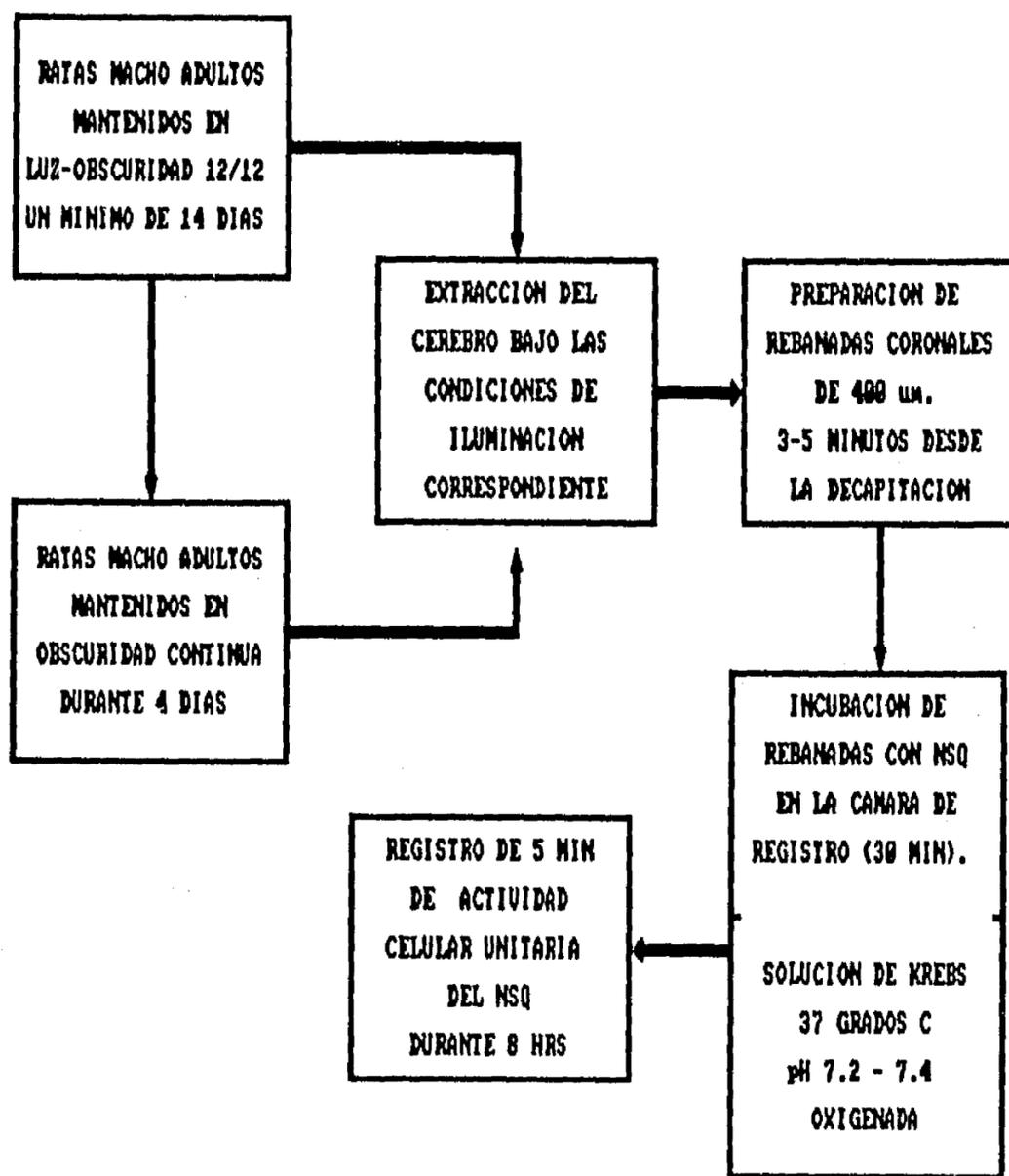


Fig. III.2 Diagrama del procedimiento experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV. 1. Caracterización de las Fluctuaciones Circadianas de Cada Núcleo Supraquiasmático

IV. 1. 1 Resultados Experimentales

Este experimento tiene como finalidad examinar la pregunta 1 y cumplir el primer objetivo.

Se registraron 186 células del grupo LO y 238 células del grupo OO. Las curvas de la distribución temporal de la actividad eléctrica de los animales mantenidos en luz - oscuridad muestran una clara oscilación circadiana. El nivel máximo de actividad ocurrió durante las 15 - 18 horas del tiempo geográfico local (Fig. IV. 1a). Dicha oscilación persistió en la curva temporal de los animales mantenidos en cuatro días de oscuridad continua (Fig. IV. 1b). El nivel máximo de actividad ocurrido durante las 12 - 15 horas del tiempo geográfico local. La amplitud de la oscilación del grupo LO fue mayor (de 2.7 Hz a 7.0 Hz) que la del grupo OO (de 2.5 a 6.1 Hz).

Cuando analizamos los datos separando los del lado derecho del NSQ con los del lado izquierdo, observamos un fenómeno interesante. Las curvas de los registros del lado derecho bajo ambas condiciones experimentales son bimodales y no hay modificación de fase después de cuatro días de corrimiento espontáneo. En cambio, las curvas del lado izquierdo son

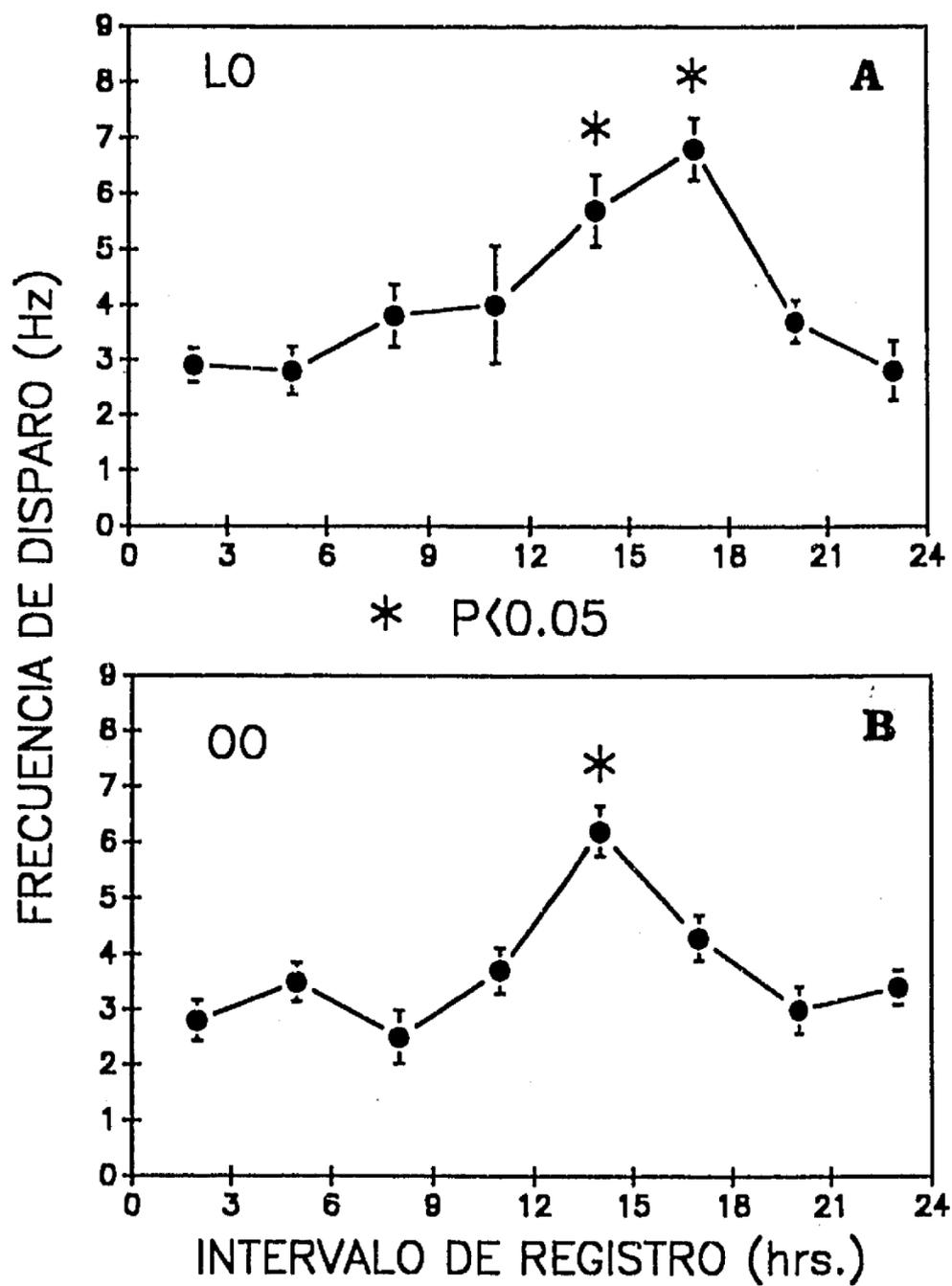


Fig. IV. 1 A) Distribución temporal de frecuencias de disparo de 186 registros extracelulares unitarios en 8 intervalos de tiempo. Los animales fueron mantenidos en luz - oscuridad 12:12 horas. (*) diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Scheffe). b) Distribución temporal de frecuencias de disparo de 238 registros extracelulares unitarios en 8 intervalos de tiempo Los animales fueron mantenidos en oscuridad continua durante 4 días. (*) diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Scheffe).

básicamente unimodales y el nivel máximo de actividad en la curva de LO ocurre durante las 14 - 16 horas, mientras que el máximo de actividad en la curva de OO ocurre durante las 12 - 14 horas. Esto implica un avance de fase de aproximadamente dos horas (Fig. IV. 2). (Zhang & Aguilar Roblero, 1990).

La Fig. IV. 3 es el resultado del análisis de la correlación cruzada entre las curvas de ambos lados tanto en luz - oscuridad (LO) como en oscuridad continua (OO). Podemos ver que los máximos valores del índice de la correlación (r) ocurrieron en el punto de defasamiento de dos horas. El r del grupo de OO ($r = 0.68$) es menor que el r del grupo LO ($r = 0.80$).

IV. 1. 2. Discusión del Experimento Anterior

La curva de distribución temporal de la actividad eléctrica del grupo de luz - oscuridad muestra una clara oscilación circadiana. Esta observación coincide con los reportes en la literatura. La oscilación circadiana también fue observada en la curva de oscuridad continua, la cual demuestra la naturaleza endógena del ritmo, tal como ha sido previamente reportado. El resultado del análisis por separado de los lados del NSQ indica una asimetría, tanto en la forma de la fluctuación como en la fase. El defasamiento de dos horas en las curvas de la correlación cruzada indica que las oscilaciones de la actividad eléctrica de los NSQs contralaterales son asimétricas tanto en la condición de luz - oscuridad como en la condición de oscuridad continua. La disminución del índice (r) de la correlación puede interpretarse como resultado la disminución de la fuerza

