



03068 5  
26

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**CENTRO DE NEUROBIOLOGIA  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE  
POSTGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**"EL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO COMO UN  
SISTEMA MULTIOSCILATORIO: ESTUDIO DEL RITMO  
DE ACTIVIDAD MULTIUNITARIA "IN VITRO" EN  
SUJETOS SOMETIDOS A LUZ CONTINUA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRIA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A :**

**JOSE RICARDO HERNANDEZ PINEDA**

**MEXICO, D. F.**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## ÍNDICE

Agradecimientos.....	5
Resumen.....	7
Introducción.....	8
Invertebrados.....	12
Insectos.....	12
Crustáceos.....	13
Moluscos.....	14
<i>Aplysia californica</i> .....	15
<i>Bulla gouldiana</i> .....	15
Vertebrados.....	18
Aves.....	18
Mamíferos.....	22
Vías de sincronización.....	22
Marcapasos.....	25
Eferentes.....	32
El Sistema Circádico en mamíferos: Un complejo multioscilario?.....	34
Desincronización interna.....	36
Rítmicos anticipatorios de alimento.....	38
Partición.....	39
Propiedades eléctricas del NSQ.....	42
Planteamiento del problema y objetivos.....	46
Materiales y Métodos.....	50
Resultados.....	54
Discusión.....	59
Conclusiones.....	64
Bibliografía.....	65



**"Tuve entre mis  
manos el universo..."  
J.M. Serrat.**

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por la vida.

A Ana por su amistad incondicional.

Para Adriana Estrada y toda su familia, por su enorme confianza y cariño.

A todos mis amigos, afortunadamente, muchos.

Para Irma Cuevas y a todas sus maravillosísimas bailarinas, por su paciencia, su amistad y por sus inolvidables sonrisas y el amor con que bailan.

Hacer este trabajo hubiera sido imposible sin la invaluable ayuda del Dr. Juan Antonio Roig quien, además, hizo brevísimas las innumerables horas de captura y análisis de datos con su agradable charla. Gracias por compartirme muchos y enriquecedores pedazos de su vida.

A don Carlos por su valiosa ayuda técnica.

A los hermanos Lumiere, porque su mágico invento ha sido un oasis en muchas ocasiones.

A los hombres y mujeres de hace dos años, que con el rostro cubierto y con su sangre, nos recordaron que existe un "México del sotano", por no dejar que olvidemos nuestros orígenes. Por su dignidad.

A mis sinodales:

Dr. Raul Aguilar Roblero

Dr. Gonzalo Martínez de Escalera

Dr. José Bargas Díaz

Dr. Juan Antonio Roig Varela

Dr. Leon Cintra Mc Glone

Por sus valiosos comentarios y consejos dentro y fuera del laboratorio.

Este trabajo fue posible gracias al donativo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) número IN 200794, al apoyo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y al CONACyT.

## RESUMEN

Los ritmos circádicos representan uno de los principales mecanismos de adaptación de los seres vivos a su ambiente.

A la fecha, uno de los problemas más estudiados de la fisiología circádica ha sido la búsqueda de las estructuras responsables de la generación de las conductas rítmicas. Los resultados, tanto experimentales como formales, sugieren la posibilidad de que los sistemas circádicos en los organismos multicelulares estén compuestos de varios osciladores y que la organización circádica de la conducta se derive de las relaciones integrativas hacia el interior de esos sistemas.

En los mamíferos, el Núcleo Supraquiasmático Hipotalámico (NSQ) ha sido identificado como el elemento crítico para la expresión de los ritmos circádicos. Sin embargo, evidencia proveniente de diversas manipulaciones experimentales sugiere la existencia de diversos generadores rítmicos en el Sistema Nervioso Central de estos organismos sin que hasta el momento alguno de ellos haya sido identificado plenamente.

El presente trabajo, apoyado en diversa evidencia experimental tiene como objetivo determinar si el NSQ de los mamíferos está constituido por al menos un par de osciladores circádicos normalmente acoplados entre sí.

Para tal fin, se emplearon rebanadas de tejido hipotalámico que contenían al mencionado núcleo, obtenidas de animales sometidos previamente a condiciones de luz continua durante diferentes períodos (0, 4, 15 y 30 días) con el fin de promover la desincronización interna, preparadas para registro extracelular multiunitario.

Los resultados obtenidos muestran claras variaciones circádicas en la actividad eléctrica para cada lado del NSQ. Como resultado del tratamiento experimental se observó una disminución en el índice de correlación cruzada entre ambos núcleos, acompañada de una disminución en la duración del período y de un aumento en el número de componentes con relación a los controles.

Lo anterior aporta mayor evidencia acerca de la posible existencia de distintos osciladores circádicos contenidos en el NSQ, así como de que la salida rítmica común sea resultado de la interacción coordinada entre ellos.



## INTRODUCCIÓN.

Desde sus orígenes, la vida en nuestro planeta se ha desarrollado en un ambiente físico caracterizado por notorios cambios periódicos en la disponibilidad de diversos recursos, entre los que sobresalen la cantidad de luz y calor en su superficie (figura 1).

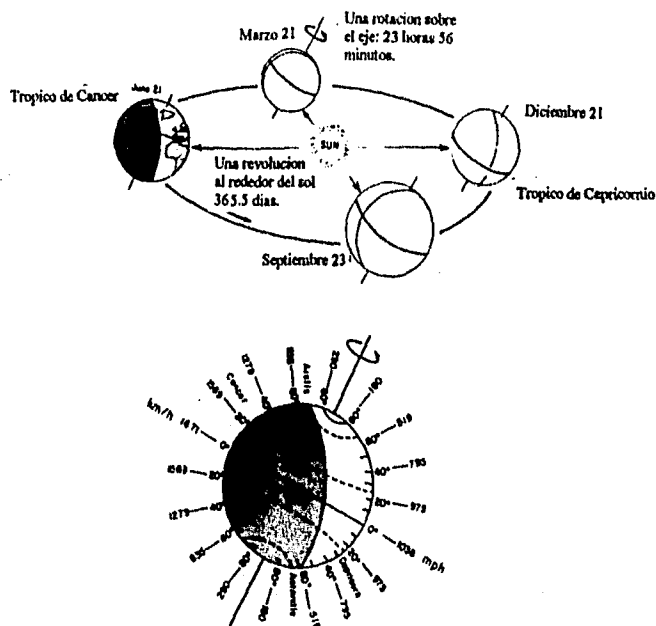


Fig. 1. La rotación anual de la tierra al rededor del sol y de su propio eje determinan los patrones de luz-obscuridad a los cuales se exponen las diferentes regiones del planeta y determinan la duración media del día y la noche en las diferentes estaciones del año (Tomado de Moore-Ede et al, 1982).

La constancia de estas fluctuaciones, derivadas del movimiento de la tierra y la luna con respecto al sol, y su predictibilidad, han provocado que la selección natural

impulse la permanencia y el desarrollo de una capacidad innata de predicción temporal de particular relevancia en los diversos ecosistemas (Aschoff, 1981; Pittendrigh, 1960; Rusak 1979, a y b). El resultado de este proceso, se refleja en la incorporación de programas anticipatorios para el control rítmico del metabolismo y la conducta en los sistemas eucarióticos (Arechiga, 1976; Pittendrigh, 1960; Moore, 1983. Figura 2).

Estos programas temporales están basados en las oscilaciones eléctricas y metabólicas generadas espontáneamente por un grupo o grupos de células cuyo período de oscilación es cercano al ciclo ambiental en el que se desarrollan los diversos organismos. Estas oscilaciones en la materia viva reciben el nombre de ritmos biológicos (Bunning, 1963).

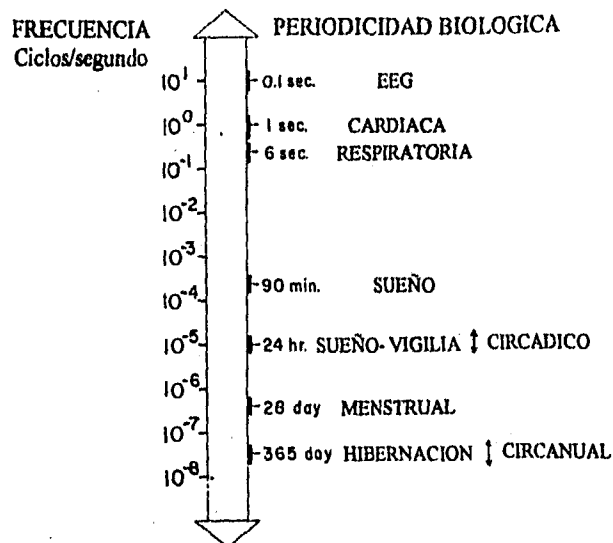


Fig. 2. Los diversos organismos poseen un amplio espectro de frecuencias en sus procesos rítmicos. A la izquierda de esta figura se muestra la frecuencia (1/período) de algunos ejemplos. Las variaciones de alta frecuencia incluyen al electroencefalograma, al ritmo cardíaco, al ritmo respiratorio y al ciclo sueño-vigilia. Estos ciclos se conocen como ultradianos (procesos con períodos inferiores a 24 horas). Los ritmos circádicos están definidos arbitrariamente como aquellos que presentan periodicidad entre 20 y 28 horas. Se muestran dos ejemplos de ciclos de baja frecuencia: el ciclo menstrual y el ciclo estacional de hibernación. Ambos ejemplos se conocen como ritmos infradianos (Tomado de Moore-Ede, 1982).

Los ritmos biológicos pueden ser la respuesta del organismo a una influencia ambiental (ritmos exógenos) o bien, pueden ser generados por el organismo mismo (ritmos endógenos). En estos últimos, una estructura marcapasos se encarga de generar una frecuencia oscilatoria en libre corrimiento, la cual es sincronizada en fase y frecuencia por uno o más factores del ambiente (Aschoff, 1981; Pittendrigh y Daan, 1976; Pittendrigh, 1981; Takahashi y Zatz, 1982).

Cuando la frecuencia de aparición del ritmo se aproxima a un ciclo ambiental de 24 horas se le denomina Circádico (Halberg, 1960).

De acuerdo a Pittendrigh (1976), para llevar a cabo su papel adaptativo, los ritmos circádicos requieren que el sistema generador tenga al menos dos características esenciales: 1) que tenga la capacidad de medir el tiempo biológico, es decir, que el ritmo sea generado endógenamente y con un período cercano a 24 horas y, 2) que pueda medir el tiempo geográfico, es decir, que bajo condiciones ambientales normales, el período del oscilador endógeno se ajuste al período del ciclo ambiental, más importante. De manera usual, el ciclo luz-obscuridad. El período está compensado con relación a la temperatura, lo cual es necesario para un efectivo sistema de medición de tiempo en poiquiloterms.

Al sistema responsable de medir la ritmicidad circádica se le denomina sistema circádico. En general, el sistema circádico está constituido, básicamente, por tres elementos principales: 1) un componente sensorial capaz de inducir la sincronización entre el período endógeno y el período ambiental, 2) uno o varios generadores de la señal oscilatoria y, 3) algunas vías de comunicación entre el marcapasos y los sistemas que exhiben los ritmos manifiestos (Figura 3).

Uno de los problemas más estudiados en la fisiología circádica ha sido la búsqueda de las estructuras responsables de la generación de las conductas circádicas. A la fecha, paralelamente con el desarrollo de modelos analíticos, se han comenzado a describir, en diversos organismos, los substratos anatómicos de estas conductas. En los metazoarios, el sistema neuroendócrino ha demostrado ser la principal fuente de las oscilaciones

biológicas. Los resultados de los estudios experimentales y formales, sugieren que los sistemas circádicos en organismos multicelulares están compuestos de muchos osciladores y que la organización circádica se deriva de las relaciones integrativas dentro de esos sistemas multioscillatorios (Pittendrigh, 1960).

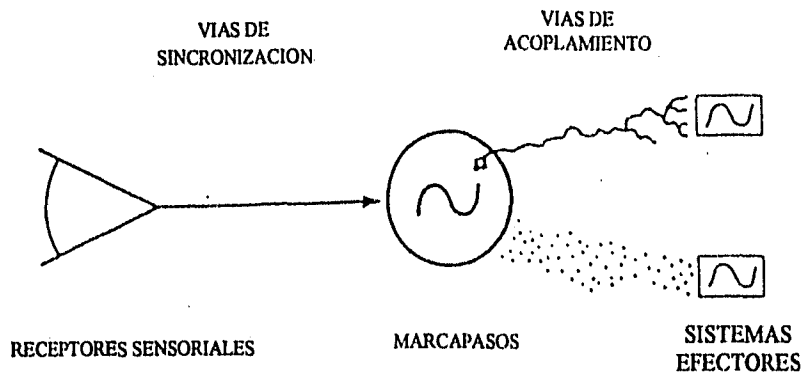


Fig. 3. El sistema circádico está constituido por tres elementos básicos interconectados: Un elemento fotoreceptor que envía información al oscilador el cual está conectado a los sistemas efectores, básicamente por dos vías, una neural y otra humoral. Son los efectores los encargados de manifestar conductualmente los ritmos biológicos.

En tanto que ningún sistema circádico ha sido completamente descrito, es probable, dada la evidencia, que el control de los procesos rítmicos ocurra únicamente en estructuras nerviosas, conclusión que se desprende de los estudios realizados en organismos filogenéticamente diversos.

## INVERTEBRADOS

Los invertebrados han sido empleados intensivamente en cronobiología debido principalmente a lo relativamente simple de su Sistema Nervioso Central, y al gran tamaño y reducido número de sus elementos celulares. Características que han facilitado el estudio detallado de las bases celulares y moleculares de los osciladores circádicos.

### INSECTOS

En estos organismos, los ritmos circádicos son variados y ocupan una amplia gama de conductas y funciones fisiológicas: la amplitud del electroretinograma (Wills et al, 1986), la depositación de la cutícula en adultos (Wiendenmann et al 1983), la eclosión de pupas (Truman 1974, 1980), la actividad locomotora (Truman 1974) y la estrudicación (Sokolove y Loher 1975).

Diversas estructuras del sistema nervioso han sido propuestas como los sitios de generación de estos ritmos (Los discos imaginales de los ojos, la *corpora allata*, la *corpora cardiaca*, el ganglio frontal, los nervios ópticos etc. ) sin que hasta el momento haya sido posible encontrar un solo sitio generador (Truman 1972). Por ejemplo, en varias especies de cucarachas, se ha demostrado que la lesión de ambos lóbulos ópticos, de sus tractos o del ganglio subesofágico abolen la ritmicidad locomotora (Nishiitsutsuji-uwo y Pittendrigh, 1968; Roberts, 1974; Sokolove, 1975; Weber 1985).

En las polillas *Antherea* y *Cecropia* la extirpación del ganglio cerebroide, no altera el patrón motor de la eclosión, pero cancela la constancia de su presentación; es decir, que un evento que se presenta de manera normal a una hora determinada, sin el control del ganglio cerebroide puede ocurrir a cualquier hora del día. La implantación de un ganglio

cerebroide en un animal arrítmico por la extirpación de este órgano, restituye el ritmo, y la eclosión ocurre a la hora que hubiera correspondido a la especie del donador. Estos resultados aportan importantes datos sobre la participación de diversas estructuras con función secretora en el proceso de acoplamiento entre los osciladores y los efectores (Truman, 1974, 1980).

## CRUSTÁCEOS

Al igual que en los insectos, en este grupo, encontramos que las estructuras relacionadas con la visión y algunas estructuras secretoras como la glándula sinusal y el órgano X, han sido implicadas en el control de los ritmos circádicos. Los ritmos estudiados en este grupo incluyen la actividad locomotora, la dispersión del pigmento de los cromatóforos, la migración del pigmento ocular, la actividad del electroretinograma, la locomoción y el metabolismo de calcio y glucosa (Brown, 1961; Arechiga et al, 1973; Beherens 1974; Page y Larimer, 1975; Arechiga y Naylor, 1976; Chamberlain y Barlow, 1977, 1981; Kaplan y Barlow, 1980).

Mediante la técnica de practicar extirpaciones o lesiones en regiones específicas del Sistema Nervioso en estos organismos fue posible detectar que el ganglio cerebroide es indispensable para el mantenimiento del ritmo circádico de migración del pigmento retineano y del ritmo locomotor, sin embargo, el pedúnculo ocular también resultó necesario para el mantenimiento del ritmo locomotor, mientras que las lesiones en otras partes del SN no perturban ninguno de los ritmos estudiados.

Mediante lesiones circunscritas al ganglio cerebroide, se ha logrado establecer que la región mas relacionada con el mantenimiento de la actividad circádica retineana es el lóbulo óptico, sin embargo, el pedúnculo ocular aislado mantiene un ritmo circádico de respuesta a la luz (Barrera-Mera, 1978).

El hecho de que en los crustáceos el SN se encuentre formado por menos de un millar de células, ha facilitado el análisis de los fenómenos celulares implicados en la función rítmica. Esto sucede principalmente en lo que al acoplamiento entre las diversas estructuras oscilatorias se refiere. Arechiga y colaboradores (1974) identificaron un péptido pequeño de efecto depresor cuya frecuencia de liberación es circádica, encontrándose también que diversas neuronas en las que se ha descrito un ritmo circádico en la actividad eléctrica son susceptibles a la presencia de este péptido por lo que se ha postulado que las células nerviosas de los crustáceos son sincronizadas a lo largo del ciclo de 24 horas mediante influencia humoral.

