

03068

A
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS FISILOGICAS
DE LA UNIDAD ACADÉMICA DE CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO



CARACTERIZACION METABOLICA DE LA
ACTIVIDAD CIRCADICA DEL TRANSPLANTE
DE NUCLEO SUPRAQUIASMATICO FETAL

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FISILOGICAS
P R E S E N T A :
E L B I O L O G O
JORGE ALBERTO ESCANDON CALDERON

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAUL AGUILAR ROBLERO

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

"Hace muchos años un hombre soñó
un imperio, un imperio muy grande.
Tenía buena cara y no paraba de hablar
con el hombre más querido y odiado del lugar.
Y soñaba tener un jardín florido
una patria de México al pie;
con hermanos de toda calaña y en sus sueños gritaba:
!! me hundo, me hundo, me hundo...!!
Y nadie supo como vine a parar yo
al Tercer Mundo."

Estrofa de una canción de Fito Paez del disco de Tercer Mundo. Cualquier parecido con algún personaje político del país es mera coincidencia.

Agradecimientos:

Expreso mi agradecimiento a:

-El Dr. Raul Aguilar por brindarme un espacio y tener paciencia en mi indagación en esa herramienta de pensamiento denominada "Ciencia".

-A la pareja conformada por el Dr. Cintra y la Dra. Diaz porque me brindaron el apoyo y la confianza para iniciar esta aventura llamada maestría

-Al Dr. Valverde por enseñarme esa soberbia y efectiva critica de los espíritus contestatarios

-A Ivette Caldelas por atreverse a lidiar por mi con la "caja negra" de la burocracia.

-A Alberto, Daniel, Arturo, Patty, Jose Luis, Carlos y Ricardo por contribuir con acaloradas discusiones que hacían de lo cotidiano algo especial.

-A Jackie, Pilar, Victor, Maribel, Tere, Oscar, Nicolás, Benjamin, Lúcia, Laura, Ana Luisa, Humberto, Denhi y todos los estudiantes por llenar de vida los pasillos de la institución.

-A la Mafer y al Didi por su ayuda técnica.

Este trabajo se realizó con el apoyo de los proyectos IN200794 e IN208494 de la DGAPA.

ÍNDICE

Glosario	4
Resumen	7
Antecedentes	8
Los ritmos circádicos	8
Medida del lapso temporal	11
Reconocimiento del tiempo local	12
Mecanismos de sincronización	12
Introducción	14
El NSQ como marcapasos circádico	14
Neuroquímica del NSQ	16
Osciladores circádicos múltiples	18
Relaciones del sistema circádico con otros sistemas rítmicos	23
Relaciones infradianas y circadianas	23
Actividad metabólica del NSQ	25
Los trasplantes de tejido nervioso	26
Aspectos funcionales de los trasplantes	27
Mecanismos de acción de los trasplantes	29
Antecedentes específicos	30
Planteamiento del problema	32
Hipótesis y objetivos	34
Material y métodos	35
Diseño Experimental	39
Resultados	41
Discusión	43
Conclusiones	49
Bibliografía	50

GLOSARIO

-Acoplamiento: Proceso mediante el cual un oscilador ajusta su periodo y su fase al de otro oscilador o marcapaso endógeno del organismo.

-Amplitud: Diferencia de intensidad entre el máximo (o mínimo) y el valor medio en una oscilación sinusoidal; se usa frecuentemente cuando se comparan diversas oscilaciones.

-Angulo de fase: Valor sobre la abscisa correspondiente a la fase de la oscilación, dada en grados o cualquier otra fracción del periodo completo con referencia a un punto arbitrario definido con un valor 0. Puede ser dado en unidades de tiempo, si la longitud del periodo es establecida.

-Cambio de fase: Desplazamiento de una oscilación a lo largo del eje temporal; puede ocurrir instantáneamente o después de varios ciclos transientes.

-Circa-ritmos: Clases de oscilaciones con capacidad de mantenerse en condiciones constantes, con periodos aproximados al ciclo ambiental al cual están normalmente sincronizadas y que son influenciadas por determinada señal ambiental.

-Coordinación relativa: Modulaciones del periodo de un ritmo, que se dan cuando el organismo es expuesto a una señal ambiental con una capacidad moderada para la sincronización del ritmo.

-Desincronización: Pérdida en la relación previamente existente del zeitgeber y un ritmo endógeno, mostrando cada uno diferentes periodos.

-Desacoplamiento: Pérdida en la relación de fase existente entre dos o más ritmos en el interior del organismo, mostrando cada uno diferentes periodos.

-Fase: Estado instantáneo de una oscilación dentro de un periodo, representado por el valor de la variable y todas sus derivadas en el tiempo.

- Fotoperiodo:** Duración del lapso de iluminación en un ciclo de luz-obscuridad.
- Frecuencia:** Número de veces que se repite un evento rítmico en un intervalo de tiempo. Es el recíproco del periodo.
- Infradiano:** Ritmo biológico con una frecuencia menor (periodo mayor) de 24 hrs.
- Marcapaso:** Entidad funcional capaz de mantener oscilaciones autosostenidas, la cual a su vez, se sincroniza a estímulos ambientales y acopla a otros ritmos endógenos.
- Oscilador:** Entidad funcional capaz de mantener una serie de oscilaciones.
- Oscilar:** Presencia de un patrón recurrente dentro de cierto margen de regularidad en una variable física o biológica.
- Oscilación espontánea:** Estado de un circa-ritmo en ausencia de agentes sincronizadores durante el cual se manifiesta el periodo endógeno del oscilador.
- Periodo:** Intervalo de tiempo después del cual una fase definida de la oscilación ocurre o se repite.
- Ritmo endógeno:** Patrón rítmico generado en el interior del organismo y que se caracteriza por ser autosostenido.
- Ritmo exógeno:** Patrón rítmico generado por influencias de una oscilación ambiental sobre el organismo, no es autosostenido.
- Sincronización:** Capacidad de un oscilador de adecuar e igualar su periodo y su fase, a fracciones múltiples del periodo de un agente geofísico. Para que se lleve a cabo, es necesario el reconocimiento del organismo a determinada señal ambiental.
- Transitorio:** Curso temporal de un ritmo endógeno, entre dos o más estados de oscilación estables.

-Ultradiano: Ritmo biológico con una frecuencia mayor (periodo menor) a 24 hrs.

-Zeitgeber: Fenómeno ambiental oscilatorio que sincroniza a un ritmo biológico autosostenido.

RESUMEN

Los trasplantes de tejido cerebral son una herramienta metodológica que ha sido relevante en ciertos aspectos relacionados con el funcionamiento del Sistema Nervioso Central. Estudios previos han demostrado la capacidad de los trasplantes de Núcleo Supraquiasmático (NSQ) fetal para inducir la recuperación del ritmo circádico de ingesta de agua en ratas que habían perdido dicho ritmo por la lesión previa del NSQ.

El presente trabajo tienen como objetivo determinar la relación de fase de la actividad metabólica entre el trasplante de NSQ fetal localizado en la zona ventricular y el NSQ del hospedero mediante la técnica de 2-DG.

En el grupo de animales transplantados a tercer ventrículo las curvas de actividad metabólica tanto del trasplante de NSQ fetal como las del NSQ hospedero, muestran una clara oscilación circádica; en ambos casos el máximo de actividad ocurre a la hora circádica 06 y el mínimo a la hora circádica 20. En el grupo de animales transplantados a ventrículo lateral, la curva de actividad metabólica del NSQ hospedero muestra una oscilación circádica, no siendo así en el trasplante de NSQ fetal. Esto sugiere que en el caso de animales con trasplante en tercer ventrículo, se observa un acoplamiento entre osciladores; mientras que en el grupo con trasplante en ventrículo lateral, no hay acoplamiento.

ANTECEDENTES

LOS RITMOS CIRCÁDICOS

La existencia de un patrón recurrente dentro de cierto margen de regularidad en diversas escalas temporales se define como ritmo. Las fluctuaciones periódicas en los parámetros fisiológicos parecen ser una de las propiedades básicas de los seres vivos ya que se observan desde los organismos unicelulares hasta el hombre (Bunning, 1960, 1973). Desde sus orígenes, hace varios millones de años, la vida se ha acoplado a cambios rítmicos pronunciados en el medio ambiente. El resultado ha sido la existencia de una amplia gama de programas temporales-mareal, diario, lunar y anual-en el metabolismo y el comportamiento de los sistemas vivos, siendo esto uno de los factores de adaptación más importantes para el organismo, ya que le permiten responder adecuadamente a los cambios del medio ambiente.

En todos los casos de organismos vivos con ciclo; mareal, diario, lunar y anual los programas temporales se basan en osciladores biológicos autosostenidos cuyo periodo ($1 / \text{frecuencia}$) es cercano al ciclo ambiental con el cual se sincroniza. La fase se describe como el estado instantáneo de una función periódica con respecto a una escala temporal arbitraria (Pittendrigh, 1954, 1974, Sweeney y Hastings, 1960).

Dentro de las fluctuaciones periódicas que existen en los seres vivos, las más estudiadas son las circádicas. La palabra circádica (del latín *circa* = cercano; *dies* = día) fue acuñada para describir ritmos de aproximadamente 24 hrs., que se generan endógenamente por el organismo (Halberg, 1959). Estos ritmos están estrechamente relacionados con la rotación de la tierra alrededor de su eje, es decir, el ciclo solar de luz y oscuridad.

El conocimiento del origen endógeno de la ritmicidad biológica, se basa en el hecho de que en las condiciones de aislamiento de señales ambientales temporales, la ritmicidad biológica persiste con una ligera pero significativa variación en el periodo que la caracteriza.

Algunos estudios en el siglo XVIII realizados por Jean Jaques Ortus de Marian, Duhamel Du Monceau y Zinn mostraron que el ritmo de apertura y cierre de las hojas de una planta sensible (probablemente la Mimosa pudica), no dependían de influencias ambientales como la luz o la oscuridad. En el siglo XIX Agustín de Candolle corroboró la misma observación en el movimiento de las hojas de la Mimosa pudica. Posteriormente Wilhelm Pfeffer refutó y más tarde apoyó la hipótesis del origen endógeno del ritmo en dicha planta.