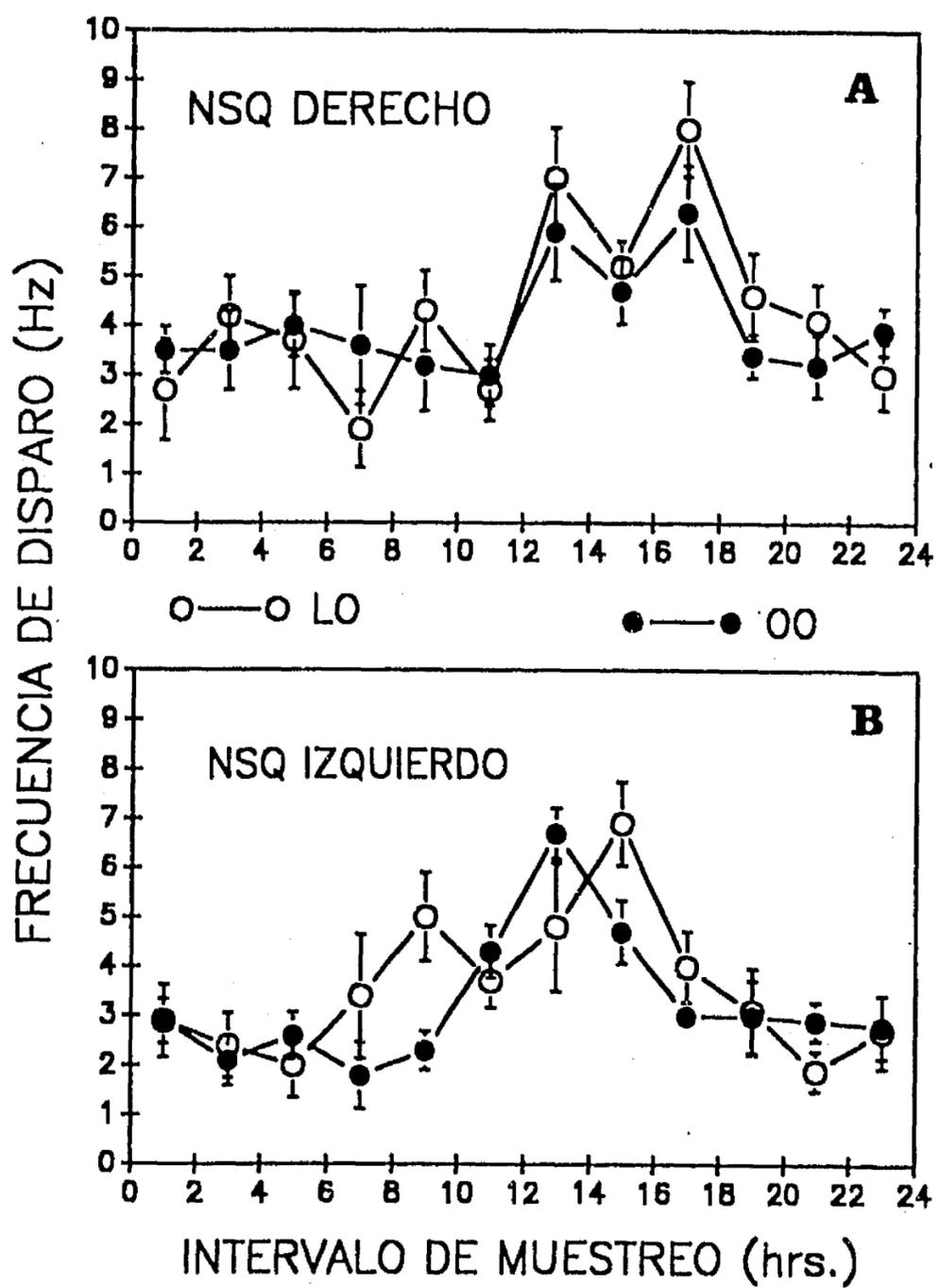


Fig. IV.2 A) Distribución temporal de frecuencias de disparo de NSQs derechos del grupo LO (círculos blancos) y del grupo OO (círculos negros). B) Distribución temporal de frecuencias de disparo de NSQs izquierdos del grupo LO (círculos blancos) y del grupo OO (círculos negros).

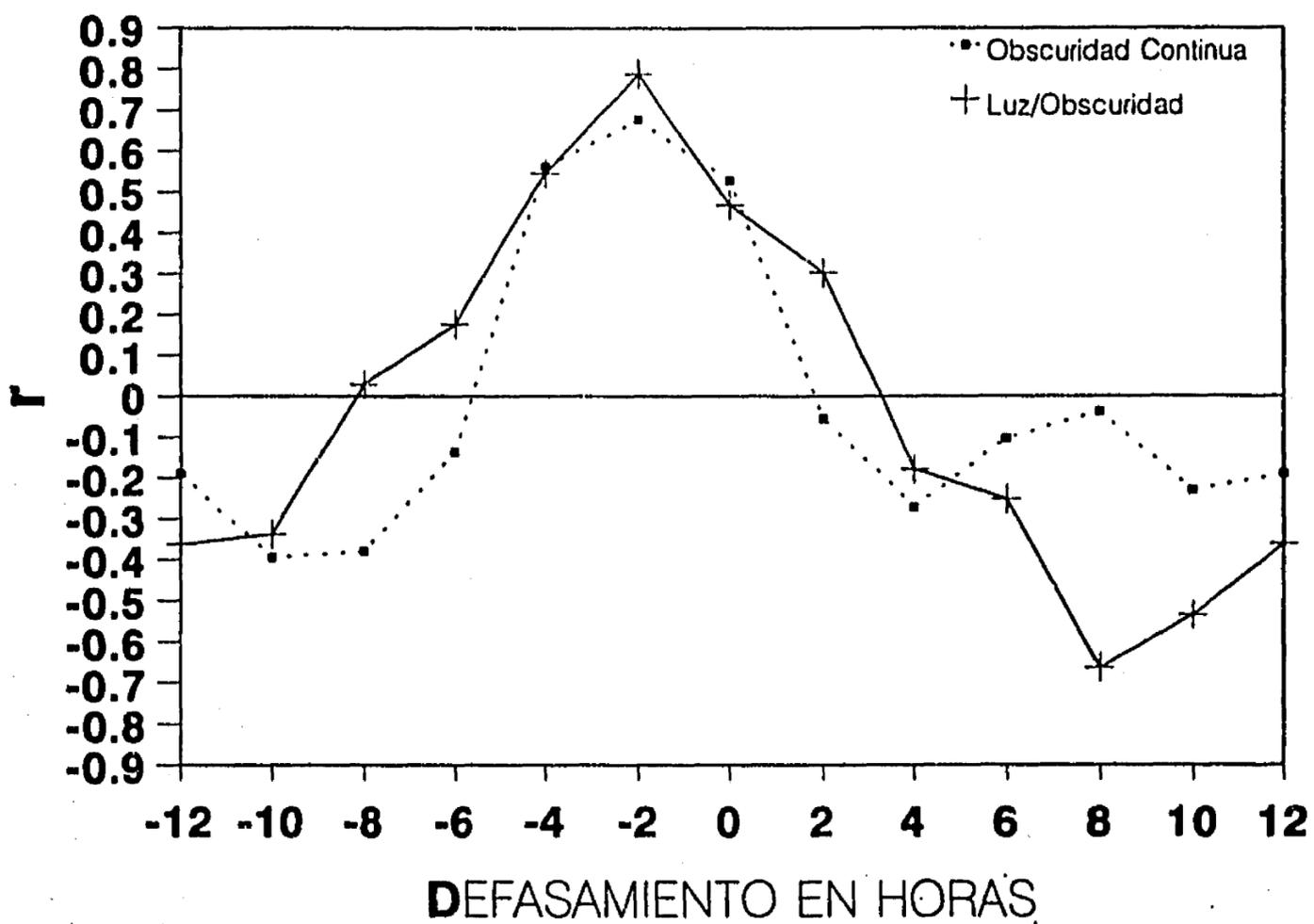


Fig. IV. 3 Correlación cruzada de las curvas de distribución temporal de frecuencias de disparo de los NSQs contralaterales. r : índice de correlación.

de acoplamiento en la condición de oscuridad continua. Esta asimetría podría implicar dos unidades oscilatorias independientes. Estas unidades se corresponderían con la anatomía del núcleo. En la última parte de la sección 1.3.3 se mencionaron algunas evidencias que sugieren que los dos NSQs podrían ser dos unidades oscilatorias con diferentes períodos. Estas dos unidades están acopladas en condiciones normales de luz - oscuridad, pero cuando desaparecen las señales de sincronización, estas unidades podrían desacoplarse. Nuestro resultado experimental sugiere que si los NSQs son dos unidades oscilatorias, entonces podrían tener diferente sensibilidad al cambio externo. En nuestro caso, después de desaparecer las señales sincronizantes, el NSQ del lado izquierdo aceleró su oscilación en pocos días (4 días) mientras que el lado derecho parecía insensible a este cambio. Esta observación sugiere que el NSQ de un lado podría funcionar como marcapaso "maestro" regulando otros marcapasos existentes. ¿Cómo se acoplan los osciladores del sistema circadiano? Se han observado receptores de melatonina de alta densidad en el NSQ (Weaver, *et al*, 1989) y es evidente que la melatonina puede jugar un papel importante en la sincronización (Moore, 1992). Pero, ¿la melatonina podría participar en el acoplamiento de diferentes osciladores? Un estudio realizado en nuestro laboratorio (Aguilar-Roblero & Vega-Gonzalez, enviado a Brain Research) mostró que la pinealectomía en hamster dorado induce una reducción de la latencia del desdoblamiento en luz continua y un aumento de la duración de los transitorios antes de establecer una relación de fase estable entre los dos componentes rítmicos. Esta observación sugiere que la glándula pineal podría

proveer uno de los mecanismos de acoplamiento endógeno entre diferentes osciladores en el sistema circadiano del roedor. Sobre este aspecto hacen falta más investigaciones. Sería interesante observar la correlación de las curvas de distribución temporal de la actividad eléctrica de ambos NSQs en ratas pinealectomizadas para confirmar la conclusión del estudio anterior.

IV. 2 Caracterización electrofisiológica del núcleo supraquiasmático

Nuevo Patron de Disparo

IV. 2 1 Resultados Experimentales

Se registraron un total de 472 células del NSQ de 30 animales en todas las horas circadianas. El intervalo de la frecuencia de disparo era de 0.60 Hz a 15.07 Hz aunque el 94% de las células registradas tenían las frecuencias de disparo de 1.0 Hz a 10.0 Hz. Todas las células registradas se pueden asignar uno de cuatro tipos típicos, de acuerdo a su distribución de intervalos entre espigas (DIEE). En las figuras IV.4 - IV. 7 se muestran ejemplos de estos cuatro tipos de células. La Fig. IV.4 es un ejemplo de una célula con patrón de disparo regular, esto es, sólo existe un pico de intervalos en la DIEE con una desviación estandar de 0.01. La frecuencia de disparo de esta célula es de 8.58 Hz. En la Fig. IV. 5 se muestra un patrón de disparo irregular con una DIEE amplia y la Fig. IV. 6 es una célula que tiene períodos silenciosos de más de 1 segundo entre los cuales dispara súbitamente en ráfagas. La DIEE de este patrón se parece bastante a la del patrón anterior. Estos tres patrones han sido reportados anteriormente

(Groos & Hendricks, 1979; Shibata, *et al.*, 1984a; Thomson, *et al.*, 1984). La neurona de la Fig. IV. 7 muestra un patrón de disparo irregular y una distribución de intervalos amplia, pero los intervalos están agrupados alrededor de múltiplos de un intervalo basal (armónicos), y los pesos de cada grupo de armónicos seguían la envolvente de la distribución al azar de la Fig. IV.5. Este patrón no ha sido reportado en la literatura previamente.

Por razones que se explicarán posteriormente, se clasificaron sólo tres patrones cualitativamente diferentes, de acuerdo la DIEE: 1) el patrón de la distribución al azar, que es asimétrica, amplia, como se muestra en las Figs. IV. 5 y 6, 2) el patrón con armónicos, como se muestra en las Figs. IV.7, y 3) el patrón "entonado", que se aproxima a un oscilador ideal (Fig. IV.4). La estadística descriptiva de las frecuencias de disparo de cada tipo neuronal y el porcentaje en la población total se presentan en la Tabla IV.1. Se puede observar que dependiendo del criterio que use, la proporción relativa de los tipos de células varía. Cuando se usa DIEE como criterio de clasificación hay una disminución de la proporción de las células entonadas y aparece el tipo "armónico".