## MOLUSCOS

En este grupo zoológico es posible observar un incremento gradual en la complejidad de la organización neural, proceso que culmina en los cefalópodos con la aparición de mecanismos sensoriales y procesamiento de información centralizados muy similares a aquellos que se observan en los vertebrados.

A pesar de que diversas especies de estos opistobranquios marinos han sido empleados para el análisis de los sistemas circádicos *in vitro* (*Aplysia*, Jacklet 1969, *Bulla*, Block y Wallace, 1982, *Bursatella*, Block y Roberts, 1981, *Haemonea* McMahon y Block, 1982, *Navanax* Eskin y Harcome, 1977), *Aplysia californica* y *Bulla gouldiana* son las más estudiadas, convirtiéndose en los modelos más importantes para el estudio de la generación rítmica, sincronización, acoplamiento entre osciladores y control de conductas rítmicas por marcapasos circádicos.

### *Aplysia californica*

Este molusco presenta ritmos circádicos en diversos elementos neuronales y en su actividad locomotora (Strumwasser, 1973., Jacket, 1981).

La R15, una neurona localizada en el ganglio parietovisceral muestra un patrón característico de actividad eléctrica tanto *in vitro* como *in vivo*. Bajo condiciones de obscuridad continua, la actividad espontánea de esta neurona generalmente incluye uno o dos picos de actividad, por lo que es muy probable que esta actividad represente un verdadero oscilador circádico (Strumwasser, 1965, 1973). Sin embargo, el hecho de que R15 resulte sensible a la temperatura y a que el punto máximo de actividad esté determinado por el tiempo de disección permiten dudar lo anterior (Beiswanger y Jacklet, 1975; Audesirk y Strumwasser, 1975).

En este organismo se ha encontrado que cada uno de los ojos es capaz de mantener, en forma independiente, un ritmo circádico de actividad eléctrica espontánea en forma de potenciales de acción compuestos (CAP) (Figura 4) los cuales son propagados por el nervio óptico hasta el ganglio cerebroide. Este potencial de acción puede ser expresado en total obscuridad y en condiciones de temperatura constante (Jacklet, 1969, 1974). Sin embargo, aun en ausencia de los ojos, el animal sigue mostrando un ritmo circádico en la actividad locomotora, indicando que, además de los ojos, una señal temporal es generada en otras regiones del organismo.

### *Bulla gouldiana*

Al igual que en *Aplysia*, los ojos aislados de *Bulla* muestran variaciones circádicas en la presencia del CAP. Pese a los numerosos tipos celulares que existen en la retina de este organismo, los registros intracelulares de largo plazo (Block et al, 1984., McMahon et al, 1984), la estimulación selectiva y la reducción sistemática de la retina (Block et al, 1984, Block y McMahon, 1984) indican que el ritmo circádico en el CAP es el resultado



de la acción conjunta de aproximadamente 100 células que residen en la base de la retina: las neuronas retinales basales (NRB).

Basados en las observaciones de que fragmentos de tejido retinal contienen neuronas intactas que continúan oscilando circádicamente y en el hecho de que cada una puede ser sincronizada fóticamente, se ha postulado que cada NRB es un oscilador independiente (McMahon et al 1984, Block y McMahon, 1984, Block y Wallace, 1982).

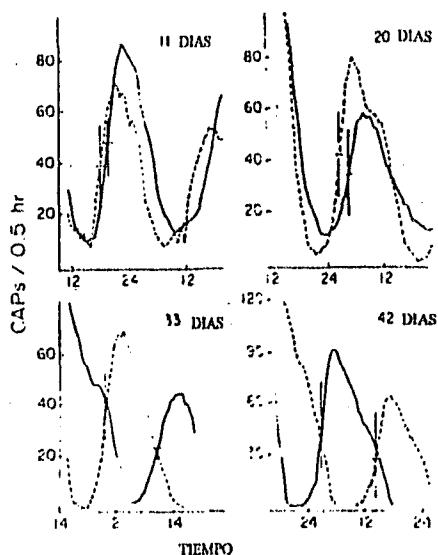


Fig. 4. CAP típico obtenido de registros en ojos aislados y en cultivo de *Aplysia*. Línea punteada, ojo izquierdo, línea sólida, ojo derecho. En la parte superior se indican los días en los cuales se realizó el registro (Tomado de Jacklet, 1969).

En otros moluscos, como *Navanax* (Eskin y Hardcombe, 1977) se ha demostrado la existencia de ritmos similares a los anteriormente descritos, lo que indica que esta actividad y la organización del sistema circádico pueden tener un patrón común en este grupo.

Es posible sugerir entonces que la integración de la ritmicidad circádica en invertebrados se establece mediante el acoplamiento interno de diversos marcapasos

distribuidos en todo el organismo. Arechiga (1983) postula la existencia de marcapasos centrales que reciben y procesan información ambiental, transmitiendo después mediante vía humoral o neural esa información a un amplio conjunto de estructuras en las que se integran las manifestaciones externas de los diversos ritmos. Algunas de estas estructuras es probable que sean osciladores periféricos capaces de generar de manera independiente ritmos circádicos pero jerárquicamente inferiores a los marcapasos centrales.

## VERTEBRADOS

Principalmente debido a la complejidad del Sistema Nervioso de estos organismos, la información que se ha obtenido del estudio de su Sistema Circádico se centra sobre todo en aspectos anatómicos y en el estudio del acoplamiento entre el o los posibles osciladores y en las estructuras encargadas de generar los ritmos manifiestos.

### AVES

El descubrimiento de que como en los invertebrados, estos organismos poseen fotorreceptores extrarretinales involucrados en la sincronización fótica de la actividad locomotora y el hecho de que la lesión de la glándula pineal (Gaston y Menaker, 1968) elimina la actividad locomotora en libre corrimiento, llamó poderosamente la atención sobre el sistema circádico de las aves.

Funcionalmente, el sistema circádico del ave esta constituido al menos por cuatro componentes: la glándula pineal, los ojos, el núcleo supraquiasmático (NSQ), y algún o algunos receptores cerebrales extraoculares (Figura 5). A pesar de que la importancia de estos componentes varia entre las diferentes especies estudiadas, todos tienen 2 características en común: 1) derivan embriológicamente de zonas diencefálicas, 2) Son fotorreceptores o reciben información fótica de aferentes directas o de estructuras asociadas (Crosby et al, 1962, Menaker, 1982).

En las aves, ambas vías, retinal y extrarretinal, contribuyen con información lumínica para la sincronización de los ritmos, para detectar el cambio en la longitud del periodo en libre corrimiento inducido por cambios en la intensidad de la iluminación y en la inducción de la arritmicidad producida por exposición prolongada a la luz constante (McMillan et al, 1975 a, b y c).

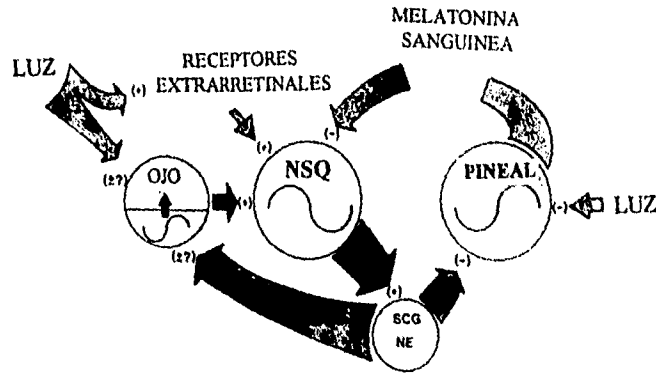


Fig. 5 Modelo del sistema circádico del ave. La glándula pineal secreta de manera activa melatonina durante la noche subjetiva al torrente sanguíneo. Esta melatonina es concentrada en el hipotálamo donde inhibe la actividad del NSQ. En cuanto la melatonina deja de circular por el torrente sanguíneo, la actividad del NSQ se desinhibe y sus células actúan sincrónicamente. Los efectos de la luz en este sistema son mediados de manera independiente por cada componente fotoreceptivo, considerando los ojos y la glándula pineal (Tomado de Cassone, 1979).

Debido a su función como elemento fotoreceptor en animales poiquilotermos y a su ultraestructura similar a los fotoreceptores de los vertebrados inferiores (Menaker y Osche, 1974), se sugirió a la glándula pineal como un elemento importante en las vías de sincronización.

La pinealectomía abole el libre corrimiento de la actividad locomotora en estrillidos, fringílicos, ploecidos (Gaston y Menaker, 1968; McMillan, 1972; Ebihara y Kawamura, 1981) y esturnidos (Gwinner, 1974). Su trasplante a la cámara anterior del ojo en animales lesionados restablece rápidamente el libre corrimiento en oscuridad continua (Zimmerman y Menaker, 1975). Zimmerman y Menaker (1979) demostraron que la fase del oscilador podía ser transplantada mediante los trasplantes de glándula pineal. La fase del animal transplantado correlacionaba altamente con la fase del animal donador y no estaba relacionada con la hora de la cirugía, sugiriendo entonces que la glándula pineal contiene al menos un oscilador identificable.

La glándula pineal parece estar acoplada hormonalmente por medio de su secreción, la melatonina, con el resto del sistema circádico. Esta hormona muestra un ritmo circádico tanto en la glándula misma como en el suero (Ralph et al, 1974).

Es probable que la melatonina sintetizada en la pineal actúe como agente sincronizador en lugares alejados del sitio de síntesis.

Si la melatonina es aplicada de manera continua en dosis pequeñas, el período de libre corrimiento se acorta y en dosis altas induce arritmicidad (Turek et al, 1970). Las inyecciones diarias de melatonina sincronizan la actividad locomotora en aves pinealectonizadas (Gwinner y Benzinger, 1978). Todos estos datos implican a la melatonina en el control de la actividad circádica al menos en este grupo zoológico.

Los ojos están involucrados como fotorreceptores y también quizá como osciladores debido a la probable existencia de marcapasos retíneales (McMillan et al 1975).

Una estructura homóloga del NSQ de mamíferos ha sido descrita por Crosby y Woodburne (1940) en aves. Hartwig (1974) ha reportado una proyección retíneal directa a esta estructura en *Passer domesticus*. En vista de las similitudes anatómicas es posible especular acerca de las similitudes que pudieran existir en los elementos del sistema circádico entre aves y mamíferos. En este caso es posible que el NSQ sea un oscilador localizado fuera de la glándula pineal.

Al respecto se ha observado que la lesión completa del NSQ produce arritmicidad en algunos ritmos hormonales y en la conducta de percha en golondrinas (Takahashi y Menaker, 1982), en *Padda oryzivora* (Ebihara y Kawanura 1981) y en la codorniz japonesa (Simpson y Follet, 1981), mientras que las lesiones parciales producen ritmos inestables.

Adicionalmente a los receptores oculares y pineales, el sistema circádico del ave tiene acceso a receptores extraoculares dentro del cerebro (Menaker, 1968). Aunque con poca eficiencia, se ha observado en golondrinas enucleadas sincronización con ritmos de

luz oscuridad (Mc Milan et al, 1975). La fotoestimulación directa al hipotálamo induce respuesta periódica en la reproducción, en la migración (Yokoyama y Farmer, 1978, Homma et al, 1979) y en algunas otras funciones que dependen de la organización circádica en diversas aves (Bunning, 1960; Hammer, 1971; McMillan, 1972; Elliot, 1976).

## MAMÍFEROS

En los mamíferos, el estudio del sistema circádico se ha dividido en 3 partes: 1) el análisis de las vías de sincronización, 2) el análisis del o de los osciladores y, 3) el análisis de las eferentes.

### 1) Vías de sincronización

En 1972, Moore y Lemm demostraron la existencia de una vía monosináptica de la retina al hipotálamo en roedores: la vía retinohipotalámica (RHP), una vía constituida por axones finos no mielinizados originados en las células ganglionares tipo W de la retina (Mason et al, 1977, Pickard, 1980, 1982) que establecen contacto con el Núcleo Supraquiasmático del Hipotálamo (NSQ) y que resultó suficiente para mantener la sincronización en ausencia de otras vías visuales (Klein y Moore, 1979). La lesión selectiva de esta vía produjo la pérdida total de la sincronización (Johnson et al, 1988 b). Johnson y colaboradores (1988 a) demostraron que la RHP también proyecta al área hipotalámica lateral, al área anterior hipotalámica y al área retroquiasmática.

Dentro del NSQ la proyección está limitada, en la mayoría de los mamíferos, a la región central del núcleo, caracterizada por la presencia de una población de neuronas que expresan el Peptido Vasointestinal Activo (VIP) aunque también se han observado contactos dendríticos en los paquetes de neuropilo provenientes del NSQ que están embebidos en el quiasma óptico (Moore, 1973; Cassone et al, 1988).

Las terminales de la RHP poseen contactos sinápticos simétricos y asimétricos (Guldner, 1976. 1978a y b). Existe evidencia que sugiere que al menos uno de los

neurotransmisores de la vía es un péptido pequeño: el N-acetilaspartilglutamato (Moffet et al., 1990).

En 1974, Swanson y colaboradores y en 1975, Ribak y Peters describieron el Tracto Genuculohipotámico (GHT). Un vía bilateral que involucra proyecciones del núcleo geniculado lateral ventral (NGLv) y cruza a través de los tractos ópticos hasta el NSQ (Figura 6).

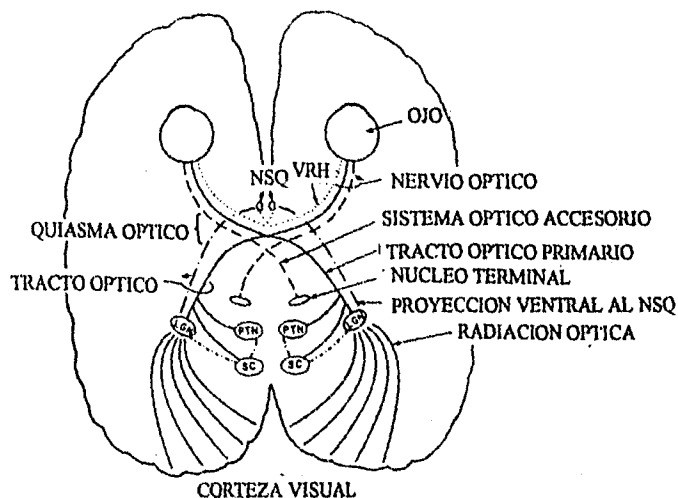


Fig 6. Diagrama de las vías visuales que proyectan de la retina al cerebro. Los nervios ópticos de cada retina proyectan hacia el quiasma óptico en la base del hipotálamo. En este punto se separan tres componentes: 1) El tracto retinohipotalámico (RHT) que termina en el núcleo supraquiasmático (SCN). 2) El tracto óptico primario, que provee la entrada primaria a la corteza visual vía el núcleo geniculado lateral (LGN) y las radiaciones ópticas. El colículo superior (SC) y el núcleo preteccial (PTN) también reciben entradas del tracto óptico primario y del LGN. El tracto primario también contiene elementos del tercer componente: el sistema óptico accesorio, el cual tiene proyecciones difusas a una gran variedad del tallo cerebral (Tomado de Moore-Ede, 1979).

En 1976, Hickey y Spear encontraron una subdivisión de esta vía a la que designaron con el nombre de hojuela intergeniculada (IGL) que recibe las proyecciones bilaterales de la retina. La IGL fue posteriormente descrita como la contenedora de una



población de neuronas positivas a neuropéptido Y, que proyectan al NSQ en un patrón que se sobrelapa a la proyección de la VRH ( Card y Moore, 1982, Mantyh y Kemp, 1983., Moore et al., 1985., Harrington et al, 1985, 1987; Pickard 1982). La IGL también contiene una población celular rica en encefalina que proyecta a la IGL contralateral via las comisuras supraópticas (Card y Moore, 1989., Pickard, 1985). La IGL, como el NSQ contiene neuronas que parecen responder principalmente a los cambios de luz. La lesión de la IGL resulta en una disminución de la velocidad de sincronización posterior a un cambio de fase o a una alteración en el ángulo de fase del estímulo sincronizador (Johnson y Mc Knight, 1989, Pickard, 1989) abole la actividad de partición asociados al alargamiento de la exposición prolongada a luz continua ( Harrington y Rusak, 1988).