Colin Pittendrigh (1993) plantea el problema de la naturaleza exógena vs. endógena de la ritmicidad biológica desde la perspectiva de la evolución, señalando la diferencia entre el orden vs. la organización temporal. Donde el orden se refiere a la ausencia del azar, o sea una serie de eventos ligados entre sí (ordenados) por relaciones estímulo-respuesta. Mientras que la organización temporal se refiere a la integración del orden temporal al código genético del organismo. Así, en sus orígenes los seres vivos se someterían al orden temporal impuesto por el ambiente, y conforme estos evolucionaron, dicho orden sería asimilado dando origen a su propia organización temporal. De esta manera, las semejanzas entre los ciclos ambientales y los ciclos biológicos se explicarían porque inicialmente los últimos dependían de los primeros, mientras que sus diferencias lo serían por las características particulares de los organismos para adaptarse al medio ambiente. Aunque los hechos básicos de la propuesta anterior no son susceptibles de ser sometidos a comprobación experimental, la teoría en su conjunto resulta congruente con nuestro conocimiento actual de la Biología.

El concepto de reloj biológico como un sistema orgánico capaz de generar un orden temporal en las actividades del organismo, implica la capacidad del sistema para oscilar con un periodo regular, así como la capacidad de usar estas oscilaciones como una referencia temporal interna. Dicho sistema permite una interacción adecuada en el dominio temporal entre el organismo y su ambiente. Las características anteriores se aceptan por la mayoría de los estudiosos de la cronobiología. Sin embargo, los mecanismos por los cuales el organismo lleva a cabo dichas funciones son aún motivo de controversia.

La discrepancia se centra en el concepto de reloj biológico, que para algunos autores como Pittendrigh y Aschoff, este se refiere a estructuras orgánicas que funcionan como marcapasos capaces de imponer periodo y fase a los procesos orgánicos. Mientras que para otros como Halberg y Reinberg, las propiedades que definen al reloj biológico son el resultado de la interacción de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios, donde la participación de estructuras específicas se limita al ajuste de fase entre diversos procesos. Los relojes biológicos miden las señales ambientales en dos vías conceptualmente distintas: 1) asegurando apropiadamente una secuencia temporal estable en la programación de eventos sucesivos; esto es, medir el lapso de tiempo (sideral); y 2) estableciendo una relación de fase apropiada en el programa para el cambio en el ciclo ambiental; esto es, reconocer el tiempo local.

Por otra parte, en los procesos fisiológicos generalmente se presentan abundantes ejemplos de sistemas organizados a partir de asas de retroalimentación negativa, las cuales pueden ser consideradas como osciladores potenciales, y cuyo funcionamiento lleva implícito un orden temporal de los eventos que regulan. ¿Cuál es el papel de estos osciladores en la generación y regulación temporal del organismo?

Algunos investigadores sugieren que dicha participación es muy importante, ya que se ha observado la persistencia de ritmicidad ultradiana (aquella con una periodicidad menor a 24 hrs.), así como de algunos ritmos circádicos, después de la eliminación completa de estructuras consideradas como marcapasos circádicos. Es posible suponer que aunque la capacidad de presentar oscilaciones sea inherente a la función celular individual, en organismos complejos exista un sistema cronométrico especializado en generar y regular las funciones implícitas en el concepto de reloj biológico.

Un aspecto importante de los ritmos circádicos es el fenómeno de oscilación espontánea. No todos los ciclos biológicos de 24 hrs. son circádicos. Algunos se deben a las fluctuaciones ambientales regulares de luz, temperatura o humedad. Estos ciclos desaparecen cuando las condiciones ambientales se vuelven constantes, en cambio, los definidos como ritmos circádicos persisten bajo estas condiciones. Este fenómeno se denomina oscilación espontánea ("free running"), y se refiere a la naturaleza endógena de los ritmos circádicos (Fig. 1). No es sino hasta este siglo en que el fenómeno de oscilación

espontánea de los ritmos fisiológicos ha sido ampliamente aceptado. Cuando un ritmo circádico está en oscilación espontánea, presenta el periodo de un oscilador endógeno este periodo se define como TAU (τ). TAU a su vez se compone de dos fracciones: una fase activa o de alta funcionalidad en el registro del ritmo definido como ALFA (α), y una fase inactiva o de baja funcionalidad en el registro del ritmo definida como RHO (σ) (Fig. 1). Para animales nocturnos α es la "noche subjetiva" y σ es el "día subjetivo", para animales diurnos esta relación es al revés.

El periodo de un ritmo en corrimiento espontáneo depende de la especie, del individuo y su estado fisiológico, así como de las condiciones ambientales. En 1951 Aschoff empleó el término zeitgeber (del alemán, que significa "dador de tiempo"), para describir aquellas variables ambientales cíclicas capaces de actuar como señales de sincronización de un ritmo circádico.

A pesar de la naturaleza endógena de los ritmos circadianos, los marcapasos endógenos se ajustan constantemente al periodo del ciclo de luz - oscuridad (L/O), el cual constituye, por mucho el zeitgeber más importante en la naturaleza. Este fenómeno se conoce como sincronización. La sincronización es una consecuencia del papel esencial de la luz, y para que esta se lleve a cabo es necesario considerar el periodo, la intensidad y la continuidad en la que se presente el estímulo luminoso. El estado adecuado de la relación de fase mantenida entre un ritmo circádico y su zeitgeber es dependiente del periodo del zeitgeber y el periodo del oscilador que controla el ritmo. Una característica importante de este proceso, es que cuando un ritmo circádico está en oscilación espontánea puede alargar o acortar su periodo en uno o varios ciclos precedidos por transitorios, dependiendo de la fase en la que el ritmo se altera, ya sea, mediante un estímulo discreto o mediante un estímulo continuo (Fig. 1).

MEDIDA DEL LAPSO TEMPORAL: HOMEOSTASIS DEL PERIODO DEL MARCAPASOS Y VELOCIDAD ANGULAR

El periodo de todos aquellos marcapasos que funcionan como relojes que miden el tiempo ambiental es estable, a través de un amplio rango o intervalo de temperaturas y otras variables ambientales (Pittendrigh, 1954, 1974; Pittendrigh y Calderola, 1973). Esta homeostasis general de TAU, contribuye

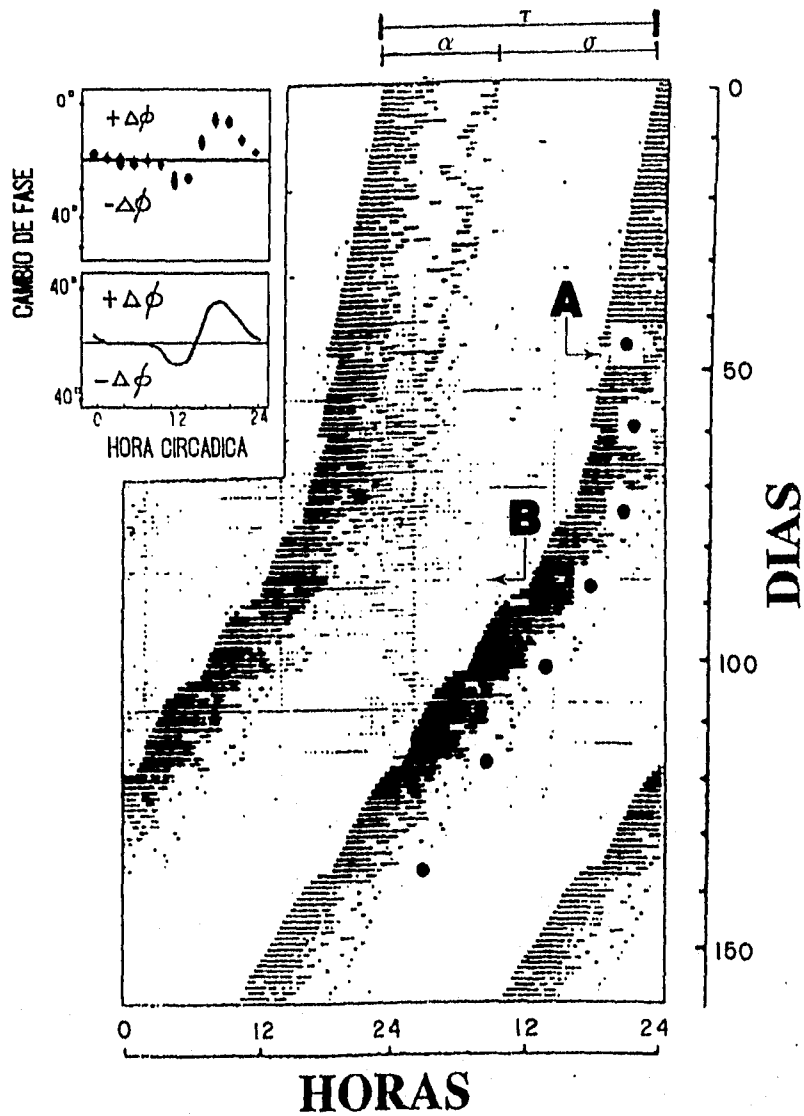


FIGURA 1.- Actograma de actividad en oscilación espontánea de un animal mantenido en oscuridad continua. En sentido horizontal tenemos el periodo del ritmo (τ), con sus respectivos componentes (α) y (σ); en sentido vertical se grafican los días consecutivos de registro conductual. Cuando se aplica un pulso de luz a diferentes fases puede haber: retrasos de fase (A) o avances de fase (B), las flechas indican la dirección hacia la cual se mueve el inicio del ritmo (tomada de Pittendrigh, 1980).

a una relación de fase (FAS) entre el programa temporal establecido y el ciclo de luz, porque FAS es sensible a la variación en $1/T$ (periodo del ciclo externo). Para promover estabilidad temporal en el sistema circádico, el marcapaso debe mantener una velocidad angular estable (V) en cada fase de ese ciclo; la secuencia de eventos dentro del programa biológico puede ocurrir a intervalos (fracciones del ciclo) tan íntegramente temporalizados como la secuencia de eventos externos.

RECONOCIMIENTO DEL TIEMPO LOCAL

Los marcapasos que manejan programas "circa" -maréales, diarios, lunares y anuales- pueden ser sincronizados por una periodicidad externa cuya frecuencia es razonablemente cercana. Cuando el periodo del marcapasos (t) es sincronizado por un ciclo externo (T), cambia de t a $t^*=T$.

Un oscilador autosostenido tiene varias ventajas en este contexto, ya que si se aísla completamente del *zeitgeber* por varios ciclos, éste almacena información sobre el tiempo local (fase del ciclo externo) adquirido por la previa sincronización (Bunning, 1960), la información es confiable solo si el periodo (t) del marcapasos es aproximado a T .

Se puede argumentar que, dado que el control del periodo ($t \rightarrow t^*=T$) es inherente a la sincronización, la selección natural solo ha demandado que t sea lo bastante cercano a T para permitir la sincronización; dando como resultado que especies activas diurnamente tengan un periodo mayor a 24hrs. y que especies nocturnamente activas tengan un periodo menor a 24 hrs. (Aschoff, 1960, 1979).

