



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA

CONVERGENCIA FUNCIONAL DE LAS AFERENTES  
ORIGINADAS EN LA RETINA Y LA HOJUJELA  
INTERGENICULADA SOBRE NEURONAS VISUALES  
DEL NUCLEO SUPRAQUIASMATICO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(AREA FISIOLOGIA) PRESENTA EL BILOGO:  
DANIEL GRANADOS FUENTES

Facultad de Medicina

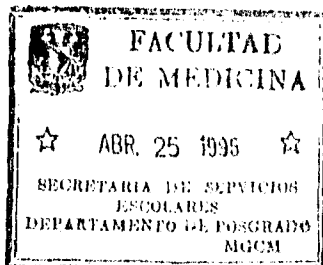


MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

DIRECTORES DE TESIS:

DR. RAUL AGUILAR ROBLERO  
DR. JUAN ANTONIO ROIG VARELA



1996

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.

La presente tesis se llevó a cabo en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo el apoyo de los proyectos de DGAPA IN202891 e IN200794 y de la beca de maestría otorgada por el CONACyT

**DEDICO ESTA TESIS A MI ESPOSA TERESA Y A MI HIJO  
OSCAR POR ESTAR PRESENTES EN MI VIDA.**

**TAMBIEN LA DEDICO A MIS PADRES Y HERMANOS POR  
TODO EL APOYO RECIBIDO DURANTE TODO ESTE TIEMPO.**

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Raúl Aguilar Roblero que además de tutor es también amigo, lo cual permite que el trabajo del laboratorio no sea aburrido.

Agradezco al Dr. Juan Antonio Roig que me brindó toda su experiencia y conocimiento para llevar a cabo el trabajo experimental y que además me brindó su amistad.

Al comité tutorial formado por el Dr. René Drucker Colín, Dr. Juan Antonio Roig, Dra. Limei Zhang, Dr. Rafael Salín y Dr. Raúl Aguilar por sus comentarios y aportaciones al trabajo.

A todos mis compañeros y amigos dentro y fuera del laboratorio.

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCION .....   | 1  |
| 1.1 LOS RITMOS CIRCADICOS .....   | 3  |
| 1.1.1 ASPECTOS HISTORICOS.....  | 3  |
| 1.1.2 CONCEPTOS BASICOS PARA EL ESTUDIO<br>DE LOS RITMOS CIRCADICOS.....        | 7  |
| 1.1.3 CARACTER ENDOGENO DE LOS RITMOS<br>CIRCADICOS.....                        | 10 |
| 1.2 BASES FISIOLÓGICAS DE LOS RITMOS CIRCADICOS.....                            | 11 |
| 1.2.1 COMPONENTES Y FUNCIONES DEL<br>SISTEMA CIRCADICO.....                     | 11 |
| 1.3 EL SISTEMA CIRCADICO EN MAMIFEROS.....                                      | 20 |
| 1.3.1 EL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO COMO<br>RELOJ ENDOGENO.....                    | 20 |
| 1.3.2 ANATOMIA DEL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO.....                                 | 23 |
| 1.3.3 NEUROTRANSMISORES PRESENTES EN EL NUCLEO<br>SUPRAQUIASMÁTICO.....         | 24 |
| 1.3.4 ASPECTOS FUNCIONALES DEL<br>NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO.....                  | 29 |
| 1.3.5 AFERENTES AL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO.....                                 | 33 |
| 1.3.6 OTRAS AFERENTES AL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO.....                           | 47 |
| 1.3.7 INTERACCIONES DE LAS AFERENTES DENTRO<br>DEL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO..... | 48 |
| 1.3.8 EFERENTES DEL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO.....                                | 49 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....  | 53 |
| 3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....   | 56 |
| 4. METODO.....  | 57 |
| 5. RESULTADOS.....  | 63 |
| 6. DISCUSION.....   | 75 |
| 7. CONCLUSIONES.....  | 85 |
| 8. REFERENCIAS.....   | 86 |

## **1. INTRODUCCION**

Los seres vivos se encuentran bajo la influencia continua de diversos estímulos, los cuales son capaces de modificar de una u otra manera una gran variedad de conductas expresadas por éstos. En muchas ocasiones los estímulos ambientales se presentan en forma cíclica, es decir que tienen una determinada frecuencia de aparición. Al igual que para otros estímulos, los organismos deben de estar adaptados a la ciclicidad ambiental y responder eficazmente a sus cambios, para así poder explotar al máximo los ecosistemas en donde se desarrollan.

La adaptación de los seres vivos a su ambiente a través del proceso evolutivo en lo que se refiere a conductas rítmicas circádicas, ha consistido en establecer una relación entre el tiempo interno que gobierna las actividades cíclicas producidas por los organismos y el tiempo externo (Pittendrigh, 1993).

Pittendrigh (1993) ha postulado que en sus orígenes, los organismos se sometieron al orden temporal impuesto por el ambiente y conforme éstos evolucionaron, dicho orden fue asimilado a la información genética dando origen a su propia organización temporal. Así las semejanzas entre los ciclos ambientales y los biológicos se explicarían porque inicialmente los últimos dependían de los primeros, mientras que sus diferencias se deberían a las características particulares de los organismos para adaptarse al ambiente.

La frecuencia de aparición de los ritmos en la naturaleza cubre un amplio espectro de unidades de tiempo, así se pueden encontrar ritmos de fracciones de segundo (por ejemplo, los ritmos electroencefalográficos), aquellos que se repiten una vez en varios segundos (el ritmo respiratorio), o los que se repiten una vez al año (el ritmo de hibernación) (Fig. 1).

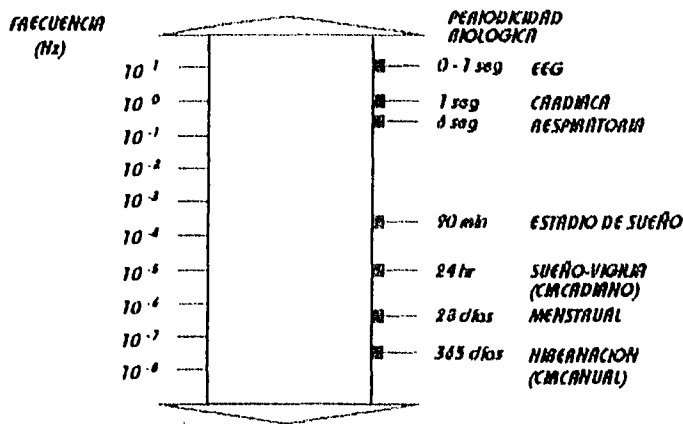


Figura 1. Espectro de frecuencias de algunos ritmos biológicos. En este esquema se muestran algunos ejemplos de ritmos biológicos con su respectiva frecuencia de aparición, dichas frecuencias pueden encontrarse desde los milisegundos hasta en algunos casos los años.

En la mayoría de los seres vivos los ritmos más evidentes son aquellos que oscilan con una frecuencia que corresponde con la de una periodicidad ambiental. Por ejemplo, muchas especies que habitan la línea costera exhiben



ritmos con una frecuencia derivada del cambio en las mareas que resulta del efecto combinado de los movimientos regulares de la luna alrededor de la Tierra y de la Tierra alrededor del Sol. De forma similar la alternancia anual de verano e invierno en la temperatura, la cual resulta del movimiento de la Tierra alrededor del Sol, da lugar a una conducta reproductiva anual tanto en plantas como en algunos animales (Minors y Waterhouse, 1981). Para la mayoría de organismos vivos el cambio ambiental más evidente es el que resulta de la rotación de la Tierra sobre su propio eje, lo cual produce la alternancia entre el día y la noche y que presenta una oscilación con una periodicidad de 24 hr. Los hábitos de actividad-reposo, ingesta de comida, de agua, etc., son regidos por la alternancia del día y la noche y no es sorprendente por lo tanto que algunos procesos fisiológicos, bioquímicos y psicológicos también oscilen con una frecuencia similar a la del día solar (Moore-Ede, 1982, Meijer y Rietveld, 1989, Minors y Waterhouse, 1981) (Fig. 2).

## **1.1 LOS RITMOS CIRCÁDICOS**

### **1.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS**

Nuestro principal interés de estudio son los ritmos circádicos (del latín *circa*-cerca y *dies*-día). El término circádico fue introducido por Halberg en 1959 para describir los ciclos de aproximadamente 24 hr que son generados en forma endógena por los organismos (Moore-Ede, 1982).

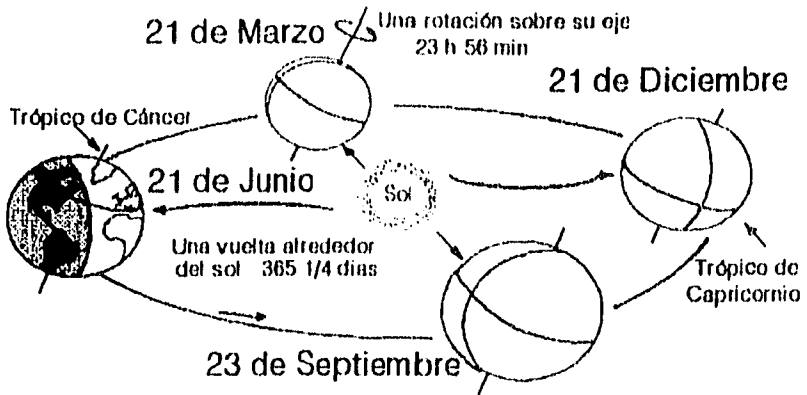


Figura 2. Origen de las oscilaciones biológicas . En este esquema se representa el movimiento de la Tierra alrededor de su propio eje (rotación) que da origen a la alternancia del día y la noche la cual se lleva a cabo en un periodo de 24 hr y que sincroniza la aparición de las conductas circádicas de los organismos. Así mismo el movimiento de traslación de la Tierra produce la aparición de oscilaciones ambientales de frecuencias distintas a las de 24 hr que también van a afectar directamente a los organismos.

Históricamente se tiene un conocimiento de los ciclos circádicos desde la época de Alejandro Magno, sin embargo el concepto de ritmo circádico como una propiedad del organismo vivo se inicia formalmente con el trabajo de Jean Jacques d'Ortois de Mairan en 1729, quien publicó en L' *Academie Royale des Sciences* de Paris un estudio de los movimientos de las hojas y pedicelos de una planta helio trópica "sensible" (*Mimosa pudica*). Esta planta abría sus hojas y pedicelos durante el día y los cerraba durante la noche. Cuando de Marian colocó la planta en un lugar donde la luz solar no la podía alcanzar y la

temperatura se mantenía constante, la planta aún abría sus hojas durante el día y las cerraba por la noche. Este fue el primer experimento que demostró la persistencia de los ritmos circádicos en ausencia de señales ambientales externas y dio margen a pensar en la existencia de un reloj endógeno circádico que regulaba el tiempo interno en los organismos. Duhamel confirmó estas observaciones en 1758 en estudios llevados a cabo en cuevas.

Más tarde Augustin de Candolle, Dutrochet, Sachs y Hofmeister también se interesaron en el movimiento periódico de las hojas. A partir de sus experimentos concluyeron que dichos movimientos eran causados por la existencia de un ritmo diurno inherente a la planta y que eran controlados por la alternancia de la luz y la oscuridad. Son importantes los experimentos que realizó de Candolle (1832) con leguminosas bajo luz u oscuridad continua o bajo ciclos de L-O alterados experimentalmente, de los cuales concluyó que había una tendencia inherente de las plantas a mostrar movimientos periódicos y que además las hojas se abrían una hora o dos más temprano cada día, es decir que desplegaban una periodicidad de 22 a 23 hr. Esta fue la primer demostración de que el reloj circádico podía "correr libremente" con su propio periodo endógeno ( $\tau$ ) cuando no había un ciclo externo sincronizador (ciclo L-O) de 24 hr.

El fisiólogo vegetal Wilhelm Pfeffer quien fue el primero que introdujo métodos fisicoquímicos en el campo de la Fisiología vegetal, originalmente dudo de los resultados obtenidos por los otros autores. En 1873 el sugirió que dichos

datos habían resultado de experimentos en donde había fugas de luz en los cuartos oscuros donde se llevaban a cabo las mediciones. Por el año de 1875 sus propias observaciones despejaron sus dudas y corroboró la persistencia del ritmo del movimiento de las hojas en oscuridad constante. Sin embargo, él interpretó sus resultados no como una periodicidad propia de la planta si no mas bien como un post-efecto por la exposición previa a un ciclo L-O. Darwin en su libro *On the Power of Movement in Plants* (1880) indicó que él creía que la periodicidad diurna del movimiento de las hojas era una propiedad inherente de las plantas.

En 1940, Johnson llevó a cabo experimentos en ratones para ver si éstos podían correr en ruedas de ejercicio manteniendo un patrón temporal en presencia ó ausencia de un ciclo de iluminación. Él reportó que los ratones parecían tener un reloj para controlar el patrón conductual visto en sus animales. Más tarde, Colin S. Pittendrigh de sus experimentos propuso que todos los organismos tenían relojes y lo más importante era que éstos relojes regulaban los ritmos conductuales vistos diariamente. En gran parte ésta idea contribuyó mucho mas a la comprensión del concepto de reloj biológico, pues dio un punto de vista nuevo para su estudio (Moore-Ede, 1982).

Estos y muchos otros experimentos dieron las bases para estudiar los mecanismos de la regulación temporal en los organismos y han permitido hasta nuestros días que se continúe con la investigación del fenómeno de la ritmicidad circádica y sus mecanismos de control.

### **1.1.2 CONCEPTOS BASICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS RITMOS CIRCADICOS**

Independientemente de la frecuencia de aparición de una oscilación, se puede considerar a ésta como un cambio cíclico medible que exhibe una forma de onda y un periodo relativamente constante. Una de las características más importantes de una oscilación es el periodo, el cual es el intervalo entre dos puntos de referencia idénticos (Minors y Waterhouse, 1981, 1988).

En una oscilación circádica ó ritmo circádico es importante conocer todas las características de la misma tales como la forma de onda, el periodo, la media ó nivel, la amplitud, la fase y el ángulo de fase. La forma de la ritmicidad puede ser vista como la desviación de la forma respecto a una onda sinusoidal pura.

El periodo ó longitud del ciclo es la duración de un ciclo completo comúnmente expresado en unidades de tiempo y es el recíproco de la frecuencia. Los ritmos con un periodo menor a las 24 hr son conocidos como ultradianos y aquellos con un periodo mayor se conocen como infradianos.

La media ó nivel de un ritmo es el valor promedio de una variable continua sobre un ciclo sencillo. Cuando el ritmo es descrito por el ajuste de una curva cosenoidal, el nivel de la mejor curva de ajuste se conoce como mesor. Solo cuando los datos son medidos equidistantemente y sobre un número integral de ciclos, el mesor será igual a la media aritmética.

mesor. Solo cuando los datos son medidos equidistantemente y sobre un número integral de ciclos, el mesor será igual a la media aritmética.

La amplitud se define como la diferencia entre el valor máximo y mínimo de la oscilación, sin embargo cuando estamos hablando de señales sinusoidales o coseinodales se define como la mitad de la diferencia entre la cresta y el valle o como la diferencia entre la media y el valor máximo.

La fase tiene varios significados, en su definición más estricta se refiere al estado instantáneo de un ritmo dentro de un ciclo, representado por el valor de la variable en un tiempo dado (por ejemplo el máximo ó el mínimo). La fase de un ritmo nos dice la posición del ritmo en el tiempo (en el caso especial donde los datos son representados por un ajuste a una curva cosenoidal la fase del ritmo puede ser definida por la acrofase la cual es el tiempo del máximo de la función coseno). Un cambio de fase implica que al mismo tiempo un ritmo retiene su forma original pero es desplazado a lo largo del eje del tiempo. Un cambio de fase puede ser descrito como un avance ó un retraso de fase para describir la dirección del desplazamiento en el tiempo. Así, un avance significa que cada punto del ritmo ocurre un poco más temprano, mientras que el retraso significa que cada punto del ritmo ocurrió más tarde de lo esperado. Si un sistema oscilante contiene más de una variable, una segunda característica importante es la relación de fase entre variables (Minors y Waterhouse, 1981, 1988).

Estas son algunas de las características más notables en el estudio de los ritmos circádicos que nos ayudaran a comprender mejor las ideas que se plantearán más adelante ( ver Fig. 3).

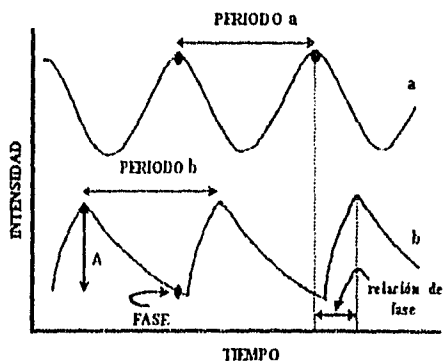


Figura 3. Características de una oscilación. Todas las oscilaciones presentan una serie de características que son importantes para su estudio. En este caso se representan dos oscilaciones diferentes con una cierta intensidad ó amplitud (A), y con un periodo propio. En la oscilación b se indica una fase cualquiera y se marca también la relación de fase (en unidades de tiempo) que se establece entre dos fases distintas pertenecientes a diferentes oscilaciones. Para una mayor explicación de los términos utilizados, ver el texto.

### 1.1.3 CARACTER ENDOGENO DE LOS RITMOS CIRCADICOS

Anteriormente se mencionó que los ritmos circádicos son producidos por los propios organismos, es decir que son producidos endógenamente, dicho concepto es fundamental para considerar a los ritmos circádicos como tales y se refiere al hecho de que en condiciones típicas de aislamiento de señales ambientales temporales la ritmicidad biológica persiste, aunque con frecuencia presenta una ligera pero significativa variación en el valor de  $\tau$  que la caracteriza. A dicho fenómeno se le denomina **corrimiento espontáneo** (free running) y demuestra la naturaleza endógena de los ritmos circadianos (Pittendrigh, y Dann, 1976; Aschoff, 1990; Moore-Ede, 1982)

Entre los factores ambientales que modifican  $\tau$  destaca su dependencia de las condiciones de iluminación ambiental. En forma general los principales efectos se resumen en las reglas de Aschoff (Tabla 1). De acuerdo con las dos primeras, en la mayoría de las especies diurnas, como invertebrados, peces, reptiles y aves, se observa el acortamiento de  $\tau$  conforme la intensidad de la luz aumenta, mientras que lo opuesto se observa en especies nocturnas. En el caso de los mamíferos tanto las especies diurnas y nocturnas presentan un alargamiento en  $\tau$  en respuesta al aumento en la intensidad de iluminación. Por otra parte, la exposición de organismos de diversas especies a la luz continua brillante resulta en la desorganización progresiva de la ritmicidad, que puede conducir a patrones arrítmicos de conducta ó bien a la descomposición de la



ritmicidad circádica en elementos ultradianos (Aschoff, 1990; Moore-Ede, 1982).

| Tipo de animal | Primera  | Segunda   | Tercera  | Cuarta  |
|----------------|--|---|--|---|
| ILUMINACION    | Incremento en la intensidad de la luz.         | Incremento en la intensidad de la luz.  | Oscuridad continua                                     | Luz continua  |
| DIURNO         | El periodo en oscilación espontánea disminuye. | El índice de actividad (alfa) e inactividad (rho) aumenta. Se incrementa el nivel de actividad. | El periodo en oscilación espontánea es mayor de 24 hr. | ....  |
| NOCTURNO       | El periodo en oscilación espontánea aumenta.   | El índice alfa rho disminuye. Se decremenla el nivel de actividad.                              | El periodo en oscilación espontánea es menor de 24 hr. | El periodo en oscilación espontánea es mayor que el exhibido en oscuridad continua. |

Tabla 1. Se describen las cuatro reglas de Aschoff. En el primer renglón se especifica la condición de iluminación a la cual se someten animales de hábitos diurnos ó nocturnos. En el segundo y tercer renglón se describe el efecto sobre el periodo de la conducta estudiada que se produjo como consecuencia de la condición de luz en la cual se colocaron los animales.

## 1.2 BASES FISIOLÓGICAS DE LOS RITMOS CIRCÁDICOS

### 1.2.1 COMPONENTES Y FUNCIONES DEL SISTEMA CIRCÁDICO

La naturaleza endógena de los ritmos circádicos implica la existencia de mecanismos fisiológicos encargados de generar y mantener la organización temporal del organismo, los cuales conforman al denominado **Sistema Circádico** (Pittendrigh, 1993).

Los procesos que regula este sistema son: 1) **CRONOMETRIA**, que se refiere a la generación de las oscilaciones involucradas en la función de reloj biológico; 2) **SINCRONIZACION** de la ritmicidad a los ciclos ambientales; 3) **TRANSMISION** de las oscilaciones a los sistemas efectores que expresan la ritmicidad y 4) **ACOPLAMIENTO** entre los osciladores del organismo para lograr su funcionamiento coordinado.