Una tercer aferente está representada principalmente por un sistema de fibras serotoninérgicas densas originadas desde el núcleo del raphé medio y del raphé dorsal (Pickard, 1982., Fuxe, 1965, Nojyo y Sano, 1978). Esta vía se sobrelapa con las vías RHP y GHP y su lesión produce un cambio en el ángulo de fase de la sincronización. Otras aferentes no visuales menos estudiadas, están originadas en el área retroquiasmática, en el núcleo paraventricular hipotalámico, en el núcleo talámico paraventricular, en la corteza subicular del hipocampo, en la porción ventral del septum lateral, en la substancia gris periacueductal mesencefálica y en el núcleo dorsal del lemnisco lateral (Swanson y Cowan, 1975). Es probable que estas vías ejerzan control sobre el sistema circádico de manera humoral. De este grupo, quizá la vía mas estudiada este representada por la glándula pineal que produce melatonina y que es capaz de inducir sincronización (Cassone et al, 1986a, b). Los receptores a melatonina son encontrados en altas concentraciones en el NSQ (Weaver et al, 1989) lo que sugiere un papel importante de esta hormona en la sincronización.

## 2) Marcapasos

El Núcleo Supraquiasmático (NSQ) se ha identificado como el elemento crítico para la expresión normal de varios ritmos circádicos en mamíferos (Menaker y Binkley, 1981; Menaker et al, 1978; Moore, 1979; Moore, 1983; Moore-Ede et al, 1982; Sato y Kawamura, 1984; Turek, 1985, Figura 7).

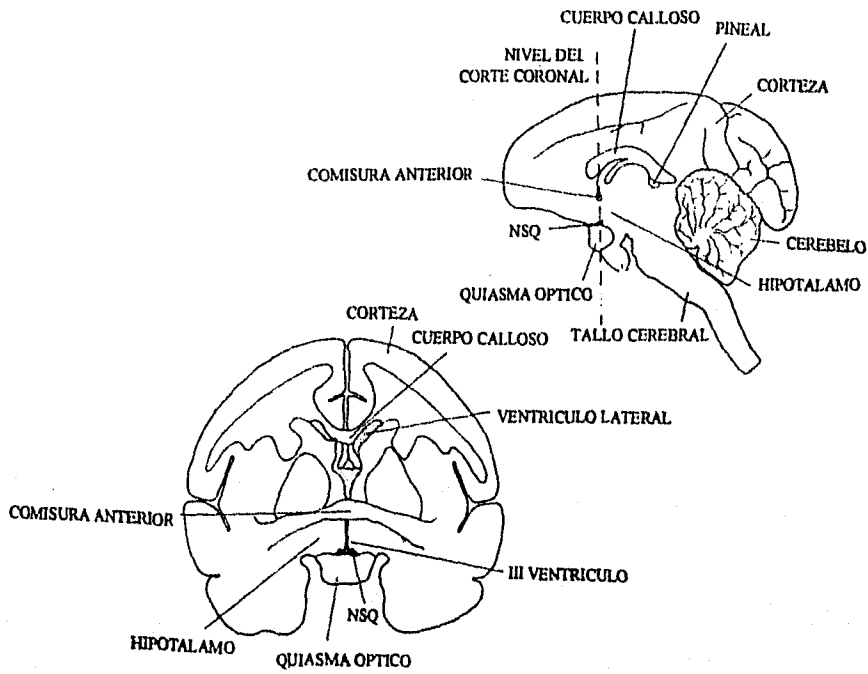


Fig 7. Localización en el cerebro de un primate del núcleo supraquiasmático. A) corte sagital y B) corte coronal. El núcleo supraquiasmático se encuentra sobre el quiasma óptico y lateral al tercio anterior del tercer ventrículo (Tomado de Moore-Ede, 1979).

La lesión completa de este núcleo (Menaker et al, 1978) causa la pérdida total e irreversible de distintas variables fisiológicas y conductuales rítmicas en roedores, tales como la actividad locomotora (Meijer y Rietveld, 1989; Drucker et al 1984; Rusak y Zucker, 1979; Rusak, 1977; Stephan y Zucker, 1972; Stetson y Watson-Whitmyre, 1976; Mosko y Moore 1979 a y b), la ingesta de agua y alimento (Boulos et al, 1980; Nagai et al, 1978; Nakagawa et al, 1979; Stoynev et al, 1982; Van den Pol y Powley, 1979; Stephan y Zucker, 1972), la actividad sexual (Eskes, 1984; Sodersten et al, 1981), la síntesis y secreción de diversas hormonas incluyendo a la corticosterona adrenal (Moore y Eichler, 1972), la hormona adrenocorticotrópica -ACTH- (Assenmacher, 1982), la melatonina (Klein y Moore, 1979), la prolactina (Bethea y Neil, 1980; Kawakami et al, 1980) y las gonadotropinas (Samson y McCann, 1979), así como las manifestaciones conductuales y electrofisiológicas del ciclo sueño- vigilia (Eastman et al, 1983a y b; Hanada y Kawamura, 1981) así como los correlatos entre el ciclo estral y el fotoperíodo (Rusak y Morin, 1976; Rusak y Zucker, 1979b), lo que sugiere que otras zonas del cerebro no tienen la capacidad de reorganizarse y suplir la función que desempeña el NSQ.

Otras manipulaciones no destructivas como la estimulación química demuestran que la manipulación de la actividad neuroquímica del NSQ altera por completo la expresión de los ritmos circádicos causando retrasos y avances de fase (Rusak y Groos 1982; Albert y Ferris, 1984).

El NSQ posee ritmicidad espontánea en el disparo neuronal *in vivo* e *in vitro* y en la tasa de utilización de glucosa también en ambas condiciones (Inouye y Kawamura, 1979; Schwartz et al, 1980., Schwartz y Gainer, 1972., Fuchs y Moore, 1980., Groos y Mason, 1978., Shibata et al, 1982; Groos y Hendricks, 1982; Green y Gillette, 1982; Shibata y Moore, 1988; Newman y Hospod, 1986; Figura 8).

Los trasplantes de NSQ fetal pueden inducir la recuperación funcional de animales arrítmicos ( Drucker Colin et al 1984, Sawaki y cols, 1984, Aguilar y cols, 1986,

Lehman y cols, 1987, de Coursey 1989, Ralph y Lehman 1990, Aguilar y cols, 1992 a, b; Figura 9), lo que sugiere que el NSQ es el principal oscilador circádico en el SNC de los mamíferos.

Anatómicamente, el NSQ esta constituido por dos acumulaciones de aproximadamente 8,000 a 13,000 células pequeñas (de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) densamente empaquetadas y localizadas bilateralmente en el hipotálamo ventral anterior (Aguilar y Drucker Colin 1987), en la base del tercer ventrículo el cual lo divide en su parte dorsal. Está limitado medialmente por el tracto infundibular y el receso óptico del tercer ventrículo, ventralmente por el quiasma óptico, dorsalmente por la porción anterior del núcleo periventricular y ocupa una posición anterior a otros núcleos hipotalámicos (Paxinos y Watson, 1982). Una zona libre de células de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  separa al NSQ medial de la pared del III ventrículo.

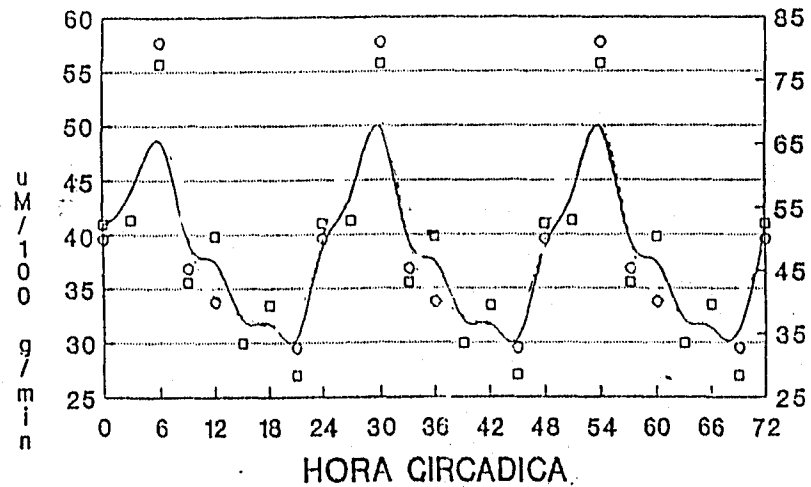


Fig 8 Gráfica que muestra la actividad circádica de la captura de 2-deoxiglucosa en el NSQ de la rata (Cortesía de Escandon y Aguilar-Roblero, 1994).

La estructura lateral del NSQ está pobremente definida. Los límites rostral y caudal están constituidos por las áreas preópticas y retroquiasmáticas. En la porción medial el NSQ invade la parte dorsal del quiasma óptico en una región característica formada por algunos somas y neurópilo (Guldner 1985). Preparaciones realizadas con microscopía electrónica muestran que la longitud dorsoventral, mediolateral y rostrocaudal del NSQ en la rata es de 360 , 450 y 750  $\mu\text{m}$  respectivamente (Guldner 1983), el volumen unilateral del mismo núcleo es de 0.064 mm cúbicos. El NSQ es ovoide pero presenta formas irregulares en otras especies (Lydic y Schoene 1980, Lydic et al 1982).

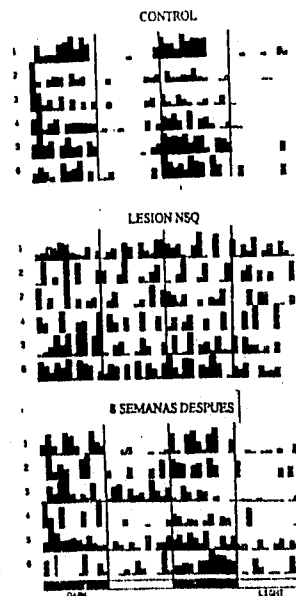


Fig 9. Gráfica doble que representa la distribución temporal de la ingesta de agua de 6 ratas mantenidas en condiciones luz-obscuridad 12:12. En la parte inferior de la gráfica se representa con una barra negra el periodo de obscuridad y con una barra clara el periodo de luz. En el panel A se observa la conducta de los animales previamente a una lesión del NSQ. B) La conducta de los mismos animales post lesión. La periodicidad de la conducta se ha perdido. C) 8 semanas después del transplante (Tomado de Drucker-Colin et al, 1984).

Esparcidas entre las neuronas se encuentran abundantes células astrogliales (Moore, 1983) en una proporción de 1 por cada 3 neuronas (Guldner, 1983, Figura 10).

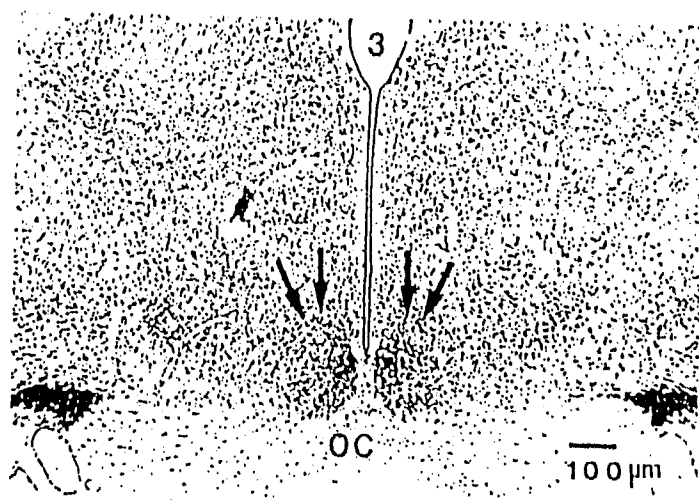


Fig 10. Micrografía de un corte coronal del cerebro de una rata donde se observa un cúmulo denso de células que representan al NSQ (indicado por flechas). 3V, Tercer ventrículo. OC, Quiasma óptico. SO, Núcleo supraóptico (Tomado de Drucker-Colin et al, 1984).

Se han identificado numerosos neurotransmisores en el NSQ de la rata y el hamster (Card y Moore 1984). Estos neurotransmisores pueden ser sintetizados dentro del NSQ o provenir de otras regiones del SNC (Van den Pol y Tsujimoto, 1985). Los neurotransmisores endógenos del NSQ son la vasopresina, la neurofisiina (Sofroniew, 1980), la bombesina, la gastrina, el GAD (Van den Pol y Gorcs, 1986) el péptido vasointestinal activo (Card y cols, 1981) y el GABA, los neurotransmisores de origen externo presentes en alta cantidad incluyen al polipéptido pancreático de ave (APP) a la serotonina, al neuropéptido Y, al glutamato y al aspartato, los cuales pueden provenir de las diferentes aferentes al NSQ (Card y cols, 1983, Moore y cols, 1984) otros

neurotransmisores presentes en los axones del NSQ son la dopamina, la norepinefrina y la epinefrina cuya densidad dentro y fuera del núcleo es la misma (Van den Pol 1986). La colecistoquinina, la prolactina la sustancia P y la hormona liberadora de la tirotrina han sido detectadas en pocos axones fuera del NSQ (Van den Pol y Tsujimoto, 1985).

Las características estructurales finas y la distribución inmunohistoquímica en las diferentes subpoblaciones neuronales varían en el aspecto rostrocaudal y mediolateral del NSQ (Card y cols, 1981), encontrando vasopresina y neurofisiina en las regiones dorsales (Buijs et al 1978, De Vries et al, 1981, Kawata y Sano 1982, Krisch 1978, Sofroniew y Weindl, 1980, Ueda et al, 1983, Vandensande et al, 1975, Van Leeuwen et al, 1978, encefalina en pocas neuronas (Finley et al, 1981, Moore 1983), péptido vasointestinal en las áreas ventrales (Card et al 1981, Kiss et al, 1984), estradiol en las áreas laterales (Pfaff y Keiner 1973), LH-RH en el NSQ del conejo (Barry 1976, Daikoku et al, 1982) y Sustancia P en aves (Gamlin et al 1982)

El NSQ está subdividido en diversas zonas de acuerdo a la existencia de diversos químicos (Van den Pol, 1980; Card et al, 1981; Van den Pol y Tsujimoto, 1985). La región de VIP también contiene neuronas que tienen el péptido liberador de gastrina (Van den Pol y Tsujimoto, 1985). La región que no recibe la entrada de fibras de VHR se caracteriza por contener una gran población de neuronas productoras de VP y también contiene pequeñas cantidades de somatostatina, encefalina, péptido natriurético atrial y neuronas productoras de angiotensina (Van den Pol y Tsujimoto, 1985; Cassone et al, 1988; Watts y Swanson, 1987). Okamura y colaboradores (1989) sugieren que casi todas las neuronas del NSQ son productoras de GABA (Figura 11).

Localization of neurotransmitters and peptides in the rat SCN

Neurotransmitter or peptide	Terminals		
	Perikarya	Paravacu	Capsula
Acetylcholine	---	---	+++
Histamine	---	---	+++
Serotonin	---	+++	---
Vasopressin (54)	+++	+++	+
Somatostatin (50)	++	+++	---
Vasoactive intestinal peptide (4)	+++	+++	+
Avian pancreatic peptide (5)	---	+++	---
Substance P	---	+++	+++
Molluscan cardioexcitatory peptide (52)	---	+++	+++
Leu-enkephalin	+	+	+++
Cholecystikinin	---	++	+++

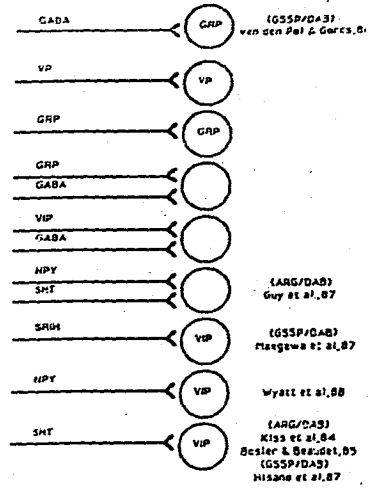
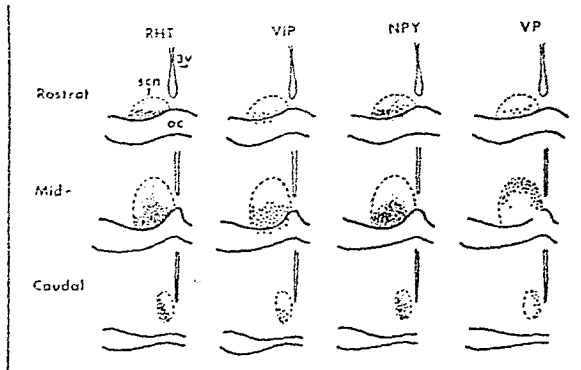


Fig. 11. A) Localización relativa de neurotransmisores y péptidos en el NSQ. B) Dibujos en cámara lucida de inmunocitoquímica contra algunos péptidos en los diferentes niveles del NSQ. C) Representación de las diferencias químicas al NSQ (Modificado de Van den Pol, 1993).



### 3) Eferentes

Las vías neuronales eferentes del NSQ se organizan en 4 grupos principales, a saber: 1) Un plexo de fibras que se dirige dorsal y caudal al NSQ entre el núcleo periventricular y el área hipotalámica anterior. Estas fibras terminan ipsilateralmente en la parte ventral posterolateral del núcleo paraventricular en una zona llamada subparaventricular. Otras fibras se continúan dorsalmente a partir de esta zona y terminan en la región mediodorsal del núcleo talámico paraventricular, un pequeño número de fibras divergen rostralmente a la fimbria y al núcleo triangular del septum, la mayoría de estas fibras se continúan caudalmente al espacio ventral del núcleo habenular lateral.