MECANISMOS DE SINCRONIZACIÓN DISCRETA Y SINCRONIZACIÓN CONTINUA

El efecto del pulso diario de luz (fotoperiodo) produce un cambio en la duración del periodo (t) del oscilador circádico (o marcapaso) en una cantidad igual a $t-T$, donde $T=24$ hrs.

Cuando la entrada del *zeitgeber* es CONTINUA a través de una gran parte -sino es que todo- del ciclo se ejerce el control por medio de un cambio continuo en la velocidad angular de la oscilación, acelerando el ciclo en algunas fases y desacelerando en otras.

Cuando el impacto del *zeitgeber* es breve, causa un cambio de fase DISCRETO sobre el oscilador, ya sea avanzándolo o retrasándolo mediante una cantidad igual a $t-T$. Se sugiere que la

acción del fotoperiodo "natural" (pulso de 12 hrs.) produce una mezcla de los dos tipos de efectos aquí descritos.

La simulación del fotoperiodo completo (PPc) por un fotoperiodo esqueleto (PPs), es pobre cuando PPs se reduce de 11 hrs. y falla cuando T (duración del fotoperiodo), excede las 14 hrs.

En la conducta de un animal en oscilación espontánea en oscuridad continua, un pulso de luz puede producir uno de los tres efectos siguientes: retraso, avance o, puede no haber cambios. La magnitud y dirección del cambio de la fase depende de la fase del ritmo en la cual se aplica el estímulo luminoso y de la intensidad de este último. Esta relación se grafica en la curva de respuesta de fase (Fig. 2). Existen diversos mecanismos para obtener una curva de respuesta de fase (CRF), en la forma más general de realizar una CRF, primero se deja que el ritmo circádico se establezca en oscilación espontánea. Posteriormente se aplica un pulso discreto de luz a diferentes tiempos, tanto en la fase activa (α) como en la fase inactiva (σ) del ritmo, y se observan los cambios de fase producidos.

El comienzo de la actividad denotado en el 50% de la amplitud del periodo de un ritmo, se utiliza como referencia para la fase y se define por convención como tiempo circádico (CT) 12:00 (Pittendrigh y Daan, 1976). A partir de este punto se procede a definir la duración del "día y la noche subjetivos". La curva de respuesta de fase tiene tres características generales en relación con la efectividad del estímulo: 1) La zona muerta, cuando no ocurren cambios de fase después de que se aplican los pulsos luminosos durante el "día subjetivo", 2) el retraso de fase que ocurre cuando los pulsos se aplican durante la "noche subjetiva" temprana y 3) el avance de fase ocurre cuando los pulsos se aplican durante la "noche subjetiva" tardía (Pittendrigh y Daan, 1976). En la figura 2 se presenta la CRF de un animal nocturno, pero en el caso de un animal diurno la curva tiene el mismo comportamiento. Durante los ciclos transitorios, el retraso de fase causa un alargamiento del periodo y el avance de fase produce un acortamiento del mismo. Aunque la curva de respuesta de fase se obtiene por medio de las mediciones de la función rítmica, esta refleja las propiedades de los osciladores circadianos responsables de esta función (Pittendrigh y Daan, 1976).

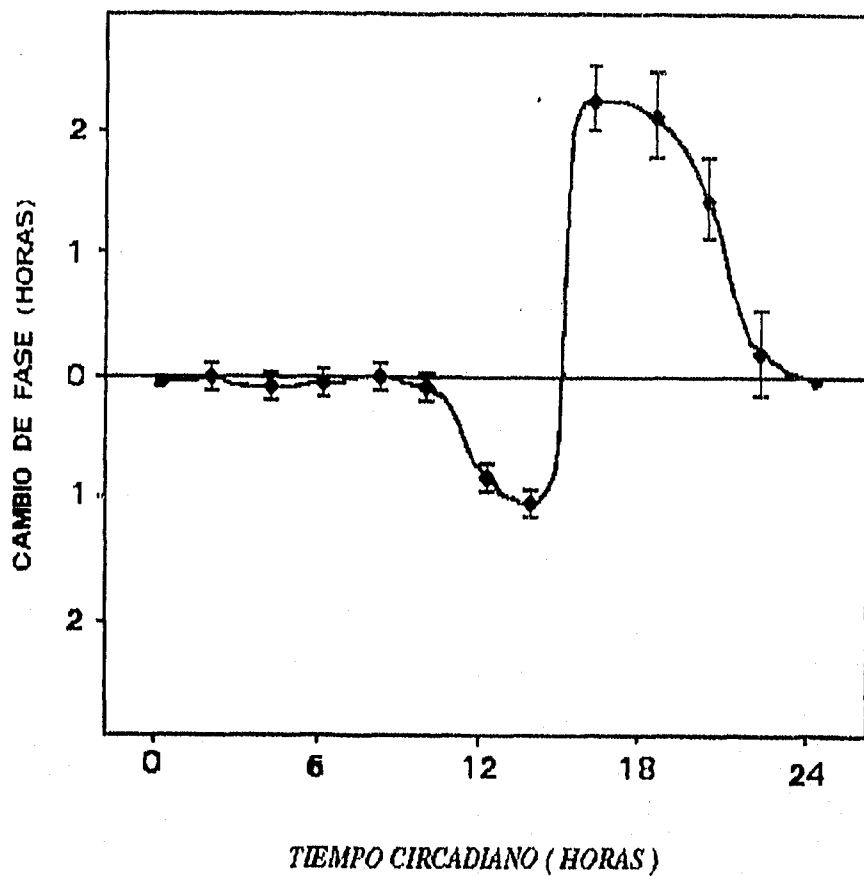


FIGURA 2.- Curva de respuesta de fase ilustrando el efecto de pulsos de (60 minutos) aplicados en diferentes tiempos de la actividad locomotora del hámster. El avance de fase es graficado como positivo y el retraso de fase como negativo (tomada de Takahashi y Zats, 1982).

El sistema regulador de los ritmos circadianos consta básicamente de los siguientes componentes: 1) vía de entrada para la sincronización, 2) sistema cronométrico endógeno para la generación y el acoplamiento de la oscilación, y 3) vías de salida para la transmisión de la información circádica a los efectores en los que se expresan los ritmos que medimos (Takahashi y Zats, 1982; Moore, 1992) (Fig. 3).

El estudio del sustrato anatómico involucrado en la regulación de los ritmos circadianos en mamíferos se inició en este siglo. Von Economo (1929) y Nauta (1946) fueron los primeros en implicar al hipotálamo en la regulación del ciclo sueño / vigilia, el cual, es uno de los ritmos circádicos más evidentes. Sin embargo, los primeros estudios dirigidos a identificar la localización anatómica del reloj biológico, fueron los realizados por Richter (1965; 1967), quien demostró la participación del hipotálamo ventral en dicha función. En la década de los setentas, dos laboratorios reportaron de manera independiente que la lesión del núcleo supraquiasmático (NSQ) interrumpe la ritmicidad circádica en los niveles de corticosterona en el plasma (Moore y Eichler, 1972), y en las actividades locomotora y de ingesta de agua en la rata (Stephan y Zucker, 1972). Desde entonces, estudios numerosos han reportado que las lesiones de dicho núcleo eliminan los ritmos circádicos de varias actividades fisiológicas y conductuales (Moore, 1981; 1983).

INTRODUCCIÓN

EL NSQ COMO MARCAPASO CIRCÁDICO

El NSQ del hipotálamo anterior se ha identificado como un sustrato crítico para la expresión normal de varios ritmos circádicos en los mamíferos, sugiriendo además que se trata del oscilador principal. Esta conclusión es apoyada por el siguiente conjunto de evidencias: las lesiones bilaterales del NSQ eliminan varios ritmos circádicos en todas las especies estudiadas (ver revisiones de Rusak y Zucker, 1979; Aguilar-Roblero y Drucker-Colin, 1987; Rosenwasser y cols., 1985). La eliminación del NSQ en neonatos de rata eliminan de por vida los ritmos de actividad locomotora e ingesta de agua, lo cual

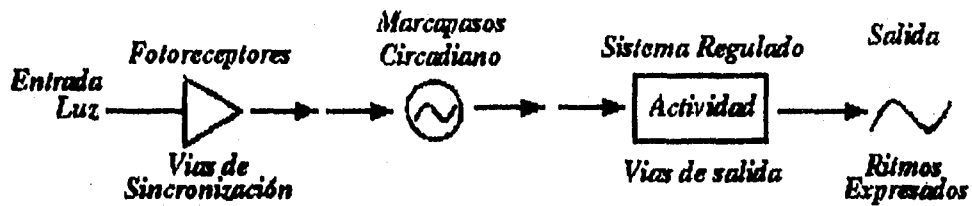


FIGURA 3.- Componentes del Sistema Circadiano. El sistema regulador de los ritmos circadianos consta básicamente de: 1) vías de entrada para la sincronización, 2) sistema cronométrico endógeno para la generación y el acoplamiento de la oscilación, y 3) vías de salida para la transmisión de la información circádica a los efectores en los que se expresan los ritmos que medimos (Takahashi y Zats, 1982; Moore, 1992).

sugiere que otras zonas del cerebro no retienen la capacidad de organizar y suplir la función que desempeña el NSQ (Mosco y Moore, 1978). La manipulación de la actividad neuroquímica del NSQ altera por completo la expresión de los ritmos circádicos causando retrasos o avances de fase (Rusak y Groos, 1982; Alberts y Ferris, 1984). Los estudios *in vivo* e *in vitro* de actividad neurofisiológica y metabólica indican que las células del NSQ manifiestan de manera intrínseca un ritmo circádico, inclusive en ausencia de una entrada rítmica externa (Inouye y Kawamura, 1979; 1982; Schwartz y Gainer, 1977; Groos y Hendricks, 1982; Newman y Hospod, 1986; Green y Gillette, 1982; Shivata y cols., 1982). Después de la eliminación del NSQ en ratas adultas, la implantación de tejido fetal de NSQ puede restaurar la ritmicidad después de la eliminación previa del NSQ en las ratas (Drucker-Colin y cols., 1984; Sawaki y cols., 1984; Aguilar-Roblero y cols., 1986; 1992) y los hámsters (Lehman y cols., 1987; Ralph y cols., 1991; Aguilar Roblero y cols., 1994).

A pesar de que esta serie de evidencias muestran la importancia del NSQ como marcapaso circádico en roedores, no se puede excluir la existencia de otros marcapasos circádicos debido al nivel de complejidad funcional de los organismos.