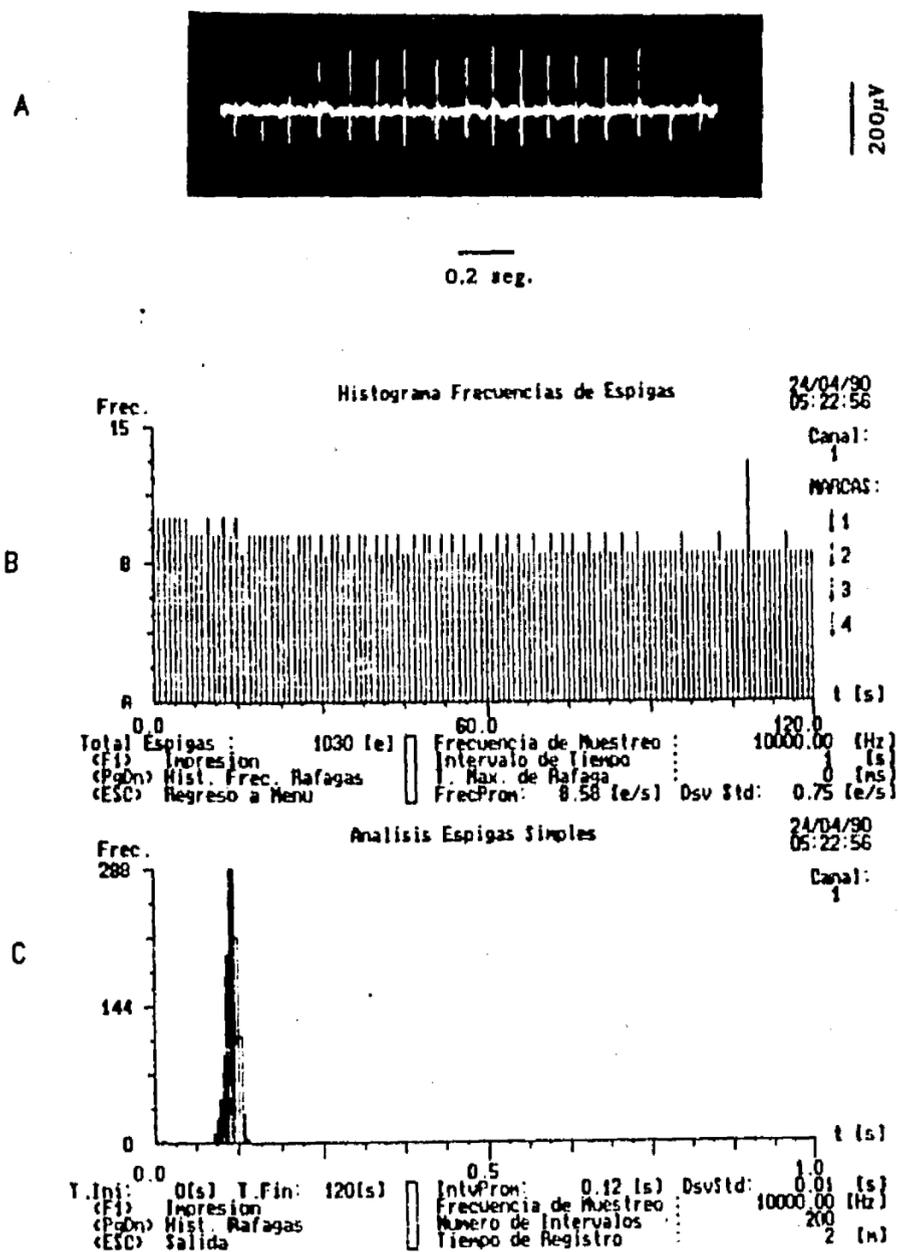


Fig. IV. 4 Ejemplo de una célula con disparos regulares. a) Trazo de espigas que corresponde al histograma de frecuencias b), y c) Distribución de intervalos entre espigas (DIEE).

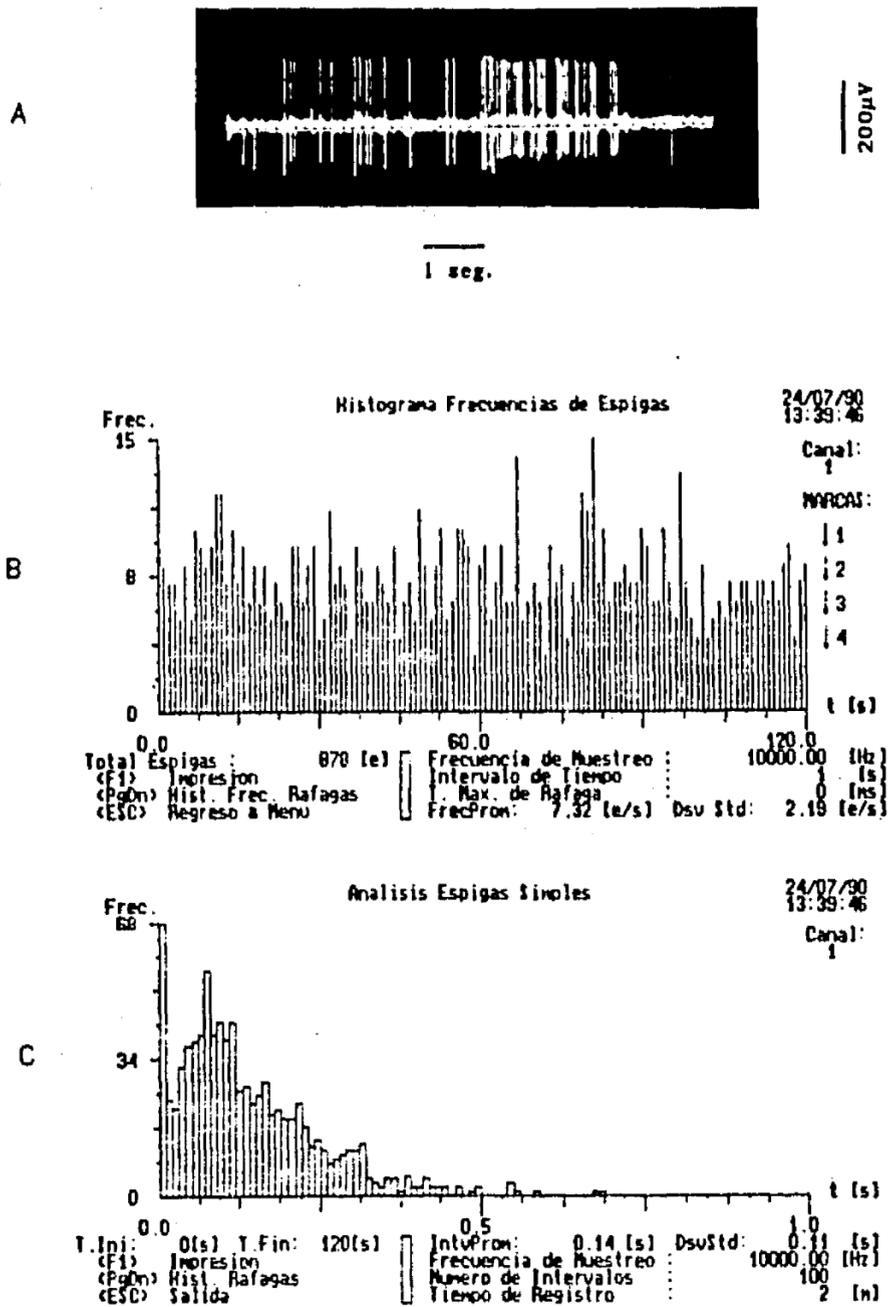


Fig. IV. 5 Ejemplo de una célula con disparos irregulares. a) Trazo de espigas que corresponde al histograma de frecuencias b), y c) Distribución de intervalos entre espigas (DIEE).

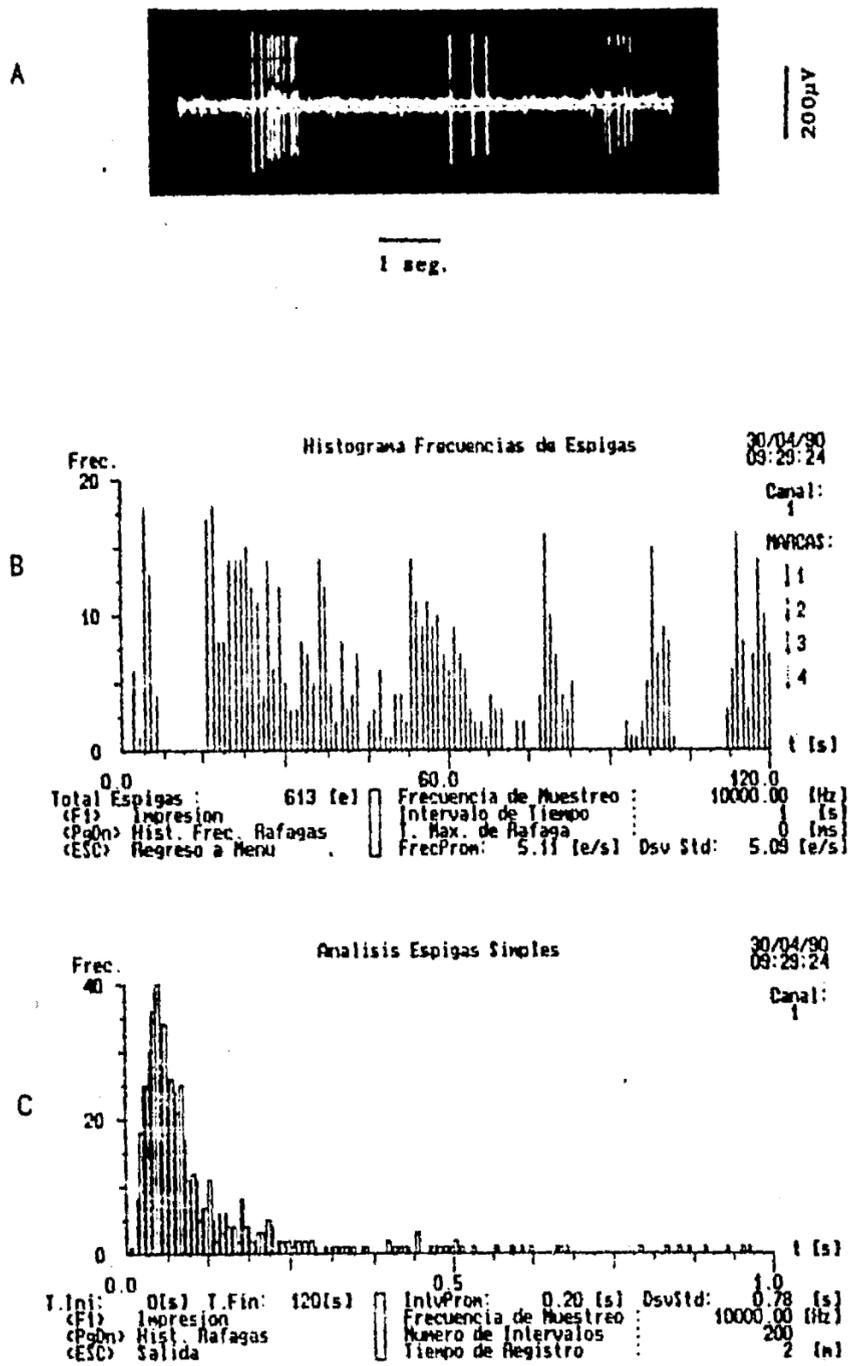


Fig. IV. 6 Ejemplo de una célula con disparos en ráfagas. a) Trazo de espigas que corresponde al histograma de frecuencias b), y c) Distribución de intervalos entre espigas (DIEE).

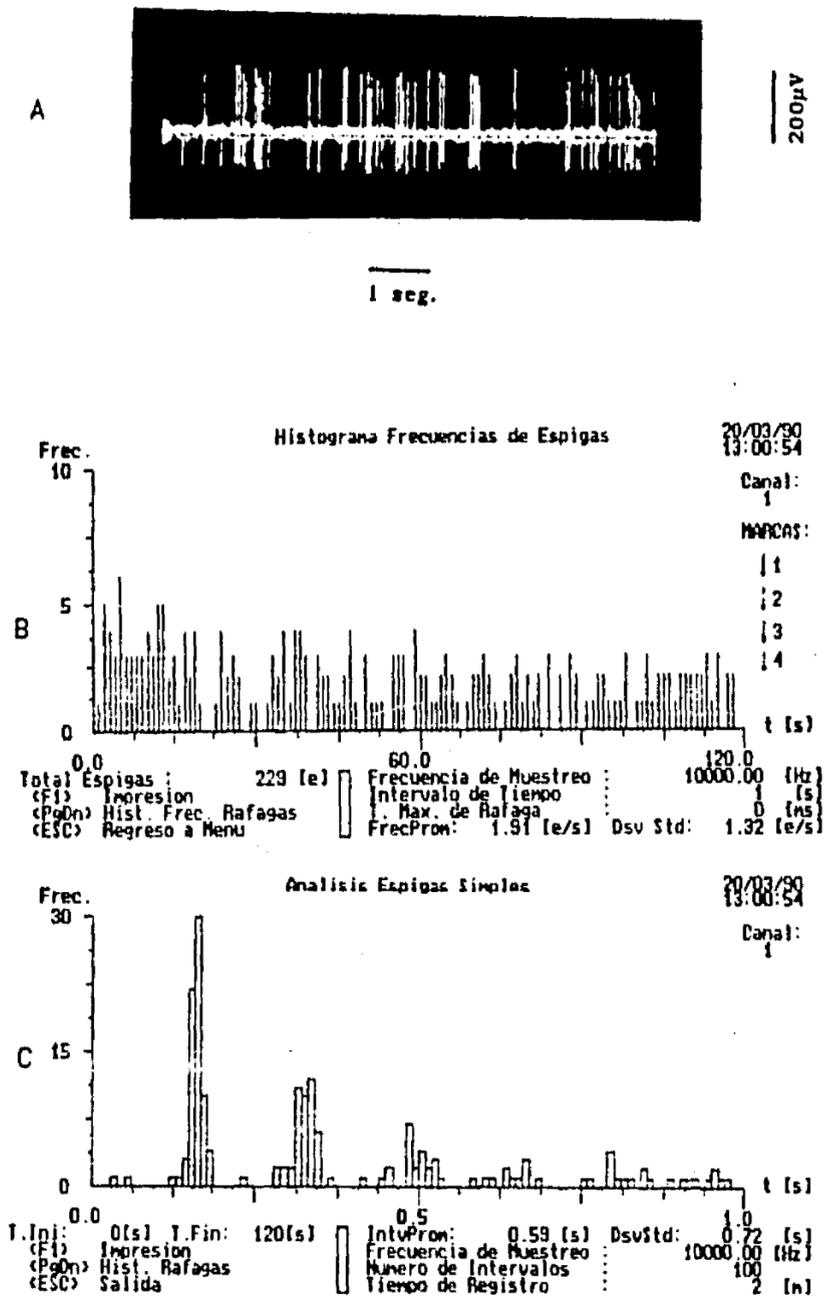


Fig. IV. 7 Ejemplo de una célula con disparos irregulares. A: Trazo de espigas que corresponde al histograma de frecuencia (B) y distribución de intervalos entre espigas (DIEE) (C). En la DIEE se observa un patrón de armónicos (ver el texto).