2) Un haz de fibras que cruza ventral y caudalmente a través del hipotálamo basal, conecta al NSQ con el núcleo arcuato, la eminencia media y los núcleos ventromedial y dorsomedial del hipotálamo. Un componente más lateral se continúa al núcleo mamilar prelateral, algunas fibras cruzan a través del complejo mamilar al área ventrolateral interpeduncular. Algunas fibras mediales viajan dorsalmente y caudalmente en la región periventricular hasta el mesencéfalo en la substancia gris central.

3) La vía rostral consiste en fibras que terminan en la parte ventral del área preóptica medial, en el núcleo periventricular anteroventral, en el núcleo septal lateral intermedio, en la continuación preóptica del núcleo del lecho de la estria terminalis, en el núcleo paratenial y en la parte rostral del núcleo paraventricular del tálamo.

4) Las fibras que salen lateralmente terminan en el NGLv, otras fibras viajan lateralmente y dorsalmente al quiasma óptico algunas de estas fibras se continúan de una región pobre en células dorsales al núcleo supraóptico así como dentro del núcleo supraóptico, otras fibras llegan al tálamo dorsomedial al núcleo paraventricular del tálamo y al núcleo del tracto solitario (Watts y cols, 1987a, Stephan y cols, 1981, Kucera y Favrod, 1979, Figura 12 y 13).

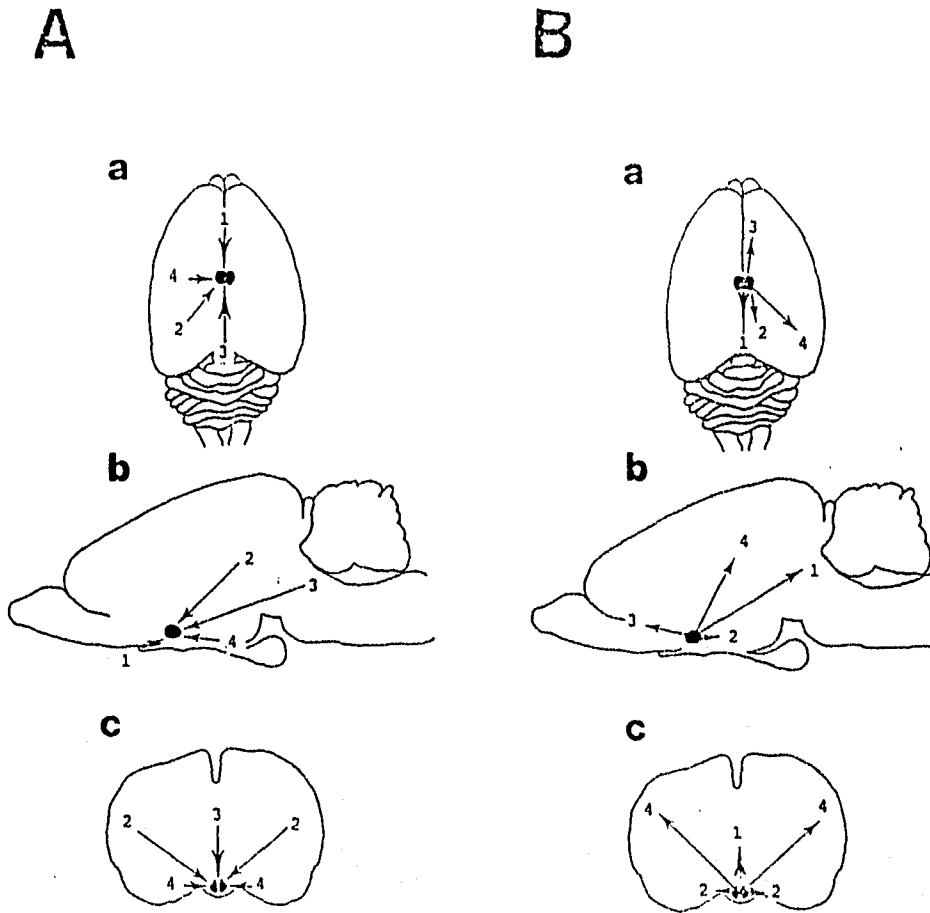


Figura 12. El NSQ en la rata.

A) Vías aferentes. 1) Tracto Retino Hipotalámico. 2) Tracto genículo-hipotalámico. 3) Fibras provenientes del rafe medio dorsal. 4) Fibras provenientes del área retroquiasmática, del núcleo paraventricular talámico, de la corteza subicular del hipocampo, de la porción ventral del septum lateral, de la sustancia gris periacueductal mesencefálica y del núcleo dorsal del lemnisco lateral.

B) Vías eferentes. 1) Fibras que terminan en la parte ventral del núcleo habenular lateral. 2) Fibras ventrocaudales que conectan con otros núcleos hipotalámicos terminando en la sustancia gris mesencefálica. 3) Vía dorsal que llega al núcleo paraventricular del tálamo. 4) Fibras laterales que llegan al núcleo geniculado lateral.

a) Corte horizontal. b) Corte sagital. c) Corte coronal

## EL SISTEMA CIRCÁDICO EN MAMÍFEROS: UN COMPLEJO MULTIOSCILATORIO?

Si bien la investigación en cronobiología ha sido desarrollada tradicionalmente desde dos enfoques, el análisis de las propiedades formales de los ritmos y el análisis de los mecanismos fisiológicos y substratos anatómicos que les subyacen, se ha logrado un substancial avance en la comprensión de estos mediante la síntesis de ambos.

Quizá el concepto que más influencia ha tenido en esta área integrativa es la hipótesis general que plantea la existencia, en organismos complejos, de osciladores circádicos múltiples, y que estos osciladores están coordinados por relaciones jerárquicas y no jerárquicas (Pittendrigh, 1974; Menaker, 1974. Figura 13).

De esta manera, la organización circádica se ve como el producto de la interacción entre subsistemas oscilatorios normalmente acoplados que pueden ser experimentalmente disecados. Así, los osciladores en la cima de este sistema jerárquico son llamados osciladores maestros o marcapasos, mientras que aquellos situados por debajo son llamados osciladores esclavos. De los primeros, depende la coordinación interna del sistema, de los segundos, las señales de tiempo para los sistemas efectores que comandan los ritmos manifiestos.

Hasta el momento, existen diferentes líneas experimentales que soportan esta hipótesis, sin embargo, cada una es de especial relevancia para algún aspecto en particular: algunos fenómenos son sugestivos hacia un acoplamiento jerárquico, otros, hacia un sistema oscilatorio multinivel.

Normalmente, las relaciones de acoplamiento entre los posibles osciladores que constituyen un sistema circádico, son suficientes para mantener la coordinación interna del

sistema circádico y por lo tanto para mantener la coherencia con las funciones manifiestas. Sin embargo, ciertas condiciones como la luz brillante, ciertas lesiones y algunas drogas y hormonas promueven la ocurrencia de estados de desorganización interna en los cuales se rompe el acoplamiento entre los diversos constituyentes del sistema circádico. En estas condiciones la naturaleza multiconstitutiva del sistema se evidencia.

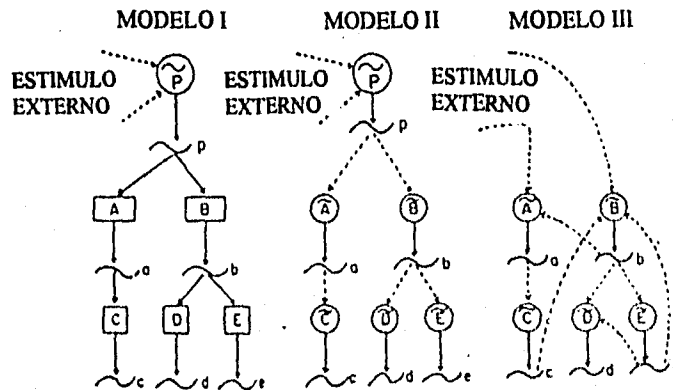


Fig. 13 Tres modelos teóricos de la posible organización del sistema circádico en invertebrados. El modelo 1 propone un sistema jerárquico con un oscilador maestro (p) y diversas estructuras con capacidad oscilatoria (A,B,C,D,y E), mientras que el modelo 2 propone un oscilador maestro (p) y varios osciladores subordinados (A,B,C,D y E). El modelo 3 propone un sistema multioscilar no jerárquico.

Existen varias formas por las cuales un sistema constituido por varios elementos puede ser integrado. Los osciladores pueden estar jerárquicamente acoplados, esto es, uno subordinado a otro. Pueden también funcionar en paralelo y entonces mostrarán acoplamiento mutuo. En mamíferos, un gran número de trabajos sugieren que el sistema circádico consiste de más de un oscilador que mantiene ambos tipos de relaciones entre osciladores (Pittendrigh et al 1960, 1981; Winfree, 1967; Kawato y Susuki, 1980; Moore Ede et al, 1982; Rosenwasser y Adler, 1985).

A continuación se mencionarán las principales evidencias de lo anterior.

## **DESINCRONIZACION INTERNA**

El fenómeno que mejor muestra el hecho de que probablemente los diferentes ritmos circádicos dependan de diferentes osciladores es la desincronización interna, en la cual las diferentes manifestaciones rítmicas muestran diferentes periodos (Aschoff y Weber, 1981; Aschoff 1980; Czeisler et al, 1980; Weber 1979). En este estado las relaciones de fase internas se pierden. La desincronización interna es comúnmente observada bajo condiciones de libre corrimiento (desincronización interna espontánea) pero también puede ocurrir bajo regímenes de sincronización que sincronizan exitosamente algunos ritmos pero no otros (desincronización interna forzada, Folkard et al, 1983, 1984, 1985; Weber, 1979). La existencia de este fenómeno parece indicar que los diferentes ritmos manifestados dependen de sistemas oscilatorios que son al menos, parcialmente distintos (Moore-Ede, 1983). En lo que respecta a la desincronización interna forzada, la evidencia más consistente ha sido obtenida solamente en primates humanos y no humanos (Gander, 1985; Moore-edo et al, 1979; Sulzman et al, 1977).

Un tercer fenómeno relacionado lo constituye la desincronización interna transitoria. Esta ha sido observada durante el periodo de ajuste posterior a un avance de fase en el ciclo luz-obscuridad (Figura 14).

A diferencia de la desincronización interna espontanea y la forzada, la desincronización interna transitoria, ocurre tanto en primates (Moore-ede y Sulzman, 1981; Moore-ede et al 1979; Sulzman et al , 1979) como en roedores (Finkelstein et al, 1978; Zucker y Stephan, 1973). En contraste con la ocurrida espontáneamente, la transitoria probablemente refleje el desacoplamiento temporal entre los osciladores múltiples y el marcapasos que normalmente los sincroniza (Moore-ede, 1982).

Por otro lado, estudios con lesión sugieren que diferentes ritmos circádicos pueden depender de diferentes marcapasos. Independientemente de la evidencia que apoya al NSQ como el único oscilador maestro demostrado en mamíferos, algunos ritmos circádicos persisten normalmente a pesar de su lesión total, lo que no indica que estos puedan depender de otros osciladores diferentes del NSQ, por ejemplo, en monos el ritmo del cortisol no es afectado por la lesión del NSQ (Reppert et al , 1981), al igual que el ritmo de temperatura (Albers et al, 1984 a y b). En otros organismos, la evidencia es contradictoria (Dunn et al 1977; Eastman et al, 1983a y b; Stephan y Nunez, 1977).

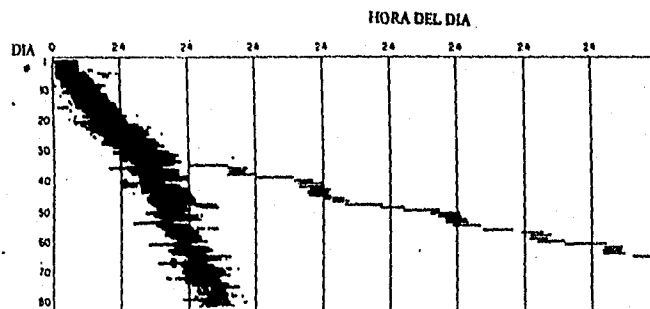


Fig 14. Desincronización interna entre los ritmos de actividad y temperatura corporal de un humano mantenido en aislamiento temporal. Los episodios de descanso (Barras horizontales) y los de temperatura corporal (barras sateadas) fueron sincronizados a un periodo de 24 horas y posteriormente sujetos a obscuridad continua. Están internamente desincronizados (Tomado de Stephan y Nunez, 1977).

## RITMOS ANTICIPATORIOS DE ALIMENTO

En roedores, la evidencia mas directa de la existencia de osciladores múltiples proviene de los experimentos sobre los efectos de la exposición del organismo a esquemas de acceso limitado de alimento. Boulos y colaboradores (1988) y Gibbs (1979) demostraron que el sistema circádico clásico (sincronizado por luz) no es sincronizado por los esquemas de alimentación. Sin embargo, ante la exposición a un esquema de alimentación circádico, el roedor desarrolla un componente "anticipador" caracterizado por incrementos en la actividad pocas horas antes del período de alimentación (Edmond y Adler, 1977 a y b; Honma et al, 1983; Stephan et al, 1979 a y b; Boulos et al, 1980; Figura 15).

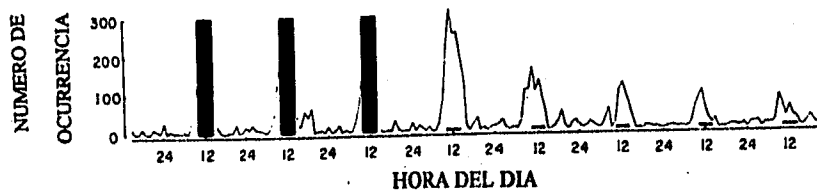


Fig 15. Ritmos anticipatorios de alimento en animales intactos. La barra negra indica el momento en el que fue proporcionada la comida. Se puede observar, en la gráfica de líneas, la actividad anticipatoria del animal representada por la presión de una palanca (Tomado de Stephan et al , 1979a).

La evidencia disponible sugiere la participación de mecanismos temporales funcional y anatómicamente diferentes al marcapasos sincronizado por la luz (Rosenwasser y Adler, 1986). A diferencia de los ritmos sincronizables fóticamente, los ritmos "alimentarios" muestran un rango muy limitado de sincronización cercano a 24 o 12 horas (Bolles, 1965; Boulos et al, 1980; Bolles y Moot, 1973).

El ritmo de alimentación puede mostrar diferente periodo al mostrado por los ritmos fóticos (Aschoff et al, 1982; Boulos et al, 1980; Giblis, 1979). Persiste y muestra idéntico comportamiento aún después de lesiones totales del NSQ (Boulos, 1980; Clarke y Coleman, 1986; Stephhan, 1981, 1986).

Inouye (1982), Krieger (1980), Mistlberger y Rechtschaffen (1984) y Bernadakis (1989) han demostrado que la lesión del hipotálamo ventrolateral (VMH) elimina los ritmos anticipatorios de alimento. Es posible entonces, sugerir la presencia de un oscilador energético localizado en estructuras normalmente involucradas en el balance de energía, como el VMH (Suda y Sato, 1979).

## PARTICIÓN

Normalmente, la posible población de osciladores que subyacen a cualquier ritmo actúan en sincronía para producir una expresión rítmica coherente, pero bajo ciertas condiciones, cierto tipo de desincronización ocurre, lo que produce una pérdida de la coherencia rítmica.

El fenómeno tipo de este grupo de anomalías es la partición (Splitting) en la cual un ritmo circádico individual se disocia en 2 o más componentes rítmicos diferentes, cada uno mostrando diferente relación de fase (Figura 16).

La partición fue descrita inicialmente en el hamster (Pittendrigh 1960; Earnest y Turek, 1982; Turek et al, 1982). Después de haberselo sometido por largos periodos de tiempo a luz brillante continua. Se observó que la actividad locomotora se dividía en 2 componentes, mientras que la transición a obscuridad continua inducía la rápida recuperación a un ritmo unimodal.

Cuando el ritmo partido emerge, transita temporalmente por un periodo de libre corrimiento para después estabilizarse en una relación de antifase de  $180^\circ$  (Pittendrigh y Daan, 1976).



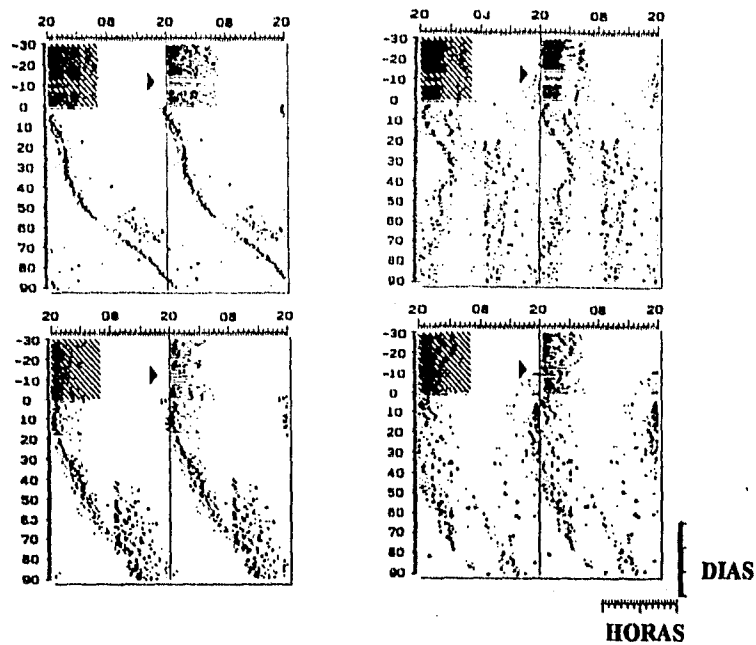


Fig 16. Diversos ejemplos de partición inducidos por luz constante. La región sombreada representa la exposición a la luz-obscuridad. El día cero indica el inicio de la exposición a la luz continua (Cortesía de Aguilar-Roblero, 1993).