Se distingue al NSQ como un par de núcleos celulares que se localizan en el hipotálamo ventral, dorsalmente a la parte caudal del quiasma óptico y rostral a las comisuras supraópticas. Está compuesto por aproximadamente 10,000 pequeñas células en cada lado de la línea media, en la base del III ventrículo (Van Den Pol, 1980) (Fig. 4). El NSQ presenta un empaquetamiento celular más denso en su parte medial, que en las regiones dorsolateral y anterior, lo que ocasiona una dificultad al definir los límites del núcleo (Guldner, 1976; Van Den Pol, 1980). La forma del NSQ difiere considerablemente entre las diferentes especies y su geometría precisa en cada una de ellas parece ser compleja (por ejemplo en la rata tiene un aspecto elongado con 950 μm en dirección rostro-caudal, 425 μm en dirección centro-lateral y 400 μm en dirección ventro-dorsal) (Albers H. y cols., 1991). Así mismo, las células del NSQ son extremadamente pequeñas en la rata su diámetro medio es de 7.8 μm y el de las células laterales es de 9.6 μm (Guldner, 1976; Van Den Pol, 1980).

Al NSQ lo componen básicamente cinco tipos diferentes de células . 1) bipolares simples con dos dendritas, 2) células monopolares con una sola dendrita, 3) células bipolares-rizadas con dos dendritas más complejas, 4) multipolares radiales con tres o cinco dendritas primarias, y 5) neuronas espinosas con soma redondo y dendritas muy variadas. También se localizan cadenas de neuronas que tienen grandes regiones de aposiciones somato-somáticas y estas se orientan en dirección antero-posterior (Van Den Pol, 1980).

Entre las neuronas hay células gliales del tipo astroglia, cuyos cuerpos celulares tienen el mismo tamaño que las neuronas y presentan de cinco a quince procesos que proyectan en algunas ocasiones a vasos sanguíneos, en donde establecen uniones de tipo comunicante (Moore, 1983).

Los axones en el NSQ son de calibre fino, y forman fascículos no mielinizados, los cuales terminan dentro del NSQ o bien, pueden pasar a través del mismo sin mantener colaterales locales. Algunos tipos de arborizaciones axonales terminan dentro del núcleo, y presentan un gran número de botones terminales sobre somas, tronco dendrítico y espinas dendríticas. Los axones se originan con igual frecuencia del soma o de una dendrita proximal, y algunos conectan el NSQ izquierdo con el NSQ derecho (Van Den Pol, 1980). Los tipos de contacto sináptico que existen en el NSQ son los Gray I y Gray II. El primero se caracteriza por una densidad postsináptica alta y probablemente es excitador. El segundo carece de densidad postsináptica y se sugiere que es inhibitorio. Ambos tipos de sinapsis se han descrito también en las terminales del nervio óptico aferentes al NSQ (Guldner, 1978).

NEUROQUÍMICA DEL NSQ

En el NSQ se han identificado muchos neurotransmisores, que pueden ser de origen intrínseco y/o extrínseco (Van Den Pol, 1985). Básicamente el NSQ se divide en dos regiones, según su contenido de péptidos: 1) la región dorsomedial y rostral, que se caracteriza por su alta densidad en vasopresina (VP), y 2) la región ventrolateral, caracterizada por la presencia de péptido vasoactivo intestinal (VIP). Además de estos neurotransmisores existen otros que se sintetizan en todo el núcleo, tales como el ácido gamma-amino butírico (GABA), neurofisiina, bombesina, el péptido liberador de gastrina (Van Den Pol y Tsujimoto, 1985) y somatostatina (Moore, 1983). También se encuentran neurotransmisores

asociados a distintos núcleos, como la serotonina, que parece localizarse en las aferencias que provienen de los núcleos dorsal y medial del rafe, el neuropéptido Y, vinculado con las aferencias provenientes de la hoja intergeniculada y del núcleo geniculado ventrolateral. El glutamato y el aspartato están relacionados con el tracto retinohipotalámico ya que se secreta después de la estimulación del nervio óptico (Liou y cols., 1986)

Así, Por estar compuesto de neuronas que pueden separarse en dos subpoblaciones, de acuerdo a características inmunohistoquímicas y estructurales al NSQ se le divide en las regiones dorsomedial y ventrolateral (Card, 1981).

El NSQ recibe proyecciones del sistema visual, el sistema límbico, el hipotálamo y el tallo cerebral (Aguilar-Roblero y Drucker-Colín, 1987). El sistema visual proyecta desde la retina (Moore y Lenn, 1972; Hendrickson y cols., 1972) y la porción ventral del cuerpo geniculado lateral (Swanson y cols., 1974; Ribak y Peters, 1975; Pickard, 1982). La vía aferente más estudiada debido a su relevancia en los ritmos circádicos ha sido la vía retinohipotalámica (VRH), en la cual, fibras originadas en la retina proyectan bilateralmente, con un componente contralateral muy importante (Moore y Lenn, 1972). Esta vía está presente en todos los mamíferos que se han estudiado (Moore, 1973; Thorpe, 1975; Colman y cols., 1976). El sistema límbico proyecta desde el núcleo septal medial (Garris, 1979) y del subículo antero-ventral a través del tracto cortico-hipotalámico (Meibach y Siegel, 1977). Al NSQ arriban aferentes del área preóptica (Swanson, 1976), del núcleo ventromedial y del núcleo arcuato (Meibach y Siegel, 1977; Zaborsky y Marcara, 1979), así como del área tuberal hipotalámica (Soper, Swanson y Cowan, 1976). El complejo del rafe proyecta desde los núcleos dorsal y medial (Fuxe y cols., 1965; Aghajanian, Bloom y Sheand, 1969; Saavedra, Palkovits, Brown-Stein y Axebrod, 1974).

Las fibras del NSQ proyectan hacia el sistema límbico, diencefalo, tallo cerebral y otros núcleos hipotalámicos. Los axones abandonan el NSQ básicamente en seis direcciones (Watts y cols., 1987). Las eferentes del NSQ al sistema límbico involucran los núcleos septal y medial (Sofroniew y Weindl, 1978; Bojjs, 1978) y el órgano vasculoso de la lámina terminalis (Campbell y Ramaney, 1974; Bojjs, 1978) y el núcleo de la banda diagonal del tracto terminal de Broca (Sofroniew y Weindl, 1978).

Las conexiones hacia el diencefalo llegan a los núcleos talámicos periventriculares (Berk y Finkelstein, 1981) y a los núcleos dorsomediales del tálamo y la habénula lateral (Sofroniew y Weindl, 1978). Las proyecciones hacia el tallo cerebral llegan al núcleo interpeduncular (Sofroniew y Weindl, 1978), a la substancia gris periacueductal del mesencéfalo (Berk y Finkelstein, 1981), al núcleo motor dorsal del vago (Bojjs, 1978) y al núcleo del tracto solitario (Sofroniew y Weindl, 1978). Algunas de estas proyecciones todavía no están bien definidas. Eferentes del NSQ hacia el hipotálamo arriban al núcleo subparaventricular (Sims, Holfman, Said y Zimmerman, 1980), especialmente a la región dorsal (Berk y Finkelstein, 1981; Stopa, King, Lydic y Schone, 1984), al núcleo periventricular parvocelular (Swanson y Cowan, 1975; Sims y cols., 1980; Berk y Finkelstein, 1981; Hoorneman y Bojjs, 1982), al área preóptica medial (Sims y cols., 1980), al núcleo dorsomedial y ventromedial (Swanson y Cowan, 1975; Sims y cols., 1980; Berk y Finkelstein, 1981; Hoorneman y Bojjs, 1982), al núcleo arcuato y región tuberal lateral (Swanson y Cowan, 1975) y al núcleo premanilar (Sims y cols., 1980). Algunas proyecciones han sido descritas hacia la región hipotalámica posterior (Berk y Finkelstein, 1981; Sofroneiw y Weindl, 1978) y la lámina interna de la eminencia media (Swanson y Cowan, 1975; Sims y cols., 1980) (Fig. 4).

OSCLADORES CIRCÁDICOS MÚLTIPLES

En general se acepta la hipótesis general de que el sistema circádico de los organismos complejos esta formado por múltiples osciladores y estos son coordinados mediante relaciones de acoplamiento tanto jerárquico como no jerárquico. Mientras que en aquella que sostiene la de un oscilador circádico, no es claro que este sea el único o igual el más apropiado nivel de análisis, aunque en la práctica sea util aceptar el papel del NSQ y su identificación como un conglomerado celular localizado anatómicamente (Turek, 1994). Existe sin embargo, un gran número de trabajos de ritmos circádicos en mamíferos que sugieren que el sistema circádico consiste de más de un oscilador (Pittendrigh y cols., 1959; Winfree, 1967; Kabato y Susuki, 1980; Rosenwasser y Adler, 1985).

Uno de los fenómenos que ponen de manifiesto la presencia de más de un oscilador es la desincronización interna que se caracteriza porque diferentes ritmos fisiológicos despliegan distintos

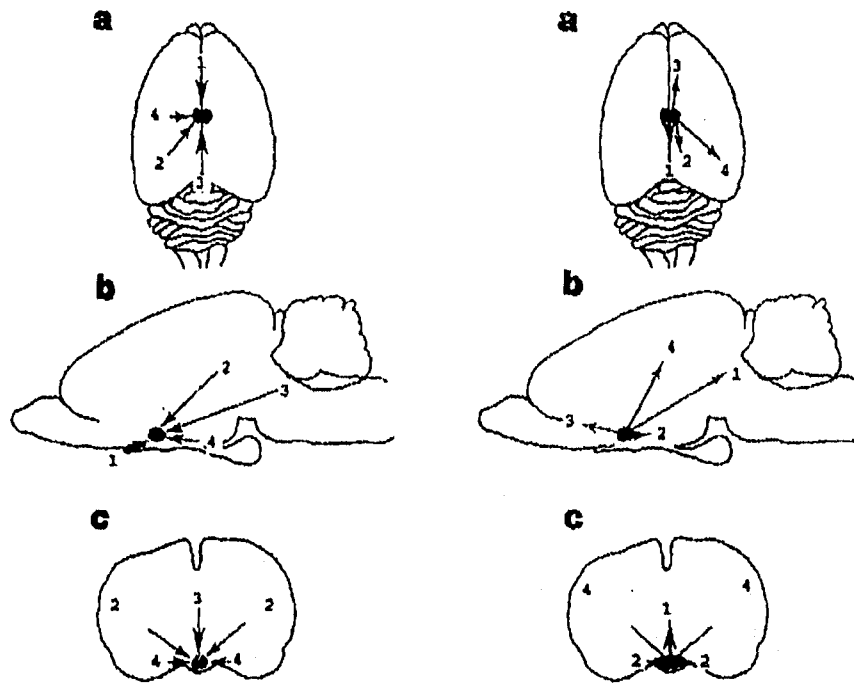
A**B**

FIGURA 4.- Localización del NSQ en la rata. a) Corte dorsal. b) Corte sagital. c) Corte coronal. A) Vías aferentes. 1) Del tracto retino-hipotalámico. 2) Del tracto genículo-hipotalámico. 3) Del Rafe medio y dorsal. 4) Del área retroquiasmática, del núcleo paraventricular talámico, de la corteza subicular del hipocampo, de la porción ventral del septum lateral, de la sustancia gris periacueductal mesencefálica y del núcleo dorsal del lemnisco lateral. B) Vías eferentes. 1) Fibras que terminan en la parte ventral del núcleo habenuar lateral. 2) Fibras ventrocaudales que conecta con otros núcleos hipotalámicos terminando en la sustancia gris mesencefálica. 3) Vía dorsal que llega al núcleo paraventricular del tálamo. 4) Fibras laterales que llegan al núcleo geniculado lateral ventral.

períodos circádicos, y las relaciones de fase internas entre los diferentes ritmos se pierden. Se han descrito las siguientes formas de desincronización:

A) Desincronización interna espontánea: el ciclo sueño-vigilia y el ritmo de temperatura corporal en seres humanos tienen un periodo similar a 24 hrs., con una relación de fase constante en condiciones normales de luz-obscuridad (L / O). Estudios realizados con individuos en condiciones de aislamiento de señales ambientales cuyo efecto es que los individuos presenten oscilación espontánea, muestran diferencias de fase y periodo para cada uno de estos ciclos, sugiriendo un desacoplamiento entre osciladores independientes para cada uno de los ritmos (Aschoff y Weber, 1984).