TABLA IV.1

FRECUENCIAS DE DISPARO (promedio \pm desv. est.) DE DIFERENTES PATRONES NEURONALES CLASIFICADOS DE ACUERDO CON EL ANALISIS DE FRECUENCIAS (A. F.) Y DE DISTRIBUCION DE INTERVALOS ENTRE ESPIGAS (DIEE)

	TIPO NEURONAL	FRECUENCIAS DE DISPARO (Hz)	PORCENTAJE DEL TOTAL (%)
A.F.	REGULAR *	5.94 \pm 1.89	23.7
	IRREGULAR	3.60 \pm 2.56	69.9
	EN RAFAGAS	2.59 \pm 1.89	6.4
DIEE	ENTONADO †	6.32 \pm 2.12	18.0
	AL AZAR †	3.38 \pm 2.45	65.9
	ARMONICO †	4.46 \pm 2.64	16.1
TOTAL NUMERO DE CELULAS = 472 PORMEDIO GENERAL DE FRECUENCIA = 4.09 \pm 2.61			

* Prueba de Scheffe P < 0.05 con respecto al resto de patrones
F = 46.41.

† prueba de Scheffe P < 0.05 entre los tres patrones,
F = 35.43.

En la Tabla IV. 2 se ha usado una nomenclatura conveniente para nuestros propósitos posteriores: al tipo de neuronas con patrones regulares se le llama "entonado", al tipo irregular se le llama "fuente" y al tipo armónico se le llama "filtro". Se observan variaciones circadianas en la distribución relativa de tipos neuronales en la población total de neuronas registradas, según la DICE. Durante los intervalos del día subjetivo (intervalos V, VI y VII) hubo una disminución del número de neuronas con disparos al azar y un incremento de los tipos armónico y entonado.

Vale la pena mencionar que las células con el patrón armónico difieren entre sí no solamente en el intervalo del armónico fundamental sino que también en el número y los pesos de los subsiguientes picos harmónicos. De esta manera, uno puede intuir que existe un acercamiento sistemático al entonamiento perfecto. Esta idea se muestra en la Fig. IV. 8.

TABLA IV. 2

VARIACIONES CIRCADIANAS EN LA DISTRIBUCION RELATIVA (%)
DE TIPOS NEURONALES (SEGUN LA DIEE) REGISTRADOS
EN EL NSQ *IN VITRO*

INTERVALOS DE TIEMPO	TIPO NEURONAL (%)				No. TOTAL DE CELULAS
	FUENTE	FILTRO	ENTONADO	ENTONADOS+ FILTROS	
I	73	13	14	27	50
II	79	12	9	21	48
III	77	3	20	23	48
IV	85	4	11	15	31
V	47	31	22	53	59
VI	49	28	23	51	86
VII	49	28	23	51	72
VIII	82	11	7	18	78

Estas curvas están normalizadas en el tiempo coincidiendo los puntos máximos de cada curva.

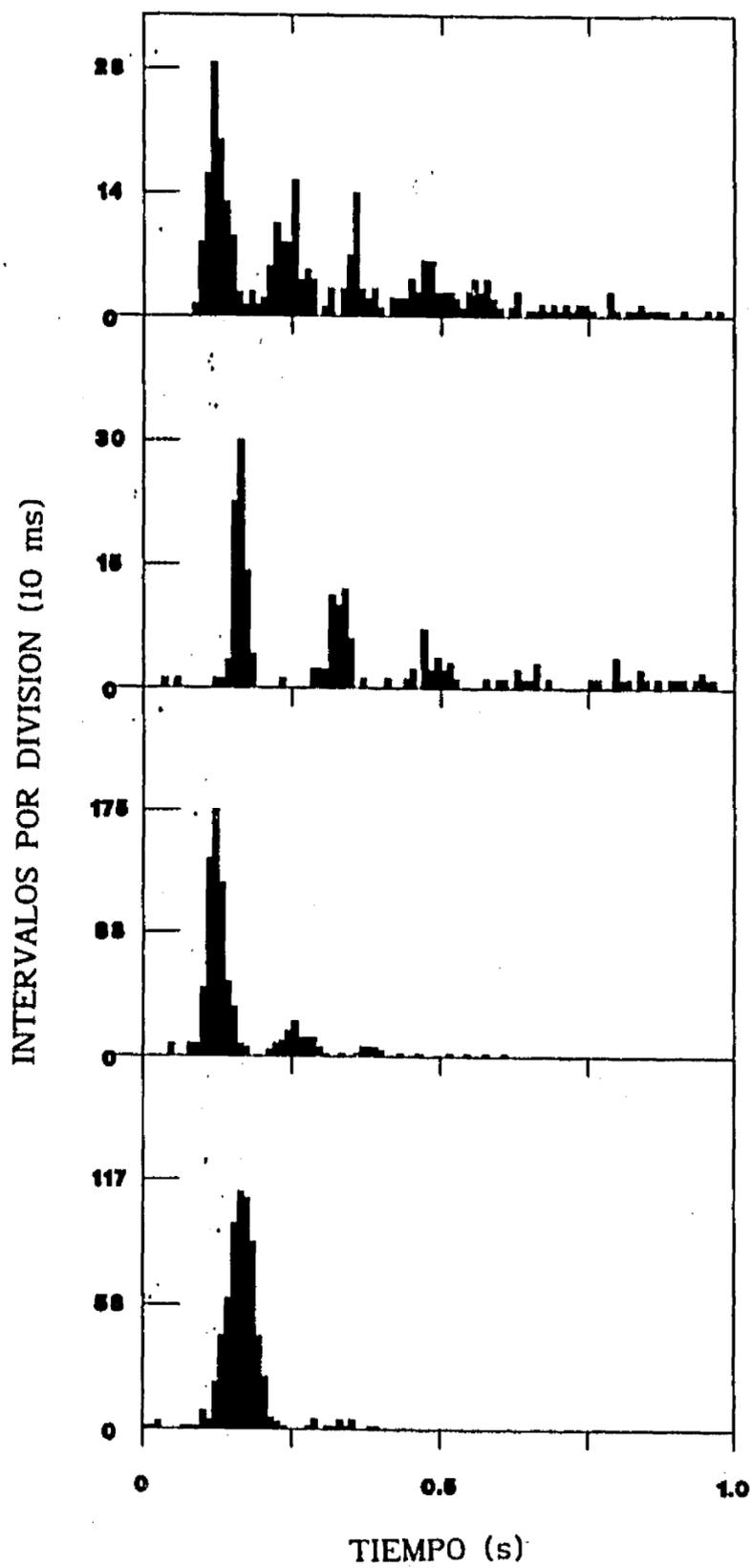


Fig. IV. 8 Cuatro ejemplos de patrones armónicos. Se puede observar una disminución de la intensidad de los picos subsecuentes en el tiempo. Esto sugiere un mecanismo de filtraje sobre la frecuencia de disparo neuronal.

IV. 2.2 Discusión del Experimento Anterior

La idea central de esta parte es la descripción de un nuevo tipo de patrón de disparo neuronal en el NSQ basada en el análisis de la DIEE. Vale la pena mencionar que este patrón armónico fue observado con claridad y es reproducible. Los disparos fueron muy estables y la amplitud de las señales es más o menos seis veces mas grande que la de ruido. También las frecuencias de disparo están dentro de los intervalos reportados en la literatura.

La proporción de las neuronas entonadas (regulares) reportada en este estudio es muy similar a la reportada por Groos y Hendricks (1979), pero difiere bastante con la reportada por Shibata *et al* (1984a). Esta diferencia podría ser debida a las diferentes formas de muestreo durante el registro (es decir, el intervalo de espera antes de mover el electrodo entre los dos experimentos). En nuestro caso, se dejó al electrodo en cada posición por lo menos cinco minutos. Así, era posible registrar neuronas que estaban silenciosas (sin mostrar potencial de acción) al momento de colocar el electrodo en una posición dada.

Como se puede ver en la tabla IV. 1, los porcentajes de cada tipo de células varían de acuerdo al criterio que se empleó para su clasificación. Cuando se usa la DIEE como el criterio de clasificación se observa una disminución de la proporción de las neuronas con disparos

regulares (entonados) y aparecen los armónicos (filtros). Esto se debe a que algunos patrones armónicos con pocos picos (dos o tres) tienen el patrón temporal de disparo muy parecido al de tipo regular. La DICE ayuda a diferenciar entre ellos. También es importante señalar que la prueba de Scheffe no muestra diferencias significativas del promedio de las frecuencias de disparo entre los patrones irregulares y los patrones en ráfagas. Cuando se clasifican los patrones por la DICE, la prueba de Scheffe muestra diferencias significativas entre los tipos de neuronas. Por lo tanto, desde punto de vista estadístico la clasificación de la DICE es mejor para diferenciar las poblaciones neuronales en el NSQ que el análisis de los patrones temporales de disparo.

Se encuentran variaciones sobre la proporción de los tipos neuronales durante el ciclo circadiano. En los intervalos V, VI y VII (ver la Tabla. IV. 2) hubo una disminución de la proporción de los patrones al azar y un aumento de los armónicos y los entonados. Variaciones análogas fueron reportadas previamente usando una clasificación basada en los patrones temporales de disparo (Shibata et al, 1984a). Estas variaciones circadianas podrían deberse a los cambios de la probabilidad de registrar cierto tipo de células y no necesariamente refleja las proporciones reales de estos elementos en la población neuronal. Esta observación es consistente con el comportamiento de la red neuronal que se propone en el modelo de la siguiente sección, porque estas variaciones podrían reflejar la regulación neuronal sobre el proceso de filtraje en la red involucrada en la selección

de la salida de una frecuencia dada.

Hasta la fecha, no se sabe claramente la relación entre los tipos de patrones de disparo y las características morfológicas o funcionales de las neuronas.

IV.2.3 Modelo Teórico

El experimento descrito anteriormente proporciona una riqueza de resultados nuevos que sugieren que el funcionamiento del reloj circadiano puede correlacionarse con las propiedades bioeléctricas de las neuronas del NSQ. El punto central a discusión es ¿qué tan válida es la suposición de que para producir una variación funcional periódica en el tiempo se necesite un reloj absoluto?. Muchos autores han concentrado sus esfuerzos en localizar osciladores ideales en el NSQ, y a partir de ellos producir simulaciones numéricas que produzcan la variación circadiana (Enright, 1980; Pittendrigh, 1974; Winfree, 1967). Estos osciladores pueden identificarse con las neuronas con disparos a intervalos regulares, aunque existe un trecho muy grande entre tener disparos regulares y un aparato regulador del sistema circadiano. Aun más, estas células parece que se encuentran por igual en todo el NSQ y no existe una correlación espacial para poder seguir las modificaciones esperadas teóricamente desde los disparos regulares a los canales efectores. Nuestros resultados agregan nuevos ingredientes al panorama general. El más importante de ellos es el descubrimiento de células

con respuesta armónica. Este tipo de respuesta es común a todos los fenómenos en los que interviene de alguna manera un proceso de interferencia de señales, lo cual inmediatamente sugiere una relación funcional entre disparos al azar, pasando por un proceso de interferencia y la obtención final de disparos regulares, que pueden ser utilizados por otros mecanismos del reloj para producir las oscilaciones circadianas, del cual no nos ocuparemos por lo pronto.

El siguiente modelo sugiere un posible mecanismo por el cual se obtienen osciladores ideales (disparos rítmicos entonados) a partir de una distribución al azar de señales. Se proponen las siguientes hipótesis:

1) Existe un gran número de neuronas en el NSQ que disparan espontáneamente y al azar. Estas células actúan como fuente de estímulos para excitar a otras células. En otras palabras, estas células generan sus potenciales de acción sin necesidad de estímulos externos. En este aspecto se parecen a las células sinusales del corazón con automatismo, excepto que no tienen un ritmo temporal. A estas células las llamamos células fuente. Este hipótesis se basa en la alta proporción de las células registradas con disparos al azar.