Cada componente puede responder de manera independiente a pulsos de obscuridad con su respectiva curva de respuesta de fases (Boulos y Morin, 1985; Boulos y Rusak, 1982).

Se conocen otros tipos de partición, por ejemplo, aquel en el que los componentes divididos no se estabilizan en antifase, mostrando diferentes periodos de libre corrimiento. Este se ha observado en ratas (Cheung y Mc Cormack, 1983) y hamsters (Pittendigh, 1975). También ha sido posible inducirla farmacológicamente (Wirz-Justice y Campell, 1982 a y b) y endocrinológicamente (Gwinner 1974).

La partición ha sido observada en numerosas especies de vertebrados: Ratas (Boulos y Terman, 1979; Cheung y Mc Cormack, 1983), ardillas (Hoffman, 1971), aves (Gwinner, 1975; Turek y Gwinner, 1982), lagartijas (Underwood, 1977), peces (Kavaliers, 1979) y en diferentes variables fisiológicas; ingesta de agua y locomoción (Aguilar-Roblero 1991), alimentación y autoestimulación (Boulos y Terman, 1979) y actividad de rueda (Pickard et al , 1984).

## PROPIEDADES ELÉCTRICAS DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

Cuando han implantado electrodos en varias regiones cerebrales en animales en libre movimiento, se registran claros ritmos en la actividad unitaria y multiunitaria (Inouye y Kawamura 1979, 1982; Ono et al 1981; Figura 17).

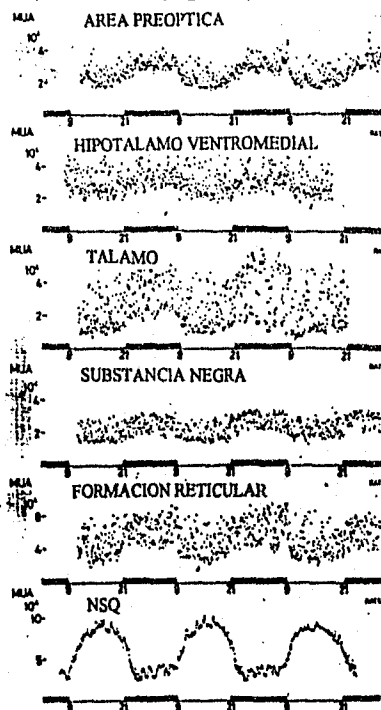


Fig 17. Ritmos circádicos de actividad multiunitaria registrada en diversas regiones del cerebro de animales intactos. Cada punto representa la actividad eléctrica registrada en 5 minutos. Las abscisas representan el tiempo gregoriano y las bandas oscuras los períodos de oscuridad (Tomado de Inouye y Kawamura, 1979).

En el NSQ la actividad multiunitaria es alta durante el día y baja durante la noche (Inouye y Kawamura, 1979). Los registros multiunitarios crónicos demuestran que las oscilaciones circádicas no sólo se presentan en el NSQ sino también en otras muchas regiones del cerebro (Inouye y Kawamura, 1979, 1982). Sin embargo, cuando el NSQ es aislado quirúrgicamente la variación circádica solo se observa en la isla hipotalámica que contiene al NSQ mientras que las oscilaciones desaparecen del resto del tejido cerebral (Honna et al, 1984; Inouye y Kawamura, 1979; Kawakami et al, 1980; Figura 19) lo mismo se observa *in vitro* (Groos y Hendricks 1982). Se ha demostrado que la sincronización de la actividad eléctrica del NSQ requiere que la VRH esté intacta (Inouye y Kawamura 1982).

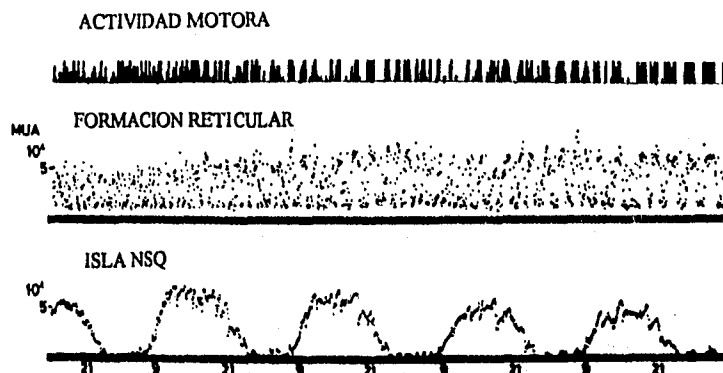


Fig 19. Registros simultáneos de actividad motora y actividad multiunitaria de la formación reticular y de una isla hipotalámica que contiene al NSQ. El animal se ha mantenido en oscuridad continua. El eje de las abscisas representa el tiempo geográfico en horas. Los registros comenzaron cinco días después del aislamiento hipotalámico (Tomado de Turek, 1979).

Una porción considerable de las células del NSQ responden a la estimulación contralateral visual de la retina (Groos y Hendricks, 1982; Groos y Mason, 1978, Sawaki, 1979). La gran mayoría de estas células cambian sus tasas de disparo tónicamente cuando el nivel de luminosidad cambia. Esto puede ocurrir de dos formas 1) incrementando sus tasas de disparo cuando se incrementa la luz y, 2) actuando en forma opuesta. Por tanto

las células se clasifican en: activadas por la luz o suprimidas por la luz (Groos 1982; Groos y Mason 1978, 1980) típicamente, esto ocurre sólo en ciertos niveles ( $>10^{-1}$  cd/m<sup>2</sup>). Sin embargo, no hay una clara relación entre estas respuestas y la fase del ritmo (Meijer et al 1986; Figura 20).

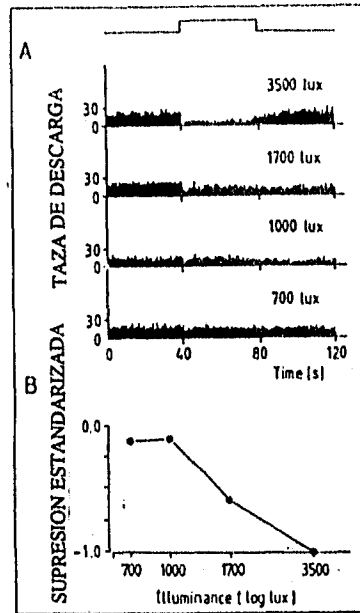


Fig 20. A) Ejemplo de la dependencia lumínica de la actividad eléctrica de algunas células del NSQ. En el panel B) se indican la relación entre la intensidad de la luz y el estado de supresión (Tomado de Groos, 1982).

Las neuronas hipotalámicas se caracterizan por presentar tasas de disparo bajas, los registros extracelulares *in vitro* del NSQ revelan tasas de disparo entre 0.2 y 22 Hz (Meijer et al 1986), entre 2 y 8 Hz (Nishino y Koizumi, 1977) y entre 0.1 y 11 Hz (Miller et al 1987; Glozibach et al, 1987), en todos estos estudios, *in vivo*, el patrón de disparo del NSQ fue irregular (Meijer et al 1986; Miller et al 1987, Nishino y Koizumi, 1977). Los estudios *in vitro*, por el contrario muestran que la media de disparo en el NSQ varía de

entre 3 y 9 Hz (Guillette 1986, Green y Gillette 1982; Groos y Hendricks, 1982; Shibata et al 1982; 1984a, 1984b; Thompson et al 1984 a y b), se encontró también un tipo regular de disparo con una curva gaussiana y coeficiente de variación pequeño (Groos y Hendricks 1979), las células restantes mostraron un patrón en ráfagas o bien fueron irregulares. Los registros de actividad eléctrica unitaria en neuronas del NSQ obtenidos en rebanadas *in vitro* muestran un ritmo circádico en la tasa de disparo espontáneo (Green y Gillette, 1982; Groos y Hendricks, 1982; Groos et al, 1983; Shibata et al, 1984; Shibata et al, 1982. Figura 21).

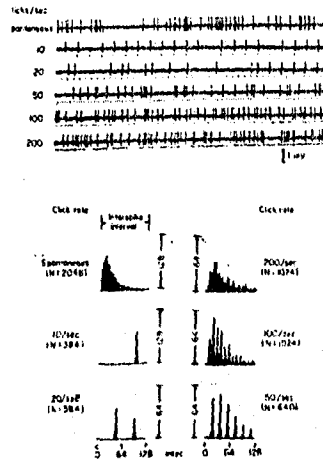


Fig 21 A) Gráfica del registro unitario de la actividad eléctrica espontánea del NSQ. B) Patrones de descarga a) regular, b) Poisson, c) irregular (Cortesía del Dr. J. A. Roig).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Diversas evidencias muestran que el NSQ esta constituido anatómica y, fisiológicamente por distintos grupos de células. Los diversos estudios microanatómicos desarrollados hasta el momento sugieren que este núcleo es una estructura altamente especializada para la comunicación interna (Moore, 1983; Van Den Pol, 1980; Van Den Pol y Powley, 1979.).

Otro aspecto de particular relevancia, es el hecho de que el NSQ es una estructura bilateral. En estos sistemas, cada oscilador es capaz de generar una ritmicidad circádica, además de mostrar diferencias entre las fuerzas de acoplamiento entre ellos. (Barrera-Mena, 1978; Block, 1981; Fleissner, 1982). En algunos de estos organismos se ha demostrado que si se altera el acoplamiento entre los osciladores se pueden inducir alteraciones en los patrones conductuales (en *Aplysia*, la desincronización espontánea entre los osciladores de la retina se asocia generalmente con alteraciones en la conducta locomotora del organismo).

De estos y otros estudios (Page, 1978; Page, 1981) se sugiere que los dos osciladores bilaterales normalmente interactúan para producir la conducta manifiesta normal.

En los mamíferos, el sistema circádico se encuentra igualmente distribuido de manera bilateral, y recíprocamente innervado por fibras que decusan cruzando la línea media provenientes del tracto infundibular, del quiasma óptico y por la decusación supraóptica (Pickard, 1979; Stephan et al, 1981). Lo anterior propone un sistema para el acoplamiento inter-NSQ.

Se han practicado lesiones unilaterales del NSQ y se ha encontrado que similarmente a cuando se lesiona parcialmente al NSQ, estas no afectan la coherencia

circádica (Davis y Gorski, 1984; Donalson y Stephan 1982), sin embargo, ambos tipos de lesiones producen alteraciones en el periodo del libre corrimiento, generalmente acortándolo (Davis y Gorski, 1984; Ebihara y Kawamura, 1981). Por otro lado, las lesiones unilaterales en hamsters que muestran actividad de partición, eliminan uno de los componentes, reinstalando el ritmo unimodal (Pickard y Turek, 1982; 1983). Estos resultados sugieren que la partición en el hamster involucra una disociación entre múltiples osciladores.

Diversos estudios (Albers et al, 1981; Eastman y Rechtschaffen, 1983; Ganshirt et al, 1984; Honma e Hiroshige, 1978; Kass et al, 1980; Pittendrigh 1974; Terman y Terman, 1980; Wever, 1980) han revelado que la luz, a pesar de ser el principal agente sincronizador en los diferentes sistemas circádicos conocidos, de manera constante puede estar induciendo considerable stress en la relaciones de acoplamiento en el sistema circádico. Además, promueve la ocurrencia de los fenómenos de desincronización interna y de partición, resultando en una aparente pérdida total de la ritmicidad circádica. Rusak (1977, 1979a y b, 1982) ha demostrado que diferentes componentes ultradianos pueden ser encontrados en el estado arrítmico producidos por lesiones del NSQ en hamster. Algunos de estos animales, además, mostraron patrones reminiscentes de partición con 2 o mas componentes, mientras que otros mostraron patrones que recordaban a la arrítmicidad inducida por la luz constante. Se llevo a la conclusión de que tanto las lesiones del NSQ como la luz constante producían alteraciones similares en el acoplamiento.

Experimentos previos, realizados en el laboratorio (Zhang y Aguilar Roblero, 1995) en animales mantenidos en condiciones tanto de obscuridad continua como de luz-obscuridad 12:12 indican que el ritmo de actividad multiunitaria *in vitro* puede ser separada en 2 patrones, cada uno de los cuales corresponde a un lado particular del NSQ (Figura 24). La fluctuación circádica del lado derecho del NSQ muestra una actividad bimodal en ambas condiciones (LD-OO) sin ningún cambio de fase entre ambas



situaciones experimentales mostrando solamente un ligero decremento en la amplitud de LD a OO. En contraste, la curva obtenida bajo condiciones de obscuridad continua muestra un patrón básicamente unimodal con un desfaseamiento de la actividad máxima de 2 horas del grupo de 12:12 al de obscuridad continua. Por lo tanto es posible que el NSQ esté compuesto de al menos un par de osciladores autosostenidos e independientes (Figura 21).

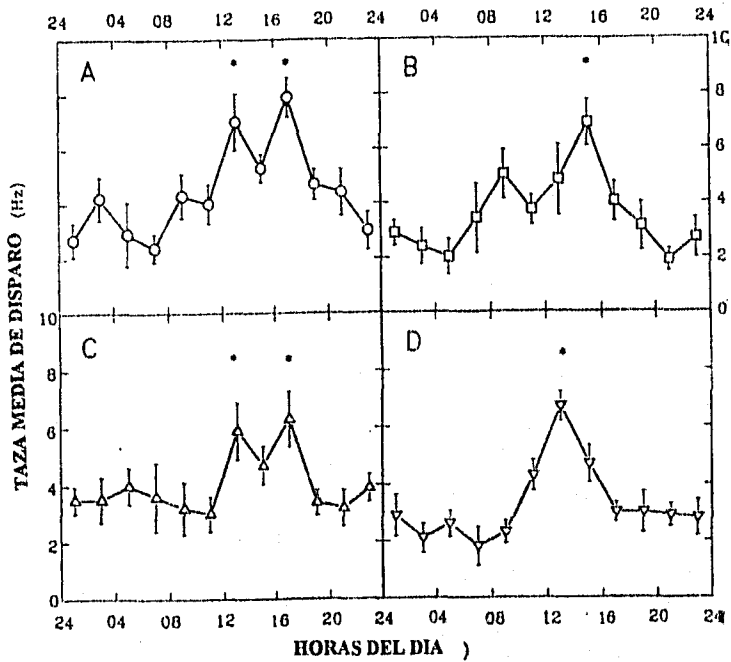


Fig. 21 Frecuencia media de disparo de células del NSQ registradas del lado derecho A) y del izquierdo B), de sujetos mantenidos en condiciones de iluminación luz-obscuridad 12:12. Los paneles inferiores representan la frecuencia media de disparo de células del NSQ de sujetos mantenidos bajo condiciones de obscuridad continua. C) lado derecho, D) lado izquierdo. Las barras representan el error estándar de la media (Fisher  $p < 0.05$ ). Se observa una asimetría funcional en la forma de la curva en aquellos animales mantenidos en obscuridad continua.

Gracias a lo anterior es posible proponer que debido a las propiedades de la luz sobre los sistemas circádicos, bajo condiciones de luz constante intensa, se induce la desincronización interna entre los posibles osciladores, permitiendo así su manifestación independiente.

Si existen varios osciladores en el interior del NSQ se esperaría que cada uno de ellos manifieste su propio periodo de actividad, lo cual podría ser evaluado comparando el desfaseamiento entre las curvas promedio de la actividad eléctrica multiunitaria obtenida del registro independiente de cada lado del NSQ.

Este estudio tiene por objetivo indagar, mediante la técnica de registro electrofisiológico de la actividad multiunitaria *in vitro*, la posibilidad de que el NSQ de la rata contenga al menos dos osciladores endógenos (uno en cada lado del núcleo) y, en concreto responder a la siguiente pregunta: ¿Podría considerarse a los núcleos supraquiasmáticos contralaterales como dos unidades oscilatorias independientes?

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Wistar con 140 gramos de peso al inicio del experimento. Estos animales fueron inicialmente sometidos a un período de habituación bajo condiciones de luz-obscuridad 12:12 en una cámara de ambiente controlado durante 2 semanas, con el fin de sincronizar la actividad circádica de todos los animales.