B) Desincronización interna pasajera (jet-lag): por ejemplo, si se sale de la ciudad de México a las 10:00 de la mañana y se vuela hacia Tokio, catorce horas después, llegamos con quince horas de diferencia en cuanto a zonas de tiempo (meridianos). A esta hora en México acaba de pasar la media noche y en Tokio es la media tarde. Gracias a los vuelos comerciales podemos trasladarnos de un lugar a otro del planeta en pocas horas, pero el sistema cronométrico endógeno requiere varios días para resincronizarse al tiempo local. Lo interesante es que los diferentes ritmos fisiológicos muestran diferentes velocidades de resincronización. El estado de desorden temporal después del cambio de zona temporal y antes de que todos los ritmos regresen a su relación de fase original, se denomina desincronización interna pasajera (Moore-Ede y cols., 1982).

C) Desincronización interna forzada: es posible separar distintos ritmos circádicos exponiendo a sujetos a ciclos de L / O de longitud anormal (Lewis y Loblan, 1957); se ha observado cuando los sujetos se estudian en "días" artificiales, es decir que presentan periodos diferentes (aunque cercanos) a 24 hrs. y tal situación es desconocida por estos. En dichas condiciones algunos de los ritmos en estudio se sincronizan con el ciclo L / O mientras que otros presentan corrimiento espontáneo (Weber, 1983; Folkard y cols., 1983; 1984; 1985). Estas observaciones se han interpretado como la manifestación de varios osciladores, cada uno de los cuales presenta su propio periodo de sincronización óptimo.

D) Fenómeno de partición (splitting): en éste fenómeno un ritmo se disocia en dos (o más) componentes rítmicos separados, los cuales despliegan un comportamiento circádico y ultradiario

diferente (Rosenwasser y Adler, 1985). Ha sido observado en lagartos, pajaros, insectos, peces y hamsters. También se ha visto en diferentes ritmos, implicando que la partición involucra a distintos osciladores.

E) Por otro lado, algunos estudios de lesión evidencian, que diferentes ritmos circádicos dependen de distintos marcapasos circádicos (Rosenwasser y Adler, 1985). Se ha observado que el ritmo de cortisol en el mono rhesus no se afecta por lesiones del NSQ. El mismo estudio reporta que existe una alteración a corto plazo, pero una recuperación eventual en el ritmo de melatonina (Reppert y cols., 1981). En el mono araña el ritmo de temperatura corporal persiste en lesiones del NSQ, mientras que la conducta de ingesta de agua se abate (Fuller y cols., 1981; Alberts y cols., 1984). Sin embargo, no se elimina el ritmo de temperatura corporal en ratas (Satinoff y Prosser, 1988). La sugerencia de que los NSQ's, funcionen como sistemas con más de un oscilador, la apoya el hecho de que lesiones unilaterales de uno de los NSQ's hacen desaparecer uno de los componentes de la partición en animales sometidos a ciclos de luz continua.

Por otro lado, la restricción en la disponibilidad de alimentos induce cambios de fase en diversos ritmos circádicos de ratas mantenidas en un ciclo de L/O (Krieger, 1974), este fenómeno no es abolido por lesiones del NSQ (Krieger y cols., 1977). Así mismo, animales lesionados del NSQ presentan actividad rítmica anticipatoria sincronizada por la disponibilidad de alimentos (Phillis y Mikulka, 1979; Stephan y cols., 1979), lo cual sugiere la presencia de otro oscilador en el sistema susceptible a la sincronización por alimentos. A pesar de que no existe evidencia directa a favor de dicho oscilador, se ha reportado ritmicidad residual después de detener la restricción de alimentos (Honma y cols., 1983). También se ha observado que el ritmo de actividad locomotora sincronizable por la alimentación presenta oscilación espontánea en oscuridad continua y privación total de alimentos, ocurriendo simultánea e independientemente de la oscilación espontánea del mismo ritmo cuando se sincroniza a la luz (Coleman y cols., 1982). Estudios sobre las interacciones del ritmo sincronizable para los alimentos sugieren que existe acoplamiento entre los osciladores que generan cada ritmicidad (Stephan, 1986). Se ha propuesto al núcleo ventromedial del hipotálamo (NVH) como el posible oscilador que se sincroniza por la disponibilidad de alimentos, ya que lesiones de dicha área

previenen los efectos sobre la ritmicidad (Krieger, 1980; Inouye, 1982). Sin embargo, la ausencia de ritmicidad autosostenida en el NVH y la recuperación espontánea del fenómeno anticipatorio después de la lesión de este, sugieren que el NVH es una vía de entrada de la información hacia el oscilador (Inouye, 1983; Mistlberger y Reischtschaffen, 1984). Existe ritmicidad circádica en la morfología y bioquímica de la retina de vertebrados (Moore-Ede y Sulzman, 1981; Moore-Ede y cols., 1979; Pittendrigh, 1960; Pittendrigh y Daan, 1976). Algunos de estos ritmos, son parcialmente independientes del control eferente (Rossenwasser y Adler, 1986), implicando la existencia de osciladores circádicos locales dentro del ojo. En ciertos reptiles y aves, la enucleación del ojo interfiere con la generación de conductas con ritmicidad circádica (Rossenwasser y Adler, 1986).

La conectividad anatómica del NSQ puede proveer indicios para la identificación de otras estructuras neurales involucradas en el sistema circádico y su coordinación. La gran variedad de conexiones que permiten al NSQ comunicarse con estructuras hipotalámicas, talámicas, límbicas, y del tallo cerebral caudal apoyan la hipótesis del papel de marcapaso del NSQ (Berk y Finkelstein, 1980; Binkley y cols., 1980; Hamm, 1980; LaVail, 1976; Pang y cols., 1981); sin embargo, estas conexiones podrían sobrellevar uno o varios de los roles funcionales temporales en el sistema circádico (Besharse y Luvone, 1983; Terstein y cols., 1980). Conceptualmente, se tiene que hacer una distinción entre vías eferentes del NSQ, las cuales están involucradas en la transmisión circádica de la señal temporal a órganos blanco no rítmicos, y aquellas vías que permiten un acoplamiento jerárquico o no jerárquico de múltiples osciladores circádicos anatómicamente distribuidos (Rossenwasser y Adler, 1986).

En varias especies de peces, (Ebihara y Kawamura, 1981; Fuchs, 1983; Gwinner, 1978; Laitman y Turek, 1979; Menaker y Binkley, 1981; Takahashi y Menaker, 1979), reptiles (Underwood, 1977; 1983), y aves (Kavaliers, 1979) la glándula pineal juega un papel importante dentro de la organización del sistema circádico. La pinealectomía trae como consecuencia alteraciones en el periodo en oscilación espontánea, partición de ritmos de actividad o pérdida de la ritmicidad (Underwood, 1984). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la pineal funciona como un marcapaso en vertebrados inferiores y probablemente a través de la secreción de melatonina, promueva el

acoplamiento entre múltiples osciladores circádicos (Cassone y Menaker, 1984; Menaker y Binkley, 1981). En mamíferos se ha reportado que la pinealectomía produce únicamente un ajuste más rápido al cambio de fase a ciclos de L / O (Klein y Moore, 1979; Klein cols., 1983), pero son importantes en lo que se refiere a la latencia de la partición (Aguilar Roblero y Vega González, 1993).

Tanto la pineal como el NSQ se cree que están involucrados en un asa de retroalimentación neuroendócrina. En los mamíferos, la ritmicidad circádica es impuesta sobre la pineal por el NSQ por una vía hipotálamo-autónomo-pineal (Binkley y cols., 1980; Hamm, 1980; Pang y cols., 1981). Se ha reportado ritmicidad circádica similar en procesos biosintéticos que ocurren tanto en retina como en la pineal (Binkley y cols., 1980; Hamm, 1980; Pang y cols., 1981), dos estructuras que reciben innervación vía ganglio cervical superior.

El núcleo mesencefálico del rafe (en particular el núcleo medio y dorsal) provee una entrada serotoninérgica al NSQ (Aghajanian y cols., 1969; Ajika y Ochi, 1978; Azmitia y Segal, 1978; Moore y cols., 1978; Van de Kar y Lorens, 1979), así mismo, se ha visto que existen proyecciones del NSQ al rafe (Bons y cols., 1983). El núcleo del rafe está también implicado en el control de la ritmicidad circádica de la secreción hormonal de la pituitaria anterior (Assenmacher, 1982; Hery y cols., 1982). Los ritmos de actividad circádica pueden ser afectados con lesiones que involucren el núcleo medio y dorsal del rafe (Levine y cols., 1986); sin embargo, también se ha reportado que estas lesiones no eliminan los ritmos circádicos, aunque disminuyen su amplitud (Block y Zucker, 1976; Kam y Moverg, 1977). También las hormonas esteroideas gonadales pueden influenciar el periodo, la fase y coherencia de los ritmos circádicos de actividad (Albers, 1981; Albers y cols., 1981; Gwinner, 1974; 1975; Morin, 1979; Morin y Cummings, 1981; Zucker, 1979; Zucker y cols., 1980).

La administración crónica de la anfetamina y metanfetamina producen la interrupción del ritmo de actividad locomotora en la rata. Los animales tratados presentan alteración de la ritmicidad en dos componentes de distinto periodo, así como cambios diarios en la relación de fase de dichos componentes con el ciclo de luz ambiental, fenómeno conocido como coordinación relativa (Honma y cols., 1986). Efectos similares se han reportado en ratas recién nacidas (Honma y Honma, 1986).