### **Cronometría**

Un reloj biológico es la parte del sistema circádico que tiene la capacidad de generar una oscilación utilizada por los organismos para medir el tiempo aun en ausencia de entradas cíclicas ambientales (Aschoff,1990). En mamíferos, los núcleos Supraquiasmáticos (NSQ) funcionan como osciladores circádicos. La evidencia que apoya esta afirmación consiste en experimentos de lesión (Moore y Eichler, 1972; Sthephan y Zucker, 1972a y b) de estimulación eléctrica o química del NSQ (Albers y cols.,1984; Miller y cols., 1987; Edgar y cols., 1993) de persistencia de la ritmicidad eléctrica y metabólica del NSQ cuando es aislado del resto del organismo (Inouye y Kawamura, 1979; Groos y Hendriks, 1982; Newman y Hospod, 1986) y; de trasplantes de NSQ fetal a sujetos que son arrítmicos en la conducta motora por la lesión del núcleo supraquiasmático (Drucker-Colin y cols., 1984; Aguilar-Roblero y cols., 1986; Ralph y cols., 1990).

## **Sincronización**

En condiciones naturales el ambiente geofísico presenta diversas variaciones cíclicas que afectan a los organismos, por lo que la ritmicidad biológica no muestra su oscilación espontánea. Esto se manifiesta en formas más notable en el periodo de la ritmicidad biológica y su relación de fase con los ciclos ambientales. A este fenómeno le llamamos sincronización, es decir, la condición en la cual el periodo endógeno y la fase del oscilador se ajustan al periodo y la fase de algún estímulo cíclico externo. Su importancia radica en que permite el ajuste o adecuación del tiempo biológico con el geofísico. De acuerdo con Pittendrigh (1993) la sincronización provee a los relojes biológicos de un mecanismo por el cual son capaces de reconocer la hora local, propiedad sin la cual éstos no tendrían relevancia adaptativa.

Diversos autores han demostrado que una variedad de fenómenos ambientales pueden funcionar como estímulos sincronizadores de los ritmos endógenos, entre los que se encuentran la luz, la temperatura, la disponibilidad de alimento, el sonido y las señales sociales (Minors y Waterhouse, 1981). De las anteriores, las variaciones de iluminación del ciclo día-noche presentan la mayor estabilidad en su periodo y fase, lo que las hace más predecibles, por lo que se consideran como la principal señal de sincronización ambiental, por lo menos en los organismos epigeos (Moore-Ede, 1982; Minors y Waterhouse, 1981).

Debido a la importancia del NSQ como el oscilador circádico en mamíferos, es de suponer que sus conexiones aferentes están involucradas en los procesos de sincronización. Las principales aferentes del núcleo se originan de la retina, la hojuela intergeniculada (HIG), el rafe dorsal y las áreas hipotalámicas adyacentes (Moore y Lenn, 1972; Moore, 1983). Se ha demostrado que algunas de estas vías participan en diversos aspectos de la sincronización al ciclo de luz ambiental, de éste punto se hablará más adelante (Harrington y Rusak, 1986; Pickard y cols., 1987; Johnson y cols., 1988b).

### ***Transmisión de la ritmicidad***

La organización temporal del organismo requiere que la señales internas de referencia temporal que generan los relojes biológicos sean asequibles para el resto del organismo. En organismos superiores los sistemas de comunicación intercelular involucran mecanismos tanto neurales como humorales (Armstrong, 1989; Watts, 1991). En el caso del sistema circádico de los mamíferos, la naturaleza precisa de los procesos de transmisión aun no es bien conocida.

Por una parte, las conexiones neurales del NSQ parecerían suficientes para explicar la gran variedad de ritmos circádicos que parecen depender de la integridad de dicho núcleo. Por otra parte, un sistema de comunicación difuso y a distancia, como el endocrino, podría también participar en el proceso de transmisión de la señal oscilatoria hacia el resto del organismo. Es natural pensar que a cierto nivel de organización, por ejemplo si nos enfocamos en la

ritmicidad circádica de la función glandular, la señal transmitida por una vía neural eferente sería codificada a una señal hormonal (Armstrong, 1989).

En el sistema circádico de invertebrados se ha descrito la participación de mecanismos neuroendócrinos involucrados en la transmisión de la señal de un oscilador circádico a un sistema efector. Probablemente, en mamíferos el sistema eferente mejor caracterizado corresponde al de la secreción de Melatonina por la glándula Pineal (Armstrong, 1989). De ésta hormona se hablará en el siguiente punto.

El análisis que se ha utilizado para estudiar el proceso de la sincronización y el comportamiento de los relojes biológicos en oscilación espontánea es la elaboración de curvas de respuesta de fases (PRC). En una PRC se gráfica en la ordenada la fase del ciclo circádico en la que se presenta un estímulo determinado y en la abcisa la magnitud del cambio de fase observada en el ritmo estudiado como consecuencia del estímulo una vez alcanzado el estado estable. En el hámster en corrimiento libre el comienzo de la actividad se usa como referencia para la fase y se define como tiempo circádico (CT) 12:00. Cuando el ritmo está sincronizado a un ciclo L-O 12:12 la hora circádica cero es el punto del ritmo en donde la luz inicia y puesto que el CT se refiere a la oscilación biológica interna, el CT es solo definida para animales en corrimiento libre (una hora circádica es igual a  $24/\tau$ ) (Menaker, 1969).

La curva de respuesta de fases tiene tres características generales: 1) la zona muerta, que es el lapso en el que no ocurren cambios de fase después de que se aplica el pulso luminoso de prueba durante el día subjetivo; 2) la zona de retrasos de fase que ocurre durante la noche subjetiva temprana y 3) la zona de avances de fase durante la noche subjetiva tardía. El retraso de fase causa un alargamiento transitorio del periodo y el avance de fase causa un acortamiento de éste (Menaker, 1969).

### ***Acoplamiento***

Además del NSQ otras estructuras hipotalámicas, como el núcleo ventromedial y el hipotálamo lateral, han sido propuestos como osciladores circádicos (Inouye, 1983; Kurumiya y Kawamura, 1991). Esto refleja la concepción contemporánea de un sistema de osciladores múltiples, como la base del proceso de cronometría del sistema circádico. Desde los primeros estudios realizados en los años sesentas, se obtuvo evidencia acerca de la presencia de más de un oscilador en el sistema. Para el caso de los mamíferos uno de los fenómenos más sugestivos sobre los osciladores múltiples es el llamado partición o desdoblamiento (splitting) (Aschoff, 1990). Este fenómeno que ha sido observado en reptiles, aves y mamíferos, consiste en que la actividad locomotora, que presenta un solo componente rítmico cuando el sujeto se registra en oscuridad o luz continua tenue o bajo un régimen de luz oscuridad, se disocia en dos componentes rítmicos de diferente periodo

cuando el sujeto se expone a luz continua brillante (Aschoff, 1990). En los humanos, se ha observado que después de ser sometidos a condiciones de oscilación espontánea, sus diferentes ritmos fisiológicos que usualmente se encuentran coordinados, despliegan distintos periodos circádicos y la relación de fase entre los distintos ritmos se pierde (Weber, 1975). Por otro lado, experimentos de lesión evidencian que diferentes ritmos circádicos dependen de distintos marcapasos circádicos (Rosenwasser y Adler, 1986). Por ejemplo: algunos reportes indican que la lesión del NSQ no modifican el ritmo de temperatura corporal (Krieger y cols., 1977); la restricción en la disponibilidad de alimentos induce cambios de fase en diversos ritmos circádicos de ratas mantenidas en un ciclo L-O (Krieger, 1974), este fenómeno no es abolido por lesiones del NSQ (Krieger y cols., 1977). Los esfuerzos encaminados a localizar los osciladores responsables del ritmo de temperatura y la sincronización al alimento han conducido a proponer a las estructuras hipotalámicas mencionadas con anterioridad como osciladores circádicos. Por otra parte se ha sugerido que en el NSQ se encuentra más de un oscilador. Dicha sugerencia se apoya en el hecho de que lesiones unilaterales del NSQ abolen uno de los componentes rítmicos observados en el fenómeno de partición, en hámsters sometidos a ciclos de luz continua (Pickard y Turek, 1982). Estudios en rebanadas mantenidas *in vitro* realizados en nuestro laboratorio, acerca de la actividad eléctrica de cada lado del NSQ, indican un patrón temporal asimétrico entre ambos lados. Dicha asimetría consiste en la forma del perfil de actividad a

lo largo de un ciclo circádico, así como en los cambios de acrofase observados por mantener a los sujetos en oscuridad continua durante 4 días previos a la preparación de la rebanada (Zhang y Aguilar-Roblero, 1995).

Ahora bien, el funcionamiento óptimo en el sistema circádico resulta de la integración de información entre los distintos osciladores en el sistema. Dicha integración se lleva a cabo por un proceso de acoplamiento entre los distintos osciladores del sistema. Donde entendemos por acoplamiento a la capacidad de un oscilador con periodo y fase propia, de ajustar dichos parámetros a los de otros elementos osciladores con los que tiene la capacidad de interactuar (Minors y Waterhouse, 1981, Aschoff, 1990).

Los mecanismos biológicos involucrados en el proceso de acoplamiento son hasta ahora desconocidos. Sin embargo, estos podrían ser similares a los que han sido descritos en el proceso de la sincronización, ya que en ambos casos se modula el periodo y la fase de un oscilador biológico. La diferencia entre acoplamiento y sincronización consiste en que en el último caso un ciclo ambiental interactúa en forma unidireccional con un oscilador biológico, mientras que en el primer caso un oscilador biológico interactúa en forma recíproca con otro oscilador del mismo organismo. Dichas diferencias nos sugieren que, a pesar de la posible similitud en algunos de los mecanismos, los substratos morfológicos sean completamente distintos entre ambos procesos.

Con respecto al posible sustrato morfológico de los procesos de acoplamiento, podemos mencionar a la glándula Pineal como un posible



acoplador interno del sistema circádico (Armstrong, 1983). Se ha reportado que la administración farmacológica de Melatonina, la principal hormona de la Pineal, es capaz de sincronizar ritmos circádicos en corrimiento espontáneo en ratas (Reedman y Cols., 1983), dicho efecto depende de la integridad del NSQ (Cassone y cols. 1986b). Efectos similares se han observado en hámsters previamente lesionados (en el NSQ) y posteriormente transplantados con NSQ fetal (Romero y cols., 1993). Parece claro que la Melatonina actúa directamente sobre el NSQ ya que: 1) la administración durante la noche subjetiva de dicha hormona deprime la actividad metabólica del NSQ (Cassone y cols., 1988); 2) provoca cambios de fase en la actividad eléctrica del NSQ in vitro (Mc Arthur y cols., 1991) y 3) se ha encontrado una alta densidad de receptores a Melatonina en el NSQ de roedores (Vanecek y cols., 1987). Por otra parte, la exposición del roedores nocturnos a luz continua brillante induce no solo el fenómeno de desdoblamiento de los ritmos circádicos, sino también disminución de la síntesis y secreción de la Melatonina. Lo anterior sugiere que la inhibición de la actividad de la Pineal pudiera estar involucrada en el desacoplamiento de los osciladores circádicos inducidos por la luz continua. En este sentido, se ha reportado que la pinealectomía acelera la velocidad de inicio y retarda la estabilización del desdoblamiento en hámsters (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993). También se ha reportado en ratas que la pinealectomía induce la disociación del ritmo de ingestión de agua en múltiples componentes ultradianos en ratas (Cassone, 1992; Yanovski y cols., 1990). Estas

observaciones han llevado a concluir que la Pineal podría funcionar como un integrador de fase en el proceso del acoplamiento (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993).

### **1.3 EL SISTEMA CIRCADICO EN MAMIFEROS**

#### **1.3.1 EL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO COMO RELOJ ENDOGENO**

El sustrato del sistema circádico identificado como reloj biológico en los mamíferos es el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, el cual es la estructura nerviosa encargada de la regulación temporal de algunas conductas rítmicas (Moore-Ede, 1982, Moore, 1983, Meijer y Rietveld, 1989).

En los primeros trabajos de Moore y Eischler (1972) y Stephan y Zucker (1972 a y b) se demostró que tanto el ritmo de liberación de corticoesterona y los ritmos de ingesta de agua y actividad locomotora se perdían por la lesión de NSQ. En general se ha demostrado que las lesiones electrolíticas bilaterales del NSQ eliminan la mayoría de los ritmos circádicos en todas las especies estudiadas (Rusak y Zucker, 1979). La ablación neonatal del NSQ en ratas eliminan de por vida los ritmos de actividad locomotora e ingesta de agua, lo cual sugiere que otras zonas del cerebro no tienen la capacidad de reorganizar y suplir la función que desempeña el NSQ (Mosko y Moore, 1978).

Los estudios de estimulación química y eléctrica demuestran que la manipulación de la actividad de las neuronas del NSQ alteran la expresión de

los ritmos circádicos, causando retrasos o avances de la fase de ritmos en corrimiento espontáneo (Rusak y Groos, 1982; Albers y cols., 1984; Miller y cols., 1987; Edgar y cols., 1993). Estudios *in vivo* de la actividad eléctrica del NSQ, indican la persistencia del ritmo circádico, en ausencia de sus aferencias neuronales por el aislamiento quirúrgico del núcleo. Estas observaciones han sido confirmadas *in vitro* por registros agudos de la actividad eléctrica y metabólica del NSQ en rebanadas de hipotálamo (Inouye y Kawamura, 1979; Green y Guillete, 1982; Groos y Hendriks, 1982; Shibata y cols., 1982, 1984; Newman y Hospod, 1986) y en la secreción de vasopresina en explantes del núcleo, así como registro de la actividad eléctrica de cultivo organotípico a largo plazo de explantes del núcleo (Earnest y Sladek, 1986; Bos y Mirmiran, 1990).

Estudios con transplantes de tejido fetal, demuestran que la implantación del NSQ es capaz de restaurar la ritmicidad perdida después de la ablación del NSQ en ratas y hámsters (Drucker-Colin y cols., 1984; Aguilar-Roblero y cols., 1986). Utilizando hámsters mutantes que expresan un periodo de ritmicidad distinto al de la cepa silvestre se demostró que el periodo de la ritmicidad restaurada depende del tejido transplantado (Ralph y cols., 1990). Finalmente se ha demostrado que el NSQ desarrollado en dichos transplantes, presenta ritmicidad circádica en su actividad eléctrica y metabólica (Aguilar-Roblero y cols., 1992).

A pesar de todas las evidencias presentadas hasta el momento es importante hacer notar que el NSQ en los mamíferos es el único oscilador

autosostenido identificado, sin embargo se considera que no es el único existente. Por ejemplo, hay datos que muestran que la sincronización a la ingesta de alimento persiste aún después de la lesión del NSQ (Krieger y cols. 1977). Se ha sugerido que los núcleos hipotalámicos Ventromedial y Lateral pueden funcionar como osciladores circádicos. Sin embargo, se ha demostrado que la actividad rítmica del primero, aunque es sincronizable por la disponibilidad de alimento, depende del ritmo generado en el NSQ, mientras que el segundo funciona como un oscilador atenuado (Inouye, 1983; Kurumiya y Kawamura, 1991).

Utilizando un abordaje experimental similar al descrito para el NSQ, se han identificado en distintas especies algunas estructuras específicamente relacionadas con la generación de los ritmos circádicos. Entre ellas podemos mencionar: en el caso de los moluscos, el ojo de los nudibranchios (Koumenis y Eskin, 1992) y el pedúnculo óptico y el ganglio supraesofágico de los crustáceos (Aréchiga, 1974, 1983 y 1993); en el caso de los insectos, los lóbulos ópticos y el ganglio cerebroide en lepidópteros, dípteros y dictiópteros (Roberts, 1974; Page, 1982) y en el caso de los vertebrados, la glándula pineal en reptiles, peces y aves (Cassone, 1990; Underwood, 1990).

### **1.3.2 ANATOMIA DEL NUCLEO SUPRAQUIASMATICO**

El supraquiasmático en la rata es una estructura bilateral localizada en el hipotálamo ventral anterior, dorsal al tercio caudal del quiasma óptico, rostral a las comisuras supraópticas y ventrolateral al tercer ventrículo (van den Pol, 1980). En una rata macho adulta un solo NSQ tiene un volumen de 0.13 a 0.16 mm.<sup>3</sup> calculado a partir de secciones seriales del núcleo (Moore, 1983). La dimensión más larga del NSQ es 950  $\mu\text{m}$  en dirección rostrocaudal con un ancho de 425  $\mu\text{m}$  y una altura de 400  $\mu\text{m}$ . El número estimado de células es de aproximadamente 16,000 en la estructura completa sin incluir el número de oligodendrocitos y astrocitos (van den Pol, 1980).

El NSQ no es homogéneo, sino que está subdividido en base al tamaño celular, volumen del neurópilo, aferentes y eferentes y contenido de neurotransmisores en los cuerpos celulares de las neuronas. Se han identificado dos grandes subdivisiones del NSQ, la región dorsomedial y la región ventrolateral en base a la inmunoreactividad a sustancias características que presenta. Las células de la región dorsomedial del NSQ de la rata tienen un área de  $84 \pm 4 \mu\text{m}^2$  y en la región ventrolateral tienen un área de  $102 \pm 5 \mu\text{m}^2$ . Las medidas en hámster y ratones muestran diferencias similares en el tamaño de las células con menor tamaño en la región dorsomedial y mayor tamaño en la región ventrolateral (van den Pol 1980, 1991).

Las neuronas del núcleo son las más pequeñas del hipotálamo y se encuentran además entre las más pequeñas de todo el cerebro. Las células están estrechamente empaquetadas con amplias regiones de aposición entre ellas. Se pueden encontrar grupos de neuronas separadas de las adyacentes por solo un espacio extracelular de 15 a 20  $\mu\text{m}$ . Por otra parte, el neurópilo del supraquiasmático es muy complejo y presenta muchos tipos de sinápsis. Se ha visto que los axones pequeños entran al núcleo de todas direcciones y que las dendritas algunas veces se extienden fuera del núcleo. Con técnicas de Golgi se ha revelado que un gran número de neuronas del supraquiasmático presentan axones con terminaciones locales encargados de la comunicación intranuclear (van den Pol, 1980, 1991).

### ***1.3.3 NEUROTRANSMISORES PRESENTES EN EL NSQ***

Las dos grandes subdivisiones del NSQ se han diferenciado por la presencia de vasopresina (VP) en la región dorsomedial (Card y cols., 1988) y de péptido vasoactivo intestinal (VIP) en la región ventrolateral, aunque hay algunas células VIPérgicas que quedan embebidas en la región dorsal del quiasma óptico (Card y cols., 1981; Card y Moore, 1988; Card y cols., 1988).

### ***Inmuno-reactividad en cuerpos neuronales***

Aparte de estos dos péptidos neuroactivos, se pueden encontrar un gran número de sustancias dentro del NSQ. Pequeñas neuronas inmunoreactivas a neurofisiña se han localizado en gran densidad en la parte dorsomedial del núcleo. La oxitocina en asociación con neurofisiña se localiza ocasionalmente en neuronas magnocelulares en los bordes dorsal, medial y rostral del núcleo. Células inmunoreactivas al péptido liberador de gastrina (GRP) se encuentran en la región ventrolateral y también algunas veces están embebidas en la región dorsal del quiasma óptico. La bombesina presenta un patrón similar al del VIP, así como el péptido histidina isoleucina (PHI), y de cuerpos celulares inmunoreactivos a 5-HT.

A diferencia de la distribución de las sustancias neuroactivas mencionadas, la neurotensina, la hormona liberadora de tirotrófina y la angiotensina II han sido identificadas en todo el NSQ.

La inmunoreactividad a GABA y su enzima sintética la glutamato descarboxilasa, ha sido identificada en todo el NSQ aunque la cantidad de dichas sustancias es menor que la observada en otras regiones cerebrales, lo cual sugiere que el efecto predominante que los axones del NSQ ejercen en otras neuronas es inhibitorio (Card y cols., 1981 y 1988; Card y Moore, 1984; van den Pol y Tsujimoto, 1985; Decavel y van den Pol, 1990; Morin, 1994).

En estudios de inmunohistoquímica donde se ha hecho doble marcaje se han encontrado neuronas del NSQ que contienen colocalizados al VIP, GRP y

GABA (van den Pol y Gorcs, 1986). También se ha visto co-localizado al VIP y PHI pues derivan de un precursor común (Dussailant y cols., 1992). Otras evidencias recientes han indicado que además de la colocación de VIP y PHI hay neuronas que presentan colocados VIP, PHI y GRP (Albers y cols, 1992).

### ***Inmuno-reactividad en axones***

En los axones también se observa inmunoreactividad para un gran número de sustancias neuroactivas, así podemos encontrar VP, bombesina, GAD, GRP, neurofisiina, serotonina, somatostatina y VIP. La densidad de axones inmunoreactivos para todas éstas sustancias es mayor ó igual que en cualquier otra parte del hipotálamo (Steinbusch, 1981).