Posteriormente, los sujetos fueron divididos al azar en cuatro grupos con igual número de individuos, colocándolos en cajas de policarbonato transparente tamaño jumbo (Complan. SA.), introducidos en nichos independientes, sin ningún contacto posible entre ellos y sometidos a diferentes periodos (0, 4, 15 y 30 días) de luz brillante continua (> 500 Lx) cuya fuente la constituían 2 tubos para cada caja de luz blanca natural (Phillips Slimlight 39W) colocados a 20 cm. por encima de la tapa de la caja.

El agua y el alimento estuvieron disponibles en todo momento.

Al final de cada periodo de iluminación, un animal, de un grupo particular a la vez, era desnucado y decapitado rápidamente, el cerebro era removido y sumergido rápidamente en una solución Krebs de aislamiento (NaCl 120 mM, KCl 4.20 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8.0 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.30 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.50 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24.8 mM, Glucosa 10.0 mM, pH 7.4) burbujeada con carbógeno (95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>, Infra. SA) y mantenida a 4°C. Una vez en esta solución, y utilizando al quiasma óptico como referencia, se extraía un bloque de aproximadamente 0.5 mm<sup>3</sup> que contenía al hipotálamo. Este cubo era cortado con la ayuda de un rebanador mecánico (Mc Illwain Instruments) en rebanadas de 400 μm de grosor. Las rebanadas obtenidas, eran revisadas visualmente, y aquellas que contenían al Núcleo Supraquiasmático, eran separadas y trasladadas a una cámara de registro, por inmersión, donde el tejido era mantenido en una solución Krebs de perfusión (NaCl 124

mM, MgSO<sub>4</sub> 1.3 mM, Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 26 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.24 mM, KCl 5.0 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.4 mM, Glucosa 10.0 mM, pH 7.4) burbujeadada con carbógeno y mantenida a 30°C.

La temperatura en la cámara de registro era monitoreada en todo momento mediante un termómetro digital (Cole Parmer tipo K). El pH de la solución también fue monitoreado constantemente mediante un microelectrodo de flujo continuo (Cole Parmer, modelo ORP 5938) ubicado en la manguera de provisión poco antes de desembocar en la poza de registro.

Todo el proceso desde la decapitación no duraba más de 5 minutos.

Una vez fija en la cámara de registro, la rebanada permanecía intacta un periodo mínimo de 60 minutos.

El registro de actividad multiunitaria se realizó mediante un par de microelectrodos de vidrio de borosilicato (Corning 7740, GT12, resistencia entre 2.0 y 2.5 megaohms) llenos con una solución de citrato de sodio 2M en agua bidestilada saturada de azul de pontamina, utilizado únicamente como referencia visual. Los electrodos se sujetaron a un par de micromanipuladores hidráulicos Narishige (WR-30) de tres ejes.

La señal biológica era transmitida a los amplificadores, uno por cada canal (Grass, modelo PS5), mediante un par de sondas de alta impedancia (Grass, modelo HIP511RA) conectadas, cada una a un alambre de plata clorurado introducido en cada uno de los electrodos. La señal captada de esta manera era observada en un osciloscopio digital (Tektronik modelo H5000) al tiempo que era transmitida a un convertidor analógico digital (Vetter-Sony modelo 400) para ser grabada en cintas convencionales de video VHS (Sony ES 120-HG).

Se consideró a cada porción del NSQ como entidades individuales, así que un electrodo registraba la actividad multiunitaria de solamente una mitad del NSQ.

Al iniciar el experimento, los microelectrodos eran colocados a poca distancia de la superficie de la rebanada, una vez ahí, uno a la vez era descendido lentamente hasta penetrar en el tejido y encontrar actividad eléctrica biológica estable, esto se repetía con el microelectrodo contralateral. Cuando se mantenía la actividad bioeléctrica estable en ambos canales, se procuraba no cambiar de posición a lo largo de la vida de la rebanada, de tal forma que siempre se estaba registrando la misma región del NSQ durante un experimento.

En caso de que la actividad biológica se perdiera en alguno de los canales de registro se hacía descender el microelectrodo correspondiente en tractos de 50  $\mu\text{m}$  hasta encontrar potenciales estables. Si se llegaba al límite inferior del tejido, se iniciaba otro trayecto en otra porción del mismo núcleo.

El período de registro ocupaba los primeros 2 minutos de cada media hora durante al menos 6 horas por rebanada y hasta completar por lo menos un ciclo de actividad circádica (24 horas).

No se sacrificó ningún animal entre las 04:00 y las 10:00 horas ni entre las 18:00 y 22:00 Hrs.

El análisis de los datos se realizó mediante el programa Experimental Work Bench V4.0 (Brain Wave Data Systems INC).

Previo a la captura de los datos contenidos en las cintas de video, estas fueron examinadas visualmente con el fin de identificar, tanto las marcas de tiempo colocadas al principio y al fin de cada fracción de 2 minutos de grabación, como la posible existencia de actividad eléctrica de origen no biológico que pudiera enmascarar la actividad biológica.

Durante el examen visual de las cintas de video se pudo observar que si bien la actividad basal era en general estable, en ocasiones se presentaba con mayor amplitud dependiendo de la hora del día. Debido a que el buffer de memoria del programa de análisis se saturaba con esta actividad, la ventana de análisis se fijó arbitrariamente en 3

veces el nivel superior de la actividad basal mínima, tanto para el límite inferior como para el superior.

La captura de los datos se realizó en una computadora personal (Acer 486) de manera continua, de tal forma que fuera posible graficar todos los datos de cada experimento de 24 horas en 2 tipos de histogramas de frecuencia contra tiempo, uno total y uno para cada subperíodo de 2 minutos. Cada uno incluyó la estadística básica.

Para obtener un promedio de la actividad a lo largo de cada hora, el total de eventos registrados en los primeros 2 minutos de cada hora era sumado con los presentados 30 minutos después. Posteriormente el total más alto fue considerado como el 100% de la actividad en el día y los datos restantes eran normalizados con respecto a esa cifra. Los datos resultantes fueron graficados contra el tiempo circádico.

La comparación entre los períodos de actividad de cada par de núcleos se realizó mediante un análisis de correlación cruzada. Con el fin de determinar la posible existencia de una desincronización interna se compararon los días de tratamiento contra el índice de correlación.

## RESULTADOS

Se obtuvieron los registros de la actividad multiunitaria de 20 sujetos, de los cuales fue posible analizar 11. En la figura 1 se observan dos ejemplos de registros sin procesar obtenidos de alguna de las rebanadas empleadas en este estudio

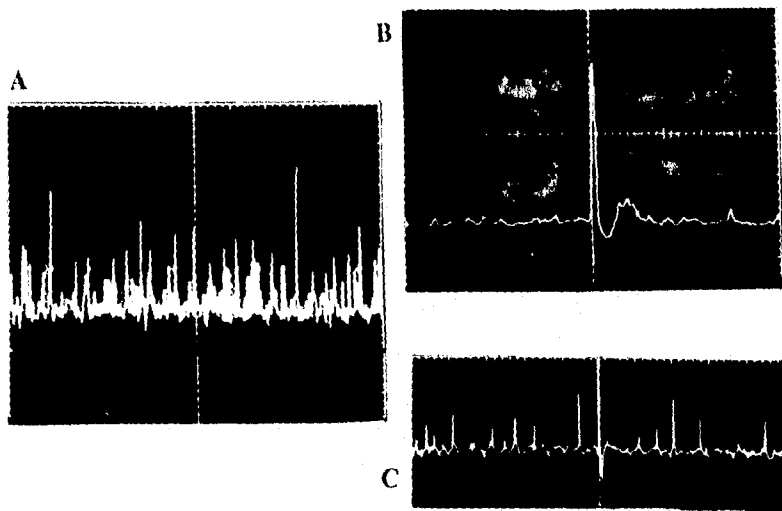


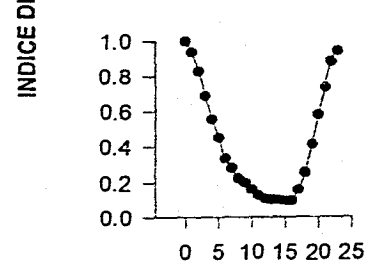
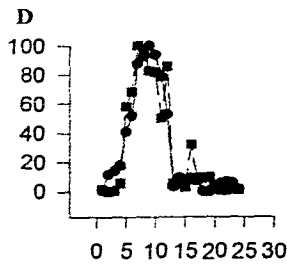
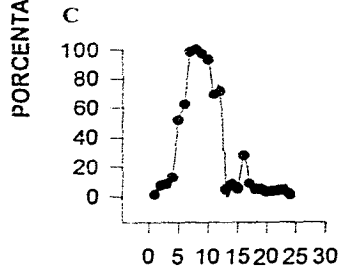
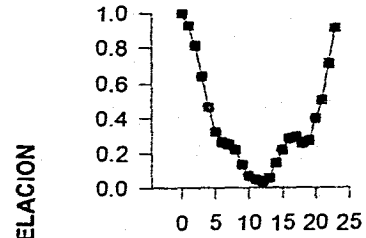
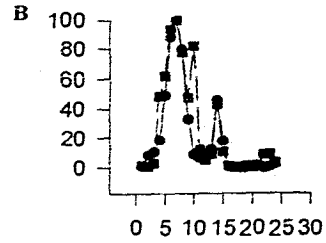
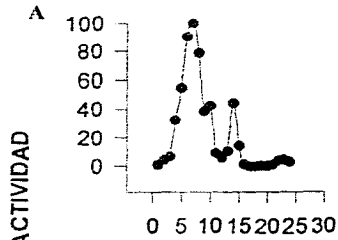
Fig.1. Fotografías obtenidas del osciloscopio con barridos a diferentes velocidades de algunos de los trazos obtenidos de los registros multiunitarios. A) Con asteriscos se indican algunos de los potenciales de acción. Las líneas blancas indicadas con flechas muestran los límites superior e inferior de la ventana de selección. Aquellas unidades que no alcanzaron este umbral no fueron consideradas para el análisis. B) Se muestra una porción del trazo anterior con algunos de los potenciales de acción a mayor velocidad. C) Esta fotografía muestra un único potencial de acción que traspasa el umbral de selección.