2) Existe otro grupo de neuronas que responden primariamente a señales externas provenientes de células interconectadas en una red. A estas células las llamamos células filtro. Los estímulos recibidos de una de estas células filtro podrían ser provenientes de una o varias células fuente, o de

una o varias células filtro, porque en la red podrían existir conexiones en serie o en paralelo con conexiones laterales. La salida de estas neuronas filtro tienen frecuencias diferentes que las de la entrada, debido a que los procesos sinápticos que comunican a una célula con otra en una red presentan tiempos de retraso.

3) La transmisión interneuronal de señales se lleva a cabo a través de un medio caracterizado por su transmitancia y su absorbancia. Estas características podrían ser modificadas por la acción de agentes externos (e.g. agentes químicos, topológicos, etc.). Los términos de transmitancia y absorbancia tienen significados precisos en óptica (Klein & Furtak, 1986). En este contexto, la transmitancia y la absorbancia se relacionan al hecho de que una señal dada pierde alguna información al pasar por un medio intercelular y se podría relacionar con la frecuencia de disparo de una célula en un tiempo dado.

Con base en estas suposiciones podemos imaginar una relación funcional entre los varios elementos definidos: si se tiene una fuente de disparos con una amplia distribución de intervalos entre espigas, se podría seleccionar a un intervalo dado entre subsecuentes disparos de una red neuronal apropiada. Las neuronas que participan en esta red tienen diferentes tiempos de retardo, dependiendo de las características de su membrana y de los neurotransmisores intercelulares que conectan estas neuronas. Finalmente, se podrían filtrar todos los intervalos excepto el

escogido.

La primera suposición podría ser comprobada de la siguiente manera:

a) Se sabe que si existe un gran número de eventos al azar, y que si la probabilidad p , característica para un evento dado, es pequeña, entonces la probabilidad $W_n(\lambda)$ de que este evento ocurra n veces en N pruebas está dada por la distribución de *Poisson* (Reif, 1965):

$$W_n(\lambda) = \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}, \quad (1)$$

donde $\lambda = Np$ es el número promedio de eventos. Esta distribución se encuentra en muchos procesos al azar en la naturaleza (Sinai, 1990). Aplicando esta ley al presente caso, podemos afirmar que si existen neuronas que disparan totalmente al azar, entonces la probabilidad de que una neurona dada dispare dos veces consecutivas en un intervalo exactamente igual al tiempo Δt es muy pequeña, y consecuentemente la distribución $W_2(\lambda)$ está dada por la ecuación (1). En este caso $\lambda = \Delta t/t_0$, donde t_0 es un tiempo característico, o un parámetro dado por el experimento, y tiene el significado del tiempo más probable que transcurre entre dos disparos consecutivos de una célula fuente.

En la Fig. IV.9a se presenta en línea continua la suma de todos los patrones de los tipos de las Figs. IV.5 y IV.6 (disparos al azar) con el fin de tener una descripción estadística representativa. La escala vertical ha sido normalizada por el área bajo la curva y el eje horizontal es el

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

intervalo de tiempo λ en unidades de $t_0=75$ msec. Este tiempo característico fue dado por el máximo de la curva (que debe ser $2t_0$ según la ecuación dos. Apéndice I). En la misma Figura se muestra la curva teórica $W_2(\lambda)$ como línea discontinua, para comparar con la curva experimental. Se puede observar que el ajuste es bastante bueno, excepto para los valores observados cerca del tiempo cero en la curva experimental.

Es difícil contar los eventos separados por menos de 10 msec en el modelo presente. Por lo tanto podemos suponer que la discrepancia alrededor de cero podría ser causada por eventos ocurridos durante el experimento (tales como respuestas a estímulos excitatorios simultáneos o disparos esporádicos de algunas células silenciosas, que no pudo discriminar el sistema detector), por lo que no se puede considerar a estos eventos dentro de este modelo. En otro trabajo (Thomson *et al.*, 1984), este tipo de espectro obtenido por una sola célula fue modelado por la distribución normal-logarítmica. Se sabe que la distribución normal-logarítmica puede ajustar muy bien cualquier curva asimétrica arbitrariamente. El uso de esta distribución es totalmente operacional. Es preferible derivar la forma de la distribución a partir de suposiciones simples con sentido físico, como en el modelo que se presenta aquí.

b) En los experimentos en donde se bloquea la transmisión sináptica del NSQ por medio de quitar el calcio (ion esencial para la transmisión sináptica del NSQ), desaparecen los disparos regulares pero las

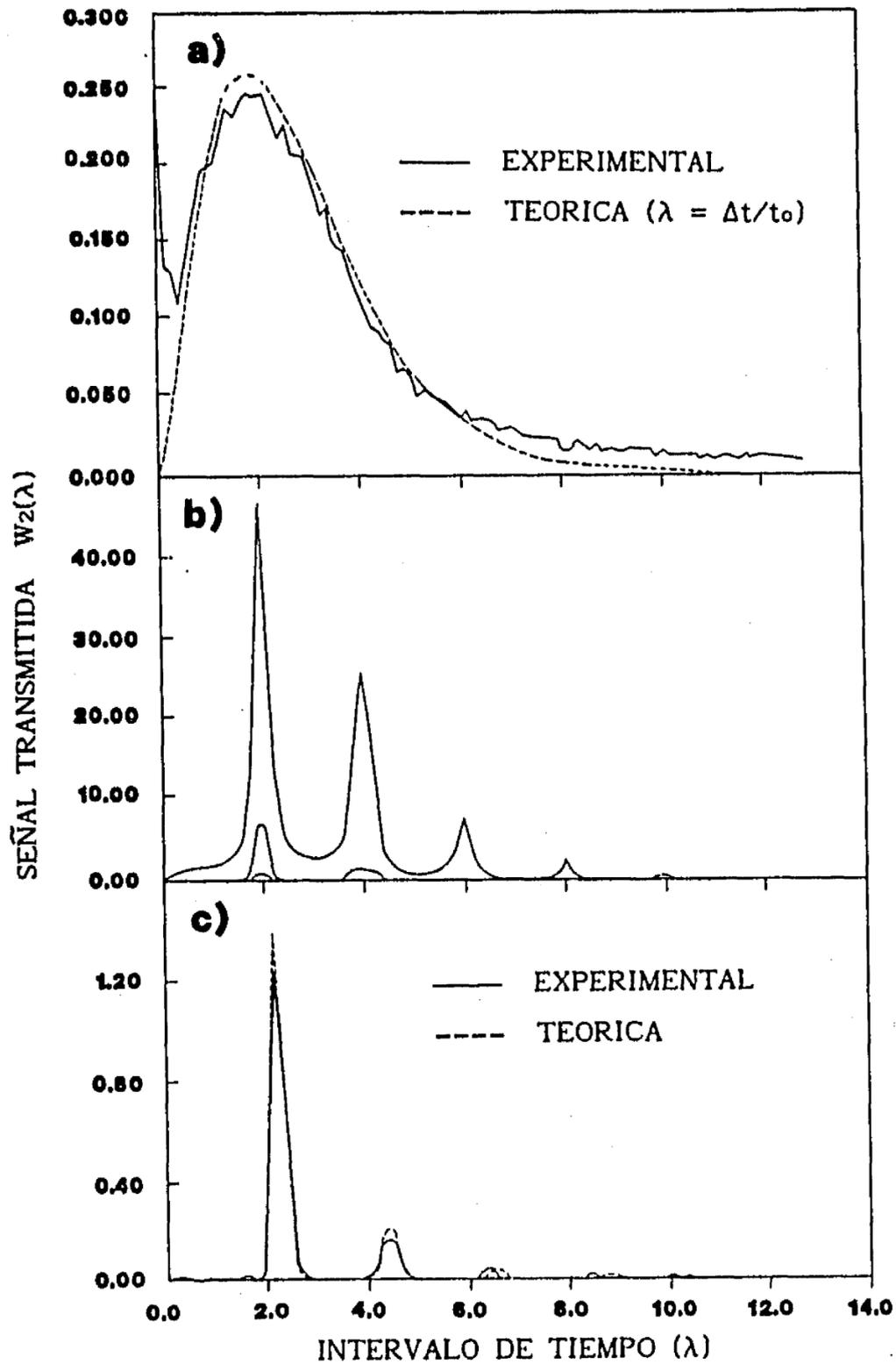


Fig. IV. 9 a) Comparación de la distribución de intervalos teórica $W_2(\lambda)$ (línea discontinua) y la curva experimental (línea continua) que es la suma de DIEE de todos los patrones irregulares y en ráfagas (como de las Fig. IV. 5 y IV. 6). b) Simulación numérica de DIEE después de uno, dos, tres procesos de filtraje. c) Comparación entre los resultados teóricos después de procesos de filtraje y un patrón experimental de tipo de la Fig. IV. 8. Los datos fueron multiplicados por una constante arbitraria para ajustar la intensidad.

células que dispara al azar persisten (Thomson, 1984; Shibata *et al*, 1984c). Esto implica que las neuronas con una DICE amplia no necesitan de estímulos provenientes de otras neuronas para disparar. Por lo tanto pueden desempeñar el papel de fuente.

La segunda etapa en el modelo propone que la razón funcional de la existencia de una fuente de disparos al azar es con el objeto de seleccionar intervalos específicos, porque se necesitan señales rítmicas como componentes para formar un oscilador. (Winfrey, 1967; Enright, 1980). Para seleccionar ritmos se tienen que tomar en cuenta las suposiciones 2 y 3 de la siguiente manera. Es razonable suponer que todas las neuronas del NSQ participan en una red, por lo tanto, se espera que haya interferencias entre las señales que llegan a una neurona dada, dependiendo de las vías permitidas en la red. Es claro que estas vías dependerán no solamente del arreglo sino que también de las características del medio interneuronal a través del cual viajan las señales. Así se puede explicar la existencia de los patrones armónicos y entonados.

Para explicar con más detalle, consideremos el arreglo más simple, que es un *sandwich* en una dimensión con dos medios N-M-N. Cada uno se caracteriza por una transmitancia T y una absorbanza A . Estas características están conectadas por la relación $T+R=1-A$, donde R es la reflectividad del medio M , dada por las paredes que separan los dos medios. Entonces, la señal transmitida de un lado del *sandwich* al otro lado está

dada por la formula de Airy (Klein & Furtak, 1986)

$$\frac{W}{W_0} = \frac{T_{\max}}{1 + F \sin^2(\delta/2)} \quad (2)$$

donde la máxima transmitancia es $T_{\max} = T^2 / (1-R)^2 = [1-A/(1-R)]^2$, y el factor de contraste es $F = 4R / (1-R)^2$. Nótese que si la reflectividad y la absorbancia son cero, la salida W es la misma que la entrada W_0 .

En todos los problemas relacionados con interferencias el término más importante es la fase δ . En este caso la fase se podría relacionar con el tiempo de retardo entre diferentes vías. Entonces la fase es:

$$\delta = 2\pi(\lambda - g) / (s + \Delta s) \quad (3)$$

donde la variable medible es λ , y g y s son tiempos en unidades de t_0 . El parámetro s da el período de la función seno, por lo que debería ser de orden del tiempo característico. Este término se puede cambiar por un Δs , al modificar el medio químico o su índice refractivo. El término g toma en cuenta los cambios de fase o tiempos de retardo dados por las paredes (membranas celulares en este caso).

En una red neuronal existen en general conexiones en serie o en paralelo, cada una de las cuales puede verse como el *sandwich* simplificado anteriormente, entonces tendremos que estudiar el resultado general en una red. Empezemos considerando una serie de *sandwiches* $N-M_1-N-M_2-\dots-N-M_n-N$, que corresponde al problema de transporte en una dimensión a través de n barreras finitas (Kouwenhoven *et al*, 1990). El problema de varios canales de transporte en paralelo es también aplicable, pero por razones de simplicidad

sólo consideramos un arreglo en serie. Entonces, obtenemos la formula:

$$T_n = \frac{T_{(n-1)}^2}{(1-R_{(n-1)})^2} [1 + F_{(n-1)} \sin^2(\delta_{(n-1)}/2)]^{-1} \quad (4)$$

La salida final W (calculada con la ecuación (2) sustituyendo T_n por T_{max}) puede ser muy complicada si los parámetros de la ecuación (2) varían en cada paso, lo cual le da más riqueza de posibles resultados de una misma red neuronal. Si además estos parámetros pueden variar en el tiempo, la red puede considerarse como no fija, incrementando aún más la versatilidad del mecanismo. Pero aún considerando que los parámetros son constantes (es decir, medios idénticos) el efecto de filtraje ya está presente. En la Fig. IV. 9b se muestran las curvas de salida subsecuentes después del primer, segundo, y tercer filtro. Los parámetros usados fueron $T=0.2$, $A=0.2$, $s=2.0$, $\Delta s=0.2$, y $g=0.01$, y la señal de entrada fue la ecuación $W2(\lambda)$, multiplicada por un factor arbitrario de 700 para dar una escala comparable⁵. Estos parámetros ajustan algunos datos reales bastante bien. En la Fig. IV. 9c se muestra un ejemplo de la comparación de una curva experimental y la curva de simulación computacional (la curva de la salida del tercer filtro). Los diferentes patrones de la Fig. IV. 7 se pueden obtener con diferentes números de filtros y el patrón de la Fig. IV. 4 se puede obtener con cinco filtros. Filtrajes similares o selección de frecuencias se pueden obtener por vías en paralelo, pero la salida final

⁵La integral de la ecuación (1) es 1, y la suma de todos los disparos irregulares fué 700.