Han sido detectados axones GABAérgicos con anticuerpos a GABA y GAD en gran cantidad dentro y fuera del núcleo. Por otra parte, axones marcados para bombesina ó GRP presentan una localización similar dentro del NSQ, los axones parecen ramificarse extensamente dentro de algunas partes del núcleo particularmente en la región ventral. En cuanto al VIP se ha visto dentro del NSQ en las mismas regiones teñidas para bombesina y el GRP así como regiones más rostrales. Axones que contienen neurofisiina y vasopresina se ramifican en todas las regiones del núcleo, siendo la parte dorsomedial la que presenta mayor marcaje. En cuanto a la somatostatina, los axones son encontrados en todo el NSQ (van den Pol, 1991).



La inmunoreactividad axónica a serotonina se localiza en gran densidad a través de todo el NSQ y en menor cantidad fuera el núcleo. Se encuentran botones terminales también en todo el núcleo sin ninguna restricción a un área específica. Los axones inmunoreactivos realizan contactos sinápticos con cuerpos neuronales y dendritas (van den Pol, 1991).

Por inmunoreactividad a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se han identificado astrocitos y procesos reactivos en el NSQ. El patrón de astrocitos es similar al del NPY y regiones del NSQ que reciben inervación de la retina en ratas y hámsters. Existen uniones estrechas extensas entre los procesos astrocíticos del supraquiasmático, sin embargo no se sabe con exactitud la función que tienen dentro del mismo. Se ha propuesto que algunas de las funciones de los astrocitos son el proteger al NSQ contra el daño de sustancias neurotóxicas; también se ha propuesto que podrían jugar un papel muy importante como parte integral del sistema circádico (van den Pol, 1991; Morin, 1994).

### ***Interacciones celulares***

Se han identificado diversas interacciones celulares dentro del NSQ entre las cuales podemos mencionar las que existen entre terminales inmunoreactivas a GABA que hacen sinápsis con neuronas que producen VIP, GRP y GABA (van den Pol y Gorcs, 1986; Francois-Bellan y cols., 1990). Se ha reportado también que existen aposiciones directas entre terminales de GABA y NPY, y una

convergencia de los dos tipos de terminales sobre otras neuronas postsinápticas blanco no especificadas (Francois-Bellan y cols., 1990). De gran interés es el reporte de que en la región ventrolateral del NSQ de rata la distribución de [ $H^3$ ]5-HT (serotonina) se sobrepone a las terminales inmunoreactivas a NPY pues supone la interacción de dos de las principales vías al NSQ. Ambas terminales establecen uniones sinápticas bien definidas algunas veces en la misma neurona blanco. Algunas veces se encontró aposiciones axo-axónicas entre los dos tipos de terminales (Guy y cols., 1987). Por triple marcaje inmunohistoquímico se ha observado una convergencia de axones serotoninérgicos a células inmunoreactivas a VIP, así mismo, terminales GABAérgicas llevan a cabo sinápsis con neuronas de VIP a nivel de las dendritas y del cuerpo celular que con frecuencia también presentan aposiciones axo-axónicas con terminales marcadas para 5-HT. Es común observar células que contienen GABA y 5-HT que convergen al cuerpo celular ó a las dendritas de neuronas que contienen VIP (Francoise-Bellan y Bosler, 1992). También se han reportado asociaciones sinápticas entre axones que contienen somatostatina y cuerpos celulares y dendritas que presentan VP y entre axones con VP y los somas y dendritas que presentan somatostatina y VIP y VP. Existen contactos sinápticos entre neuronas de VP y axones de VIP, axones de somatostatina y neuronas de VIP, lo que parece mostrar que las neuronas que presentan somatostatina podrían estar regulando la neuronas de VP y VIP (Daikoku y cols., 1992; Ibatá y cols., 1993) (Fig. 4).

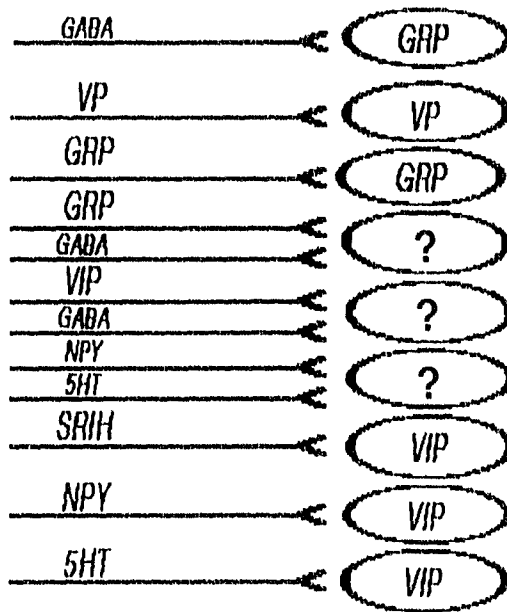


Figura 4. Interacción sináptica dentro del NSQ. En este esquema se muestra la interacción entre neuronas presinápticas (líneas) y neuronas postsinápticas (círculos) dentro del NSQ. La interacción involucra a una presináptica y una postsináptica ó a más de una presináptica y una sola postsináptica. En algunos casos se ha identificado el neurotransmisor presente tanto en las neuronas pre como postsinápticas mientras que en otras no se identificado el neurotransmisor (?).

#### 1.3.4 ASPECTOS FUNCIONALES DEL NSQ:

##### RITMOS ENDOGENOS AL NSQ

Anteriormente se han mencionado algunas de las evidencias que apoyan el papel del NSQ como un oscilador endógeno. Algunas de éstas evidencias se

refieren a la persistencia de un ritmo endógeno al NSQ como la actividad eléctrica y la actividad metabólica, liberación de sustancias, etc., en condiciones de ausencia de estímulos sincronizadores externos las cuales se tratarán a continuación.

### ***Ritmo de actividad metabólica***

En 1977 Shwartz determinó un ritmo diario de utilización de glucosa en la rata, siendo el NSQ más activo metabólicamente durante la fase de luz y relativamente inactivo en la fase de oscuridad a diferencia de otras regiones cerebrales que no exhiben dicha ritmicidad. Este mismo ritmo de utilización de glucosa también ha sido observado en rebanadas in vitro de cerebro de rata (Shwartz y Gainer, 1977; Newman y Hospod, 1986; Newman, 1991).

### ***Ritmo de liberación de Vasopresina***

Otro de los parámetros que se han estudiado en el NSQ es la liberación de vasopresina (VP) en explantes in vitro y cultivos organotípicos de NSQ (Earnest y Sladek, 1986 y 1987; Murakami y cols., 1991; Shinohara y cols., 1994), este ritmo persiste hasta 4 ciclos mostrando un periodo circádico. También se ha cuantificado el contenido de VP en el NSQ de ratas y se ha encontrado que éste muestra un patrón circádico aún en condiciones de oscuridad continua (Tominaga y cols., 1992).

### ***Ritmo de actividad eléctrica***

En el trabajo de Inouye y Kawamura (1982) se mostró que la actividad eléctrica multiunitaria registrada en la rata presenta un ritmo circádico, con un aumento de la misma en el periodo de luz y una disminución en el periodo de oscuridad. La actividad multiunitaria en regiones fuera del NSQ de animales nocturnos (rata) también presenta un ritmo circádico impuesto por el NSQ y cuya relación de fase es de aproximadamente  $180^\circ$  en relación con la de dentro del NSQ (Kubota y cols., 1981). Cuando el NSQ es aislado del resto del cerebro en una isla hipotalámica por cortes con una navaja Halasz la actividad multiunitaria circádica se mantiene solo en las islas que contienen el NSQ y se pierde en el resto de cerebro; así mismo el ritmo puede presentar libre corrimiento cuando el animal es mantenido en oscuridad constante y puede ser resincronizado con pulsos de luz cuando la conexión con la retina se deja intacta (Inouye y Kawamura, 1979, 1982; Kubota y cols. 1981, Inouye, 1984). En los trabajos realizados en rebanadas de hipotálamo se ha mostrado también un ritmo circádico en la actividad unitaria (Green y Guillete, 1982; Groos y Hendriks, 1982; Shibata y cols., 1982).

### ***Características de la actividad eléctrica dentro del NSQ***

En registros de actividad eléctrica en rebanadas de NSQ se ha observado que en un ritmo de 24 hr, el día subjetivo (el periodo que correspondería a la luz en el ciclo de iluminación del animal donador de la

rebanada) se caracteriza por la presencia de actividad unitaria de frecuencia muy rápida que se encuentra alrededor de los 14 Hz ó más, aunque se observan también unidades lentas con actividades por debajo de 1 Hz. Durante la noche subjetiva la actividad generalizada es muy baja, las unidades con frecuencias mayores de 5 Hz son muy raras y la mayor parte de la actividad se encuentra entre 0.5-3.0 Hz, adicionalmente el número de unidades silentes se incrementa. El pico máximo de actividad en estudios in vitro se han encontrado a la hora circádica 7 (CT 7) con un promedio de frecuencia de 7-8 Hz y presenta su punto mínimo a CT 19.

El patrón de disparo de las neuronas del supraquiasmático ha sido clasificado en tres tipos según su histograma de frecuencia a lo largo del tiempo en: tipo I, con patrón de disparo regular; tipo II, con patrón de disparo irregular y tipo III, con patrón de disparo en ráfagas, los porcentajes reportados para cada patrón son de 80, 19 y 1% respectivamente según Shibata y cols. (1984). Si se clasifican los patrones de disparo según su HII también se observan tres patrones (Zhang y cols., 1992): el patrón entonado cuyo HII presenta una distribución normal y que representa a las neuronas que disparan regularmente; el patrón al azar cuyo HII presenta una distribución parecida a la de Poisson y que representa a las neuronas que disparan irregularmente y finalmente el patrón armónico que representa a las neuronas cuyo HII tiene una amplia distribución asimétrica agrupada en múltiplos de un intervalo básico.

### **1.3.5 AFERENTES AL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO:**

#### **TRACTO RETINO-HIPOTALÁMICO**

##### ***Características generales***

En roedores se han descrito tres aferentes visuales principales al NSQ. La primera vía es directa y las otras dos indirectas. La vía directa se ha estudiado ampliamente y se considera la principal entrada de información visual al NSQ, ésta vía recibe el nombre de tracto retino-hipotalámico (RHT) (Moore y Lenn, 1972; Moore, 1973).

Por medio de marcaje de vías con aminoácidos tritados, y con HRP se ha observado que el RHT se origina en las células ganglionares de la retina y viaja por el nervio y el quiasma óptico para terminar bilateralmente en el NSQ (Moore y Lenn, 1972; Moore, 1973; Pickard, 1985; Johnson y cols., 1988a; Norgren y Lehman, 1989; Murakami y cols., 1991; Levine y cols., 1991; Martinet y cols., 1992).

Se ha reportado que solo algunas células ganglionares dispersas en la retina son identificadas cuando se realiza una inyección de marcadores radiactivos en el supraquiasmático, a diferencia de cuando el marcaje se realiza en zonas que están directamente relacionadas con el procesamiento visual como el quiasma óptico ó los colículos superiores, en donde todas las células ganglionares de la retina se marcan. Esto parece indicar que solo algunas células ganglionares están conectadas al NSQ y que son diferentes a las células ganglionares que participan en los mecanismos de formación de

imágenes (Norgren y Lehman, 1989). Con respecto a éste punto, en información muy reciente se ha visto que a nivel de la retina, el proceso de sincronización involucra la activación de células ganglionares W que proyectan al NSQ a través del RHT, estas células responden principalmente a la intensidad del estímulo luminoso. Dicho sustrato anatómico fue recientemente demostrado, empleando el transporte transináptico del virus PRV-Bartha, inyectado en la retina. En dicho estudio, también se demostró que las células W forman parte del tracto óptico primario que terminan en la HIG (Moore y cols. 1995).

En roedores la proyección de la retina al supraquiasmático es bilateral, siendo más densa hacia la parte ventral del núcleo, sin embargo, todo el núcleo parece recibir fibras de origen retinal (Moore, 1973). El RHT se extiende dentro de una área que es esencialmente coextensiva con la distribución de VIP y GRP (región ventrolateral del NSQ) (Card y Moore, 1991).

Se ha reportado que el RHT no solo inerva al NSQ sino también a otras regiones del hipotálamo, en particular, el área hipotalámica anterior (AHA), el hipotálamo lateral (HL), la región retroquiasmática (RRQ), el núcleo supraóptico, el núcleo paraventricular, la zona subparaventricular, la región ventromedial y núcleo dorsomedial (Pickard y Silvermann, 1981; Riley y cols., 1981; Youngstrom y cols., 1987; Levine y cols., 1991; Morin, 1994).

Las proyecciones al AHA en la rata son encontradas en la vecindad inmediata del NSQ por arriba de la superficie dorsal del supraquiasmático y a lo



largo de la superficie dorsal del quiasma óptico. Las fibras retinales que inervan la región circundante del NSQ terminan en porciones del hipotálamo que ocupan áreas poco extensas y que están compuestas de una variedad de poblaciones neuronales funcional y químicamente distintas. Algunas fibras se extienden a través del AHA hasta la región la región perifornical. Rostralmente las fibras se extienden al área preóptica y caudalmente se extienden dorsalmente en la zona subparaventricular. Las proyecciones hacia el AHL son largas y se esparcen a nivel rostral del NSQ pero se hacen más densos caudalmente y que lleva a la porción lateral del tracto óptico y núcleo supraóptico. Hay un gran número de terminales dentro del tracto óptico dorsal y por arriba de éste. Algunas fibras entran al núcleo supraóptico. Las proyecciones a la RRQ son densas y se extienden del borde caudal del NSQ al nivel de la parte rostral de la eminencia media. A éste nivel rodea la parte rostral del núcleo ventromedial en el área tuberal (Moore y Eichler, 1972; Card y Moore, 1991).

### ***Neurotransmisores presentes en el RHT***

Hasta el momento no se ha identificado al neurotransmisor que interviene en la comunicación entre el RHT y el NSQ, sin embargo, se tienen evidencias muy convincentes de que pudieran ser aminoácidos excitadores, específicamente el glutamato. Por medio de inmunohistoquímica y radioinmunoensayo con anticuerpos de alta afinidad al N-acetilaspargilglutamato

(NAAG) se ha demostrado que dicho transmisor está localizado extensivamente en el tracto retino-hipotalámico y en sus zonas blanco, incluyendo el NSQ. Las transecciones del nervio óptico producen una reducción significativa en la inmunoreactividad a NAAG en el quiasma óptico y el NSQ (Moffett y cols., 1990, 1991). En cuanto a éste punto, se ha reportado que en rebanadas que contienen el NSQ, la estimulación eléctrica del nervio óptico induce la liberación de [ $^3$ H]glutamato y [ $^3$ H]aspartato (Liou y cols. 1986).

Por inmunoreactividad se ha determinado la presencia de glutamato en las terminales nerviosas del tracto retino-hipotalámico de la rata (de Vries y cols., 1993). Apoyando las observaciones anteriores, se ha encontrado por hibridación *in situ* la señal de ARNm de algunas subunidades del receptor a NMDA dentro de el NSQ (Wisden y Seeburg, 1993; Gannon y Rea, 1994). Por microdiálisis *in vivo* en hámsters se ha caracterizado el patrón diario de aminoácidos excitadores (glutamato y aspartato) y se han visto que bajo un ciclo de iluminación 14:10 existe un ritmo diurno en la concentración extracelular con los niveles del pico máximo ocurriendo en la noche y que prevalece en oscuridad continua manteniéndose el pico máximo durante la noche subjetiva (Glass y cols., 1993).

Por otra parte, la inyección de glutamato en el NSQ produce cambios de fase en el ritmo de actividad locomotora en el hámster dependientes de la hora circádica a la que se realice; en contraste, las inyecciones del mismo neurotransmisor fuera del NSQ no producen ningún cambio en la fase circádica

(Meijer y cols. 1988a). En un experimento similar se observó que la estimulación eléctrica del nervio óptico de hámsters en libre corrimiento produce cambios de fase similares a los observados en el experimento anterior los cuales son atenuados por la administración del EI MK-801 (un antagonista no competitivo muy selectivo de receptores NMDA) (de Vries y cols. 1994). La administración intraventricular de antagonistas de los aminoácidos excitadores previenen los cambios de fase producidos por pulsos de luz en hámsters en libre corrimiento (Colwell y cols., 1990; Colwell y Menaker, 1992; Takeuchi y cols., 1992).

Se ha estudiado el efecto de aminoácidos excitadores e inhibidores sobre neuronas del supraquiasmático en cultivo y se ha observado que el glutamato excita cerca del 70% de neuronas del NSQ que presentan un patrón de disparo regular y 60% de neuronas de patrón de disparo irregular. El GABA inhibe la actividad espontánea y evocada por glutamato en 90% de células del NSQ. El MK-801 bloquea parcialmente las respuestas producidas por la administración de glutamato, el NAAG incrementa la frecuencia de disparo y potencia las respuestas inducidas por glutamato (Bos y Mirmiran, 1993).

En cuanto al papel de otros neurotransmisores en la comunicación del RHT con el supraquiasmático, hay evidencia que parece mostrar que la acetilcolina (ACh) participa en la neurotransmisión del RHT. Se ha observado que la infusión del agonista colinérgico carbacol ó carbamilcolina en el NSQ produce avances de fase que pueden ser bloqueados con antagonistas del tipo NMDA (Meijer y Cols., 1988b; Colwell y cols., 1992; Takeuchi y cols., 1993). El

antagonista nicotínico mercaptilamina, bloquea los cambios de fase inducidos por pulsos de luz (Keefe y cols., 1987) , y la nicotina activa las neuronas del NSQ (Miller y cols., 1987). Sin embargo, los estudios de marcaje con  $[H^3]$ nicotina no muestran marca en el NSQ (Swanson y cols., 1974), ni la enzima acetil-transferasa se encuentra en el RHT (Rao y cols., 1987). Finalmente, se ha mostrado por inmunohistoquímica la presencia de receptores muscarínicos y nicotínicos en neuronas del NSQ. Los receptores se encuentran distribuidos en todo el núcleo, aunque se observa un ligero aumento de células inmunoreactivas en la región dorsolateral (van der Zee y cols., 1991). Con estos datos contradictorios, hasta el momento no se tiene claro si la Ach es un neurotransmisor importante del RHT.

Reportes recientes han demostrado la presencia de sustancia P (SP) en células ganglionares de la retina de rata que proyectan al NSQ. La densidad de fibras inmunoreactivas a SP aumenta después de la enucleación (Takatsuji y cols., 1991), lo cual sugiere una posible modulación de la actividad del NSQ por medio del péptido.

### ***Importancia del RHT***

La demostración de la existencia del RHT fue el resultado de estudios que mostraron que el acoplamiento de algunos ritmos circádicos persistían después de la ablación de todas las vías visuales conocidas que parten del quiasma óptico. Otros estudios (Klein y Moore, 1979) han confirmado la

observación de que las lesiones en las que se corta el tracto óptico en el borde lateral del quiasma no alteran el acoplamiento del animal a un ciclo de L-O. A partir de estos estudios se puede concluir que el RHT es suficiente para mantener el acoplamiento en ausencia de todas las demás proyecciones retinales centrales. Más recientemente se ha encontrado que lesiones en donde se corta exactamente por debajo del NSQ y cortando el RHT resultan en la aparición de ritmos en libre corrimiento (Johnson y cols., 1988b). Esto sugiere que el RHT es necesario para el acoplamiento, sin embargo no se descarta la posibilidad de que otras vías fueran afectadas por la lesión. En resumen todo parece indicar que el RHT es la vía de entrada al NSQ más importante para el acoplamiento de los ritmos circádicos (Moore y Card, 1994).

### **TRACTO GENICULO-HIPOTALAMICO**

#### ***Características generales.***

De la retina surgen fibras que comparten con el RHT el mismo trayecto, pero que se dirigen a la hojuela intergeniculada (HIG) sin entrar al supraquiasmático (Pickard, 1985). La hojuela se encuentra situada entre los núcleos geniculados lateral dorsal y ventral del tálamo y recibe proyecciones bilaterales retinianas (Pickard, 1985). Hasta antes de 1976 se consideraba que el núcleo geniculado lateral (NGL) tenía solo dos subdivisiones; el núcleo geniculado dorsal lateral (DLG) que es un núcleo de relevo talámico que maneja información que viene del ojo y va hacia la corteza visual, el núcleo geniculado

ventral lateral (VLG) presumiblemente involucrado en reflejos visuales, control oculomotor y en otras funciones visuales subcorticales. En 1976, Hickey y Spear marcaron una nueva subdivisión del complejo del geniculado caracterizada en la rata por recibir casi el mismo número de aferentes retinales del ojo contralateral e ipsilateral y que es lo que se conoce ahora como la hojuela intergeniculada (Moore y Card, 1994).

En roedores, de la HIG parte la aferencia hacia el NSQ la cual es propiamente la que recibe el nombre de tracto geniculo-hipotalámico (TGH) (Moore, 1989; Meijer y Rietveld, 1989; Morin y cols., 1992; Agarwala y cols., 1992a y b). Estudios metabólicos y morfológicos en rata y primates señalan que la proyección geniculo-hipotalámica inerva principalmente la región ventrolateral del NSQ y que se superpone a la innervación que proviene del RHT (Maxwel y Fink, 1988; Moore, 1989).