RELACIONES DEL SISTEMA CIRCÁDICO CON OTROS SISTEMAS RÍTMICOS

Teóricamente, los ritmos ultradianos pueden interrelacionarse con el sistema circádico a dos niveles generales. Primero, los ritmos ultradianos pueden ser modulados sobre una escala de tiempo circádico; y segundo, ciertos procesos biológicos pueden ser la razón fundamental de la generación tanto de ritmos ultradianos como de ritmos circadianos.

Dentro de la endocrinología hay muchos ejemplos de ritmos ultradianos que son en cierta medida modulados sobre bases circádicas. Esto involucra la fase, la amplitud y la frecuencia de la oscilación ultradiana (Turek, 1994). Efectos de dirección de fase del mantenimiento temporal circádico ocurre para una amplia variedad de oscilaciones ultradianas (Aschoff y Gerkema, 1985). La modulación de la amplitud es apoyada por diversos eventos experimentales. La magnitud del incremento en la oscilación ultradiana de GH asociada al sueño y la liberación puberal de LH depende de la hora circádica a la cual ocurra el sueño (Van Cauter y Refetoff, 1989; Van Cauter, 1985). Por otro lado, la variación circádica pronunciada de ACTH y cortisol es activada por la modulación de la amplitud del pulso, más que por cambios en la frecuencia del pulso (Van Cauter y cols., 1990; Veldhuis y cols, 1989; 1983), y modulación de la frecuencia. El sueño ejerce cierto control sobre la frecuencia de la liberación neuroendócrina del cortisol, con una clara inhibición de la pulsatilidad durante las primeras horas después del inicio del sueño (Weitman y cols., 1983). A pesar de que las lesiones del NSQ interrumpen muchas-sino es que todas-las variedades de ritmos circádicos, el patrón pulsátil ultradiano de liberación de LH por la pituitaria en ratas (Soper y Weich, 1980) y la ritmicidad ultradiana en actividad locomotora en el ratón campestre (Gerkema y Daan, 1985) no desaparecen. La gran variabilidad de ritmos ultradianos y la naturaleza imprecisa del periodo de muchos ritmos ultradianos plantea una gran limitante en este tipo de correlaciones (Turek, 1994).

RELACIONES INFRADIANAS Y CIRCADIANAS.

A pesar de que eventos específicos en el ciclo ovárico de muchos mamíferos ocurran a intervalos que se ubican en el rango infradiano, existen datos de diferentes especies de roedores demostrando que

eventos relacionados al estro, tales como la variación proestral en la liberación de LH y FSH, ovulación, incremento en secreción de progesterona, e inicio de receptividad sexual, están todas relacionadas con el sistema circadiano y ocurren a horas específicas sobre los días en los que estas deben de ocurrir (Campbell y Turek, 1981; Rusak y Zucker, 1979; Donham y Stetson, 1991; Keefe y Turek, 1985).

Una amplia variedad de señales ambientales, las cuales cambian sobre una base anual son usadas para sincronizar la estación de apareamiento y así la época de nacimiento, cuando la probabilidad de supervivencia tanto de los padres como de las crías es elevada. La principal señal ambiental para estimular la actividad gonadal y la condición reproductiva durante la época apropiada del año para muchos animales es el cambio estacional de la longitud del día (Follet y Follet, 1981; Goldman y Elliot, 1988; Reiter y Follet, 1980). Una enorme variedad de ciclos anuales tanto fisiológicos como conductuales han sido reportados, incluyendo color de pelaje, migración, crecimiento, muda de piel e hibernación (Turek, 1994).

La glándula pineal y la melatonina juegan un papel central en la transmisión de información acerca de la longitud del día al eje neuroendócrino-gonadal (Turek, 1994). La transferencia de información fotoperiódica de la madre al feto es prevenida por la pinealectomía de la madre, además puede ser alterada por la administración de melatonina exógena (Weaver y Reppert, 1986; Elliot y Goldman, 1989; Horton y cols., 1989, 1990; Lee cols., 1989; Stetson y cols., 1989).

En varias especies de hamster, la exposición a días cortos resulta en dramáticas inhibiciones de actividad reproductiva manifestada por un decremento en niveles de LH, FSH, prolactina y testosterona así como en regresión testicular. Cambios inducidos presumiblemente por el fotoperiodo en la liberación de GnRH hipotalámica sustenta los efectos de la longitud del día sobre la liberación de gonadotropinas. Sin embargo, no se ha establecido el papel de los efectos de la longitud del día sobre la actividad de GnRH (Turek, 1994). Los efectos del fotoperiodo pueden propiciar un cambio en el pulso generador hipotalámico, mientras la exposición a días cortos pueden inducir un decremento de la frecuencia de la liberación pulsátil de LH de la glándula pituitaria (Bittman y cols., 1992; Swann y Turek, 1988; Kley y cols., 1989)

A pesar de que algunos de estos ritmos parecen ser conducidos por un ritmo circanual en secreción gonadal de hormonas, otros ritmos anuales se han observado en animales castrados mostrando independencia del ciclo gonadal (Pengelley, 1974; Gwinner, 1981; Zucker y Litch, 1983, Zucker y Boshes, 1982).

Los relojes circanales se piensan usualmente como "relojes reales" cuya función primaria es proveer de orden temporal al organismo. Sin embargo, mientras ciertos relojes circanales pueden tener la función primordial de marcapasos, algunos simplemente pueden representar osciladores que son producto de propiedades dinámicas del sistema (Turek, 1994). Con todo y que el NSQ tenga un papel esencial en la generación de la ritmicidad circádica, este no es un componente esencial en el sistema responsable para la generación de ritmicidad circanual (Gwinner, 1981).

A pesar de que este conjunto de evidencias sugieren la existencia de un sistema multioscilariorio, todavía queda abierta la pregunta de cuáles podrían ser los otros sustratos anatómicos involucrados como posibles osciladores.

ACTIVIDAD METABÓLICA DEL NSQ

Se ha mostrado que la utilización de glucosa puede medirse en el NSQ y que esta propiedad puede servir como un marcador efectivo para la actividad funcional del núcleo (Schwartz y Gainer, 1977). Esto se lleva a cabo por medio de una técnica de autorradigrafía desarrollada *in vivo*, la cual permite determinar la utilización de glucosa de estructuras individuales dentro del cerebro usando 2-deoxi-D-[14C]-glucosa (2-DG) como trazador inyectada intravenosamente (Kennedy y cols., 1975; Plum y cols., 1976; Sokoloff y cols., 1977).

En animales sincronizados a un ciclo de L/O 12:12 se han reportado valores altos en la actividad metabólica del NSQ durante la fase de iluminación (Schwartz y Gainer, 1977). En animales sometidos a O/O, se ha reportado valores altos durante el día subjetivo y valores bajos en la noche subjetiva (Schwartz y cols., 1979).

LOS TRANPLANTES DE TEJIDO NERVIOSO.

Los trasplantes de tejido nervioso al sistema nervioso de los mamíferos, surgieron hace aproximadamente 100 años. Los experimentos de Dunn (1917), Le Gross Clark (1940) y de May (1945, 1962), establecieron algunos principios básicos para ésta técnica. El desarrollo de tejido neural de fetos y neonatos como donadores puede sobrevivir cuando se coloca dentro de un lugar que permita un adecuado suplemento de nutrientes a partir del sistema nervioso del animal hospedero. Las neuronas transplantadas continúan sus patrones normales de diferenciación y frecuentemente se organizan en patrones citoarquitectónicos reminiscentes del sitio de origen. No es sino hasta la década de los setentas que los trasplantes de tejido cerebral de los mamíferos se ensayan propiamente y es en la década pasada que el trasplante de células y tejidos neurales en tejido nervioso adulto comenzó a usarse ampliamente como herramienta experimental (Bjorklund, 1991). En este proceso se ha sugerido que las limitantes para la supervivencia, desarrollo y diferenciación del tejido nervioso transplantado al cerebro son: la edad del sujeto donador, la edad del sujeto receptor y el sitio donde se coloca el trasplante.

La edad del tejido a transplantar: se ha mostrado que tomar un explante de embriones o de neonatos facilita la supervivencia de este al ser transplantado. Un tejido poco diferenciado como los neuroblastos o las células neuroepiteliales tienen la capacidad de sobrevivir a las manipulaciones a las que sean sometidas. Así, una vez concluido el trasplante, el tejido continúa su desarrollo y conserva características de la región de donde fue tomado. Cabe mencionar, que en el desarrollo ontogenético del sistema nervioso central (SNC), las áreas cerebrales surgen y maduran en diferentes tiempos y velocidades, siendo importante considerar la edad gestacional y el nivel de maduración del área en estudio.

La edad del receptor: el crecimiento e integración del trasplante con el tejido huésped, si bien no es afectado ni es limitado cuando éste se realiza a organismos maduros o seniles. En un tejido con vías definidas, la interacción anatómica entre el tejido transplantado y el tejido huésped muestra dificultades para llevarse a cabo. Por otro lado, cuando el trasplante se realiza dentro de los primeros días de vida postnatal, el proceso de diferenciación de los núcleos y de las vías en el tejido huésped,

continua, dando lugar a una integración óptima entre ambos tejidos. Esto se debe a que en el crecimiento inicial y desarrollo de las neuronas y sus procesos existen concentraciones altas de factores neurotróficos (macromoléculas directamente responsables de la viabilidad de las neuronas en el SNC).

La colocación del trasplante: si se coloca el trasplante en un sitio como lo es la cavidad junto a los plexos coroideos o en un espacio artificial donde se ha permitido la proliferación de la pía, se asegura una vascularización rápida y con ello una nutrición adecuada del trasplante que es el principal requisito para que éste sobreviva. Estos procedimientos aunque efectivos, resultan ser poco aplicables ya que su uso se restringe a las áreas corticales (Bjorklund y Stenevi, 1984; Stenevi y cols., 1985). La luz de los ventrículos cerebrales es favorable a la sobrevivencia del trasplante, donde el implante se nutre a partir del líquido cefaloraquídeo (Perlow y cols., 1979). Con este procedimiento se tiene que considerar que el crecimiento del trasplante está limitado y, se ha propuesto que la interacción entre ambos tejidos es mejor cuando se compromete la pared ependimaria (Freed, 1985).

La posibilidad de disociar células e inyectarlas dentro del parénquima cerebral, ha incrementado las posibilidades para el uso de los trasplantes, con este procedimiento el daño al cerebro huésped es mínimo y no se requiere de un lecho vascular enriquecido. Asimismo, la ubicación del trasplante en el área requerida es precisa y se puede calcular la cantidad de células implantadas (Bjorklund y cols. 1985).