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

depende de la configuración particular de varios elementos. El cálculo de este caso no va a dar mayor información, lo importante es que la entonación a la frecuencia de disparo deseado no depende de los detalles específicos de la red. (Zhang *et al*, 1991; Zhang *et al*, 1992a).

La Fig. IV. 10 es un diagrama que muestra una de las posibles soluciones topológicas al modelo descrito anteriormente. (Zhang *et al*, 1992c).

IV. 2. 4 Discusión de la Relación entre el Modelo y el Experimento No.2

El modelo fenomenológico propuesto aquí toma en cuenta la aparición de los diferentes patrones de disparos registrados en el NSQ *in vitro* y sugiere una relación funcional entre estos patrones. La consecuencia de esta asociación funcional es poner el disparo en una frecuencia fija. Esta selección de una respuesta a partir de un proceso originalmente al azar es un mecanismo eficiente, flexible y versátil y existen mecanismos análogos en la Naturaleza tal como la mutación genética para la adaptación evolutiva.

Es importante enfatizar que el modelo no se relaciona con la pregunta sobre la generación de la ritmicidad circadiana. Sin embargo, este modelo proporciona nuevas ideas para estudiar los mecanismos de la regulación circadiana y sirve como apoyo de otros modelos estadísticos y simulaciones (Enright, 1980; Kawato & Susuki, 1980; Winfree, 1967). Modelos

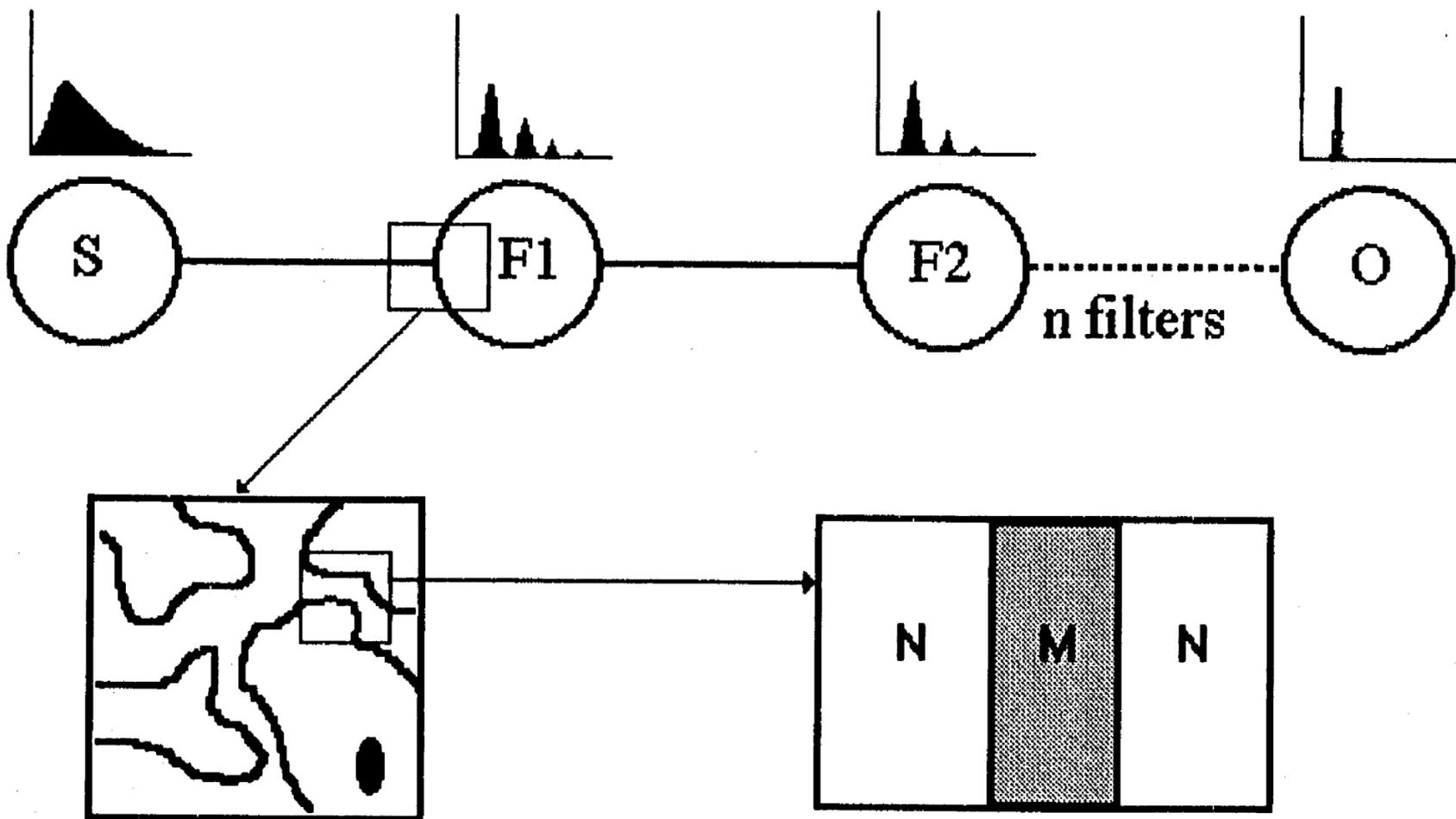


Fig. IV. 10 Presentación esquemática de los procesos de filtraje idealizados propuestos por el modelo. Las neuronas fuente (S) alimentan a las neuronas filtro (Fi) que están interconectadas y después de n pasos de filtraje se obtiene una frecuencia perfectamente entonada (O). La DICE representativa de cada célula fue dibujada arriba y el recuadro representa una figura idealizada de la sinápsis que es modelado como un filtro óptico in la forma de un Sandwich de un medio M situado entre dos medios N.

previos han sugerido que se podría obtener un ciclo circadiano con alta precisión temporal por un arreglo de interacciones de osciladores de frecuencias fijas (Kawato & Susuki, 1980; Pittendrigh & Daan, 1976; Winfree, 1976) ó sin necesidad de tener componentes precisos (Enright, 1967; Enright, 1980), simplemente como las oscilaciones usuales causadas por el comportamiento no lineal de sistemas fuera de equilibrio. Sin embargo, ninguno de estos modelos se ha podido relacionar con datos fisiológicos para formar un oscilador biológico.

Hay varios hechos experimentales que apoyan a este modelo de redes neuronales. En primer lugar, registros eléctricos en el NSQ *in vitro* en un medio sin iones de calcio muestran la desaparición de los patrones de disparo regulares mientras los patrones de disparo irregulares persisten (Shibata *et al*, 1984a; Thomson *et al*, 1984). Se sabe que el ión calcio es esencial para la transmisión sináptica en el NSQ (Shibata *et al*, 1984c), si se quita el calcio en el medio extracelular se bloquea la transmisión sináptica. Estos resultados experimentales demuestran que la aparición de los patrones regulares (entonados, como los llamamos) dependen de la transmisión sináptica, *i. e.* depende de la estimulación proveniente de otras células, mientras que las células que disparan al azar no. En otras palabras, disparan espontáneamente. En segundo lugar, se ha reportado la existencia de cadenas de neuronas y abundantes circuitos locales dentro del NSQ (Van den Pol, 1980). Esta observación es consistente con la suposición de que existen redes neuronales para el filtraje. Mas aún, estudios

inmunohistoquímicos reportan un número muy elevado de sustancias neuroactivas y conexiones dentro del NSQ (Card y Moore, 1984). La abundancia extraordinaria de células gliales en el NSQ podría relacionarse con la importante función de regular la composición iónica del medio extracelular y por lo tanto poder cambiar los parámetros del filtraje. Esto es sumamente importante para la obtención de un reloj flexible y adaptable. Por último, el valor de g calculado por la simulación numérica que da la frecuencia de las señales filtradas es de 0.01to (0.75 mseg.) (Ver Apéndice I). Este valor coincide con los tiempos que tardan las señales para cruzar la sinápsis medidos experimentalmente (0.5 - 1.0 mseg, Martin, 1977; 0.3 - 5 mseg, Kndel *et al*).

Como trabajo a futuro, nos proponemos estudiar las relaciones entre los patrones de disparo de las neuronas y sus características topológicas, morfológicas y neuroquímicas para un mejor entendimiento de la fisiología del NSQ. También es importante investigar los efectos de cambios de la composición química del medio extracelular, en particular, las concentraciones de iones que afectan los procesos sinápticos y comparar con las predicciones que genera el modelo.

Los experimentos de administrar TTX en el NSQ hechos por Schwartz *et al* (1987) demostraron que los potenciales de acción son esenciales para la expresión de los ritmos circadianos conductuales. (Ver la sección I. 4). Pero, cómo participa la actividad eléctrica del NSQ en la generación del

reloj? El hecho de que después de suspender la infusión de TTX, se regrese al ritmo circadiano medido y la fase del ciclo circadiano continúa con la misma pendiente del corrimiento espontáneo observado antes de la perfusión, hace que uno sospeche de la participación de la actividad eléctrica en el mecanismo del reloj. Aquí quisiera especular sobre una alternativa que es teóricamente posible.

Supongamos que existe un mecanismo general que mide el tiempo absoluto dentro del organismo. Este mecanismo es una función monótona (no oscilatoria) del tiempo. Por ejemplo, vemos un sujeto y estimamos su edad sin saber nada de su pasado. La estimación no depende de si la hacemos en el mediodía o en la medianoche. Hoy uno es más viejo que ayer y mañana será más, inequívocamente. Esta observación parece muy trivial pero revela que dentro de cada organismo hay un mecanismo que memoriza irreversiblemente el tiempo. Este mecanismo, que mide el tiempo, tendría poder sobre un mecanismo traductor, que es el reloj biológico que mide el tiempo relativo. La actividad eléctrica podría desempeñar la función de este traductor. Las redes neuronales del NSQ tienen salidas de muchos osciladores infradianos (los patrones de disparos entonados) de orden de magnitud de varios Hz. Estos osciladores se acoplarían para producir las oscilaciones circadianas de una manera análoga de la producción de la frecuencia modulada. Estas oscilaciones podrían ocurrir con períodos diferentes pero alrededor de 24 horas. El mecanismo que mide el tiempo absoluto pondría la fase de estas oscilaciones tomando en cuenta tanto tiempo absoluto como la información

fónica que obtiene del medio externo. Esta especulación podría ser simulada teóricamente.

IV.2.5 Comentarios sobre las características y las limitaciones del Modelo Teórico.

El modelo teórico surge de la necesidad de explicar los diferentes patrones de disparo de las células de NSQ, sin embargo, puede enmarcarse dentro de una filosofía mas general: La Naturaleza necesita un reloj que sea durable (por lo menos toda la vida del animal), regulable (adaptable a los cambios externos imprevistos), regenerable (que se pueda reparar) y preciso. Es posible diseñar tal aparato con muy pocas componentes (de hecho sólo dos), pero esto no sería deseable, ya que la falla de una de ellas bastaría para arruinar al reloj en forma definitiva, por lo tanto debemos pensar que el mecanismo cuenta con muchas partes, individualmente no imprescindibles.

Por lo tanto, debemos esperar que el órgano responsable de generar la oscilación circádica conste de partes esencialmente redundantes. Una evidencia de esto es la persistencia de los ritmos en lesiones extensas, pero parciales del NSQ. Aún mas, dentro de la misma filosofía, podemos esperar que esta multitud de partes no esté compuesta de osciladores muy precisos, ya que es mucho menos costoso crear un comportamiento colectivo preciso a partir de elementos no precisas.