Utilizando marcaje anterógrado con leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* en las células de la HIG, se ha mostrado que un haz de fibras en el tracto óptico dorsomedial desciende dorsalmente a el NSQ. Las células de la HIG localizadas lateralmente proyectan a el supraquiasmático ventrolateral. Las células mediales de la HIG terminan en la región ventrolateral y medial del NSQ (Mikkelsen, 1992).

Adicionalmente las neuronas de la HIG proyectan dentro del TGH para innervar neuronas en el hipotálamo lateral y el núcleo periventricular. Se ha descrito una vía de intercomunicación entre hojuelas de la cual se ha observado

que los axones que la componen se extienden medialmente por la comisura anterior ó por el tracto óptico y quiasma óptico (Mikkelsen, 1992; Moore y Card, 1994).

### ***Neurotransmisores presentes en el TGH y la HIG.***

La HIG ha sido caracterizada por inmunoreactividad la presencia de numerosos neuromoduladores, de los cuales el neuropéptido Y (NPY) es uno de los mas importantes pues las neuronas que lo contienen son las que proyectan al NSQ en un patrón que se traslapa con el del RHT.

Ademas de las neuronas que contienen NPY se han identificado células que contienen encefalinas (ENK) adyacentes a las de NPY en la ardilla y la rata y que proyectan exclusivamente a la HIG contralateral (Card y Moore, 1989), substancia P (SP), serotonina (5-HT), péptido relacionado con la calcitonina, factor liberador de corticoesteroides (CRF), neurotensina, tirosina hidroxilasa, GABA ó descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) las cuales también proyectan al NSQ (Morin y cols., 1992; Morin, 1994; Agarwala y cols., 1992a y b; Harrington y cols., 1987; Mantyh y Kemp, 1983; Ibata y cols., 1988; Smale y cols., 1991).

Aparentemente el NPY es el transmisor que media la comunicación entre la HIG y el NSQ.

Los estudios conductuales han mostrado que la inyección de NPY y de polipéptido pancreático de ave (PPA) -el cual tiene una estructura molecular

muy similar al NPY producen cambios de fase en la conducta locomotora cuando se administra en el NSQ de rata y hámster. La curva de respuesta de fases obtenida por la estimulación con NPY se asemeja a la obtenida con pulsos de oscuridad (Albers y Ferris, 1984; Albers y cols., 1984).

En estudios electrofisiológicos se ha reportado que la administración de NPY a rebanadas que contienen el NSQ produce un cambio de fase en el ritmo de actividad eléctrica neuronal (Mason y cols. 1987; Shibata y Moore, 1993).

En registros en rebanadas la respuesta de neuronas del supraquiasmático a la aplicación del NPY determinan que un 65 % de neuronas se excite y el restante 35 % no responda, existiendo además la tendencia a encontrar un mayor número de células que responden NPY durante la fase de iluminación (Mason y cols., 1987).

### ***Importancia del TGH***

Como se ha observado la lesión de la HIG o del TGH no impide la sincronización a el ciclo L-O, a diferencia de la lesión al RHT. Sin embargo, la lesión de la HIG afecta significativamente los cambios de fase producidos por pulsos de luz u oscuridad ya que retarda la velocidad de reacoplamiento después de un cambio en el fotoperiodo (Harrington y Rusak, 1986; Pickard y cols., 1987; Johnson y cols. 1989) y elimina el *splitting* en la actividad locomotora que ocurre bajo la exposición prolongada a la luz continua (Harrington y Rusak, 1986). Las lesiones del TGH bloquea los cambios de fase



inducidos por benzodiazepinas (Biello y cols., 1991; Meyer y cols., 1992). Por otra parte, la estimulación eléctrica del TGH produce cambios de fase en hámsters mantenidos en luz u oscuridad constante (Johnson y cols., 1989; Pickard, 1989; Rusak y cols., 1989) y bloquea la capacidad de la luz constante a alargar el periodo (Pickard y cols., 1987); lo que lleva a pensar que el TGH junto con la HIG juegan mas bien un papel muy importante como un sistema integrador de luminiscencia (Harrington y Rusak, 1989; Zhang y Rusak, 1989).

## **TRACTO RAJE-HIPOTALAMICO**

### **Características generales**

La menos estudiada de las vías es la tercera, la cual se conoce como tracto rafe-hipotalámico (TR). El sistema serotoninérgico inerva densamente la NSQ y también proyecta al IGL. El origen preciso de las fibras serotoninérgicas que llegan al NSQ no ha sido descrito lo suficientemente bien. Hasta el momento no se tiene la certeza de que núcleo del rafe es el que provee las proyecciones, sin embargo hay resultados en los que se reporta que la vía se origina en los núcleos dorsales y mediales del rafe e inerva principalmente la parte ventral del NSQ (Maxwel y Fink, 1988). Basados en transporte anterógrado y [ $H^3$ ]aminoácidos en ratas, se ha reportado una proyección principal del rafe dorsal que viaja en el tracto periventricular del rafe dorsal descendiendo al nivel de la región periventricular del tercer ventrículo para terminar en la porción caudal del NSQ. Otra proyección del rafe dorsal se

extiende dorsolateralmente a la HIG y núcleo geniculado ventral (VLG), con algunas fibras continuando a través de las comisuras supraópticas para entrar al supraquiasmático de forma ventral. Del rafe medial surge una proyección que corre dentro del haz medial del cerebro anterior y que se extiende ventromedialmente desde el hipotálamo rostral hasta llegar al NSQ (Azmitia y Segal, 1978; Morin, 1994). Estos resultados no son consistentes con los estudios de lesiones discretas mostrando que el rafe medial y no el dorsal es la fuente primaria de inervación serotoninérgica a el NSQ (van de Kar y Lorens, 1979), por otra parte en otro estudio en el que se utiliza marcaje retrógrado del rafe y en el cual no se muestra la presencia de ninguna aferente del rafe dorsal al NSQ o a la HIG (Vertes, 1991).

Aunque el origen preciso de la aferencia de la zona del rafe al NSQ permanece por ser aclarada; se ha visto por marcaje retrógrado y anterógrado una conexión retinal directa hacia el rafe dorsal en la rata, aunque no se puede descartar que el marcaje obtenido sea a través de neuronas extraretinales que también comuniquen con el rafe dorsal (Foote y cols., 1978; Hao y Semba, 1994).

Dentro del NSQ se ha estimado que el 45% de las terminales serotoninérgicas forman sinápsis con células inmunohistoquímicamente identificables (Foote y cols., 1978, Card y Moore, 1991)

Al igual que las dos vías descritas anteriormente, las terminaciones de ésta proyección se traslapan con las del RHT y el TGH (Card y Moore, 1991).

Existe una gran cantidad de trabajos en los que se ha puesto de manifiesto la posible participación del neurotransmisor serotonina (5-HT) presente en el rafe dorsal y medial en la regulación de los ritmos; algunos de estos estudios se mencionan a continuación.

En experimentos conductuales se ha observado que la lesión de los núcleos mediales y dorsales del rafe parece afectar la amplitud del ritmo de actividad locomoción en la rata, sin embargo no parecen afectar el acoplamiento a el ciclo L-O (Kam y Moberg, 1977; Levine y cols., 1986).

Teniendo en cuenta que la 5-HT es el neurotransmisor identificado de ésta vía se ha encontrado que el tratamiento crónico de hámsters con clorgilina (un inhibidor de la monoamino oxidasa) o la fluoxetina (un potente inhibidor de la recaptura de 5-HT), incrementan el periodo de actividad locomotora, alteran la curva de respuesta de fase a pulsos breves de luz, alteran la curva de actividad locomotora de animales mantenidos en condiciones de luz oscuridad u oscuridad constante, acortan el periodo en la actividad locomotora en oscuridad constante e incrementan el radio de actividad reposo en animales mantenidos en oscuridad constante (Duncan y cols., 1988, Possidente y cols., 1991). La destrucción del sistema serotoninérgico con la toxina 5,7- Dihidroxidopamina produce avances en el inicio de actividad locomotora en ratas mantenidas en un ciclo luz-oscuridad (Possidente y cols., 1991) y producen una respuesta más robusta de la región de retrasos de fase de la PRC en animales que son mantenidos en oscuridad continua (O-O) (Morin y Blanchard, 1991). La

depleción de monoaminas modifica el acoplamiento y la respuesta a la luz del ritmo de actividad locomotora en el hámster (Penev y cols., 1993)

Datos adicionales han mostrado que en el NSQ se presenta un ritmo en los niveles de 5-HT, en condiciones de L-O y que se mantienen en O-O, dicha ritmicidad no se observa en otras regiones cerebrales como el hipotálamo anterior y corteza (Cagampang e Inouye, 1994).

En complemento con éstas observaciones, se ha reportado que en el NSQ se presentan abundantemente los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> y un pequeño número de receptores 5-HT<sub>1C</sub> y 5-HT<sub>2</sub> (Prosser y cols., 1993). Estudios electrofisiológicos han mostrado que el ritmo de actividad neuronal puede ser "reseteado" por la aplicación de 5-HT en el baño (Medanic y Guillet, 1992). El agonista inespecífico quipazina induce cambios de fase en la actividad neuronal actuando al menos en dos tipos de receptores a 5-HT; parece actuar primariamente en receptores 5-HT<sub>1A</sub> para inducir avances de fase a CT 6 y en un receptor 5-HT no bien caracterizado, posiblemente del subtipo 5-HT<sub>1</sub>, para inducir retrasos de fase durante la noche (Prosser y cols., 1993). Resultados similares se han obtenido en estudios conductuales (Edgar y cols., 1993).

Los registros de actividad unitaria han mostrado que las neuronas del NSQ que responden a estímulos luminosos son inhibidas por dosis bajas de quipazina (agonista 5-HT), mientras que el antagonista serotoninérgico metergolina revierte el efecto producido por la quipazina (Miller y Fuller, 1990). En estudios donde se registra el ritmo de actividad extracelular espontánea in

vitro, la aplicación de 5-HT durante el día subjetivo induce avances de fase. (Medanic y Guillete, 1992).

En general el sistema serotoninérgico aparentemente podría ejercer una modulación inhibitoria del sistema circádico en respuesta a la luz (Meijer y Groos, 1988).

### **1.3.6 OTRAS AFERENTES AL NSQ**

Además de las aferentes ya descritas, el NSQ recibe proyecciones de otros núcleos hipotalámicos y talvez de estructuras del cerebro anterior, así como una aferencia hormonal proveniente de la glándula pineal la cual es la encargada de producir la hormona Melatonina. Dicha hormona es capaz de sincronizar algunos ritmos como se ha mencionado anteriormente (Cassone y cols., 1986a y b) y de "resetear" también el ritmo de actividad eléctrica neuronal del NSQ (McArthur y cols., 1991). Recientemente se ha descrito una via aferente al NSQ originada en el núcleo talámico paraventricular (Moga y cols., 1995) de la cual se desconoce su papel funcional en relación los ritmos circádicos (Fig. 5).

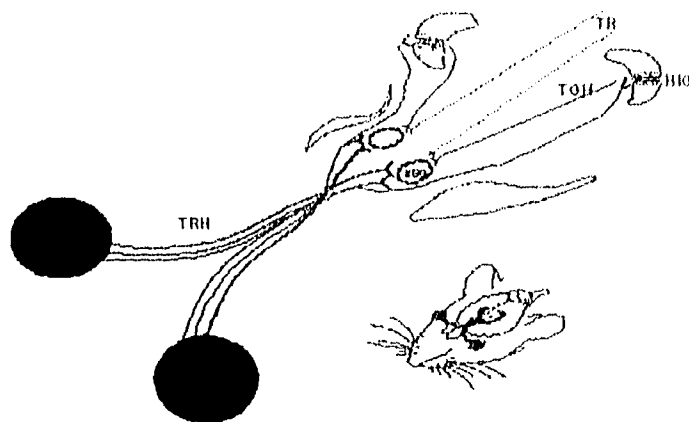


Figura 5. Aferentes al NSQ. En este esquema se representan solamente las tres aferentes al NSQ mas estudiadas, que son el tracto retino-hipotalámico (RHT), el tracto geniculado-hipotalámico (TGH) y el tracto rafe-hipotalámico (TR). Además se muestra la localización espacial en el cerebro de la rata. Hojuela Intergeniculada (HIG)

### 1.3.7 INTERACCION DE LAS AFERENTES DENTRO DEL NSQ

Estudios morfológicos del supraquiasmático, han mostrado interacciones entre células serotoninérgicas y NPYérgicas (Bosler y Beaudet, 1985; Kawakami y cols., 1985 ) y células gabaérgicas y NPYérgicas dentro del NSQ, además se ha demostrado que neuronas inmunoreactivas a VIP de la región ventral del NSQ se traslapan con sitios que recapturan ( $^3\text{H}$ )5-HT (Guy y cols., 1987; Francois-Bellan y cols., 1990). En otro trabajo se han demostrado interacciones celulares entre células VIPérgicas y VPresinérgicas del NSQ

(Daikoku y cols., 1992; Iyata y cols., 1993). La dependencia de algunos de los sistemas que forman parte de las aferentes se ha reportado en el trabajo de Kawakami y cols. (1985) en donde la destrucción del sistema serotoninérgico con 5,6-dihydroxitriptamina también disminuye la inmunoreactividad a VIP pero no a vasopresina (VP) dentro del supraquiasmático.

### **1.3.8 EFERENTES DEL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO**

La mayoría de conexiones que parten del NSQ se dirigen hacia núcleos hipotalámicos, especialmente al núcleo paraventricular (PVN) en su división dorsal, al núcleo periventricular en su parte parvocelular y a la parte medial del núcleo hipotalámico dorsomedial. Muchas fibras cursan en la región retroquiasmática y pasan a los bordes mediales y ventrales del núcleo ventral hipotalámico, así como a través de la zona central de éste mismo núcleo. Algunas fibras en el borde lateral del ventromedial hipotalámico se extienden dorsomedialmente en el área hipotalámica posterior y la sustancia gris mesencefálica. El mayor número de proyecciones extrahipotalámicas se dirigen al núcleo periventricular talámico (Berk y Finkelstein, 1981).

De una forma más específica las aferentes en la rata se han agrupado en seis componentes que proyectan a un gran número de zonas intra y extra-hipotalámicas. A continuación se describen los seis componentes.

1) Fibras que se dirigen rostralmente a el área preóptica, particularmente a la parte ventral del área preóptica medial, el núcleo periventricular anteroventral, y el núcleo preóptico anterodorsal.

2) La proyección más importante (dentro de la zona paraventricular) comienza en el borde del NSQ y corre dorsocaudalmente hacia el borde ventral del núcleo paraventricular del hipotálamo. Las fibras continúan caudalmente dentro de la región medial a el núcleo dorsomedial y finalmente dentro del hipotalámica y la región rostral de la sustancia gris periacueductual.

3) Fibras que proyectan caudalmente a través del área retroquiasmática para terminar entre los núcleos arcuato y ventromedial.

4) Una vía dirigida dorsalmente dentro de los núcleos principal e intrafascicular del núcleo del lecho de la estria terminalis, el núcleo paraventricular del tálamo y el núcleo paratenial.

5) Una vía pequeña a núcleo septal intermedio lateral.

6) Una proyección dirigida lateralmente que pasa por el trácto óptico para terminar en la hojuela intergeniculada (Watts, 1991).

En el hámster se ha mostrado un patrón muy similar en las eferentes del supraquiasmático marcadas con leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris* que se divide en cuatro grupos (Kalsbeek y cols., 1993, Morin y cols., 1994).

1) Una proyección anterior a el septum ventral lateral, al núcleo cama de la estria terminalis y al paraventricular talámico anterior.



2) Una proyección periventricular hipotalámica que se extiende de la región preóptica a el área premamilar.

3) Una proyección talámica lateral a la hojuela intergeniculada y al geniculado lateral ventral.

4) Una proyección posterior al paraventricular talámico posterior , núcleo precomisural y núcleo pretectal olivar.

Para investigar la naturaleza bioquímica de éstas proyecciones, en un trabajo realizado por Kalsbeek y cols., (1993) se reporta que despues de la lesión bilateral del NSQ se induce la desaparición de fibras que contienen VP, VIP ó GRP del núcleo preóptico medial (MPN), núcleo paraventricular del tálamo en su parte anterior (PVA), núcleo supraóptico (SON), núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) y del núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH) en su parte medial.

Las lesiones revelan que las proyecciones más densas de fibras de VP son hacia el MPN, PVA, regiones anteriores y mediales del PVN y DMH medial. Las fibras que se derivan del NSQ y que son inmunoreactivas al VIP fueron muy abundantes en el área subparaventricular, de la parte anterior y medial del PVN, la parte medial del DMH y el PVA. En la región preóptica se ve poca inervación de fibras que contienen VIP. En lo que se refiere a GRP, solo el área subparaventricular, el DMH medial, el PVA y el SON se consideran como zonas blanco de fibras que contienen GRP (Kalsbeek y cols., 1993). En el hámster también se ha descrito una clara inervación del NSQ contralateral, sin embargo

el contenido de ésta proyección es desconocida aunque al menos parte contiene VIP (Card y cols., 1981) (Fig. 6).

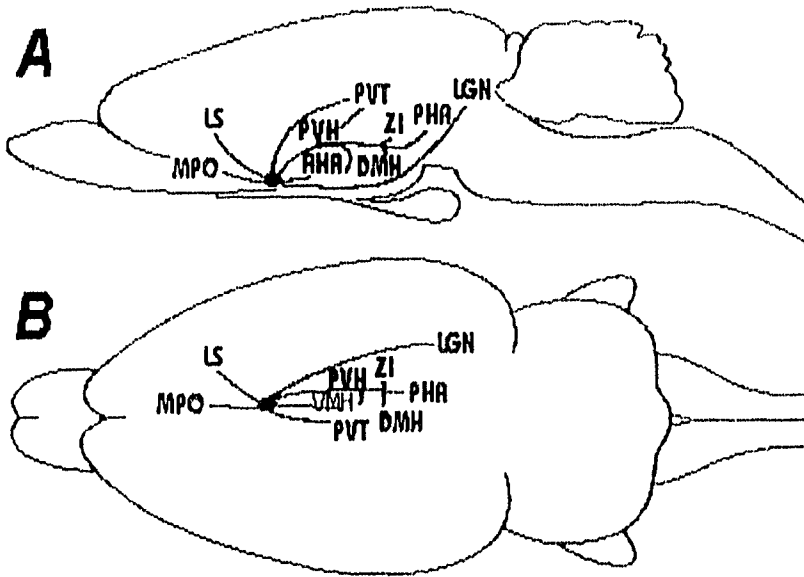


Figura 6. Eferentes del NSQ. A partir del NSQ se originan una gran cantidad de eferentes a través de las cuales distintas partes del Sistema Nervioso reciben información temporal que ha sido procesada dentro del supraquiasmático. En ésta figura se muestran en una vista sagital (panel A) y en una vista horizontal (panel B) las mayores vías eferentes identificadas en roedores. AHA-Hipotálamo anterior; DMH-Hipotálamo dorsomedial; LGN-Núcleo geniculado lateral; LS-Núcleo septal lateral; MPO-Area preóptica medial; PHA-Area hipotalámica posterior;PVH-Núcleo paraventricular hipotalámico;PVT-Núcleo paraventricular talámico;VMH-Núcleo ventromedial hipotalámico; ZI-Zona incerta.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Está bien establecido que la información luminosa ambiental es la principal señal que sincroniza algunas conductas rítmicas presentes en los organismos en respuesta al ambiente externo. Esta sincronización posiblemente es a través de la regulación de la actividad del NSQ. La información luminosa es transmitida al NSQ a través de sus dos principales aferentes que son el RHT y el TGH, aunque posiblemente también por el TR. Es muy importante hacer notar que las aferentes no solo proyectan al NSQ sino que también al hipotálamo circundante y que dentro del NSQ las aferentes se traslapan en una misma región del núcleo (posiblemente sobre una misma neurona del NSQ) y establecen contactos sinápticos. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido de qué manera las interacciones de las aferentes modulan la actividad eléctrica de las neuronas que se encuentran dentro del NSQ.

Se ha observado que las células del supraquiasmático cambian su frecuencia de disparo frente a la estimulación de las aferentes fóticas; a las células que responden a estos estímulos se les ha llamado neuronas visuales del NSQ (Groos y Mason, 1978; Sawaky, 1979; Groos y Mason, 1980; Meijer y cols., 1986). La respuesta puede ser tanto de aumento en la frecuencia de disparo, como disminución en la misma, pero se ha observado que las neuronas responden en mayor proporción con un aumento en la frecuencia de disparo que con una disminución. Sin embargo, en condiciones basales los dos tipos de neuronas no difieren en su frecuencia de disparo (Meijer, 1991). Según Groos y Mason (1986), en especies como el gato, la rata y el hámster la mayoría de las células son activadas por la luz siendo aproximadamente el 80 %

del total de las células estudiadas. También existen también células que no responden a ningún tipo de estimulación.

Las latencias de las respuestas excitatorias varían entre 50 a 140 mseg, los 200 mseg a 20 seg y de los 100-160 mseg para las respuestas inhibitorias. Estas diferencias en las latencias podrían deberse a las diferentes preparaciones experimentales en las que se trabajaron y a los diferentes parámetros de estimulación utilizados en cada uno de los experimentos realizados (Groos y Mason, 1978, 1980; Sawaky, 1979; Meijer y cols., 1986).