**CONTROL**

**PROMEDIO**

**DERECHO + IZQUIERDO**

**CORRELACION**



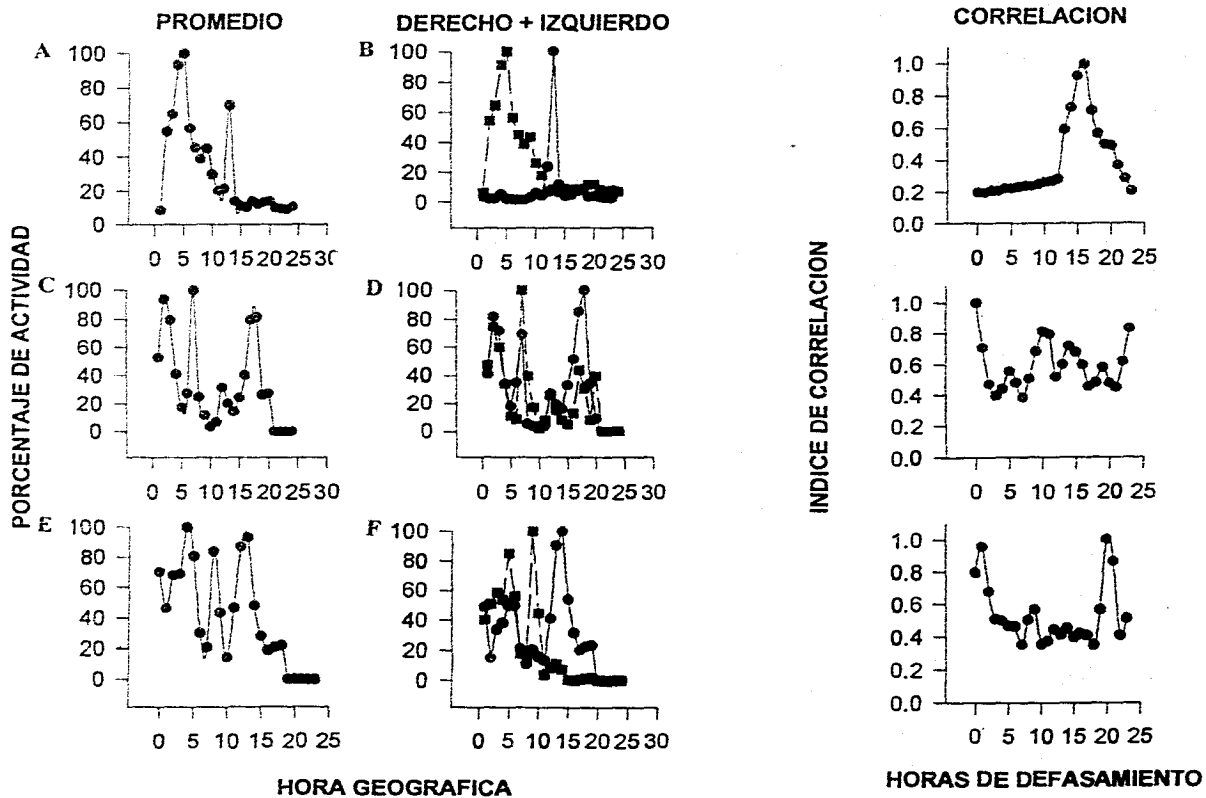
**HORA GEOGRAFICA**

**HORAS DE DEFASAMIENTO**

**GRAFICA 1**

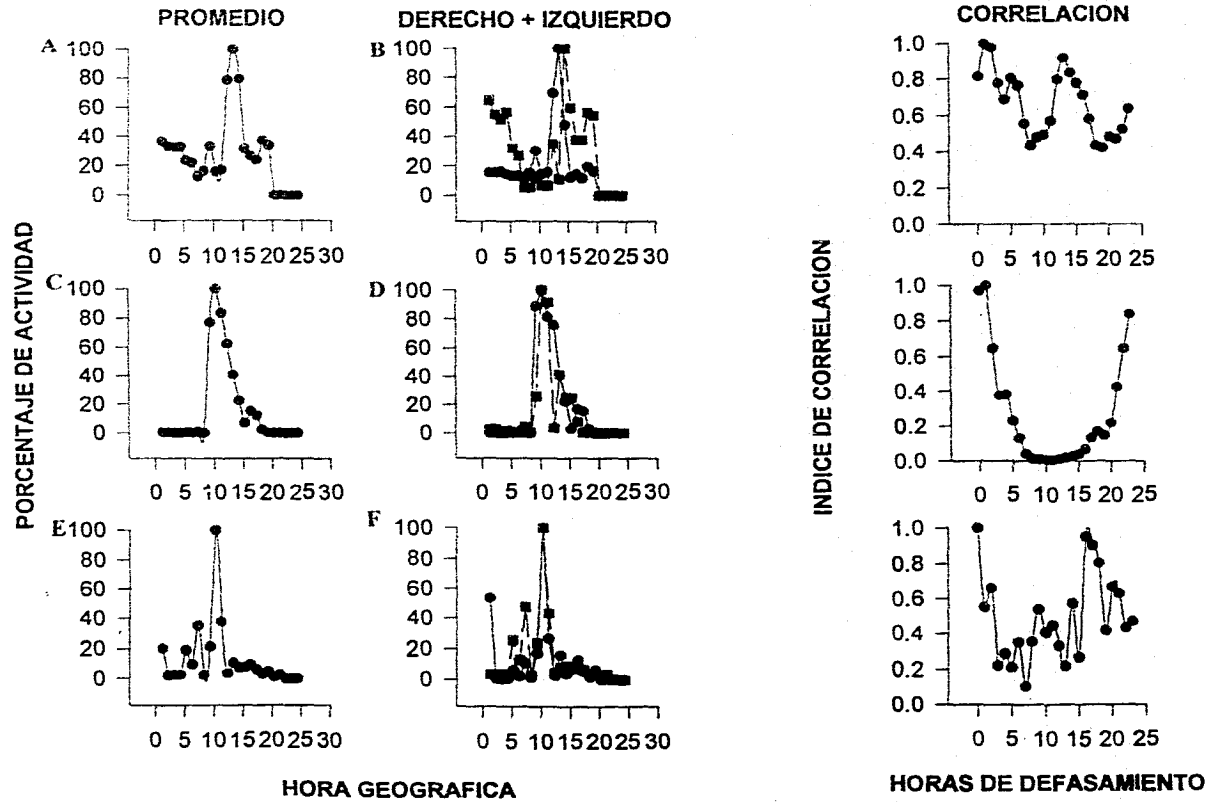


### 4 DIAS EN LUZ CONTINUA



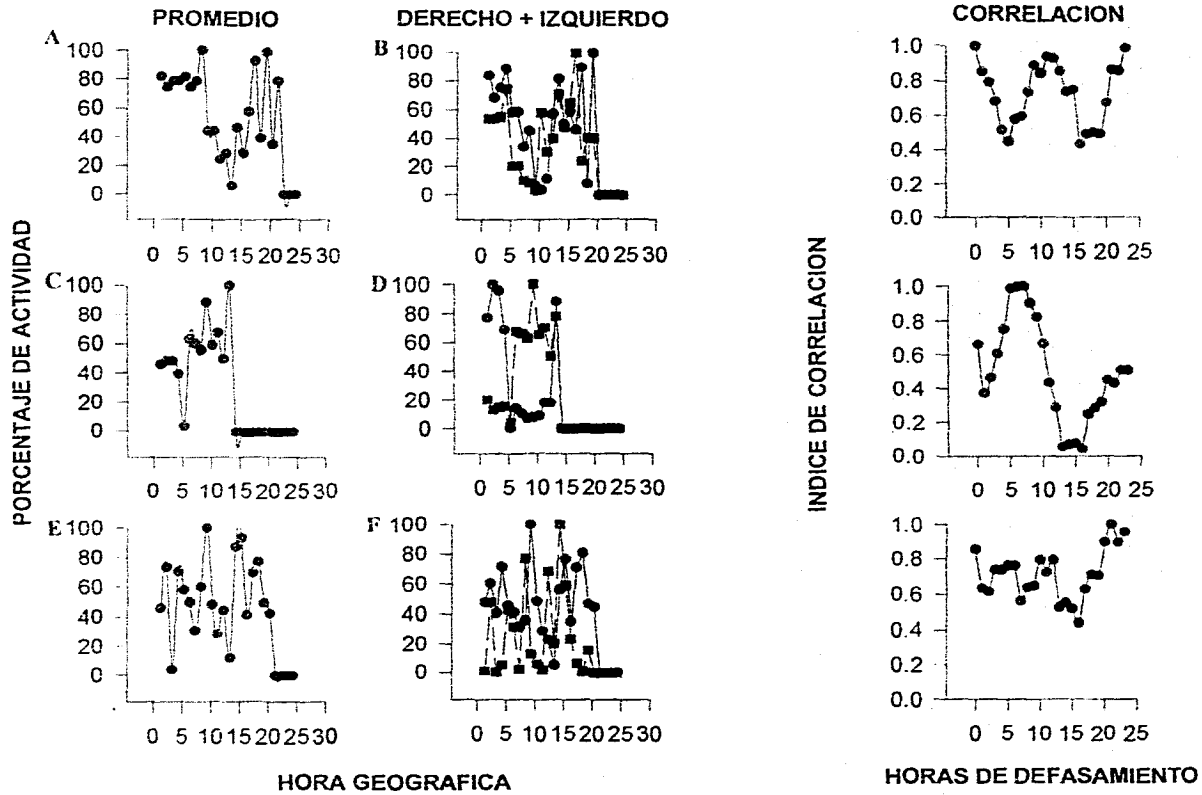
GRAFICA 2

15 DIAS EN LUZ CONTINUA



GRAFICA 3

30 DIAS EN LUZ CONTINUA



GRAFICA 4

#### **Grupo control (LO 12:12)**

En estos animales ( $n=4$ , se muestran 2 ejemplos) el punto de máxima actividad se observó aproximadamente a las 7 de la mañana, presentando un segundo periodo, aunque de menor intensidad, entre las 14 y 17 horas. (Gráfica 1, paneles A y C). En los paneles B y D, se muestran los trazos superpuestos de las gráficas independientes para cada lado del NSQ, representados en círculos el lado derecho y en cuadros el izquierdo. Se puede apreciar que ambos lados del NSQ presentan la misma fase y periodo. En lo que respecta al índice de correlación, en ambos casos la máxima correlación se obtuvo en desfase cero y la mínima cuando se desplazaron las gráficas 12 horas.

#### **Grupo mantenido 4 días en luz continua**

Estos animales ( $n=4$ ) mostraron irregularidad en sus patrones promedio de actividad eléctrica (Gráfica 2, Paneles A, C y E). Observándose en los paneles B, D y F, se muestran los trazos superpuestos de las gráficas obtenidas independientemente para cada lado del NSQ. En círculos está representada la actividad del lado derecho mientras que en cuadros la correspondiente al lado izquierdo. En este grupo de gráficas se puede observar que uno de los componentes (el derecho) muestra un avance de fase con respecto al lado contralateral que varía entre 4 y 16 horas. En dos de los tres ejemplos mostrados aquí (paneles D y F) se puede observar un incremento en el número de componentes en la curva de actividad eléctrica correspondiente al lado izquierdo del NSQ. Sin embargo, en

los promedios obtenidos para ambos lados del NSQ en todos los animales, se puede observar la constancia de un pico principal de actividad circadica, con un periodo de actividad maxima localizado aproximadamente a las 7 horas.

En las graficas donde se muestran los indices de correlacion entre las curvas de actividad para ambos lados del NSQ, se observa en dos casos (los correspondientes a los grupos de graficas C y E) una maxima correlacion a las 12 horas de defasamiento. En el primer ejemplo (Grupo de graficas A) se aprecia un corrimiento de fase de aproximadamente 8 horas. Se mantiene la periodicidad circadica.

#### **Grupo mantenido 15 días en luz continua**

En estos animales,  $n=4$  (se muestran tres ejemplos, grafica 3), el punto maximo del promedio de actividad de ambos nucleos se desplazo entre 4 y 7 horas. En dos graficas (paneles A y E) se aprecia algun incremento en el numero de componentes de pequeña intensidad. La resultante de la comparacion entre los trazos obtenidos para ambos lados del NSQ, muestra un par de curvas que coinciden tanto en amplitud como en fase y periodo manteniendo su característica circadica.

Con respecto a los indices de correlacion, en general, estos presentan una maxima correlacion a defasamiento cero y otro componente con alta correlacion entre las 15 y 24 horas. Asi mismo, existe una tendencia a presentar un incremento en el numero de componentes.

#### Grupo mantenido 30 días en luz continua

En estos animales (n=4, grafica 4, tres ejemplos) se observa en los paneles correspondientes al promedio de las curvas obtenidas para ambos lados del NSQ (paneles A, C y D) que no existe ningun componente principal en la actividad electrica, sino que una tendencia a presentar multiples picos. De la comparacion entre las graficas independientes para cada lado del NSQ (circulos, lado derecho; cuadros, lado izquierdo) se observa la presencia de componentes multiples para ambas regiones del NSQ, cada una presentando periodos y fases diferentes. En los indices de correlacion se mantiene la tendencia observada en el grupo anteriormente descrito, a presentar multiples componentes, evidenciados por la presencia de puntos de correlacion maxima a diferentes tiempos de defasamiento, manteniendo sin embargo, la frecuencia circadica.

En la tabla uno se resumen los resultados obtenidos del promedio de los indices de correlacion por sujeto en defasamiento cero, asi como de la duracion del periodo de oscilacion en horas y del numero de componentes observados en cada caso. Se incluyen los resultados de una prueba de autocorrelacion. Se puede observar que los indices de correlacion cruzada entre ambos lados del NSQ solo disminuyen en promedio solo 0.2 por ciento despues de 30 dias de exposicion a luz continua brillante, tanto la duracion del periodo de los principales picos de actividad, mantienen una frecuencia de 24 horas.

TABLA UNO

GRUPO	CORRELACION EN DESFASAMIENTO CERO	AUTOCORRELACION MAXIMA EN DESFASAMIENTO CERO	PERIODO	NUMERO DE COMPONENTES
CONTROL	1, 1	1	24	1
4 DIAS EN LUZ CONTINUA	0,2, 0,8, 1, 0,8	1	17,5 ± 5	1,75 ± 0,5
15 DIAS EN LUZ CONTINUA	1, 1, 0,8, 0,3	1	16,5 ± 5	2 ± 0,8
30 DIAS EN LUZ CONTINUA	0,7, 1, 0,8, 0,8	1	9 ± 3,5	3 ± 1

## DISCUSIÓN

La investigación sobre ritmos circádicos se ha desarrollado desde, básicamente, dos puntos de vista: 1) el análisis de los problemas formales relacionados con la conducta de sincronización y los ritmos circádicos en corrimiento espontáneo, y 2) el análisis de los mecanismos fisiológicos y de los componentes anatómicos que participan en la generación y transmisión de la manifestación rítmica. El presente trabajo se ubica en el segundo punto.

Probablemente, el concepto que más influencia ha tenido en los últimos años en este campo es aquel que propone como hipótesis general la existencia en los metazoarios de un sistema oscilatorio distribuido, cuyos generadores podrían encontrarse acoplados tanto, jerárquica, como no jerárquicamente (Moore-Ede et al, 1982., Pittendrigh, 1974., Pittendrigh y Daan, 1976). De esta manera, la respuesta conductual circádica sería resultado de la interacción entre varios subsistemas oscilatorios normalmente acoplados. Dada esta condición, surgen 2 posibilidades para explicar los resultados:

1) La aparición de componentes ultradianos pudiera resultar de la ruptura del mecanismo de acoplamiento entre diversos subsistemas no circádicos normalmente acoplados entre sí. Asumiendo así, un sistema no jerárquico.

2) La existencia de un sistema circádico constituido por uno o algunos pocos osciladores circádicos independientes que se encuentran acoplados entre sí y que imponen su período a otras estructuras con capacidad oscilatoria distribuidas por todo el organismo, asumiendo de esta manera una organización jerárquica. El o los osciladores



jerárquicamente superiores comprendidos en este modelo, llevarían a cabo la función de marcapasos, mientras que aquellos, jerárquicamente inferiores, se encargarían de proporcionar la información temporal a los sistemas efectores de los ritmos manifiestos. Así, la aparición de componentes ultradianos pudiera ser resultado del desacoplamiento entre los diversos osciladores, cuyo periodo corre libremente.

En este estudio, la evaluación de las características básicas de los ritmos obtenidos en los animales control son consistentes con los reportados en la bibliografía (Green y Gillette, 1982., Groos y Hendrick 1982., Shibata et al 1982). Los animales muestran un ritmo con una frecuencia de 24 horas en la tasa media de disparo de la actividad eléctrica multiunitaria de las neuronas del NSQ mantenidas *in vitro*, para ambos lados del NSQ. La persistencia de la ritmicidad en la actividad eléctrica registrada en las rebanadas de tejido hipotalámico indican la naturaleza endógena del fenómeno rítmico. Las curvas de actividad circádica obtenidas para cada lado del NSQ, reflejan dos patrones de actividad claramente distinguibles que corresponden en amplitud y forma a los observados por Zhang y Aguilar Roblero (1995). Esta asimetría no puede ser considerada como resultado de un artefacto debido a la técnica de muestreo porque: 1) ambos lados del núcleo supraquiasmático fueron registrados simultánea e independiente y, 2) la asimetría fue consistente en todos los animales control. Lo anterior permite sugerir que el comportamiento de ambos núcleos es diferente aun bajo condiciones de sincronización, aunque el significado de esto se desconoce.

Como se puede observar de la comparación entre los índices de correlación cruzada en desfase cero, no existen diferencias significativas entre los diferentes

grupos experimentales, sin embargo, llama la atención el hecho de que no se conserva un solo periodo con múltiples componentes desfasados entre si, lo que significaría una severa desincronización interna entre distintos marcapasos con periodos de oscilación diferentes (inferiores) a 24 horas, sino que el periodo de oscilación disminuye y el numero de componentes aumenta, aunque se conserva la frecuencia circádica. Lo que podría estar reflejando el desacoplamiento entre ritmos circadicos generados de manera independiente en cada lado del NSQ y que al sobreponerse en el registro generan ritmos ultradianos aparentes.

A pesar de que se desconoce el mecanismo por el cual la luz continua brillante induce arritmicidad, en aves (el modelo mas estudiado al respecto) se ha sugerido que bajo estas condiciones, el marcapasos deja de oscilar (Ganshirt et al, 1984, Weber, 1980). Sin embargo, en este estado se ha encontrado un incremento estadísticamente significativo en la presencia de frecuencias ultradianas. Esta manifestación se interpreta como el reflejo de la disociación de un numero relativamente grande de osciladores circádicos, mas que una atenuación de ellos (Binkley 1980., Eastman y Rechtshaffen, 1983a y b; Pittendrigh, 1974; Terman y Terman, 1980).

Al respecto existen diversos estudios sobre el desarrollo del NSQ que indican que las células que lo forman se originan como osciladores independientes que posteriormente se acoplan entre sí mediante conexiones que forman una red que emite una señal circadica. Moore y Benistein (1989) y Reppert y Schwartz (1984) encontraron que la ontogenia de los ritmos metabólicos y electrofisiológicos del NSQ es diferente. Las variaciones entre el día y la noche en la captura de 2-Desoxiglucosa pueden ser detectadas prenatalmente

varios días antes de la llegada de las conexiones de la retina y antes del desarrollo de las conexiones intra y extra NSQ, mientras que la ritmicidad eléctrica aparece poco después de las dos primeras semanas de vida postnatal, al tiempo que algunos de los ritmos manifiestos tanto fisiológicos como conductuales se manifiestan. Por su parte, Schwartz y colaboradores (1987) encontraron que la tetrodotoxina (TTX) produce una interrupción en la expresión de la conducta circádica y una falla en la sincronización durante su infusión en el NSQ. Sin embargo, cuando se suspende la administración de la toxina, la expresión circádica se reincide, manteniendo el mismo periodo que presentaba antes de la infusión, como si esta no fuese sido aplicada. Lo anterior podría indicar que la oscilación comandada por el NSQ es independiente de las vías aferentes y eferentes y que la generación de las oscilaciones no depende de los potenciales de acción.

Aunque en la rata normal no se ha descrito ningún fenómeno similar a la partición (en la rata desnutrida si existe) esta diferencia podría deberse a patrones anatómicos y de conectividad interna del mismo NSQ, mientras que en la rata el núcleo esta conformado por dos unidades bilaterales claramente identificables, en el hámster conforman un solo núcleo.

Por otro lado, en diversas especies de organismos se ha demostrado que la pinealectomía produce alteraciones en el periodo de animales mantenidos bajo condiciones de libre corrimiento, induciendo partición o incluso pérdida de la ritmicidad (Cassone, 1988). En aves, tanto la lesión de la pineal como del NSQ pueden romper la actividad de los ritmos circádicos, mientras que en hámsters disminuyen el tiempo de exposición a la luz brillante necesario para inducir arritmicidad o partición (Casonne, 1988). Por su parte,

Wever (1979) observo que la pinealectomia repite los efectos observados por la exposición a luz continua brillante proponiendo que la pineal puede estar involucrada en la transducción de la información fótica en mamíferos. Estos resultados conllevan a la hipótesis de que la pineal actúa probablemente mediante su secreción, la melatonina, promoviendo el acoplamiento entre los múltiples osciladores subordinados (Cassone, 1988).

## **CONCLUSIONES**

1. Existen al menos un par de osciladores contenidos en el NSQ de la rata.
2. La luz continua brillante induce desacoplamiento entre los diversos osciladores contenidos en el NSQ de la rata.
3. El grado de desacoplamiento se incrementa conforme aumenta el tiempo de exposicion a la luz continua brillante
4. Es probable que cada parte del NSQ presente su propio periodo de oscilacion en libre corrimiento.

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilar-Roblero, R., Drucker-Colin, R., Moore, R.Y. (1992) The effects of fetal neural grafts on the circadian rhythms of water drinking in SCN-lesioned adult rats. Results of behavioural and morphological studies. *Cronobiology international* (en prensa).
- Aguilar-Roblero, R., Shibata, S., Speh, J.C., Drucker-Colin, R., Moore, R.Y. (1992) Morphological and functional development of the suprachiasmatic nucleus in foetal hypothalamic grafts. *Brain Res.* 580:288
- Aguilar-Roblero, R., Drucker-Colin, R. (1987) The role of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of circadian rhythms in mammals. *Boletín de estudios medicos y biológicos*, 35:35
- Arechiga, H., Fuentes, P., Barrera, B. Circadian Rhythms of responsiveness in the visual system of the crayfish, *Neurobiology of Invertebrates*, J. Salanki, ed. Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, 1973. 403-421
- Arechiga, H., Huberman, A., Naylor, E. (1974) Hormonal modulation of circadian neural activity in *Carcinus maens*, *Proc. R. Soc. London Ser B* 187, 299-313
- Arechiga, H., Naylor, E. Endogenous factors in the control of rhythmicity in decapod crustaceans, en *Biological Rhythms in the marine environment*. P. de Coursey ed. Universidad de Carolina del Norte, 1976. 1-16.
- Arechiga, H. (1983) Mecanismos de integracion de los ritmos circadianos. *Ciencia*, 34: 141

- Barry, J. (1976) Characterisation and topography of LH-RH neurones in the rabbit. *Neuroscience Letters*, 2, 201.
- Audesirk G., F. Strumwasser (1975) Circadian rhythm of neurone R15 of *aplysia californiaca*: *in vivo* photoentrainment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 72, 2408.
- Albers, H.E., Ferris, C.F. (1984) Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neuroscience Lett.* 50:163
- Beiswanger C.N., J.W. Jacket. (1975) *In vitro* test for a circadian rhythm in the electrical activity of a single neurone in *aplysia californica*. *J. Comp. Physiol.* 103, 19.
- Block, G.D., Roberts, M.H. (1981) Circadian pacemaker in the *Bursatella* eye: properties of the rhythm and its effect on locomotion behaviour. *J. Comp. Neurol.* 142:403
- Block, G.D. Wallace, S.F. (1982) Localisation of a circadian pacemaker in the eye of a mollusc, *Bulla*. *Science* 217: 155
- Block, G.D., McMahon, D. G., Wallace, S.F., Friesen, W.O. (1984) Cellular analysis of the *Bulla* ocular circadian pacemaker system I A model for retinal organisation, *J. Comp. Comp. Physiol.* 155:365
- Block, G.D., McMahon, D.G. (1984) Cellular analysis of the *Bulla* ocular circadian pacemaker III: Localisation of the circadian pacemaker, *J.Comp. Physiol.* 155:387
- Brown, F.A. Physiological rhythms, en: *Physiology of crustacean*, Waterman, TH. ed. Academic Press, NY 1961. II, 401-430
- Buijts, R.M., Swaab, D.F., Dogterom, J., Van Leeuwen, F.W. (1978) . Intra and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tiss. Res*, 186, 423.