ASPECTOS FUNCIONALES DE LOS TRANSPLANTES

Trasplantes de tejido nervioso del SNC fetal han revelado una enorme capacidad para desarrollarse en nuevos ambientes, integrándose con el tejido hospedero y ejerciendo efectos tróficos y funcionales que promueven la regeneración funcional después de un daño cerebral previo (Bjorklund, 1991).

Los intentos de promover la recuperación de funciones alteradas por lesión o deficiencias congénitas en el SNC, se remontan a los trabajos de Tello (1911) y de Ramón y Cajal (1928), quienes introdujeron la idea de utilizar secciones de nervios periféricos como puente para promover la

regeneración axonal. En los últimos veinte años esta idea ha sido retomada aplicándose a diversas estructuras cerebrales como el hipocampo, el cuerpo estriado, la corteza frontal y el hipotálamo entre otras. En éste último punto se ha concentrado el esfuerzo conjunto de muchos investigadores obteniendo resultados alentadores.

Los trabajos de Bjorklund y Stenevi (1979) y de Dunnet y cols. (1981), colocando un trasplante dopaminérgico (de sustancia nigra fetal) en una cavidad cortical junto al cuerpo estriado previamente denervado induce recuperación funcional. En el modelo de lesión unilateral de la vía nigro-estriatal se ha visto también un efecto de recuperación funcional por medio de trasplantes de tejido nervioso (Perlow y cols., 1979; Freed y cols., 1980; 1981). Se ha reportado recuperación en animales con trastornos congénitos. Posteriormente, en ratones con hipogonadismo congénito el trasplante del área preóptica al III ventrículo es capaz de revertir el hipogonadismo (Gibson y cols., 1982; 1984).

Ratas que han sufrido lesión del NSQ muestran una pérdida del ritmo circádico de ingesta de agua y de locomoción, la recuperación del ritmo se da después de colocar en el III ventrículo trasplantes de hipotálamo fetal (Drucker Colin y cols., 1984; Sawaki y cols., 1984; Aguilar Roblero y cols., 1986; 1992a; 1992b). Hoy en día un considerable número de estudios indica que el tejido neural transplantado sobrevive, se integra al hospedero y provee recuperación funcional después de un daño cerebral en modelos de animales de desórdenes neurodegenerativos (Koutosis y cols., 1994). A continuación se muestra una tabla con los principales enfoques que se le dan a los estudios de trasplantes.

MODELO	PRUEBA CONDUCTUAL	TEJIDO TRANSPLANTADO	OBSERVACIONES NEUROQUÍMICAS Y ANATÓMICAS
Mal de Parkinson. Lesiones con 6-OHDA de ratas y primates.	Rotaciones inducidas por amfetaminas y apomorfina.	Substancia nigra.	Conexiones sinápticas entre el trasplante y el hospedero. Restauración de los niveles de dopamina (DA).
Mal de Parkinson Lesiones con MPTP de ratones y primates.	Prueba sensorio-motora independiente del uso de miembros. Afagia y adipsia, temblor y rigidez. Coordinación y balance.	Médula adrenal y células modificadas genéticamente.	Producción y secreción de DA y factores tróficos por parte de Médula adrenal y las células modificadas respectivamente.
Mal de Huntington Lesión de cuerpo estriado con excitotoxinas.	Actividad locomotora, rotación inducida por apomorfina. Respuesta de laberinto T.	Cuerpo estriado y células modificadas genéticamente.	Reestablecimiento de fibras por tejido transplantado. Recuperación de la actividad de la colinesterasa
Mal de Alzheimer Lesiones del núcleo basal, sistemas colinérgicos corticales y septohipocampales.	Laberinto de Morris de agua, laberinto de brazo radial, respuesta a laberinto T. Actividad locomotora y prevención pasiva.	Septum / Banda diagonal del locus coeruleus.	Reestablecimiento de fibras. Recuperación de los niveles de GABA y enzimas catabólicas y anabólicas asociadas.
Epilepsia. Lesiones farmacológicas y electroshocks.	Kindling.	Locus coeruleus, cortex, septum.	Reestablecimiento de fibras del corte transversal de la fimbria /formix.
Deficiencia en la hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica	Conducta reproductiva.	Area preóptica.	Incremento en la LH pituitaria y/o LH y FSH plasmática.
Lesión del NSQ	Act. circádica en conductas de ingesta de agua, alimento y locomoción.	NSQ y cortex.	Restauración de la entrada retinal, presencia de agrupaciones celulares neuropeptidérgicas similares a las del NSQ adulto.
Dolor y Parálisis Lesión de médula espinal.	Anelgesia, locomoción y reflejos sexuales.	Médula adrenal y metaencefalinas, médula espinal, locus coeruleus y cortex.	Liberación de opiáceos y catecolaminas, conexiones sinápticas entre el trasplante y el hospedero.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS TRANSPLANTES

En la década pasada y principios de esta, ha quedado bien establecido que en condiciones adecuadas, los trasplantes de tejido nervioso son capaces de sobrevivir por largos periodos, en comparación con la supervivencia en sitios periféricos. De hecho, el trasplante parece integrarse en el parénquima del hospedero (Winder y cols., 1988). Este hecho no excluye que la reacción inmune no tenga lugar, ni tampoco implica la supervivencia permanente de un tejido inmunológico incompatible. El hecho de que se evite el reconocimiento del trasplante en forma total o parcial se conoce como restricción inmunológica (Barker y Billingham, 1977).

Aún cuando se desconocen los fundamentos de este fenómeno, se ha sugerido que podría facilitarse por una deficiencia para detectar la presencia de antígenos ajenos al organismo y la presencia disminuida de macrófagos. Se ha observado que la presencia de la barrera hematoencefálica no es fundamental, ya que la mayoría de las técnicas desarrolladas implican la ruptura de la misma en el área que rodea al trasplante. Sin embargo, estos trasplantes sobreviven en forma adecuada (Rosentein, 1987). Se ha reportado que el trasplante, de tejido nervioso al cerebro parece no sensibilizar al sistema inmune del huésped. No obstante, si un trasplante de piel se realiza antes que el tejido nervioso, el sistema es sensibilizado y el rechazo del trasplante de tejido nervioso es inmediato. Estos resultados sugieren que a pesar de la capacidad del sistema inmune de provocar el rechazo del trasplante, dicho sistema carece de cierta capacidad para identificar los antígenos presentes en el implante. Esto apoya la idea de que los antígenos asociados a cualquier tipo de trasplante parecen no ser expuestos al sistema inmune cuando se colocan en sitios con restricción inmunológica (Wikstrand y Bigner, 1980).

Se han propuesto dos mecanismos básicos por los cuales puede interactuar el trasplante con el cerebro huésped. En ciertas patologías se ha visto que la administración periférica de fármacos análogos a determinados neurotransmisores, restauran funciones que están relacionadas con regiones conocidas del SNC. En este sentido, el trasplante puede proveer un sistema local liberador de determinado neurotransmisor funcionando como "bomba biológica", proporcionando ciertas ventajas

como por ejemplo evitar el paso previo de la sustancia activa por la barrera hematoencefálica y permitiendo dirigir las sustancias de interés a regiones cerebrales determinadas (Bjorklund, 1991).

El otro mecanismo propuesto, se plantea en base del grado de reinervación en los trasplantes. Dada la existencia de una posible interconexión, se ha propuesto que los trasplantes podrían participar en funciones más integradas (Bjorklund y cols., 1987). Esto se puede ver en trasplantes de tejido mesencefálico ventral y sustancia nigra, los cuales se caracterizan por la habilidad de regenerar conexiones interneurales complejas, así como conexiones sinápticas en el estriado de animales previamente lesionados (Annet y cols., 1990; Fine y cols., 1988; Dunnet y cols., 1981); observándose además que el tejido transplantado forma axones y crece extensivamente en el área cerebral lesionada (Stenevi y cols., 1976). Además se ha reportado que los trasplantes desarrollan factores morfológicos y neuroquímicos observados en tejido normal adulto (Koutouzis y cols., 1994).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Como se mencionó previamente, existe la evidencia experimental que apoya la hipótesis de que el NSQ transplantado puede considerarse un oscilador circádico. La capacidad de una diferenciación morfológica y funcional adecuada de los trasplantes de NSQ fetal en el sistema nervioso se ha demostrado previamente por métodos de inmunohistoquímica, autorradiografía, electrofisiología y conducta. Dichos estudios han demostrado que el NSQ transplantado se diferencia morfológicamente en las regiones que lo caracterizan en el adulto (un grupo de neuronas vasopresinérgicas adyacente a otro grupo de neuronas VIPérgicas), que dichas células presentan ritmicidad circádica de actividad metabólica y eléctrica (Aguilar Roblero, 1986; Aguilar Roblero y cols., 1992a,b) y que dichos trasplantes son capaces de inducir la recuperación de la ritmicidad circádica en la ingesta de agua (Drucker Colín y cols., 1984; Aguilar Roblero y cols., 1986) y la locomoción (Sawaki y cols., 1984) en ratas, así como la locomoción en hámsters (Aguilar Roblero y cols., 1988; 1995). Se ha visto que fibras de neuropéptido Y o serotonina provenientes del hospedero inervan a los trasplantes de NSQ con

especificidad hacia células vipérgicas de los trasplantes; sin embargo, la presencia de estas entradas no parece ser crítica para la restauración de la ritmicidad (Letman y cols., 1991).

Por otro lado, ratas Brattleboro (cepa que se caracteriza por la deficiencia congénita de vasopresina) utilizadas como receptores de trasplantes de NSQ de ratas Long-Evans (cepa con niveles normales de vasopresina), muestran ritmicidad circádica en la presencia de vasopresina en el líquido cefaloraquídeo, así también como inmunoreactividad a este neuropéptido, con características que se asemejan a las mostradas por células del NSQ (Earnest y cols., 1989). Otra serie de experimentos realizados con una cepa mutante del hamster dorado *Mesocricetus auratus* (Ralph y cols., 1990) con un periodo circádico menor (20 hrs.), utilizada como donadora del NSQ para animales con un periodo circádico normal (24 hrs.), así como, el uso de xenotrasplantes de especies cruzadas de roedores (Saitoh y cols., 1991; Sollars y Kimble, 1993) muestran recuperación de la función y el periodo refleja inobjetablemente características genotípicas, o sea el periodo característico al organismo del cual se obtuvo el tejido que se transplantó. Por otro lado, trasplantes de células del NSQ disociadas han demostrado que la organización típica del núcleo no es necesaria para la generación y expresión del ritmo circádico en oscilación espontánea, de locomoción (Silver y cols., 1990).