Las neuronas visuales que responden alteran su frecuencia de disparo como función monotonica del nivel de iluminación. Los umbrales para las respuestas visuales son 10 lux en el hámster y 0.1 lux en la rata, ocurriendo la saturación a 500 lux (Meijer y Rietveld, 1989).

La localización de las células que responden a la estimulación fótica coincide con los campos terminales de las vías aferentes fóticas principalmente en la región ventral. Es curioso observar que el estímulo al cual las neuronas responden con mayor efectividad no son las transiciones entre cambios rápidos de iluminación, sino que son los estímulos fóticos que se presentan por periodos prolongados de tiempo o que son directamente presentados en la retina completa (Card y Moore, 1991; Meijer, 1991).

Tanto las células activadas como las suprimidas mantienen su respuesta hacia el estímulo fótico aún cuando se ha lesionado el TGH, lo cual sugiere que el RHT es el único que media los dos tipos de respuesta (Meijer, 1991).

Por otra parte se ha establecido que la estimulación fótica de larga duración puede producir cambios de fase en ritmos de actividad de acuerdo a la hora circádica en la que se aplican y que podrían ser el resultado de un cambio en la actividad eléctrica generalizada del núcleo. Algunos trabajos han mostrado que la estimulación eléctrica del RHT modifica la actividad eléctrica en

rebanadas de NSQ , sin embargo hasta el momento no se ha estudiado el efecto de la estimulación eléctrica de la HIG sobre la actividad eléctrica del NSQ.

En base a éstos antecedentes, se propone en el presente trabajo, investigar el efecto de la estimulación con pulsos de luz de corta duración (5 mseg) aplicados a la retina sobre la actividad eléctrica unitaria del NSQ, así mismo estudiar el efecto de estimulación eléctrica de la HIG sobre la actividad eléctrica unitaria del NSQ.

Adicionalmente, para explorar la interacción de las aferentes RHT y TGIH se propone estudiar el efecto de la estimulación simultánea fótica de la retina y eléctrica de la HIG sobre la actividad unitaria del NSQ.

Este estudio permitirá tener mayor información para tratar de entender el papel que juegan por separado algunas aferentes y de su interacción para el control de la actividad eléctrica del NSQ.

### **3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS:**

#### **Hipótesis General:**

1. El NSQ esta organizado en microcircuitos funcionales, cada uno de los cuales se encarga de regular diferentes aspectos de los ritmos circádicos.

#### **Objetivos Generales:**

La comprobación de parte de esta hipótesis general se llevará a cabo cumpliendo con los siguientes objetivos:

1. Caracterizar en el NSQ los procesos de integración de la información de sus aferentes a través del análisis de los cambios en la excitabilidad de neuronas del NSQ producidos por la estimulación individual y simultánea de 2 de sus aferentes.

#### **Hipótesis Especificas:**

i) La estimulación eléctrica de las diferentes aferentes del NSQ modificará la el nivel de respuesta de grupos neuronales específicos en cuanto a su función dentro del NSQ.

ii) La respuesta de neuronas del NSQ a la estimulación fótica de la retina puede ser modulada por la estimulación simultánea de otra de las aferentes al núcleo.

#### **Objetivos Especificos:**

La comprobación de estas hipótesis se llevará a cabo cumpliendo con los objetivos respectivos:

Sobre la actividad eléctrica unitaria del NSQ:

i) Determinar los efectos de la estimulación eléctrica de la Hojuela Intergeniculada.

ii) Determinar los efectos de la estimulación eléctrica de la Hojuela Intergeniculada simultáneamente a la estimulación fótica de la retina.

#### 4. METODO

##### ***Animales y cirugía.***

En los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar y Sprague Dawley de 180-200 gr de peso, las cuales se colocaron en cajas de Plexiglas 5X10X15 (fondo x largo x ancho), en grupos de cuatro a cinco ratas de la misma cepa por caja. Los animales se mantuvieron en un cuarto bajo un ciclo de luz-oscuridad 12:12 hr (las luces se encendían a las 8:00 hr), desde el nacimiento hasta el día del experimento, con agua y alimento *ad libitum*. La intensidad luminosa a nivel de la caja se mantuvo en 450 lux en promedio durante el periodo de iluminación hasta el día del experimento.

La cirugía se llevó a cabo en condiciones asépticas. Las ratas se anestesiaron con Uretano (Sigma, Co.) a una dosis de 1.2 g/Kg., y si era necesario se administraban una ó dos dosis adicionales de anestésico de 0.6 g/Kg para mantener el nivel de anestesia adecuado durante todo el experimento. La mayoría de veces, una sola dosis de Uretano fue suficiente para una sesión experimental de 4 a 6 hr de duración que iniciaba alrededor de las 10:00 hr y terminaba entre las 14:00 y 16:00 hr.

Cuando el animal se encontró completamente anestesiado, se colocó en un aparato estereotáxico (David Kopf, Co.). Después de montar al animal correctamente en el estereotáxico se realizaron incisiones en la piel de la rata para exponer el cráneo y poder realizar las trepanaciones necesarias para la colocación de los electrodos. Se hicieron tres trepanaciones las cuales correspondían a: a) electrodo para estimulación de la hojuela intergeniculada de acuerdo a las coordenadas de Paxinos (1982) P:4.3; L:3.2; V:3.5, b) micro-electrodo para el registro de actividad unitaria extracelular (se utilizará el

término de unidades) dentro del NSQ P:0; L:0; V:6.2 y c) electrodo indiferente en el hueso etmoidal.

Una vez que se tuvieron los trépanos hechos se llevó a cabo la colocación de los electrodos de estimulación y de registro de unidades.

Para la estimulación de la HIG se utilizó un electrodo bipolar, elaborado con alambres de una aleación de cromo-níquel aislados con una cubierta de teflón y trenzados, cuyo diámetro de cada una de las puntas fue de 300  $\mu\text{m}$ . El electrodo se colocó en una torre del estereotáxico y se llevo hasta la HIG (P:4.3; L:3.2; V:3.5 tomando como referencia a bregma). Una vez colocado, el electrodo se fijo al cráneo con cemento dental y se retiró la torre. El microelectrodo para registro de la actividad unitaria del NSQ se colocó en la posición adecuada (P:0; L:0; V:6.2) con la ayuda de un microposicionador hidráulico (David Kopf Co. Mod. 650), a través del trepano realizado a nivel de Bregma. Un pequeño tornillo de acero inoxidable, se colocó en el hueso etmoidal a modo de ser usado como un electrodo indiferente.

Al final del experimento, la posición de los electrodos de estimulación y la última posición del electrodo de registro de unidades se marco con una lesión electrofónica de la siguiente forma: por medio de un estimulador (Grass, Co. Mod. S8800) se aplicó un pulso de corriente directa el cual se pasó a través de una unidad de corriente constante (Grass Instruments Co., Mod. CCU1A). La unidad de corriente constante se conectó directamente a los electrodos. Para el electrodo de estimulación de la HIG se aplicó un pulso de corriente de 1 mA de intensidad con una duración de 5 segundos mientras que para el electrodo de registro del NSQ se aplicó un pulso de corriente de 0.5 mA de intensidad con una duración de 2 segundos.



### ***Registro de la actividad unitaria.***

Se utilizaron microelectrodos de tungsteno de 10 a 15 Mohms para registrar la actividad eléctrica extracelular. La señal amplificada (pre-amplificador A.C Grass, Mod. P500) fue filtrada a una banda final entre 300 y 10,000 Hz. La actividad neuronal y un pulso generado por el estimulador el cual se utilizó como un pulso de sincronía fueron registrados en cinta magnética para análisis posterior.

El electrodo de registro se colocó 1 ó 2 mm. por arriba del borde dorsal del NSQ, desde éste punto el electrodo se bajó en pasos de 10  $\mu\text{m}$  por medio de el microposicionador hasta encontrar una unidad. Cuando se detectó una unidad, se registró por dos minutos la actividad espontánea (registro control), después la respuesta neuronal a la estimulación fótica de la retina, la estimulación eléctrica de la hojuela y la estimulación simultánea de la retina y de la HIG también se registraron.

### ***Estimulación de las vías aferentes.***

El RHT se estimuló a través de la aplicación de pulsos de luz a la retina de la rata por medio de una lámpara estroboscópica que se colocó 15 cm. frente a los ojos del animal, el estímulo consistió de flashes de 600 lux de intensidad con 5 mseg de duración y una frecuencia de 0.5 Hz. La estimulación de la HIG consistió de pulsos cuadrados DC de 1.2 mA de intensidad con 0.5 mseg de duración, y una frecuencia de 0.5 Hz.

El protocolo de estimulación consistió de 25 pulsos de sincronía sin estimulación, 25 flashes de luz, 25 pulsos de estimulación eléctrica y 25 flashes y pulsos eléctricos presentados simultáneamente. Al final del protocolo de estimulación el electrodo se movió 100  $\mu\text{m}$  y se buscó otro disparo neuronal. Este procedimiento permitió asegurarnos que se estaba registrando una unidad

de una neurona diferente, pues la unidad previamente registrada desaparecía de la pantalla del osciloscopio. El trayecto del electrodo finalizó cuando se llegó a la porción medial del quiasma óptico. Se realizaron cuatro trayectos por animal, dos al lado izquierdo y dos al lado derecho de la línea media.

Con el fin de tener un estimado del retraso sináptico que ocurre desde la retina hasta en NSQ se registró en 5 animales la respuesta multiunitaria del quiasma óptico (en la porción del nervio óptico que se encontraba precisamente por debajo del NSQ) provocada por la estimulación fótica de la retina. El protocolo de estimulación se realizó de forma similar a la que se llevó a cabo en la manipulación anterior. De igual manera, los parámetros de estimulación son los mismo que los descritos anteriormente para la estimulación fótica de la retina y registro de actividad unitaria en el NSQ.

### ***Histología.***

Posteriormente el animal recibió una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundió por vía transcardiaca con 100 ml de una solución de NaCl al 0.9 % seguida de 300 ml de formalina al 10 % en H<sub>2</sub>O destilada.

El cerebro de la rata se removió de la cavidad craneana y se post-fijo por 24 hr con la solución fijadora a 4 °C. Mas tarde, el tejido se transfirió a soluciones de sacarosa en concentraciones crecientes (10%, 20% y 30%) hasta que el cerebro se sumergiera en el recipiente.

Después de la sacarosa al 30%, los cerebros se sacaron de la solución y se cortaron en secciones coronales de 40 µm de espesor en un criostato (Reichert-Jung, Co.) a -10 °C. Los cortes obtenidos se colocaron en pozos (2 cortes por pozo) conteniendo buffer fosfatos 0.1 M y pH 7.2. El orden de los cortes colocados en los pozos se llevó a cabo en una dirección antero-posterior.

### ***Tinción de los cortes.***

Los cortes se montaron en portaobjetos cubiertos con gelatina (0.2%) , se tiñieron con violeta de cresilo y se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (70%; 95%; Abs). Los cortes se aclararon en Xilol y se cubrieron con Permount (Baxter, Co.). La laminillas teñidas se almacenaron para su análisis posterior.

### ***Análisis de resultados.***

El análisis de datos se llevó a cabo en una sesión independiente con ayuda del programa Experimenter's Workbench (Brain Wave Inc.). La señal grabada en la cinta magnética primero se digitalizó a 20 KHz, y la unidad a estudiar se seleccionó con una ventana discriminadora, finalmente el análisis de las unidades consistió de la estimación de la frecuencia de disparo promedio antes y después de cada tipo de estimulación y de la construcción de histogramas peri-estimulo, histogramas de intervalos interespigas e histogramas de frecuencia a lo largo del tiempo. Los histogramas peri-estímulo se refieren a la representación gráfica del número de cuentas de los disparos neuronales en lapsos de tiempo regulares (bins) antes y después de la presentación de un estímulo específico; los histogramas de intervalos interespigas se refieren a la representación gráfica de los intervalos de tiempo que transcurren entre cada disparo neuronal; y los histogramas de frecuencias a lo largo del tiempo se refieren a la frecuencia de disparo que presenta una neurona determinada a lo largo de un periodo fijo de tiempo.

Se consideraron respuestas excitatorias cuando las cuentas del número de disparos en cualquier bin de 1 mseg en los 500 mseg inmediatamente después de la estimulación fue 200 % mayor que la máxima cuenta encontrada

500 mseg antes de la estimulación. Las respuestas inhibitorias se consideraron cuando la duración de cualquier periodo silente (sin disparo) después de la estimulación fue 200 % mas largo que cualquier periodo silente antes de la estimulación. El análisis estadístico se realizó con el programa Statgraph, con la prueba de U de Mann-Whitney. El nivel de alfa se seleccionó a un valor de 0.05.

La localización de los electrodos se verificó por el análisis histológico de secciones seriales de cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  teñidos con violeta de cresilo. La localización de las neuronas registradas se estimó al comparar la posición del electrodo al momento del registro de acuerdo a la bitácora del experimento, con el sitio de lesión determinado en dibujos realizados bajo la cámara lúcida. La localización del electrodo de estimulación de la HIG en el tálamo se determinó directamente de los dibujos en la cámara lúcida.

De acuerdo a la localización de las neuronas registradas se dividieron en neuronas que estaban dentro ó fuera del NSQ. Adicionalmente las neuronas se dividieron en neuronas que respondían o no a algún tipo de estimulación tanto dentro como fuera del NSQ y todas se analizaron por separado.

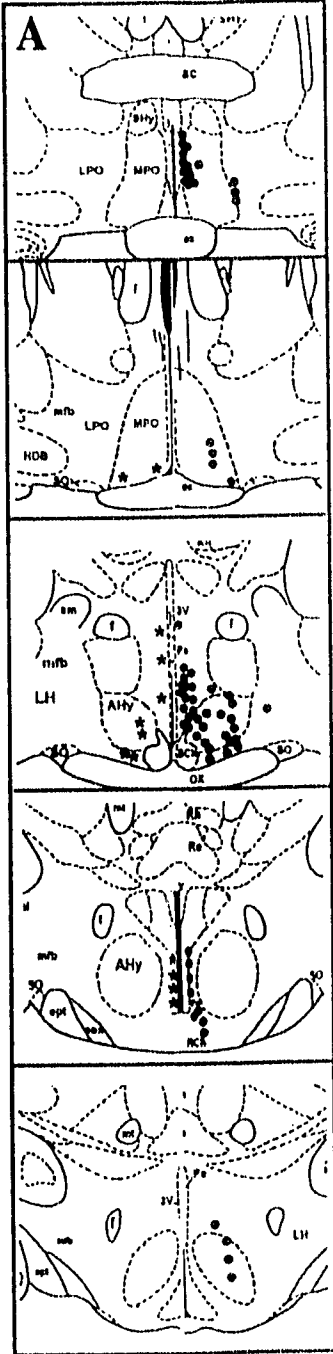
Se estimó la latencia y duración de las respuestas a los diferentes tipos de estimulación.

## 5. RESULTADOS

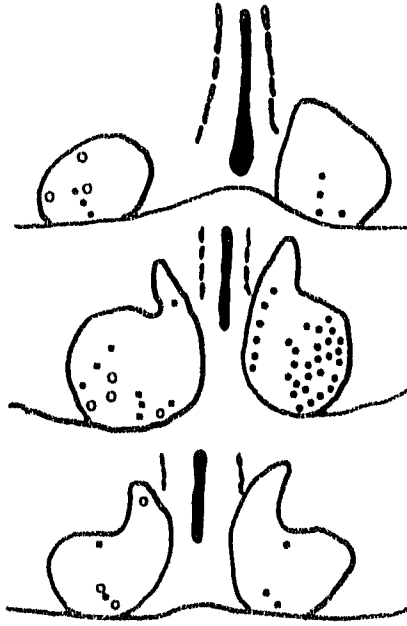
Se registraron un total de 262 neuronas en 61 animales (con un promedio de 4 neuronas registradas por animal). El análisis histológico mostró que 82 (31.3 %) neuronas se localizaron dentro del NSQ y 180 (68.7 %) neuronas se localizaron en el área hipotalámica circundante (no-NSQ). Las neuronas se localizaron en una región que comprendía un radio de 1,500  $\mu\text{m}$ , donde el NSQ se encontraba al centro.

El análisis por cepa nos mostró que del total de neuronas registradas, 184 se registraron en 56 ratas de la cepa Wistar (con un promedio de 3 neuronas registradas por animal) y 78 neuronas se registraron en 5 ratas de la cepa Sprague Dawley (con un promedio de 15 neuronas registradas por animal). El análisis histológico de las ratas Wistar mostró que 63 (34.2 %) neuronas se localizaron dentro del NSQ y 121 (65.8 %) neuronas se localizaron en el área hipotalámica circundante. En el caso de las neuronas registradas en las ratas Sprague Dawley, 19 (24.3 %) se localizaron dentro del NSQ y 59 (75.6 %) se localizaron en el área hipotalámica circundante. La distribución de las neuronas se muestra en la figura 7 y 8.

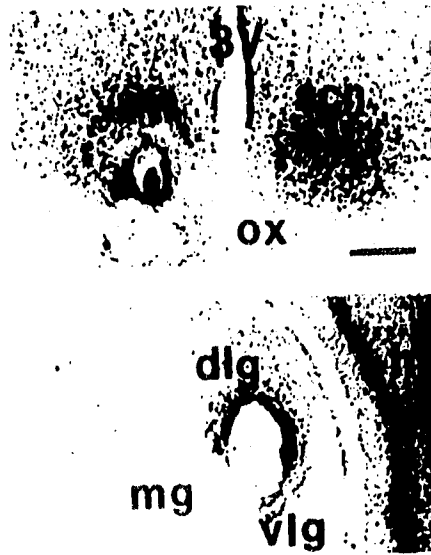
En cuanto a la frecuencia espontánea de disparo no se encontraron diferencias significativas entre las neuronas dentro del NSQ ( $0.9 \pm 0.85$  Hz) y neuronas fuera del NSQ ( $1.12 \pm 1.3$  Hz) en las ratas Wistar. Lo mismo ocurrió en las ratas Sprague en donde la frecuencia espontánea de disparo de las neuronas NSQ fue de  $1.20 \pm 1.74$  Hz y la de las neuronas no-NSQ fue de  $0.94 \pm 1.37$  Hz.



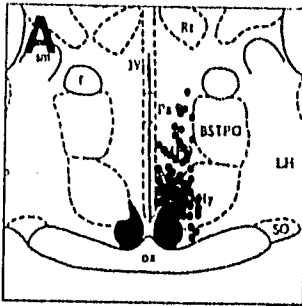
**B**



**C**



**Figura 7. Localización de los sitios de registro de neuronas registradas en ratas de la cepa Sprague-Dawley.** Se muestran los sitios de registro de las neuronas que respondieron a algún tipo de estimulación en el lado izquierdo de las figuras y de las neuronas que no respondieron en el lado derecho de las figuras (círculos cerrados). En el panel A se muestran los dibujos seriales de las áreas del hipotálamo en donde se registraron neuronas que estuvieron fuera del NSQ. En B, se representa el área de registro dentro del NSQ. (en \* aparecen las células que si respondieron a algún tipo de estimulación). Los círculos abiertos representan neuronas que respondieron al estímulo de luz; los cuadrados cerrados representan neuronas que respondieron a la estimulación eléctrica de la HIG; finalmente los asteriscos representan neuronas que respondieron a la estimulación simultánea de las dos aferentes. En la parte superior de C, se muestra una lesión en la parte ventral del NSQ producida al final de un trayecto del microelectrodo de registro; en la parte inferior se representa el sitio de lesión donde estuvo colocado el electrodo de estimulación de la HIG. OX, quiasma óptico; 3V, tercer ventrículo; SCN, núcleo supraquiasmático; dlq, núcleo geniculado dorsal lateral; vlg, núcleo geniculado ventral lateral; mg, núcleo geniculado medial; hi, hipocampo. Barra de calibración 250  $\mu$ m.



**B**

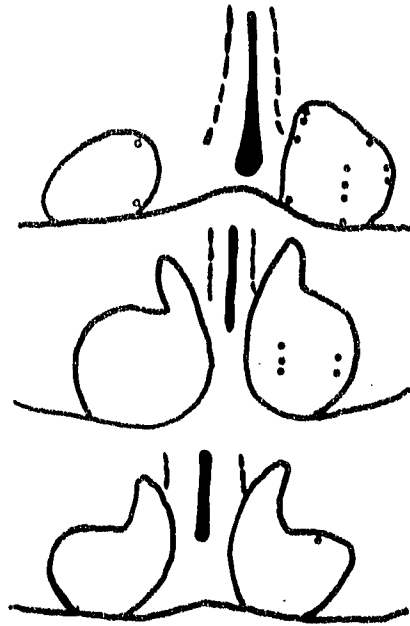


Figura 8. Localización de los sitios de registro de neuronas registradas en ratas de la cepa Wistar. Ver figura 7. En este caso no se muestra el panel C.