Las características morfológicas de las células del NSQ, tales como el tamaño pequeño de las neuronas y la alta densidad de ellas sugieren una alta eficiencia computacional, es decir, una gran variedad de elementos en un espacio disponible con un gran número de conexiones interneuronales, con la característica que, otra vez, una conexión en particular no juega un papel imprescindible en el funcionamiento global del reloj, que debe ser multifuncional.

Entonces, un modelo que se apegue a estos requerimientos no debe depender ni del número y calidad de las componentes, ni de una configuración o circuito de neuronas en particular. Nuestro modelo tiene esas características, ya que las células generadoras de las señales son muy numerosas, distribuidas al azar, y no se supone una red específica de neuronas filtro para dar el resultado deseado, ni siquiera se debe suponer que las vías de conexión interneuronales son fijas en el espacio o en el tiempo. Los cálculos se llevaron a cabo en un circuito en serie únicamente por simplicidad y para ilustrar que la respuesta experimental puede obtenerse, pero otros circuitos más complicados no pueden ser descartados y tendrían el mismo tipo de comportamientos. Simulaciones numéricas más complicadas podrían llevarse a cabo, pero a falta de un soporte experimental que sugiera el tipo de interacciones entre neuronas, este esfuerzo no sería válido ni útil.

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

Otra característica que tiene el modelo es que, a fin de cuentas, no depende de la aparición de los potenciales de acción para su funcionamiento. Esto es porque la esencia del modelo es proponer la existencia de procesos de filtraje en una red neuronal en el NSQ. Este proceso de filtraje sólo depende de la existencia de dos medios con diferentes transmitancias y absorbancias y retrasos de tiempo que ocurren en las fronteras que se separan de estos dos medios. El hecho clave es que el tiempo de retraso que necesita el modelo para explicar las medidas es de 0.75 mseg, que es parecido a los tiempos de retraso en la sinápsis química. Entonces el modelo sugiere una participación sináptica en la comunicación de señales, que tiene que ver con el medio químico, mas que con el valor de los potenciales eléctricos. De esta forma podemos considerar que, aunque en los experimentos se mide la actividad eléctrica de las neuronas, dicha actividad no es imprescindible para el funcionamiento del reloj (ni del modelo), sino que es necesaria como un eslabón para transmitir la oscilación generada a los efectores. Esto estaría de acuerdo con los experimentos de aplicación de TTX: el bloqueo de los canales de sodio elimina los potenciales de acción (que se suponen necesarios para la manifestación de ritmos), pero no los procesos de la transmisión sináptica química, con los cuales el reloj funciona, por lo que la TTX hace que desaparezca el ritmo, pero no destruye al reloj, que vuelve a manifestarse en fase cuando se normalizan los canales de sodio.

Otro hecho interesante es la gran abundancia de glía en el NSQ. Se

sabe que en general las células gliales regulan la química del medio extracelular, por lo tanto esto sugiere que el mecanismo del reloj necesita de una regulación precisa de la composición química de este medio. Esto está de acuerdo con la conclusión del modelo de que la transmitancia y la absorbancia del medio deben cambiar, si se requiere modificar la frecuencia de los disparos. El mecanismo que sugiere el modelo es compatible con la conclusión que hizo Moore recientemente (1992): "El NSQ parece que está compuesto de osciladores neurales individuales y probablemente neuronas no osciladores. Estos elementos se acoplan para formar una red que expresa la señal circadiana."

Las limitaciones del modelo son múltiples, por ejemplo, no es capaz de dar una respuesta a la pregunta de ¿cómo se genera la oscilación circadiana?. Aunque uno puede imaginarse la creación de un ritmo circadiano a partir de osciladores ideales, el modelo no explica la forma en que esto puede llevarse a cabo. Puede concluirse que el modelo no explica los ritmos circadianos, sino que sólo pretende explicar de una forma lógica y coherente la aparición de células entonadas a partir de procesos al azar.

Otra desventaja es que, a pesar del poder predictivo del modelo, no es fácil extenderlo a explicar características fisiológicas reales del NSQ. Por ejemplo, una predicción del modelo es que si se cambia el medio químico se puede variar la frecuencia de entonación de las neuronas, pero desafortunadamente, sin un conocimiento experimental sobre la acción de

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

ciertas sustancias en los procesos sinápticos, es muy difícil convencerse de la validez de las predicciones. Mas experimentos son necesarios para corroborar la validez de las hipótesis en las que el modelo se basa.

V DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

Las investigaciones sobre los ritmos circadianos tradicionalmente han presentado principalmente dos frentes: 1) análisis de las propiedades formales de la sincronización y de los ritmos circadianos en corrimiento espontáneo y 2) análisis de los mecanismos fisiológicos y componentes anatómicos participantes en la generación y transmisión de estos ritmos. En el segundo punto se ubica este trabajo.

Quizás el concepto heurístico más influyente que guía la investigación en este campo es la hipótesis general de que la porción cronométrica del sistema circadiano de organismos complejos consiste en osciladores múltiples. Estos osciladores se acoplan tanto jerárquicamente como no jerárquicamente (mutuamente) (Moore-Ede *et al*, 1982; Pittendrigh, 1974; Pittendrigh & Daan; 1976). Vista de esta manera, la organización circadiana en conjunto podría ser la producción de la interacción de varios subsistemas oscilatorios que normalmente están acoplados, pero que pueden desacoplarse experimentalmente. Cada subsistema oscilatorio podría estar formado por múltiples osciladores no circadianos, y, el resultado de su acoplamiento produciría una oscilación circadiana. El subsistema oscilatorio que está en la cima de la jerarquía lleva la función del marcapaso y los subsistemas más bajos jerárquicamente proporcionarían información de tiempo a los sistemas efectores que expresan las funciones rítmicas.

El experimento de la primera parte se ubica en el estudio de los subsistemas oscilatorios. A partir de las comparaciones de las curvas de distribución temporal de la actividad eléctrica extracelular unitaria de los NSQs contralaterales *in vitro* podemos concluir lo siguiente:

El presente experimento apoya las conclusiones de experimentos de lesión unilateral del NQS (Picard y Turek, 1982), en el sentido de que los NSQs contralaterales podrían funcionar como dos unidades oscilatorias independientes y acopladas en condiciones de sincronización.

En la segunda parte de esta tesis se caracterizaron detalladamente los tres tipos de patrones de disparo de las neuronas del NSQ *in vitro* ya reportados previamente en la literatura. Aquí se reporta por primera vez un nuevo tipo de patrón de disparo (armónico) encontrado por el análisis de distribución de intervalos entre espigas. Propusimos un modelo neuronal para explicar la existencia de estos patrones de disparo dándole funciones fisiológicas para generar osciladores infradianos. Estos osciladores podrían servir, eventualmente, para la generación de osciladores circadianos.

La ventaja principal de nuestro modelo sobre los demás modelos matemáticos existentes es que a partir de suposiciones muy simples, se puede explicar la presencia de las diferentes unidades de la actividad eléctrica, encontradas experimentalmente. Las ecuaciones y los parámetros que usamos en las simulaciones tienen sentidos físico y fisiológico. Este es un enfoque anatomofisiológico mientras los demás modelo carecen de la base

anatomofuncional.

Un modelo teórico tiene dos propósitos generales: simular procesos bajo condiciones que ya se han estudiados experimentalmente para saber si el modelo representa adecuadamente el mayor número posible de hechos conocidos, y simular los procesos bajo condiciones aún inexploradas experimentalmente para establecer predicciones (hipótesis) por comprobarse experimentalmente. (Zhang, 1988).

En este sentido, podemos concluir que:

- 1.- Existen tres tipos de patrones de disparos cualitativamente diferentes en el NSQ *in vitro*. La existencia de estos tipos tiene un sentido fisiológico.
- 2.- Proponemos un modelo para explicar la relación funcional de estos tipos de patrones de disparo celulares. Este modelo representa adecuadamente los componentes neuronales y sus resultados pueden predecir las características de los datos experimentales.
- 3.- La consecuencia de esta asociación funcional, según el modelo, es poner a los disparos de algunas neuronas en una frecuencia fija. Una neurona con una frecuencia de disparo rítmico es un oscilador infradiano que podría participar la formación de oscilador circadiano de alta precisión temporal a partir de arreglos de osciladores acoplados.

4.- Este modelo neuronal propone un mecanismo suficientemente flexible, ya que por las conexiones no fijas en serie y en paralelo de la red, fallos de algunos eslabones intermediarios no afectarían la salida final. Y también es un mecanismo termodinámico eficiente por que se obtiene señales rítmicas a partir de señales al azar que cuestan menos, energéticamente.

Como parte final de esta tesis, quisiera enfatizar la importancia del entendimiento sobre los ritmos circadianos para la salud humana. Como el estudio sobre los ritmos circadianos todavía es una rama de investigación muy joven, se sabe muy poco sobre la importancia del buen funcionamiento de los ritmos circadianos sobre la salud y el bienestar del organismo humano. Algunos estudios en humanos han sugerido que el desorden del sistema circadiano podría estar involucrado por lo menos, en la formación de algunas enfermedades mentales. Por ejemplo, los síntomas clásicos de la depresión implican desordenes rítmicos: la variación diurna de humor, el insomnio terminal, anomalías del patrón de la secreción de algunas hormonas y la recurrencia periódica de episodios maniaco-depresivos (Wirz-Justice, 1992). Desde este punto de vista se puede concluir que el sistema fisiológico del cuerpo está bajo la influencia de señales circadianas. Por lo tanto, la profundización del entendimiento de la neurobiología del sistema circadiano es sumamente importante sobre el diagnóstico, tratamiento y entendimiento de numerosos desordenes mentales y físicos del ser humano.

VI. REFERENCIAS

Aguilar-Roblero, R., García-Hernández, F., Aguilar, R. Arankowsky- Sandoval, G. & Drucker-Colín, R. (1986), Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neurosci. Lett.* 69: 47 - 52.

Aguilar-Roblero R. and Drucker-Colin R. (1987) The role of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of circadian rhythms in mammals., *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos.*, 35, 35-51.

Aguilar-Roblero, R., Drucker-Colín, R. & Moore, R. Y. (1992): The effects of fetal neural grafts on the circadian rhythm of water drinking in SCN-lesioned adult rats. Results of behavioral and morphological studies. *Cronobiology International* (En prensa).

Aguilar-Roblero, R., Shibata, S., Speh, J. C., Drucker-Colín, R. & Moore, R. Y. (1992), Morphological and functional development of the suprachiasmatic nucleus in fetal hypothalamic grafts. *Brain Res.* 580: 288 - 296.

Aguilar-Roblero, R. & Vega-Gonzales (1992), Splitting of locomotor circadian rhythmicity in hamsters is facilitated by pinealectomy. (Enviado).

Aschoff, J. (1964), Survival value of diurnal rhythms. *Symp. Zool. Soc.* London, 13: 79-98.

Aschoff, J. & Wever, R. (1984), The circadian system of man. In *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol. 4, Biological Rhythms, Ed. J. Aschoff, pp. 311-348, New York: Plenum.

Bretzl, H. (1903) *Botanische Forschungen des Alexanderzuges*. Leipzig: B. G. Teubner.

Bünning, E. (1973), *The Physiological Clock* (3rd ed). New York: Springer, 1973.

Cooper, R, Osselton, J. W. y Shaw, J. C. (1980) *E E G Technology*, tercera

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

edición, Butterworths.

Card J. P. and Moore R. Y. (1984) The suprachiasmatic nucleus of golden hamster: Immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution., *Neuroscience*, 13, 415-431.

Drucker-Colín, R., Aguilar-Roblero, R., Garcia-Hernández, F., Fernández - Cancino F. & Bermudez-Rattoni, F. (1984), Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res.* 311: 353 - 357.

Ebihara, S. & Kawamura, H. (1981), The role of the pineal organ and the suprachiasmatic nucleus in the control of the circadian locomotor rhythms in the Java sparrow, *Padda oryzivora*. *J. Comp. Physiol.* 141: 207 - 214.

Enright J. T. (1967) The spontaneous neuron subject to tonic stimulation. *J. Theoret. Biol.* 16, 54 -77.

Enright J. T. (1980) Temporal precision in circadian systems: A reliable neuronal clock from unreliable components?. *Science* 209, 1542-1545.

Folk, G. E., Jr. (1966), *Introduction to environmental Physiology*. Philadelphia: Lea & Fibeger.

Fuchs, J. L. & Moore, R. Y. (1980), Development of the circadian rhythmicity and light responsiveness in the rat suprachiasmatic nucleus: a study using the 2-deoxy[1-¹⁴C]glucose method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 1204-1208.

Gillette, M. U. (1986). The suprachiasmatic nuclei: circadian phase-shifts induced at the time of the hypothalamic slice preparation are preserved in vitro. *Brain Res.* 379: 176 - 181.