- Bunning, E. (1963) Die Physiologische Uhr Berlin Springer-Verlag.
- Card, J.P., Moore, R.Y. (1982) Ventral lateral geniculate Nucleus efferent to the rat suprachiasmatic nucleus efferent exhibit avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 206, 390.
- Card, J.P., Moore, R.Y. (1989) Organisation of lateral geniculo-hypothalamic connection of the rat. *J. Comp. Neurol.* 284:135
- Cassone, V.M., Chesworth, M.J., Armstrong, S.M. (1986a) Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injections of melatonin. *J. Biol. Rhythms* 1: 219
- Cassone, V.M., Chesworth, M.J., Armstrong, S.M. (1986b) Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends upon the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. *Physiol. Behav.* 36:1111
- Cassone, V.M., Spel, J.C., Card, J.P., Moore, R.Y. (1988) Comparative anatomy of the mammalian suprachiasmatic nucleus, *J. Biol. Rhythms* 3:71
- Card, J.P., Brecha, N., Karten, H.J., Moore, R.Y. (1981) Immunocytochemical localisation of vasoactive intestinal polypeptide containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat, *J. Neurosci.* 1: 1289
- Card, J.P., Moore, R.Y. (1982) Ventral lateral geniculate nucleus efferent to the rat suprachiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polypeptide immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 206:390



- Daikoku, S., Hisano, S., Maki, Y. (1982) Immunohistochemical demonstration of LHRH- neurones in young rat hypothalamus light and electron microscopy. *Arch. Histol. Jpn.* 45, 69.
- De Vries, G.J., Buijs, R.M., Swaab, D.F. (1981) Ontogeny of the vasopressinergic neurones of the suprachiasmatic nucleus and their extrahypothalamic projections in the rat brain-presence of a sex difference in the lateral septum. *B. Res.* 218, 67.
- Drucker-Colin, R., Aguilar-Roblero, R., Garcia-Hernandez, F., Fernandez-Cancino, F., Bermudez-Rattoni, F. (1984) Foetal suprachiasmatic nucleus transplants: Diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res.* 311:353
- Eskin, A., Harcombe, E. (1977) Eye of *Navanax*: Optic activity, circadian rhythm and morphology. *Comp. Biochem. Physiol.* 57A: 443
- Finley, J.C.W., Maderdrut, J.L., Petrsz, P. (1981) The immunocytochemical localisation of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 198, 541.
- Fuch, J.L., Moore, R.Y. (1980) Development of the circadian rhythmicity and light responsiveness in the rat suprachiasmatic nucleus: a study using the 2-deoxyglucose method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:1204
- Fuxe, K. (1965) Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.* 64: Suppl.247, 37
- Gamlin, P.D., Reiner, A., Karten, H.J. (1982) Substance P- containing neurones of the avian suprachiasmatic nucleus project directly to the nucleus of Edinger-Westphal. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 79, 3891.

ESTRATÉGIA DE PESQUISA  
EM NEUROCIÊNCIAS

- Gillette, M.U. (1986) The suprachiasmatic nuclei circadian phase-shifts induced at the time of hypothalamic slice preparation are preserved *in vitro*. Brain Res. 379, 176.
- Glotzbach, S.F., C.M. Cornett and H.C. Heller. (1987) Activity of suprachiasmatic and hypothalamic neurones during sleep and wakefulness in the rat. Brain Res. 419, 279
- Green, D.J. and R. Gillette. (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. Brain Res. 245, 198.
- Gross, G.A. and J. Hendriks. (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded *in vitro*. Neurosci. Lett. 34, 283.
- Gross, G.A. and R. Mason. (1978) Maintained discharge of rat suprachiasmatic neurones at different adaptation levels. Neurosci. Lett. 8, 59.
- Guldner, F.H. (1978) Synapses of optic nerve afferentes in the rat suprachiasmatic nucleus. Cell Tiss. Res. 194, 17.
- Guldner, F.H. (1983) Numbers of neurones and astroglial cells in the suprachiasmatic nucleus of female and male rats. Exp. Brain Res. 50, 373
- Guldner, F.H. and S.C. Phillips. (1985) Structural plasticity of developing optic synapses under different lighting conditions. Neurosci. Lett. 55, 225.
- Groos, G.A., Hendricks, J. (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded *in vitro*, Neurosci. Lett. 34:283
- Harrington, M.E., Nance, D.M., Rusak, B. (1985) Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. Brain Res. Bull. 15:465
- Harrington, M.E., Rusak, B. (1988) Ablation of the geniculo-Hypothalamic tract alters circadian activity rhythms of hamsters housed under constant light. Physiol. Behav. 42:183

- Halberg, F. (1960) Temporal co-ordination of physiologic function. Cold, Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 289.
- Hickey, T.L., Spear, P.D. (1976) Retinogeniculated projections in hooded and albino rats. Exp. Brain. Res. 24:523
- Inouye, S.T., Kawamura, H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic island containing the suprachiasmatic nucleus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5962
- Jacklet, J.W. (1969) Circadian rhythm of optic nerve impulse recorded in darkness from the isolated eye of *Aplysia*. Science, 164, 562
- Jacklet, J.W. (1981) Circadian timing by endogenous oscillators in the nervous system toward cellular mechanisms. Biol Bull. 160: 199
- Johnson, R.F., Moore, R.Y. Morin, L.P. (1988b) Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. Brain Res. 460: 297
- Johnson, R.F. Morin, L.P., Moore, R.Y. (1988a) Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. Brain Res. 462:301
- Johnson, R.F., McKnight, S.L. (1989) Eukariotic transcriptional regulatory proteins. Annu. Rev. Biochem. 58:799
- Kawata, M., Sano, Y. (1982) Immunohistochemical identification of the oxytocin and vasopressin neurones in the hypothalamus of the monkey (*Macaca fuscata*). Anat. Embriol. 165, 151.
- Kawato, M., Susuki, R. (1980) Two coupled neural oscillator as a model of circadian pacemaker, J. Theoretical Biol. 86:547

- Krisch, B. (1978) Hypothalamic and Extrahypothalamic distribution of somatostatin-immunoreactive elements in the rat brain. *Cell. Tiss. Res.* 195, 499.
- Kucera, P., Favrod, P. (1979) Suprachiasmatic nucleus projection to mesencephalic central gray in the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*). *Neuroscience*, 4, 349.
- Kiss, J., Leranthe, C., Halasz, B. (1984) Serotonergic endings on VIP- neurones in the suprachiasmatic nucleus and on ACTH-neurones in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. A combination of high resolution autoradiography and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience Letters*, 44, 119.
- Mantyh, P.W., Kemp, J.A. (1983) The distribution of putative neurotransmitters in the lateral geniculate nucleus of the rat. *Brain Res.* 228:344
- McCormack, C.E. and C.R. Sontag. (1980) Entrainment by red light of running activity and ovulation rhythms of rat. *Am. J. Physiol.* 239 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 8), R450.
- McMahon, D.G., Block, G.D. (1982) Organized photoreceptor layer is not required for light response in three opisthobranch eyes. *Neuroscience*, abst. 8:33
- McMahon, D.G., Wallace, S.F., Block, G.D. (1984) Cellular analysis of the *Bulla* ocular circadian pacemaker system II: Neurophysiological basis of circadian rhythmicity. *J. Comp. Physiol.* 155:379
- Meijer, J.H., G.A. Gross and B. Rusak. (1986) Luminance coding in a circadian pacemaker: the suprachiasmatic nucleus of the rat and the hamster. *Brain Res.* 382, 109.
- Meijer, J.H., Rietvelt, W. (1989) The neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.* 69:671

- Miller, J.D., D.M. Murakami, and C.A. Fuller. (1987) The response of suprachiasmatic neurones of the rat hypothalamus to photic and non photic stimuli. *J. Neurosci.* 7, 978
- Lenn, N. J., Beebe, J.B., Moore, R.Y. (1977) Postnatal development of the suprachiasmatic hypothalamic nucleus of the rat. *Cell Tiss. Res.* 178, 463.
- Lehman, M., Silver, R., Gladstone, W.R., Kahn, R.M., Gibson, M., Bittman, E.L. (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplants. *J. Neurosci.* 7: 1626
- Luiten, P.G.M., Room, P. (1980) Interrelations between lateral, dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei in the rat. An HRP study. *B. Res.* 190, 321.
- Mai, J.K., Junger, E. (1977) Quantitative autoradiographic light- and electron microscopic studies on the retinohypothalamic connections in the rat. *Cell. Tiss. Res.* 183, 221.
- Mason, C.A., Lincoln, D.W. (1976) Visualisation of the retino-hypothalamic projection in the rat by cobalt precipitation. *Cell Tiss. Res.* 168, 117.
- Mason, C.A., Sparrow, W., Lincoln, D.W. (1977) Structural features of the retinohypothalamic projection in the rat during normal development. *B. Res.* 132, 141.
- Maibach, R.C., Siegel, A. (1977) Efferent connections of the suprachiasmatic nucleus. *B. Res.* 122, 33.
- Menaker, M. J., Takahashi, J., Eskin, A. (1978) The physiology of circadian pacemakers. *Ann. Rev. Physiol.* 40:501
- Millhouse, O.E. (1977) Optic chiasm collaterals afferent to the suprachiasmatic nucleus. *B. Res.* 137, 351.

- Moore, R.Y., Lenn, N.J. (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *J Comp. Neurol.* 146, 1.
- Moore, R.Y. (1973) Retinohypothalamic projection in mammals a comparative study. *B. Res.* 49, 403.
- Moore, R.Y. (1983) Organisation and function of a central nervous circadian oscillator the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.* 42, 2783.
- Moore, R.Y., M.C., Sulzman, F.M., Fuller, C.A. *The clocks that time us.* Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass. (1982)
- 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
- Moore, R. Y. (1983) Organisation and function of a central nervous system circadian oscillator, the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.* 42:2783
- Nishino, H., K. Koizumi. (1977) Responses of neurones in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus putative transmitters. *Brain. Res.* 120, 167.
- Nishiitsusuji, Uwo, J., Pittendrigh, C.S. (1967) Central nervous system control of circadian rhythmicity in the cockroach. II. The pathway of light signals that entrain the rhythm, *Z. Vergl. Physiol.* 58, 14-46.
- Page, T.L., Larimer, J.L. (1975) Neural control of circadian rhythms in the crayfish. II The ERG amplitude rhythm, *J. Comp. Neurol.* 97, 81-96
- Pickard, G.E. (1980) morphological characteristics of retinal ganglion cells projecting to the suprachiasmatic nucleus: a horseradish peroxidase study. *B. Res.* 183, 458.

- Pickard, G.E. (1982) The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *J. Comp. Neurol.* 211, 65.
- Pickard, G.E. (1985) Bifurcating axons of the retinal ganglion cells terminate in the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci. Lett* 55:211
- Pittendrigh, C. S. (1960) Circadian rhythms and the circadian organisation of living systems. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 25. 159.
- 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, 333-335.
- Pittendrigh, C.S. (1981) Circadian systems: Entrainment, en: J. Aschoff, ed. *Handbook of behavioural neurobiology: biological rhythms*, vol. 4, Plenum press, NY 95-124.
- Pfaff, D., Keiner, M. (1973) Atlas of estradiol- concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J.Comp. Neurol.* 151, 121.
- Reppert, S.M., Schwartz, W.J. (1984) The suprachiasmatic nuclei of the foetal rat: characterisation of a functional circadian clock using 2-deoxyglucose, *J. Neurosci.* 4: 1677
- Ribak, C.E., Peters, A. (1975) An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *B. Res.* 92, 341.
- Rosenwasser, A.M., R.J. Pelchat, N.T. Adler (1984) Memory for feeding time: possible dependence on coupled circadian oscillators. *Physiol. Behav.* 32, 25.

- 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
- Rusak, B., Zucker, I (1979) Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.* 59, 449.
- Rusak, B., Groos, G.A. (1982) Suprachiasmatic stimulation phase shift rodent circadian rhythms. *Science* 215, 1407.
- Schwartz, W.J., Davidsen, L.C., Smith, C.B. (1980) *in vivo* metabolic activity of a putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *J.Comp. Neurol.* 189, 157.
- Schwartz, W.J., Groos, R.A., Morton, M.T. (1987) The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin resistant circadian pacemaker. *Proc. Natl. Acad. USA.* 84: 1694
- Shibata, S., Y. Oomura, H. Kita, K. Hattori. (1982) Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic slice. *Brain. Res.* 247, 154.
- Shibata, S., Y. Oomura, S.Y. Liou, S. Ueki. (1984) Electrophysiological studies of the development of suprachiasmatic neuronal activity in rat hypothalamic slice preparations. *Dev. Brain Res.* 13, 29.
- Shibata, S., A. Shiratsuchi, S.Y. Liou, S. Ueki. (1984) The role of calcium ions in circadian rhythms of suprachiasmatic nucleus neurone activity in the rat hypothalamic slice. *Neurosci. Lett.* 52, 181.
- Shibata, S.A., Moore, R.Y. (1988) Electrical and metabolic activity of suprachiasmatic neurones in hamster hypothalamic slices. *Brain Res.* 438:374



- Stephan, F. H., Zucker, I. (1972) Circadian rhythms in drinking behaviour and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1586
- Stephan, F.H., Berkley, K.J., Moss, R.L. (1981). Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus, J.Anat. 105, 439.
- Strumwasser, F. (1965) The demonstration and manipulation of a circadian rhythm in a single neurone. En: Circadian Clocks. Ed. J. Aschoff Amsterdam, Holanda. 442.
- Strumwasser, F. (1973) Neuronal and humoral factors in the temporal organisation of behavior. Physiologist. 16, 9.
- Swanson, L.W., Cowan, W.M. (1975) The efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus, neuroscience, 6, 2625.
- Swanson, L.W., Cowan, W.M., Jones, E.G. (1975) An autoradiographic study of the efferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the albino rat and the cat. J. Comp. Neurol. 156, 143.
- 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
- Takahashi, JS, Zatz, M. (1982) Regulation of circadian rhythmicity. Science Wash. DC. 217: 1104-1111.
- Thomson, A.M. (1984) Slow regular discharge in suprachiasmatic neurones is calcium dependent in slices of rat brain. Neurosci. Lett. 13, 761.
- Thomson, A.M., D.C. West, I.G. Vlachonikolis. (1984) Regular firing patterns of suprachiasmatic neurones maintained *in vitro*. Neurosci. Lett. 52, 329.

- Truman, J.W. Circadian rhythmicity in an insect brain, in The neurosciences Research Program, FO Schmitt (MIT press, Cambridge, 1974) 525-529
- Truman, J.W. Organisation and hormonal release of stereotyped motor programs from the CNS of an insect, Comparative aspects of neuroendocrine control of behaviour, C. Valverde y H. Arechiga, eds. S Karger, Basel, 1980. 1-13
- Vandesande, F., Dierickx, K., De Mey, J. (1975) Identification of the vasopressin-neurophysin producing neurones of the rat suprachiasmatic nuclei. Cell. Tiss. Res. 156, 377
- Van den Pol, A.N. (1980). The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat: intrinsic anatomy. J. Comp. Neurol. 191, 661.
- Van den Pol, A. N., Powley, T. (1979) A fine grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of drinking and feeding. Brain Res. 160: 307
- Van den Pol, A., Tsujimoto, K.L. (1985) Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. Neurosci. 15:1049
- Van Leeuwen. F.W., Swaab, D.F., De Raay, C. (1978) Immuno-electron-microscopic localisation to the nucleus of the solitary tract in rat. J.Comp. Neurol. 224, 1.
- Watts, A.G., Swanson, L.W., Sanchez-Watts, G. (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. studies using anterograde transport of *Phaseolus* leucoagglutinin in the rat. J. Comp. Neurol. 258:204

- Winfree, A.T. (1967) Biological rhythms and the behaviour of populations of coupled oscillators, *J Theoret. Biol.* 16:15
- Zhang, L., Aguilar-Roblero, R. (1992) A new pattern of neuronal firing in the suprachiasmatic nucleus *in vitro* and a possible mechanism which induces rhythmicity. *Bol. Estud. Med. Biol Mex.* 40:31
- Zimmerman, N.H., Menaker, M. (1975) Neural Connections of sparrow pineal: role in circadian control Activity, *Science.* 190:477