Al comparar la frecuencias de disparo de las neuronas registradas en las dos cepas por su localización (es decir, NSQ Wistar vs. NSQ Sprague y no-NSQ Wistar vs no-NSQ Sprague) no se encontraron diferencias significativas, por lo cual se tomo como un solo grupo al total de células registradas en ambas cepas.

Teniendo en cuenta a las dos cepas como un solo grupo se encontró que la frecuencia espontánea de disparo de las neuronas dentro del NSQ fue de  $0.97 \pm 0.93$  Hz y de las neuronas no-NSQ fue de  $1.05 \pm 1.32$  Hz, sin encontrarse diferencias significativas entre los dos grupos de neuronas.

Ambas poblaciones (neuronas NSQ y no-NSQ) respondieron a la estimulación retinal ó a la de la HIG, pero solo las neuronas del NSQ respondieron a ambos tipos de estimulación.

De las 82 neuronas del NSQ, 25 de ellas (30.5 %) respondieron a algún tipo de estimulación. De estas neuronas, un 48 % respondieron a la estimulación retinal y 28 % respondieron a la estimulación de la HIG. Se observó una sobreposición del 24 % de neuronas las cuales respondieron a los dos estímulos. La estimulación de la retina produjo de manera general respuestas excitatorias en un 41.7 % (Fig. 9a) y respuestas inhibitorias en un 58.3 % de las unidades (Fig. 9b). La estimulación en la HIG produjo respuestas excitatorias en un 28.5 % y respuestas inhibitorias en un 71.5 % de las unidades (Figs. 9c y d). La respuesta excitatoria a la estimulación retinal mostró una latencia promedio de  $50.3 \pm 17.43$  mseg y la de la estimulación a la HIG fue de  $50.8 \pm 34.7$  mseg. En cuanto a las respuestas inhibitorias, las producidas por la

estimulación retinal tuvieron una duración de  $67.5 \pm 41.5$  mseg; por otra parte, las producidas por la estimulación de la hojuela tuvieron una duración de  $145.4 \pm 74.5$  mseg.

En la figura 10 se representa la comparación de las respuestas para algunas neuronas registradas dentro y fuera del NSQ.

La actividad multiunitaria registrada en las fibras del quiasma óptico, presentaron 4 olas sucesivas de activación después de un pulso de estimulación; de las cuales las primeras dos olas mostraron latencias de  $32.7 \pm 8.6$  y  $75.0 \pm 3.0$  mseg respectivamente (Fig. 11).

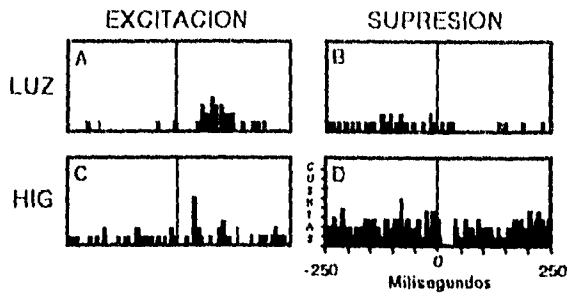
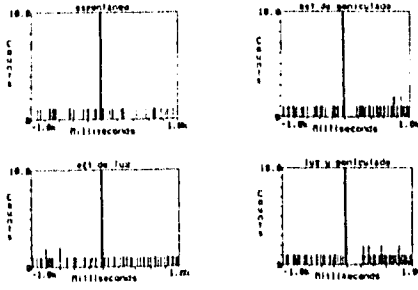
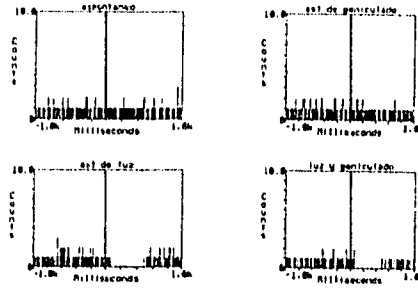
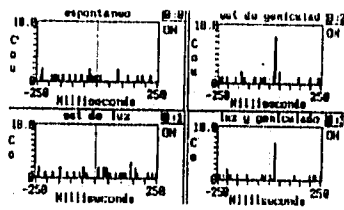


Figura 9. Histogramas peri-estímulo. Se muestran 4 ejemplos de las respuestas generales de excitación ó supresión encontradas en neuronas del NSQ. Los histogramas A y C, corresponden a respuestas de excitación producidas por la estimulación con pulsos de luz ó por estimulación eléctrica de la HIG. En los histogramas B y D, se ejemplifican las respuestas de supresión producidas por la estimulación con luz de la retina ó eléctrica de la HIG.

**A****B****C**

**Figura 10. Histogramas peri-estímulo.** Los histogramas son ejemplos específicos de las respuestas registradas en neuronas tanto dentro como fuera del NSQ. El panel A representa una neurona dentro del NSQ que responde con una supresión a la estimulación de la HIG. El panel B representa una neurona fuera del NSQ que responde con una supresión a la estimulación de la retina. El panel C representa una neurona dentro del NSQ que responde con una excitación a la estimulación de la HIG

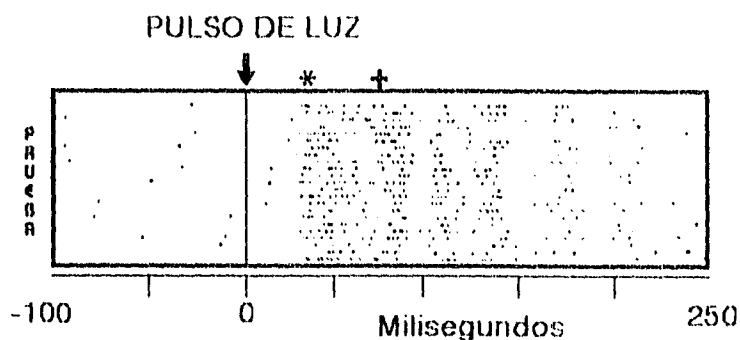


Figura 11. Dot-Raster. El Dot-Raster de construyo a partir de la respuesta multiunitaria registrada despues de la estimulación con luz de la retina (flecha). Se pueden apreciar las dos oleadas de activación, la primera a los 33 mseg aprox. (\*) y la segunda a los 75 mseg aprox. (+).

De las 180 neuronas registradas fuera del NSQ solo 13 (7.2 %) respondieron a algún tipo de estimulación. De éstas neuronas, 53.8 % respondieron a la estimulación de la retina y 46.2 % respondieron a la estimulación de la hojuela. Ninguna de las neuronas registradas fuera del NSQ respondieron a ambos tipos de estimulación. La estimulación retinal indujo respuestas excitatorias en 50 % de las unidades, la latencia de respuesta fue de  $35.0 \pm 5.0$  mseg. Las respuestas inhibitorias presentaron una duración de  $242.3 \pm 145.7$  mseg. La estimulación de la hojuela produjo solo respuestas inhibitorias con una duración de  $196.3 \pm 105.65$  mseg

Al considerar todas las neuronas registradas, se encontraron diferencias en la frecuencia de disparo espontánea, entre las neuronas que responden y

que no responden, sin tomar en cuenta su ubicación ni el tipo de estímulo aplicado. Las frecuencias de disparo fueron  $2.24 \pm 2.3$  en neuronas responsivas y  $0.96 \pm 1.2$  Hz en neuronas no responsivas. Las diferencias fueron significativas de acuerdo con la prueba de U de Mann-Whitney ( $Z=4.53$ ,  $p<0.001$ ).

El análisis de histogramas interespigas mostraron dos tipos de patrones de disparo. El patrón más frecuente consistió de una distribución asimétrica semejante a la distribución de Poisson (Fig. 12a). Un segundo patrón consistió de una distribución asimétrica, caracterizada por agrupamientos en múltiplos de un intervalo básico, generalmente de más de cuatro picos de amplitud decreciente. (Fig. 12b).

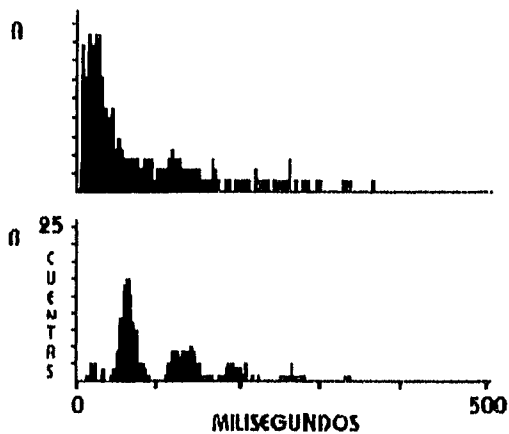


Figura 12. Histogramas de Intervalos. Los dos patrones de disparo observados en las neuronas registradas se muestran en esta figura. El panel A representa a una neurona con una distribución parecida a la de Poisson, mientras que el panel B muestra una neurona con una distribución armónica.

En la mayoría de los casos el patrón mostrado por las neuronas permaneció sin cambio después de los diferentes tipo de estimulación (Fig. 13) Sin embargo, algunas neuronas mostraron un cambio en el patrón de disparo después de la estimulación simultánea de la retina y la hojuela intergeniculada. En estos casos las neuronas que originalmente presentaron una distribución interespigas asimétrica (durante el periodo basal y la estimulación retinal ó de la HIG), cambiaron a el segundo patrón después de la estimulación simultánea de la retina y la hojuela (Fig. 14).

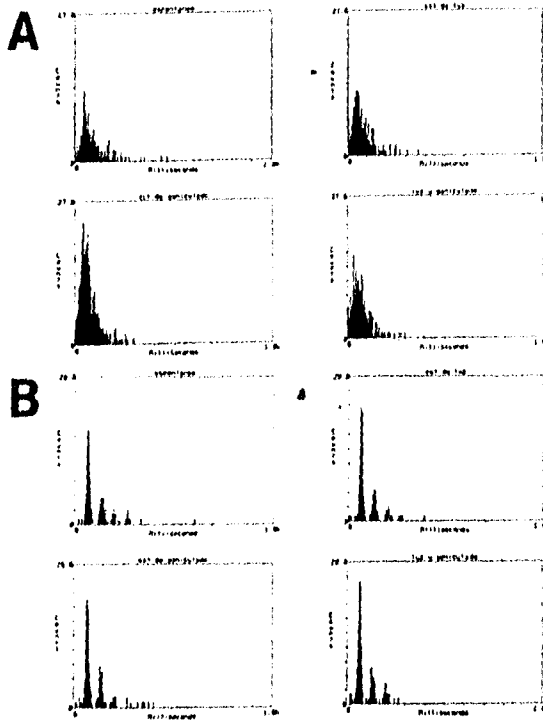


Figura 13. Histogramas de intervalos. Los histogramas representan los dos tipos de patrones de disparo encontrados y que además no cambian bajo ninguna de las condiciones de estimulación. El panel A muestra el patrón de disparo de una neurona fuera del NSQ y que presenta un patrón de Poisson. El panel B muestra el patrón de disparo de una neurona dentro del NSQ que presenta un patrón armónico.

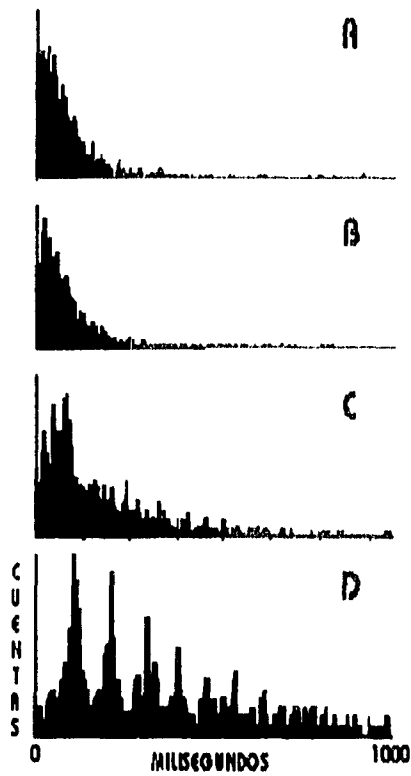


Figura 14. Cambio de patrón de disparo. En estos histogramas de intervalos se muestra el cambio de patrón ocurrido en una neurona del NSQ de un patrón de disparo de Poisson a un patrón armónico cuando se estimulan dos aferentes simultáneamente. En el panel A se muestra la condición basal, en B se muestra la estimulación de la retina, en C se muestra la estimulación de la HIG y finalmente en D se muestra el cambio del patrón de disparo cuando se estimulan tanto la retina como la HIG.



## **6. DISCUSION**

Los resultados encontrados muestran que existen cuatro grupos de neuronas en el NSQ de acuerdo a su respuesta a la estimulación de las aferentes visuales. El primer grupo corresponde a las células que no responden a ningún tipo de estimulación, las cuales comprenden aproximadamente a dos tercios de neuronas. El tercio sobrante de la población muestreada corresponde a células que si responden, las cuales pueden ser divididas en los siguientes tipos: tipo A, que responden exclusivamente a la estimulación fótica de la retina; tipo B, que responden exclusivamente a la estimulación eléctrica de la hojuela y; tipo C, que responden a ambos tipos de estimulación. La proporción de neuronas que no responden dentro del NSQ coinciden con los datos reportados en donde se estima alrededor de un 68 % (Meijer y cols., 1986). De los resultados, también se puede observar que la información visual proveniente de la HIG afecta a dos poblaciones neuronales claramente diferenciables dentro del supraquiasmático. Una población corresponde a una vía independiente del RHT (manifestado por las neuronas tipo B) mientras que la otra corresponde a una vía en donde la convergencia funcional de la información visual proveniente de la retina y la HIG (manifestado por las neuronas tipo C) se lleva a cabo. En el caso de las neuronas de la población A, éstas representan exclusivamente a las que son afectadas directamente por los estímulos luminosos aplicados.

En éste sentido, la identificación de las poblaciones B y C que son afectadas por la información proveniente de la HIG y de la retina adquiere importancia, pues podría estar representando el hecho de que la HIG procesa diferente tipo de información (fótica y no fótica) y la manda a diferentes

poblaciones del NSQ. Está establecido que la HIG no es necesaria para la sincronización fótica, pero que puede mediar algunos de los efectos paramétricos de la luz sobre el sistema circádico además de que es una estructura integradora de luminiscencia (Pickard y cols., 1987; Harrington y Rusak, 1989; Zhang y Rusak, 1989; Johnson y cols., 1989; Pickard, 1989; Rusak y cols., 1989); esta relación de la HIG con el procesamiento de información luminosa nos lleva a pensar que dicha información que llega a la hojuela y al NSQ a través del TGH podría estar incidiendo sobre la población que nosotros clasificamos como tipo C sobre la cual también converge la información luminosa proveniente del RHT.

Por otro lado, recientemente se ha establecido que estímulos no-fóticos (por ejemplo pulsos de locomoción) pueden inducir cambios de fase en el sistema circádico de los animales (Mrosovsky, 1991; Wickland y Turek, 1991) y pueden sincronizar ritmos de actividad locomotora cuando son aplicados en forma periódica (Rebbs y Mrosovsky, 1989). En otros experimentos se ha observado que la inyección de triazolam (una benzodiazepina) produce cambios de fase en los animales a través de un aumento en la actividad locomotora y que son muy parecidos a los producidos por los pulsos de actividad (Turek, 1989). Los cambios de fase producidos por la inyección de triazolam son abolidos por la lesión de la región del geniculado lateral (Johnson y cols., 1988c) lo cual nos hace pensar que el efecto de la benzodiazepina lo ejerce sobre la HIG. Finalmente para completar esta idea se tienen reportes también muy recientes de que la HIG parece estar participando en la regulación de los cambios de fase inducidos por pulsos de actividad ya que su lesión evita o atenúa los cambios de fase producidos por estímulos no-fóticos. (Johnson y cols., 1988c; Janik y Mrosovsky, 1994; Wickland y Turek, 1994). Por lo tanto es posible especular que la población tipo B que hemos registrado y que solo

responde a la estimulación eléctrica de la HIG podría representar a las neuronas que están mediando las respuestas a estímulos no-fótico o simplemente neuronas que no responden a la intensidad del estímulo que nosotros utilizamos, a diferencia de la población C que parece representar a células que responden a estímulos luminosos mediados por el RHT y el TGH. En cuanto a la población del tipo A, ésta podría estar representando a las neuronas que solo responden a estimulación luminosa mediada solamente por el RHT y en la que no participa para nada el TGH.

En referencia a las respuestas específicas del NSQ, los resultados indican una proporción muy similar de neuronas que se activaron o se suprimieron después de la estimulación retinal o de la hojuela. Los resultados difieren de los encontrados previamente (Groos y Mason, 1978,1980; Inouye, 1984) ya que indican predominantemente una activación neuronal después de la estimulación retinal. La diferencia podría estar dada a los diferentes parámetros de estimulación con luz entre éste y estudios previos. Nosotros utilizamos, para la estimulación flashes cortos de 5 mseg de duración y de alta intensidad (600 lux), lo cual permitió producir respuestas de duración breve, de más de 10 mseg para la activación y 55 mseg para la inhibición. Se ha reportado que con estimulación de 500 mseg, una neurona activada por luz requiere de la presentación de más de 100 estímulos antes de la detección de la respuesta. Aunque, una sola prueba fue suficiente para la detección de la respuesta cuando la duración del estímulo fue de 2 min (Meijer y cols., 1986). Estos resultados, apoyan la hipótesis de que los cambios en la excitabilidad en el NSQ, puede resultar en función de la duración del estímulo. De manera alternativa, ya que las neuronas del NSQ responden monotónicamente incrementando su disparo como función de la intensidad de la iluminación, la proporción más baja de neuronas activadas con luz encontradas en el presente

trabajo, podría reflejar esto, aunque la intensidad de la luz es alta, debida a la corta duración del estímulo, el presente flujo fotónico, podría ser equivalente a una menor intensidad. En dicho caso, el número de neuronas activadas por luz podría esperarse que fuera menor en éste estudio. El uso de atropina en estudios previos para inducir midriasis, podría contar al menos parcialmente para las diferencias reportadas.

En cuanto a la latencias de respuesta después de la estimulación de la retina, se observó que las respuestas de activación en el NSQ fueron detectadas a los  $50.3 \pm 17.43$  mseg. En otros estudios se había reportado latencias que se encontraban de los 50 a los 140 mseg (Groos y Mason, 1978, 1980; Sawaki, 1979) y de los 200 mseg a los 20 seg (Meijer y cols., 1986). Las diferencias podrían estar dadas por los criterios empleados por los autores para definir si una respuesta era producida y a diferencias en la duración del estímulo aplicado. Se ha sugerido que la larga latencia de respuestas registradas en el NSQ podrían estar dadas por una combinación del retardo en la red neuronal de la retina y la baja velocidad de conducción debida a el diámetro tan pequeño de las fibras del RHT (Groos y Mason, 1978). Para tener un estimado directo de dichos factores, la respuesta multiunitaria a la estimulación fótica fue registrada desde el quiasma óptico en cinco animales. El quiasma óptico presentó olas sucesivas de activación después de un estímulo simple de luz (Fig. 11). Las latencias para las primeras dos olas fueron respectivamente  $32.7 \pm 8.6$  mseg y  $75.0 \pm 3.0$  mseg. Parece ser que las neuronas del supraquiasmático fueron estimuladas por la primera ola, ya que la latencia de respuesta de las neuronas del supraquiasmático se presentó antes de la llegada de la segunda ola de activación a el NSQ. Algunas de estas respuestas podrían ser mediadas por el TGH (Meijer y cols., 1986). Esto podría explicar el retraso de alrededor de 15 mseg, el cual excede el tiempo de

conducción de impulsos desde las células ganglionares hasta el NSQ, excepto para aquellas neuronas que respondieron exclusivamente a la estimulación de la retina. En tal caso, se podría asumir que el retraso corresponde a un circuito intrínseco del NSQ con varias sinápsis, sin embargo, la posibilidad de la existencia de fibras de conducción lenta no puede desecharse completamente.

Se tienen solo 2 reportes en los que se han observado latencias de potenciales postsinápticos excitatorios (PPE) menores a los 50 mseg. En el trabajo de Kim y Dudek (1991) en donde se realizaron registros intracelulares de neuronas del NSQ se reporta que la estimulación del nervio óptico a una distancia de aproximadamente 2.5 mm. del quiasma óptico produce PPE con una latencia de  $6.2 \pm 0.5$  ms, esta latencia es mucho menor que la que se ha reportado en otros trabajos, sin embargo hay que considerar que se está estimulando el nervio óptico directamente y no ocurre el retraso que implica el paso de información a través de todas las capas de la retina. Más recientemente Senseman y Rea (1994) mediante una técnica que involucra la utilización de una colorante sensible a cambios de voltaje, se estableció la presencia de 2 tipos de potenciales postsinápticos poblacionales (PPEP). El primero de ellos lo han denominado PPEP temprano y su latencia de aparición es de  $15.9 \pm 0.8$  mseg; el segundo tipo lo han denominado PPEP tardío y su latencia de aparición es de  $39.8 \pm 5.7$  mseg. Al comparar las latencias nosotros hemos observado que la latencia descrita en el presente trabajo ( $50.3 \pm 17.43$  mseg) se parece más a la latencia de aparición del PPEP tardío. Los autores concluyen que tal vez los PPEP tempranos estén representando a las neuronas del NSQ que son activadas por una vía monosináptica por la latencia corta y que las PPEP tardías estén representando a las neuronas del NSQ que son activadas a través de una vía polisináptica.