Green D.J. and Gillette R. (1982). Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.*, 245, 198-200.

Gross G. A. and Hendriks J. (1979) Regularly firing neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Experientia*, 35, 1597-1598.

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

Groos, G. A. & Hendrick, J. (1982): Circadian rhythm in electric discharge of rat suprachiasmatic neurons recorded in vitro. *Neurosci. Lett.* 34: 283-288.

Güldner, F.- H. (1976), Synaptology of the rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.* 165: 509 - 544.

Güldner, F. H. (1978), Synapses of optic nerve afferents in the rat suprachiasmatic nucleus. II. Structural variability as revealed by morphometric examination. *Cell Tissue Res.* 194: 37 - 54.

Hatton, G., Doran, A. D., Salm A. K. & Tweedle, C. D. (1980), Brain slice preparation: Hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 5: 405 - 414.

Hendrickson, A. E., Wagoner, E. N. y Cowan, W. N. (1972): An autoradiographic and electron microscopic study of retino-hipotalamic connections. *Z. Zellforsch Mikrosk. Anat.* 135: 1-26.

Hickey, T. L. & Spear, P. D. (1976), Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. *Exp. Brain res.* 26: 329-342.

Inouye S.-J. T. and Kawamura H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 5962-5966.

Inouye S.-T. J. and Kawamura H. (1982) Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Physiol.*, 146, 153-160.

Johnson, M. S. (1926), Activity and distribution of certain wild mice in relation to biotic communities. *J. Mammal.* 7: 245 -277.

Johnson, M. S. (1939), Effect of continuous light on periodic spontaneous activity of white footed mice (*Peromyscus*). *J. Exp. Zool.* 82: 315-328.

Kandel, E. R., Siegelbaum, S. A. & Schwartz, J. H. (1991): Synaptic Transmisión. En: Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (eds.),

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

Principles of Neuroscience, 3ra edición. Elsevier, N. Y.

Kawato M. and Susuki R. (1980) Two coupled neural oscillator as a model of circadian pacemaker. *J. Theoret. Biol.*, 86, 547-575.

Kalmus, H. (1935), Periodizität und autochronie (= ideochronie) als zeitregelnde eigenschaften des organismus, *Biologia Generalis*, 11, 93-114.

Klein M.V. and Furtak T.E. (1986) *OPTICS* 2nd Ed., Willey and Sons., New York, p.302.

Kouwenhoven L.P., Van Wees B.J., Van der Enden B. and Harmans K.J.P.M. (1990), Electronic transport through single and multiple quantum dots: The formation of an ID crystal band structure. In E.M. Anastassakis and J.D. Joannopoulos (eds.), 20th. International conference on the physics of semiconductors., 3, World Scientific, London, 1990, pp. 2325- 2333.

Lehman, M. N., Silver, D., Gladstone, W. R., Hahn, R. M., Gibson, M. & Bitman E. L., (1987), Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization with the host brain. *J. Neurosci.* 7: 1626 - 1638.

Liou, S. Y., Shibata, S. Iwasaki, K & Ueki, S (1986): Optic nerve stimulation-induced increase of release of ³H/glutamate and ³H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 16: 527 - 531.

Martin A. R. (1977) Junctional transmission II. Presynaptic mechanisms. In *Handbook of Physiology, Section I: The Nervous System*. Vol. I, part 1 (ed. Kandel E. R.) pp. 329-355. American Physiological Society, Bethesda, Maryland.

Meijer, H. H., Groos, G. A. & Rusak, B. (1986), Luminance coding in a circadian pacemaker: the suprachiasmatic nucleus of the rat and the hamster. *Brain Res.* 382: 109 - 118.

Meijer J. H. and Rietveld W. J. (1989) Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.*, 69, 671-707.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

Miller, J. D., Murakami, D. M. & Fuller, C. A. (1987), The response of the suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and nicotinic stimuli. *J. Neurosci.* 7: 978 - 986.

Moore, R. Y. (1983), Organización and function of a central nervous system circadian oscillator, the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Federation Proc.* 42: 2783 - 2789.

Moore, R. Y. (1992), The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. En: Magistretti, P. J. (ed.), *Circadian Rhythms, Discussions in Neuroscience*. Vol. VIII, Nos. 2+3. Elsevier Science Publishers, B. V. Netherlands.

Moore, R. Y. & Eichler, V. B. (1972), Loss of the circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Res.* 42: 201 - 206.

Moore, R. Y. & Lenn, N. J. (1972), A retino - hypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 46: 1 - 14.

Moore-Ede, M. C., Kass, D. A. & Hard, J. A. (1977), Transient circadian internal desynchronization after light-dark phase shift in monkeys. *Am. J. Physiol.* 232: R31 - R37.

Moore-Ede, M. C., Sulzman, F. M. & Fuller, C. A. (1982): *The Clocks that Time Us: Physiology of the Circadian Timing System*. Harvard University Press.

Mosko, S. S., Moore, R. Y. (1979), Neonatal suprachiasmatic nucleus lesions: Effects on the development of the circadian rhythms in the rat. *Brain Res* 164: 17 - 38.

Nishino, H. & Koizumi, K. (1977), Response of neurons in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus to putative transmitters. *Brain Res.* 112: 45 - 59, 1976.

Pickard, G. E. & Turek, F. W. (1982), Splitting of the circadian rhythm of

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

activity is abolished by unilateral lesion of suprachiasmatic nuclei. *Science* 215: 1119 - 1121.

Pickard, G. E. & Turek, F. W. (1983), The suprachiasmatic nuclei: two circadian clocks? *Brain Res.* 268: 201 - 210.

Pittendrigh, C. S., Bruce, V. G., Rosenzweig, N. S. & Rubin, M. L. (1959), A biological clock in neurospora. *Nature* 184: 169 - 170.

Pittendrigh, C. S. (1974), circadian oscillators in cells and the circadian organization of multicellular system. In: *The Neuroscience Third Study Program*. Schmitt O. F. y Worden F. G. (eds.). Cambridge, MA: MIT Press, 1974.

Pittendrigh, C. S. & Daan S. (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. V. Pacemaker structure: A clock for all seasons., *J. Comp. Physiol. A.*, 106, 333-355.

Reif F. (1965) *Fundamentals of statistics and thermal physics*. McGraw-Hill Kugakusha, LTD, Tokyo, 1965, p.42.

Richter, C. P. (1922), A behavioristic study of the activity of the rat. *Comp. Psych. Monographs*, 1: 1 - 15.

Rosenwasser, A. M. & Adler, N. T. (1986), Structure and function in circadian timing system: Evidence for multiple coupled circadian oscillator. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 10: 431 - 448.

Rusak, B. & Zucker, I. (1979), Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.* 59: 449 - 426.

Satinoff, E. & Prosser, R. (1988), Suprachiasmatic nuclear lesions eliminate circadian rhythms of drinking and activity, but not of the body temperature, in male rats. *J. Biol. Rhythms* 3: 1 - 22.

Sawaki, Y, Hinonmatsu I & Kawamura H. (1984), Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci. Res.* 1: 67 - 72.

Limel Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

Schwartz W. J., Gross R. A. and Morton M. T. (1987) The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*, 84, 1694-1698.

Shibata S., Oomura Y. Kita, H & Kattori, K. (1982). Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic slice. *Brain Res.* 247: 154 - 158

Shibata S., Oomura Y., Liou S. Y. and Ueki S. (1984a) Electrophysiological studies of the development of suprachiasmatic neuronal activity in hypothalamic slice preparations. *Dev. Brain Res.*, 13, 29-35.

Shibata S., Shiratsuchi, A., Liou S. Y. and Ueki S. (1984b). The role of calcium ions in circadian rhythm of suprachiasmatic nucleus neuron activity in rat hypothalamic slice. *Neurosci. Lett.* 52: 181 - 184.

Shibata, S., Liou, Oomura, Y., Hattori, K. & Kita, H. (1984), Responses of suprachiasmatic nucleus neurons to optic nerve stimulation in rat hypothalamic slice preparation. *Brain Res.* 302: 83 - 89.

Sinai Y. G. (1990) In *Proceedings from the 17th IUPAP International conference on thermodynamics and statistical mechanics*, C. Tsallis (ed.) North Holland, Amsterdam, pp. 197-204.

Stephan, F. K. & Zucker I. (1972), Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 1583 - 1586.

Sugimori, M. S., Shibata, S. & Oomura, Y. (1984), Electrophysiological basis for biohythmic activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat: an in vitro study. *Neurosci. Abstr.* 10: 294.

Takahashi, J. S. & Menaker, M. (1982): Role of the suprachiasmatic nuclei in the circadian system of the house sparrow, *Passer domesticus*. *J. Neurosci.* 2: 815 - 828.

Takahashi, J. S. & Zatz, M. (1982): Regulation of circadian rhythmicity.

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

Science Wash DC 217: 1104 - 1111.

Terman, M & Terman, J (1985): A circadian pacemaker for visual sensitivity? *Ann. NY Acad. Sci.* 453: 147 - 161.

Thomson A. M. (1984): Slow, regular discharge in suprachiasmatic neurons is calcium dependent, in slices of rat brain., *Neurosci.*, 13, 761-767.

Thomson A. M., West D.C. and Vlachonikolis I. G. (1984) Regular firing of suprachiasmatic neurons maintained *in vitro*. *Neurosci Lett*, 52, (1984) 329-334.

Van Den Pol, A. N. (1980), The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat intrinsic anatomy. *J. Comp. Neurol.* 191: 661 - 702.

Van Den Pol, A. N. & Powley, T. (1985), A fine - grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neurosci.* 15: 1049 - 1085.

Van Den Pol, A. N. & Tsujimoto, K. L. (1985), Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15: 1049 - 1086, 1985.

Wheal, H. V. & Thomson M. A. (1984): The electrical properties of neurones of the rat suprachiasmatic nucleus recorded intracellularly *in vitro*. *Neuroscience* 13: 97 - 104.

Winfree A. T. (1967) Biological rhythms and the behavior of populations of coupled oscillators. *J. Theoret. Biol.* 16, 15 - 42.

Wirz-Justice, A. (1992). Circadian rhythms and affective disorder. In: *Circadian Rhythms, Discussions in Neuroscience*, Zatz, M. & Axelrod (eds.) Vol. VIII, Nos 2+3.

Yamamoto, C. (1972), Activation of hippocampal neurons by mossy fiber stimulation in thin brain sections *in vitro*. *Expl. Brain Res.* 33: 131 - 134.

Limei Zhang, Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas, 1992

Zhang, Limei (1988): Un modelo de la construcción de campos receptivos corticales de la vía parvocelular visual basado en propiedades electrofisiológicas. Tesis para obtener la Maestría en Ciencias Fisiológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Zhang, L. & Aguilar Roblero, R. (1990), Mecanismo de acoplamiento de los osciladores en el sistema circadiano de los roedores: correlaciones del patrón temporal de actividades eléctricas de los núcleos supraquiasmáticos contralaterales. *XXXIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*, Guadalajara, Jal. Resumen, 053.

Zhang, L., Aguilar Roblero, R. & Barrio, R. (1991), Modelo de redes neuronales en el núcleo supraquiasmático basado en actividad eléctrica. *XXXIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*, Colima, Col. Resumen, 049.

Zhang, L., Aguilar-Roblero, R. & Barrio, R. (1992a), A neuron network model for generating a non-circadian oscillation in the suprachiasmatic nucleus based on a new firing pattern classification. Third Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms, Amelia Island Plantation, Jacksonville, Florida, USA. *Abstr.* 90.

Zhang, L., Aguilar-Roblero, R. & Barrio, R. (1992c), A new pattern of neuronal firing in the suprachiasmatic nucleus *in vitro* and a possible mechanism which induces rhythmicity. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*. (Aceptado).

VII. APENDICE

IDENTIFICACIÓN DE t_0

En la Fig. IV.9, se observa un máximo de $W_2(\lambda)$. Este máximo se encuentra localizado en un valor λ_{\max} dado por la condición

$$\left. \frac{\partial W_2(\lambda)}{\partial \lambda} \right|_{\lambda_{\max}} = 0$$

derivando la ecuación (1), se obtiene

$$\frac{\partial W}{\partial \lambda} = \frac{n \lambda^{n-1}}{n!} e^{-\lambda} - \frac{\lambda^n}{n!} e^{-\lambda}$$

que se anula para $n = \lambda$. O sea que el máximo en la gráfica se encuentra en

$$\lambda = 2 = \frac{\Delta t}{t_0}$$

por lo tanto el intervalo más frecuente es

$$\Delta t = 2t_0$$

en el experimento $\Delta t = 150$ mseg, lo cual da el valor de t_0 usado en modelo teórico.