En otro modelo experimental (en neuronas sensoriales del acocil *Procambarus clarkii*) se ha tratado de explicar las latencias de respuesta largas asumiendo un mecanismo de sumación temporal, ya que se ha observado que a frecuencias bajas de estimulación la respuesta neuronal es caracterizada por la presencia de una espiga sencilla. Sin embargo, conforme la frecuencia de estimulación va aumentando la respuesta neuronal va aumentando, la respuesta neuronal cambia a un patrón de disparo en ráfagas. El incremento de la frecuencia de estimulación permitiría que la depolarización de la membrana neuronal alcanzara un valor umbral para que los canales iónicos involucrados en la regulación del patrón de disparo por ráfagas se manifestarán, por medio de un mecanismo de sumación temporal (Fernández de Miguel y Aréchiga, 1992).

Con estos resultados nosotros podemos pensar que debido a la similitud en la latencia de respuesta que hemos obtenido y la de los PPEP tardíos, las células registradas en el presente trabajo representen a las neuronas que son activadas por una vía polisináptica ó que las neuronas registradas presentan una latencia larga de respuesta debido a que ocurre un fenómeno de sumación en ellas, este punto sería interesante de estudiar más tarde.

En cuanto a los resultados de la estimulación de la HIG observamos que la latencia para las respuestas de activación en el NSQ fueron de  $50.8 \pm 34.7$  mseg. Aun considerando que las fibras del TGH fueran también de baja conducción como las del RHT, el valor de la latencia sugiere la presencia de un circuito multisináptico antes de que se de el registro de la respuesta en el supraquiasmático.

Cerca del 10 % de las neuronas registradas fuera del NSQ presentaron respuestas ya sea a la estimulación de la retina ó de la HIG. La localización de las neuronas (Figs. 7 y 8) muestra una gran concordancia con el campo terminal

de las fibras provenientes de la retina, el cual ha sido reportado que se extiende más allá del NSQ principalmente hacia el núcleo paraventricular hipotalámico (Harrington y cols., 1985; Johnson y cols., 1988). La actividad espontánea de estas neuronas fue similar a la registrada dentro del supraquiasmático, sin embargo se encontró una diferencia significativa entre neuronas responsivas y no responsivas, sin importar la localización de las mismas. Dicho resultado es consistente con trabajos previos en relación a la alta probabilidad de respuesta de neuronas visuales del NSQ a frecuencias de disparo espontáneas muy altas. Esto sugiere que aunque las neuronas presentes en este estudio fueron de diferentes lugares anatómicos, podrían ser consideradas de la misma población funcional. En contraste ninguna de las neuronas no-NSQ respondieron a ambos tipos de estimulación; la estimulación de la HIG produjo solo respuestas inhibitorias y, la latencia a activación producida por la estimulación retinal fue de  $35.0 \pm 5.0$  mseg. Este último valor fue mucho más pequeño que el encontrado para neuronas del supraquiasmático, pero dentro del valor esperado de la latencia de respuestas en las fibras del quiasma óptico. Dichas diferencias podrían corresponder a retraso sináptico dentro del NSQ.

Los histogramas de intervalos interespigas (HII) mostraron dos patrones neuronales en el NSQ, el que se encontró con mayor frecuencia, es el que se asemeja a la distribución de Poisson. Otros estudios han denominado a éste como una curva log-normal (Thompson y cols., 1984), o una curva de Poisson para las neuronas registradas en rebanadas mantenidas in vitro (Zhang y cols., 1992). El segundo patrón, el cual hemos llamado armónico, fue una distribución asimétrica de gran amplitud agrupada en múltiplos de un intervalo básico (Fig. 12b). Aunque existe razón para creer que dicho patrón había sido observado previamente (ver fig. 1 en Thompson, 1984), fue reportado hasta recientemente (Zhang y cols., 1992). Los presentes resultados confirman la ocurrencia de

dicho patrón neuronal en el NSQ de ratas anestesiadas. Ninguna neurona mostró una distribución normal en el HII, en contraste con otros estudios indicando la presencia de dicho patrón (Groos y Mason, 1978, 1980; Meijer y cols., 1986; Shibata y cols., 1984; Thompson y cols., 1984; Zhang y cols., 1992). Hasta ahora no se tiene una explicación para dicha diferencia. La estimulación simultánea de la retina y la hojuela produce cambios de la misma magnitud y dirección que los encontrados por la estimulación de una sola aferencia. Esto sugiere que no hay interacción sinérgica ni antagónica entre ésta vías a nivel del NSQ. Esto debe tomarse con cautela por que no se tiene ningún dato que estime el retardo en la transmisión de la información de la retina a el NSQ vía el TGH, el cual debe ocurrir en condiciones naturales después de la estimulación con luz. En algunos casos la estimulación simultánea alteró el patrón de disparo. Las neuronas con patrón de Poisson no mostraron cambios cuando la retina o la HIG fueron estimulados individualmente, sin embargo, después de la estimulación simultánea el patrón cambio a uno armónico (Fig. 12b). Estos resultados sugieren una modulación del patrón de disparo como resultado de la interacción entre el RHT y el TGH sobre las neuronas del NSQ. Estos resultados se muestran consistentes con los reportados en un modelo propuesto recientemente (Zhang y cols., 1992).

En otro modelo experimental se ha encontrado que la estimulación eléctrica de la HIG por largos periodos de tiempo, produce la aparición de inmuno-reactividad a Fos en una porción específica del NSQ la cual se cree que es el resultado de la estimulación antidrómica de células ganglionares retinales y no propiamente a la estimulación directa de la TGH (Treep y cols., 1995). Los resultados que nosotros obtuvimos al estimular eléctricamente la hojuela no pueden descartar también una estimulación antidrómica de las células ganglionares retinales.



La relevancia funcional para el acoplamiento de la ritmicidad por las aferencias directas retinales sobre el NSQ ha sido discutido en otros estudios (Card y Moore, 1991) así como la contribución de la HIG en éste proceso (Harrington y Rusak, 1986; Pickard y cols., 1987; Rusak y cols., 1989).

Finalmente, es importante mencionar que se necesitan realizar más trabajos con el fin de explorar el papel modulador que ejercen otras aferentes al NSQ sobre su actividad eléctrica así como la posible interacción de dichas aferentes a través de microcircuitos funcionales, entendiendo por circuitos neuronales a la relación específica que se establece entre las aferentes dentro del NSQ y que desempeñan posiblemente un papel funcional específico en los mecanismos de sincronización (ver Fig. 15).

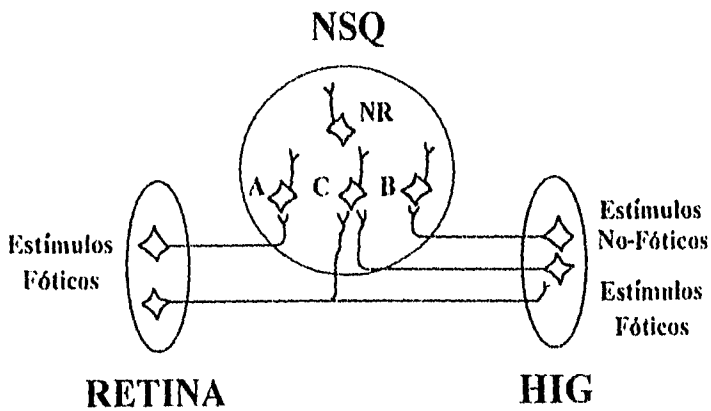


Figura 15. Este dibujo representa un modelo de la posible interacción que existe entre las aferentes RHT y TGH dentro del NSQ y que pueden estar modulando la actividad eléctrica del mismo. También se representan las poblaciones neuronales encontradas en el presente trabajo.

## 7. CONCLUSIONES

- Las neuronas del NSQ responden a las estimulación con pulsos cortos de luz aplicados a la retina y a la estimulación eléctrica de la HIG produciendo tanto respuestas excitatorias como respuestas de supresión.
- La presencia de tipos neuronales (grupos A, B y C) dentro del NSQ que responden solo a determinados estímulos establece la existencia de microcircuitos funcionales encargados de la transmisión de información a cada uno de ellos.
- La presencia del tipo neuronal C dentro del NSQ establece la existencia de convergencia de información proveniente de las dos aferentes estudiadas solo en el NSQ.
- La respuesta por parte de neuronas del hipotálamo circundante a la estimulación fótica de la retina y eléctrica de la HIG señala que existe una pequeña radiación de información a estas otras zonas, cuya importancia funcional debe ser estudiada.

## 8. REFERENCIAS

Agarwala, S., May, J.G., Moore, J.K. y Petry, H.M. (1992a) Immunohistochemical organization of the ventral lateral geniculate nucleus in the ground squirrel. J. Comp. Neurol. 318:255-266.

Agarwala, S., Güllük, A.E. May, J.G., y Petry, H.M. (1992b) Immunohistochemical organization of the ventral lateral geniculate nucleus in the tree shrew. J. Comp. Neurol. 318:267-276.

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

Aguilar-Roblero, R. y Drucker-Colin, R. (1987) The role of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of circadian rhythms in mammals. Bol. Est. Méd. Biol. 35:35-51.

Aguilar-Roblero, R., Shibata, S., Spheeris, J., Drucker-Colin, R. y Moore, R.Y. (1992) Morphological and functional development of the SCN in transplanted fetal hypothalamus. Brain Res. 580:288-296.

Aguilar-Roblero, R. y Vega-González, A. (1993) Splitting of locomotor circadian rhythmicity in hamsters is facilitated by pinealectomy. Brain Res. 605:229-236.

Albers, H. E. y Ferris, C.F. (1984) Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. Neurosci. Lett. 50:163-168.

Albers, H.E., Ferris, C.F., Leeman, S.E. y Goldman, B.D. (1984) Avian pancreatic polypeptide phase shifts hamster circadian rhythms when microinjected into the suprachiasmatic region. Science 223:833-835.

Albers, H.E., Liou, S-Y., Stopa, E.G. y Zoeller, R.T. (1992) Neurotransmitter colocalization and circadian rhythms. En: Progress in Brain Res. Cap. 25. (Joosse, J., Buijs, R.M. y Tilders, F.J.H. eds.) Elsevier Science Publishers B.V. pp 289-307.

Aréchiga, H., Huberman, A. y Naylor, E. (1974) Hormonal modulation of circadian neural activity in the crab *Carcinus maenas* (L.). Proc. Roy. Soc. Lond. B. 187: 299-313.

Aréchiga, H. (1983) Mecanismos de integración de los ritmos biológicos. Ciencia 34:141-152.

**Aréchiga, H., Fernández-Quiróz, F., Fernández de Miguel, F. y Rodríguez-Sosa, L.** (1993) The circadian system of crustaceans. Chronobiol. Int. 10:1-19.

**Armstrong, S.M.** (1989) Melatonin: the internal Zeitgeber of mammals?. Pineal Res. Rev. 7:157-202.

**Aschoff, J.** (1990) A survey on biological rhythms. En: Handbook of behavioral neurobiology Vol. 4. Biological Rhythms. (Aschoff, J. ed.) Plenum Press. pp 3-10.

**Azmitia, E.C., y Segal, M.** (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. J. Comp. Neurol. 179:641-668.

**Berk, M.L., y Finkelstein, J.A.** (1981) An autoradiographic determination of the efferent projections to the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. Brain Res. 226:1-13.

**Biello, S.M., Harrington, M.E. y Mason, R.** (1991) Geniculo-hypothalamic tract lesions block chlordiazepoxide-induced phase advances in Syrian hamsters. Brain Res. 552:47-52.

**Bosler, O., y Beaudet, A.** (1985) VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in the rat suprachiasmatic nucleus radioautographic and immunocytochemical study. J. Neurocytol. 14:749-763.

**Bos, N.P.A. y Mirmiran, M.** (1993) Effects of excitatory and inhibitory aminoacids on neuronal discharges in the cultured suprachiasmatic nucleus. Brain Res. Bull. 31:67-72.

**Bos, N.P.A. y Mirmiran, M.** (1990) Circadian rhythms in spontaneous neuronal discharges of the cultured suprachiasmatic nucleus. Brain Res. 511:158-162.

**Cagampang, F.R.A. e Inouye, S.I.T.** (1994) Diurnal and circadian changes of serotonin in the suprachiasmatic nuclei: regulation by light and an endogenous pacemaker. Brain Res. 639:175-179.

**Card, J.P., Brecha, N., Karten, J.H. y Moore, R.J.** (1981) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic microscopic analysis. J. Neurosci. 1:1289-1303.

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

**Card, J.P., Fitzpatrick-McEillgott, S., Gozes, I. y Baldino, F.** (1988) Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. Cell Tissue Res. 252:307-315.

- Card, J.P. y Moore, R.Y.** (1988) Neuropeptide Y localization in the rat suprachiasmatic nucleus and periventricular hypothalamus. Neurosci. Lett 88:241-246.
- Card, J.P. y Moore, R.Y.** (1989) Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. J. Comp. Neurol. 284:135-147.
- Card, J.P., y Moore, R.Y.** (1991) The organization of visual circuits influencing the circadian activity of the suprachiasmatic nucleus. En: Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock (Klein, D.C., Moore, R.Y., Reppert, S.M. eds) Oxford University Press. pp 51-76.
- Cassone, V.M., Chesworth, M.J. y Armstrong, S.M.** (1986a) Dose-dependent entrainment of rat circadian rhythms by daily injections of melatonin. J. Biol. Rhythms. 1:219-229.
- Cassone, V.M., Chesworth, M.J. y Armstrong, S.M.** (1986b) Entrainment of rat circadian rhythms by daily injection of melatonin depends on the hypothalamic suprachiasmatic nuclei. Physiol. & Behav. 36:1111-1121.
- Cassone, V.M., Roberts, M.H. y Moore, R.Y.** (1988) Effects of melatonin on 2-deoxy(1-<sup>14</sup>C) glucose within the rat suprachiasmatic nucleus. Am. J. Physiol. 255:R332-R337.
- Cassone, V.M.** (1990) Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. TINS. 13:457-464.
- Cassone, V.M.** (1992) The pineal gland influences rat circadian activity rhythms in constant light. J. Biol. Rhythms. 7:27-40.
- Colwell, C.S., Ralph, M.R., y Menaker, M.** (1990) Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior?. Brain Res. 523:117-120.
- Colwell, C.S., y Menaker, M.** (1992) NMDA as well as Non-NMDA receptor antagonists can prevent the phase-shifting effects of light on the circadian system of the golden hamster. J. Biol. Rhythms. 7:125-136.
- Colwell, C.S., Kaufman, C.M. y Menaker, M.** (1993) Phase-shifting mechanism in the mammalian circadian system: key light on the carbachol paradox. J. Neurosci. 13:1454-1459.
- Daikoku, S., Hisano, S. y Kagotani, Y.** (1992) Neuronal associations in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrated by immunoelectron microscopy. J. Comp. Neurol. 325:559-571.
- Decavel, C., y van den Pol, A.** (1990) GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. J. Comp. Neurol. 302:1019-1037.
- de Vries, M.J., Cardozo, B.N., van der Want, J., de Wolf, A. y Meijer, J.H.** (1993) Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat. Brain Res. 612:231-237.
- de Vries, M.J., Treep, J.A., de Pauw, E.S.D. y Meijer, J.H.** (1994) The effects of electrical stimulation of the optic nerves and anterior optic chiasm on the circadian rhythm of the syrian hamster: involvement of excitatory aminoacids. Brain Res. 642:206-212.
- Drucker-Colin, R., Aguilar-Roblero, R., García-Hernández, F., Fernández-Cancino, F. y Bermúdez-Rattoni, F.** (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. Brain Res. 311:353-357.

Duncan, W.C., Tamarkin, L., Sokolove, P.G. y Wehr, T.A. (1988) Chronic clorgyline treatment of syrian hamster: an analysis of effects on the circadian pacemaker. J. Biol. Rhythms. 3:305-322.

Dussailant, M., Sarriveau, A., Gozes, I., Berod, A. y Rostene, W. (1992) Distribution of cells expressing vasoactive intestinal peptide/peptide histidine isoleucine-amide precursor messenger RNA in the rat brain. Neuroscience. 50:519-530.

Earnest, D.J. y Sladek, C.D. (1986) Circadian rhythms of vasopressin release from the individual rat suprachiasmatic explants in vitro. Brain Res. 382:129-133.

Earnest, D.J. y Sladek, C.D. (1987) Circadian vasopressin release from perfused rat suprachiasmatic explants in vitro: effects of acute stimulation. Brain Res. 422:398-402.

Edgar, D.M., Miller, J.D., Prosser, R.A., Dean, R.R. y Dement, W.C. (1993) Serotonin and the mammalian circadian system: II. phase-shifting rat behavioral rhythms with serotonergic agonists. J. Biol. Rhythms. 8:17-31.

Fernández-de-Miguel, F. y Aréchiga, H. (1992) Sensory inputs mediating two opposite behavioral responses to light in the crayfish *Procambarus clarkii*. J. Exp. Biol. 164:153-169.

Foote, W.E., Taber-Pierce, E., y Edwards, L. (1978) Evidence for a retinal projection to the midbrain raphe of the cat. Brain Res. 156:135-140.

Francois-Bellan, A.M., Kachidian, P., Dusticier, G., Tonon, M.C., Vaudry, H. y Bosler, O. (1990) GABA neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: involvement in chemospecific synaptic circuitry and evidence for GAD-peptide colocalization. J. Neurocytol. 19:937-947.

Francois-Bellan, A.M. y Bosler, O. (1992) Convergent serotonin and GABA innervation of VIP neurons in the suprachiasmatic nucleus demonstrated by triple labeling in the rat. Brain Res. 595:149-153.

Gannon, R.L., y Rea, M.A. (1993) Glutamate receptor immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nucleus. Brain Res. 622:337-342.

Gannon, R.L., y Rea, M.A. (1994) In situ hybridization of antisense mRNA oligonucleotides for AMPA, NMDA and metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat suprachiasmatic nucleus at different phases of the circadian cycle. Mol. Brain Res. 23:338-344.

Glass, J.D., Hauser, U.E., Blank, J.L., Setim, M., y Rea, M.A. (1993) Differential timing of amino acid and 5-HIAA rhythms in suprachiasmatic hypophalamus. Am. J. Physiol. 265:R504-R511.

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

Groos, G.A., y Mason R. (1978) Maintained discharge of rat suprachiasmatic neurons at different adaptation levels. Neurosci. Lett. 8:59-64.

Groos, G.A., y Mason R. (1980) The visual properties of rat and cat suprachiasmatic neurones. J. Comp. Physiol. 135:149-356.

Goos, G.A., y Hendriks, J. (1982) Circadian rhythm of firing in electrical discharges of rat suprachiasmatic neurons recorded in vitro. Neurosci. Lett. 34:283-288.

Guy, J., Bosler, O., Dusticier, G., Pelletier, G. y Calas, A. (1987) Morphological correlates of serotonin-neuropeptide Y interactions in the rat suprachiasmatic nucleus: combined radioautographic and immunocytochemical data. Cell Tissue Res. 250: 657-662.

Hao, S. y Semba, K. (1994) A direct retinal projection to the dorsal raphe nucleus in the rat. Brain Res. 635:159-168.

Harrington, M.E. , Nance, D. M y Rusak, B. (1985) Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. Brain. Res. Bull. 15:465-472.

Harrington, M.E. y Rusak, B. (1986) Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. J. Biol. Rhythms. 1:309-325.

Harrington, M.E., Nance, D.M., y Rusak, B. (1987) Double-labeling of neuropeptide Y-immunoreactive neurons which project from the geniculate to the suprachiasmatic nucleus. Brain Res. 410:275-282.

Harrington, M.E. y Rusak, B. (1989) Photic responses of geniculo-hypothalamic tract neurons in the Syrian hamster. Vis. Neurosci. 2:367-375

Hickey, T.L. y Spear, P.D. (1976) Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. Exp. Brain Res. 24:523-529.

Ibata, Y., Takahashi, Y., Okamura, H., Kubo, T. y Kawakami, F. (1988) Fine structure of NPY-containing neurons in the lateral geniculate nucleus and their terminals in the suprachiasmatic nucleus of the rat. Brain Res. 439:230-235.

Ibata, Y., Tanaka, M., Ichitani, Y., Takahashi, Y. y Okamura, H. (1993) Neuronal interaction between VIP and vasopressin neurones in the rat suprachiasmatic nucleus. Neuroreport. 4:128-130.

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

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

Inouye, S.I.T (1983) Does the ventromedial hypothalamic nucleus contain a self sustained circadian oscillator associated with periodic feeding?. Brain Res. 279:53-63.

Inouye, S.I.T (1984) Light responsiveness of the suprachiasmatic nucleus within the island with the retino-hypothalamic tract spared. Brain Res. 294:263-269.

Janik, D. y Mrosovsky, N. (1994) Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. Brain Res. 651:174-182.

Johnson, R.F., Morin, L.P., y Moore, R.Y. (1988a) Retinohypothalamic projections in the hamster and rat demonstrated using cholera toxin. Brain Res. 462:301-312.



Johnson, R.F., Moore, R.Y., y Morin, L.P. (1988b) Loose of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract. Brain Res. 460:297-313.

Johnson, R.F., Smale, L., Moore, R.Y. y Morin, L.P. (1988c) Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift responses to a benzodiazepine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:5301-5304.

Johnson, R.F., Moore, R.Y. y Morin, L.P. (1989) Lateral geniculate lesions alter activity rhythms in the hamster. Brain Res. Bull. 22:411-422.

Kalsbeek, A., Teclerian-Mesbah, R., y Póvot, P. (1993) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). J. Comp. Neurol. 332:293-314.

Kam, L.M. y Moberg, G.P. (1977) Effect of raphe lesions on the circadian pattern of wheel running in the rat. Physiol. & Behav. 18:213-217.

Kawakami, F., Okamura, H., Fukui, K., Yanahara, C., Yanahara, N., Nakajima e Ibata, I. (1985) The influence of serotonergic inputs on peptide neurons in the rat suprachiasmatic nucleus: an immunocytochemical study. Neurosci. Lett. 61:273-277.

Keefe, D.L., Earnest, D.J., Nelson, D., Takahashi, J.S. y Turek, F.W. (1987) A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks the phase-shifting effects of light on the circadian rhythm of locomotor activity in the golden hamster. Brain Res. 403:308-312.

Kim, Y. I. y Dudek, F.E. (1991) Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: excitatory synaptic mechanism. J. Physiol. 444:269-287.

Klein, D.C. y Moore, R.Y. (1979) Pineal-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase. Control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. Brain Res. 174:245-262.

Koumenis, C. y Eskin, A. (1992) The hunt for mechanisms of circadian timing in the eye of *Aplysia*. Chronobiology Int. 9:201-221.

Krieger, D.T. (1974) Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. Endocrinology. 106:649-654.

Krieger, D.T., Hauser, H. y Krey, L.C. (1977) Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. Science. 197:398-399.

Kubota, A., Inouye, S.T. y Kawamura, H. (1981) Reversal of multiunit activity and outside the suprachiasmatic nucleus in the rat. Neurosci. Lett. 27:303-308.

Kurumlya, S. y Kawamura, H. (1991) Damped oscillation of the lateral hypothalamic multineuronal activity synchronized to daily feeding schedules in rats with suprachiasmatic nucleus lesion. J. Biol. Rhythms. 6:115-127.

Levine, J.D., Rosenwasser, A.M., Yanovski, J.A. y Adler, N.T. (1986) Circadian activity rhythms in rats with midbrain raphe lesions. Brain Res. 384:240-249.

Levine, M.L., Weiss, M.L., Rosenwasser, A.M. y Miselis, R.R. (1991) Retinohypothalamic tract in the female albino rat: a study using horseradish peroxidase conjugated to cholera toxine. J. Comp. Neurol. 306:344-360.

Liou, S.Y., Shibata, S., Iwasaki, K. y Ueki, S. (1986) Optic nerve stimulation-induced release of  $^3\text{H}$ -glutamate and  $^3\text{H}$ -aspartate but not  $^3\text{H}$ -GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. Brain Res. Bull. 16:527-531.

Mantyh, P.W. y Kemp, J.A. (1983) The distribution of putative neurotransmitters in the lateral geniculate nucleus of the rat. Brain Res. 288:344-348.

Martinet, L., Servièrre, J. y Peytevin, J. (1992) Direct retinal projections of the "non-image forming" system to the hypothalamus anterodorsal thalamus and basal telencephalon of mink (*Mustela vison*) brain. Exp. Brain Res. 89:373-382.

Mason, R., Harrington, M.E. y Rusak, B. (1987) Electrophysiological responses of hamster suprachiasmatic neurones to neuropeptide Y in the hypothalamic slice preparation. Neurosci. Lett. 80:173-179.

Maxwell, R.C. y Fink, G. (1988) The connections between the suprachiasmatic, ventrolateral geniculate and raphe nuclei studied by uptake of [ $^{14}\text{C}$ ]2-deoxyglucose. Neuroscience. 24:265-274.

Menaker, M. (1969) Biological Clocks. BioScience. 19:681-689.

McArthur, A.J., Guillete, M.U. y Prosser, R.A. (1991) Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. Brain Res. 565:158-161.

Medanic, M. y Guillete, M.U. (1992) Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. J. Physiol. 450:629-642.

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

Meijer, J.H., y Groos, G.A. (1988) Responsiveness of suprachiasmatic nucleus and ventral lateral geniculate neurons to serotonin and imipramine: a microiontoporetic study in normal and imipramine-treated rats. Brain Res. Bull. 20:89-96.

Meijer, J.H., van der Zee, E. y Dietz, M. (1988a) Glutamate phase shifts circadian activity rhythms in hamsters. Neurosci. Lett. 86:177-183.

Meijer, J.H., van der Zee, E. y Dietz, M. (1988b) The effects of intraventricular carbachol injections on the free-running activity rhythm of the hamster. J. Biol. Rhythms. 3:333-348.

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

Meijer, J.H. (1991) Integration of visual information by the suprachiasmatic nucleus. En: Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock (Klein, D.C., Moore, R.Y., Reppert, S.M. eds) Oxford University Press. pp 107-119.

Meyer, E.L., Harrington, M.E. y Rahmanl, T. (1992) A phase-response curve to the benzodiazepine chlordiazepoxide and the effect of geniculo-hypothalamic tract ablation. Physiol. & Behav. 53:237-243.

- Mikkelsen, J.D.** (1992) The organization of the crossed geniculogeniculate pathway of the rat: a *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin study. Neuroscience. 48:953-962.
- Miller, J.D. y Fuller, C.A.** (1990) The response of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and serotonergic stimulation. Brain Res. 515:155-162.
- Miller, J.D., Murakami, D.M. y Fuller, C.A.** (1987) The response of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and nicotinic stimuli. J. Neurosci. 7:978-986.
- Minors, D.S., y Waterhouse, J.M.** (1981) Introduction and methods of study. En: Circadian rhythms and the human (Minors, D.S., y Waterhouse, J.M. eds), Wright PSG, London, pp 1-24.
- Minors, D.S., y Waterhouse, J.M.** (1988) Mathematical and statistical analysis of circadian rhythms. Psychoneuroendocrinology. 13:443-464.
- Moffett, J.R., Williamson, L.C., Neale, J.H., Palkovits, M., y Nambodiri, M.A.A.** (1990) N-Acetylaspartylglutamate: a transmitter candidate for the retinohypothalamic tract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:8065-8069.
- Moffett, J.R., Williamson, L.C., Neale, J.H., Palkovits, M., y Nambodiri, M.A.A.** (1991) Effect of optic nerve transection on N-acetylaspartylglutamate immunoreactivity in the primary and accessory optic projection systems in the rat. Brain Res. 538:86-94.
- Moga, M.M., Weis, R.P. y Moore, R.Y.** (1995) Efferent projection of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. J. Comp. Neurol. 359:221-238.
- Moore-Ede, M.C.** (1982) A physiological system measuring time. En: The Clocks That Time Us (Moore-Ede, M.C., Sulzman, F.M., Fuller, C.A. eds) Harvard University Press. pp 1-112.
- Moore, R.Y., y Eichler, V.B.** (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. Brain Res. 42:201-206.
- Moore, R.Y., y Lenn, N.J.** (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. J. Comp. Neurol. 146:1-14.
- Moore, R.Y.** (1973) Retinohypothalamic projection in mammals: a comparative study. Brain Res. 49:403-409.
- Moore, R.Y.** (1983) Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. Fed. Proc. 42:2783-2789.5.
- Moore, R.Y.** (1989) The geniculohypothalamic tract in monkey and man. Brain Res. 486:190-194.
- Moore, R.Y., Shigenobu, S. y Berstein, M.E.** (1989) Developmental anatomy of the circadian system. En: Research in perinatal medicine, vol. IX. Development of circadian rhythmicity and photoperiodism in mammals (Reppert, S.M. ed). Perinatology Press, pp 1-23.
- Moore, R.Y., Speh, J.C. y Card, J.P.** (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. J. Comp. Neurol. 352:351-366.

**Morin, L.P. y Blanchard, J.** (1991) Depletion of brain serotonin by 5,7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. Brain Res. 566:173-185.

**Morin, L.P., Blanchard, J. y Moore, R.Y.** (1992) Intergeniculate leaflet and suprachiasmatic nucleus organization and connections in the golden hamster. Vis. Neurosci. 8:219-230.

**Morin, L.P.** (1994) The circadian visual system. Brain Res. Rev. 67:102-127.

**Morin, L.P., Goodless-Sanchez, N., Smale, L., y Moore, R.Y.** (1994) Projections of the suprachiasmatic nuclei, subparaventricular zone and retrochiasmatic area in the golden hamster. Neuroscience. 61:391-410.

**Mosko, S. y Moore, R.Y.** (1978) Neonatal suprachiasmatic nucleus ablation: absence of functional and morphological plasticity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:6243-6246.

**Mrosovsky, N.** (1991) Double-pulse experiments with nonphotic and photic phase-shifting stimuli. J. Biol. Rhythms. 6:167-179.

**Murakami, N., Takamura, M., Takahashi, K., Utunomiya, K., Kuroda, H. y Etoh, T.** (1991) Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. Brain Res. 545:347-350.

**Murakami, D.M., Miller, J.D., y Fuller, C.A.** (1989) The retinohypothalamic tract in the cat: retinal ganglion cell morphology and pattern of projection. Brain Res. 482:283-296.

**Newman, G.C. y Hospod, F.E.** (1986) Rhythm of suprachiasmatic nucleus 2-deoxyglucose uptake in vitro. Brain Res. 381:345-350.

**Newman, G.C.** (1991) SCN metabolic activity in vitro. En: Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock (Klein, D.C., Moore, R.Y., Reppert, S.M. eds) Oxford University Press. pp 155-177.

**Norgren, R.B. y Lehman, M.N.** (1989) Retrograde transneuronal transport of Herpes simplex virus in the retina after injection in the superior colliculus, hypothalamus and optic chiasm. Brain Res. 479:374-378.

**Page, T.L.** (1982) Transplantation of the cockroach circadian pacemaker. Science. 216:73-75.

**Paxinos, G. y Watson, C.** (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press Australia.

**Penev, P.D., Turek, F.W., y Zee, P.C.** (1993) Monoamine depletion alters the entrainment and the response to light of the circadian activity rhythm in hamsters. Brain Res. 612:156-164.

**Pickard, G.E., y Silvermann, A.J.** (1981) Direct retinal projections to the hypothalamus, piriform cortex and accessory optic nuclei in the golden hamster as demonstrated by a sensitive anterograde horseradish peroxidase technique. J. Comp. Neurol. 196:155-172.

**Pickard, G.E. y Turek, F.W.** (1982) Splitting of a circadian rhythm of activity is abolished by unilateral lesion of suprachiasmatic nuclei. Science. 215:1119-1121.

- Pickard, G.E.** (1985) Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. Neurosci. Lett. 55:211-217.
- Pickard, G.E., Ralph, M.R. y Menaker, M.** (1987) The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. J. Biol. Rhythms. 2:35-56.
- Pickard, G.E.** (1989) Entrainment of the circadian rhythm of wheel-running activity is phase shifted by ablation of the intergeniculate leaflet. Brain Res. 494:151-154.
- Pittendrigh, C.S. y Daan, S.** (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. I. The stability and lability of spontaneous frequency. J. Comp. Physiol. 106:223-252.
- Pittendrigh, C.S.** (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. Annu. Rev. Physiol. 55:17-54.
- Possidente, B., Lumia, A.R., McEldowney, S. y Rapp, M.** (1991) Fluoxetine shortens circadian period for wheel-running activity in mice. Brain Res. Bull. 28:629-631.
- Prosser, R.A., Dean, R.R., Edgar, D.M., Heller, H.C. y Miller, J.D.** (1993) Serotonin and the mammalian circadian system: I. *In vitro* phase shifts by serotonergic agonists and antagonists. J. Biol. Rhythms. 8:1-16.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C. y Menaker, M.** (1990) Transplanted SCN determines circadian period. Science. 247:975-978.
- Rao, Z.R., Yamano, M., Wanaka, A., Tatehata, T., Shiosaka, S. y Tohyama, M.** (1987) Distribution of cholinergic neurons and fibers in the hypothalamus of the rat using choline acetyltransferase as a marker. Neuroscience. 20:923-934.
- Robbs, S.G. y Mrosovsky, N.** (1989) Effects of induced wheel running on the circadian activity rhythms of Syrian hamsters: entrainment and phase response curve. J. Biol. Rhythms. 4:39-48.
- Reedman, J., Armstrong, S. y Ng, K.T.** (1983) Free running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. Science. 219:1089-1091.
- Riley, J.N., Card, J.P. y Moore, R.Y.** (1981) A retinal projection to the lateral hypothalamus in the rat. Cell Tissue Res. 214:257-269.
- Roberts, S.** (1974) Circadian rhythms in cockroaches: effects of optic lobe lesions. J. Comp. Physiol. 88:21-24.
- Romero, M., Lehman, M.N. y Silver, R.** (1993) Age of donor influences ability of suprachiasmatic nucleus grafts to restore circadian rhythmicity. Dev. Brain Res. 71:45-52.
- Rosenwasser, A.M. y Adler, N.T.** (1986) Structure and function in circadian timing system: evidence for multiple coupled circadian oscillators. Neurosci. Biobehav. Rev. 10:431-448.
- Rusak, B. y Zucker, I.** (1979) Neural regulation of circadian rhythms. Physiol. Rev. 59:449-526.
- Rusak, B. y Groos, G.** (1982) Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. Science. 215:1407-1409.

- Rusak, B., Meljer, J.H. y Harrington, M.E. (1989) Hamster circadian rhythms are phase-shifted by electrical stimulation of the geniculo-hypothalamic tract. Brain Res. 493:283-291.
- Sawaky, Y. (1979) Suprachiasmatic nucleus neurones: excitation and inhibition mediated by the direct retino-hypothalamic projection in female rats. Exp. Brain Res. 37:127-138.
- Senseman, D.M. y Rea, M.A. (1994) Fast multisite optical recording of mono- and polysynaptic activity in the hamster suprachiasmatic nucleus evoked by retinohypothalamic tract stimulation. Neuroimage. 1:247-263.
- Schwartz, W.J. y Galner, H. (1977) Suprachiasmatic nucleus: use of <sup>14</sup>C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. Science. 197:1089-1091.
- Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H. y Hattori, K. (1982) Circadian rhythmic changes of neural activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. Brain Res. 247:154-158.
- Shibata, S., Oomura, Y., Liou, S.Y. y Ueki, S. (1984) Electrophysiological studies of the development of suprachiasmatic neuronal activity in hypothalamic slice preparations. Dev. Brain Res. 13:29-35.
- Shibata, S. y Moore, R.Y. (1993) Neuropeptide Y and optic chiasm stimulation affect suprachiasmatic nucleus circadian function in vitro. Brain Res. 615:95-100.
- Shinohara, K., Honma, S., Katsuno, Y., Abe, H. y Honma, K. (1994) Circadian rhythms in the release of vasoactive intestinal polypeptide and arginine-vasopressin in organotypic slice culture of rat suprachiasmatic nucleus. Neurosci. Lett. 170:183-186.
- Smale, L., Blanchard, J., Moore, R.Y. y Morin, L.P. (1991) Immunocytochemical characterization of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet in the diurnal ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. Brain Res. 563:77-80.
- Spoh, J.C. y Moore, R.Y. (1993) Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. Dev. Brain Res. 76:171-181.
- Steinbusch, H.W.M. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat cell bodies and terminals. Neuroscience. 6:557-618.
- Stephan, F.K., y Zucker, I. (1972a) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 69:1583-1586.
- Stephan, F.K., y Zucker, I. (1972b) Rat drinking rhythms: Central visual pathways and endocrine factors mediating responsiveness to environmental illumination. Physiol. & Behav. 8: 315-326.
- Swanson, L.W., Simmons, D.M., Whiting, P.J. y Lindstrom, J. (1987) Immunohistochemical localization of neuronal nicotinic receptors in the rodent central nervous system. J. Neurosci. 7:3334-3342.
- Takatsuji, K., Miguel-Hidalgo, J.J., y Tohyama, M. (1991) Substance P-immunoreactive innervation from the retina to the suprachiasmatic nucleus in the rat. Brain Res. 568:223-229.

Takeuchi, Y., Takashima, M., Katoh, Y., Nishikawa, T., y Takahashi, K. (1992) N-methyl-D-aspartate, quisqualate and kainate receptor are all involved in transmission of photic stimulation in the suprachiasmatic nucleus in rats. Brain Res. 563:127-131.

Takeuchi, Y., Katoh, Y., y Takahashi, K. (1993) Classical acetylcholine receptors do not play a direct role in neuronal transmission of photic information in the suprachiasmatic nucleus in rats. Neurosci. Lett. 158:71-74.

Thompson, A.M., West, D.C., y Vlachonikolls, I.G. (1984) Regular firing patterns of suprachiasmatic nucleus neurons maintained in vitro. Neurosci. Lett. 52:329-334.

Tomnaga, K., Shinohara, K., Otori, Y., Fukuhara, C., e Inouye, S.I.T. (1992) Circadian rhythms of vasopressin content in the suprachiasmatic nucleus of the rat. Neuroreport. 3:809-812.

Treep, J.A., Abe, H., Rusak, B. y Goguen, D.M. (1995) Two distinct retinal projections to hamster suprachiasmatic nucleus. J. Biol. Rhythms. 10:299-307.

Truman, J.W. (1974) Circadian rhythmicity in an insect brain. En: The neurosciences third study program. Schmitt, F.O. (ed), MIT Press, Cambridge, pp 525-529.

Turek, F.W. (1989) Effects of stimulated physical activity on the circadian pacemaker of vertebrates. J.Biol. Rhythms. 4:135-147.

Underwood, H. (1990) The pineal and melatonin: regulators of circadian function in lower vertebrates. Experientia. 46:120-128.

van den Kar, L.D., y Lorens, S.A. (1979) Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and median midbrain raphe nuclei. Brain Res. 162:45-54.

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

van den Pol, A.N. y Tsujimoto, K.L. (1985) Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. Neurosciences. 15:1049-1086.

van den Pol, A.N. y Gorcs, T. (1986) Synaptic relationships between neurons containing vasopressin, gastrin-releasing peptide, vasoactive intestinal polypeptide, and glutamate decarboxylase immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus: dual ultrastructural immunocytochemistry with gold-substituted silver peroxidase. J. Comp. Neurol. 252:507-521.

van den Pol, A.N., Wuarin, J.P. y Dudek, F.E. (1990) Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. Science. 250:1276-1278.

van den Pol, A.N. (1991) The suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. En: Suprachiasmatic Nucleus.

The Mind's Clock (Klein, D.C., Moore, R.Y., Reppert, S.M. eds) Oxford University Press. pp 17-50

van den Pol, A. y Trombley, P.Q. (1993) Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission. J. Neurosci. 13:2829-2836.

van der Zee, E.A., Streefland, C., Strosberg, A.D., Schröder, H., y Luiten, P.G.M. (1991) Colocalization of muscarinic and nicotinic receptors in cholinceptive neurons of the suprachiasmatic region in young and aged rats. Brain Res. 542:348-352.

Vanecsek, J., Pauik, A. e Ilnerova, H. (1987) Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. Brain Res. 435:359-362.

Vertes, R.P. (1991) A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. J. Comp. Neurol. 313:643-668.

Watts, A.G. (1991) The organization of visual circuits influencing the circadian activity of the suprachiasmatic nucleus. En: Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock (Klein, D.C., Moore, R.Y., Reppert, S.M. eds) Oxford University Press. pp 77-106.

Wever, R.A. (1975) The circadian multi-oscillator system of man. Int. J. Chronobiol. 3:19-55.

Wickland, C.R. y Turek, F.W. (1991) Phase-shifting effects of acute increases in activity on circadian locomotor rhythms in hamsters. Am. J. Physiol. 261:R1109-R1117.

Wickland, C.R. y Turek, F.W. (1994) Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster. Brain Res. 660:293-300.

Wisden, W. y Seeburg, P.H. (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. J. Neurosci. 13:3582-3598.

Youngstrom, T.G., Weiss, M.L. y Nunez, A.A. (1987) A retinal projection to the paraventricular nuclei of the hypothalamus in the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). Brain Res Bull. 19:747-750.

Zhang, D.X. y Rusak, B. (1989) Photic sensitivity of geniculate neurons that project to the suprachiasmatic nuclei or contralateral geniculate. Brain Res. 504:161-164.

Zhang, L., Aguilar-Roblero, R. y Barrio, R. (1992) A new pattern of neuronal firing in the suprachiasmatic nucleus in vitro and a possible mechanism which induces rhythmicity. Bol. Est. Med. Biol. 40:31-40.

Zhang, L. y Aguilar-Roblero, R. (1995) Asymmetrical electrical activity between the suprachiasmatic nuclei in vitro. Neuroreport. 6:537-540.