En cuanto a los mecanismos de interacción entre el trasplante del NSQ y el hospedero para restaurar la ritmicidad hay controversia. Se ha reportado que la colocación de trasplantes de hipotálamo anterior en el ventrículo lateral, muestran efectividad en cuanto a la inducción de ritmicidad en hámsters previamente lesionados (Letman y cols., 1987; Aguilar Roblero y cols., 1988) sugiriendo un mecanismo humoral. Por otro lado, otra serie de experimentos muestran resultados controvertidos (Harrington y cols., 1987), ya que en este reporte no se observa recuperación funcional.

En estudios anatómicos del NSQ intacto se ha visto que son posibles numerosos canales neurales para comunicar la información circádica. Uno de estos es la proyección al núcleo paraventricular hipotalámico y la zona subparaventricular, principal fuente de conexión hacia la glándula pineal que es responsable de la producción rítmica de melatonina (Klein y cols., 1983), que es la ruta por la cual el NSQ media las respuestas reproductivas al fotoperíodo (Pickard y Turek, 1983). En este

sentido, la deficiencia de trasplantes del NSQ para restaurar respuestas fotoperiódicas en hamsters puede ser debido a la ausencia de conexiones neurales apropiadas entre el trasplante y el hospedero (Ralph y Lehman, 1991).

De esto podemos concluir que el trasplante de hipotálamo fetal es una valiosa herramienta en el estudio del papel del NSQ en la ritmicidad porque puede funcionar como oscilador circádico.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De lo anterior podemos plantear una perspectiva general del funcionamiento del sistema circádico en roedores, pero todavía son insuficientes los estudios que indaguen los mecanismos por los cuales se genera la ritmicidad circádica y cómo ésta última se transmite a los efectores. Con respecto a la hipótesis de osciladores múltiples en el SNC no se ha identificado el sustrato anatómico de otros osciladores que no sean el NSQ. Por otro lado, a la luz de una creciente evidencia experimental que apoya la existencia de osciladores circádicos múltiples en roedores uno se pregunta: cuáles son los mecanismos de acoplamiento entre el NSQ y otros osciladores no identificados, surgiendo básicamente las siguientes posibilidades:

1) Acoplamiento neural. Implica que las conexiones eferentes del NSQ afectan los sistemas efectores y a otros osciladores a través de vías nerviosas. Datos disponibles indican que sólo la lesión de las salidas caudales del NSQ son capaces de alterar algunos ritmos circádicos (Moore y Eichler, 1972; Moore y Klein, 1974). Por otra parte, se ha reportado que los ritmos de actividad locomotora y de corticosterona plasmática mantienen relaciones de fase constantes cuando se descomponen por luz continua (Honma e Hiroshigue, 1978) o después de la interrupción de su patrón circádico por lesiones del NSQ (Watanabe e Hiroshigue, 1981). Estos resultados sugieren que los efectores de algunos ritmos están acoplados a una estructura distinta del NSQ, ya que lesiones de este núcleo no alteran sus relaciones de fase. Ciertos estudios indican que ésta estructura podría localizarse en la zona subparaventricular del núcleo paraventricular, ya que el marcaje con trazadores anterógrados y

retrogradados indican que gran parte de las eferencias del NSQ proyectan a dicha zona, la cual a su vez proyecta hacia las mismas áreas a las que lo hace el NSQ, formando así un sistema de información redundante (Watts y cols., 1987; Watts y Swanson, 1987).

II) Acoplamiento neuroendócrino. Implica que las salidas del NSQ están acopladas a un sistema de neurosecreción. cuyas "neurohormonas" serían las responsables de imponer a sistemas efectores y otros osciladores, un nivel de ejecución en función del tiempo o una relación de fase dada. El que una o varias "neurohormonas" se encarguen de acoplar distintos osciladores es una hipótesis atractiva, ya que el mecanismo típico de regulación sostenida, difusa y a distancia corresponde al del sistema endócrino. Esto se sugiere porque la mayoría de las salidas del NSQ van hacia el hipotálamo (Swanson y Cowan, 1975; Sofroniew y Weindl, 1978; Sims y cols., 1980; Berk y Finkelstein, 1981; Hoorneman y Bojts, 1982), el cual es considerado la vía final común endócrina (Krieger, 1980) y funciona como un transductor neuroendócrino a través de la regulación de fenómenos neurosecretorios (Scharer, 1978; Guillermin, 1980). Recientemente se ha reportado que la melatonina es capaz de sincronizar el ritmo locomotor de ratas en oscuridad continua (Reedman y cols., 1983). Adicionalmente se ha reportado que la melatonina es capaz de inducir cambios de fase en el ritmo de actividad metabólica del NSQ (Cassone y cols., 1987) y que la pinealectomía induce una partición más acelerada en hamsters sometidos a luz continua (Aguilar Roblero y Vega González, 1993).

Lo que limita el estudio de este problema es que no se han identificado otros osciladores con las características del NSQ, y que no se sabe si este se forma por unidades independientes con características de osciladores (p.e. los NSQ izquierdo y derecho). Además se desconocen los mecanismos por los cuales las células del NSQ generan y regulan la expresión de los ritmos circádicos. En definitiva, hay limitantes metodológicas que no permiten solucionar de manera apropiada estas preguntas.

Una posible solución a las limitantes anteriores es el uso de los transplantes como herramienta experimental. El hecho de que exista evidencia experimental que apoya la hipótesis de que el NSQ fetal transplantado funciona como oscilador, nos permite crear un sistema multioscilariorio en animales sin

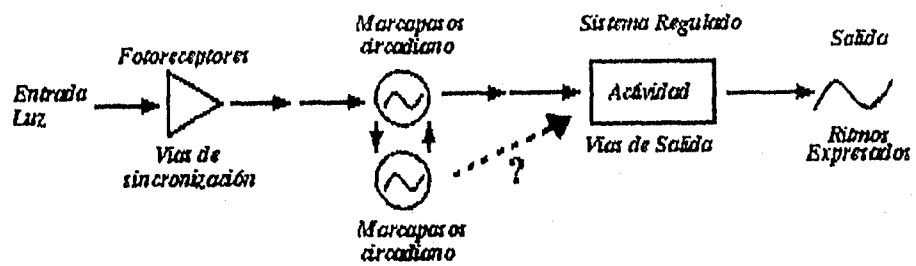


FIGURA 5.- Modelo experimental para el estudio de fenómenos relacionados con el acoplamiento del Sistema Circadiano.

lesión del NSQ, con sustratos identificables donde se pueden determinar los efectos del trasplante sobre el sistema circádico, pudiendo evaluarse a nivel metabólico (2-DG) y a nivel conductual la salida del ritmo (conducta de ingesta de agua) que vamos a evaluar. Con este enfoque es posible estudiar en un sistema experimental los mecanismos de acoplamiento de osciladores circádicos en la rata (Fig. 5).

***HIPOTESIS DE TRABAJO**

Partiendo de que la fase del ritmo de la conducta predice la fase del NSQ en el animal normal, podemos decir que: si la fase del NSQ determina la fase del NSQ del trasplante entonces ambos osciladores están acoplados. Por otra parte, si el acoplamiento es humoral, no depende de la localización del trasplante.

***OBJETIVOS**

Para el grupo de animales con trasplantes a III ventrículo:

- 1) Determinar la fase de la conducta.
- 2) Determinar la fase del NSQ hospedero y del NSQ del trasplante por medio de 2-DG.
- 3) Comparar la fase conductual con la fase metabólica del NSQ.
- 4) Comparar la fase del NSQ con la fase del NSQ transplantado.

Para el grupo de animales con trasplantes a ventrículo lateral:

- 1) Determinar la fase de la conducta.
- 2) Determinar la fase del NSQ hospedero y del NSQ del trasplante por medio de 2-DG.
- 3) Comparar la fase conductual con la fase metabólica del NSQ.

- 4) Comparar la fase del NSQ con la fase del NSQ transplantado.

MATERIAL Y METODOS

- * Sujetos: en este estudio se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 180 y 200 g., como animales receptores de los transplantes. Ratas hembras con 17 días de gestación se utilizaron como donantes de los fetos, de los cuales procedieron los transplantes.
- * Cirugía: todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en condiciones asépticas. Los sujetos se anestesiaron con Hidrato de cloral a una dosis de 400mg/Kg de peso corporal. Se montaron en un aparato estereotáxico, con la barra de los incisivos en 0. Posteriormente se tomo una cánula de acero inoxidable (calibre 18), que se colocó en el cerebro utilizando en el aparato estereotáxico las coordenadas A-P: 0.0; L: 0.0 : V: 8.0 con respecto a Bregma para transplantes al tercer ventrículo; y las coordenadas A-P: -0.8; L: 1.2; V: 3.6 con respecto a Bregma para transplantes a ventrículo lateral (Paxinos , 1986).

El tejido a transplantar se obtiene de fetos de 17 días de gestación. En las ratas hembras, una vez anestesiadas, se procedió a exponer el útero mediante una laparotomía. Los fetos se extrajeron en el momento del transplante. Se disecó el cerebro fetal y se colocó sobre su cara dorsal en un vidrio de reloj con solución salina fisiológica a temperatura ambiente. Bajo el microscopio de disección se localizó la convergencia de las arterias cerebrales anteriores y la emergencia de los nervios ópticos. Se realizaron cortes a nivel rostral y caudal de la emergencia del nervio y entre éste y las arterias mencionadas, éstos últimos cortes fueron en sentido dorsomedial, formando un bloque de aproximadamente 0.5 mm³ en forma de pirámide cuadrangular cuya base era el quiasma óptico. Este bloque se inyectó en 0.10 ml de solución salina al III ventrículo y al ventrículo lateral de los animales receptores. El tiempo transcurrido entre la incisión del útero y la inyección del tejido fue aproximadamente entre 3 y 6 minutos.

- * Condiciones ambientales. todos los animales se mantuvieron en un ciclo natural de luz / oscuridad correspondiente a la época del año antes del procedimiento quirúrgico. Posteriormente a la recuperación quirúrgica, los animales hospederos del trasplante fueron mantenidos en un ciclo de oscuridad continua; con disponibilidad de agua y alimentos ad libitum.
- * Registros se determinó el patrón temporal de ingesta de agua mediante un sistema de monitoreo continuo diseñado en el laboratorio de cronobiología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La rata se colocó en una caja de acrílico transparente de 40X25X20 cm. En el piso del tercio frontal de la caja, se colocó una placa de aluminio, justo por encima de esta placa se localizaba la botella con agua con un bebedero de acero inoxidable. Este se aisló con un tubo de plástico de 2mm de espesor que sobresalía 2mm del orificio de salida del bebedero; de tal forma, que para que la rata bebiera agua, era necesario que introdujera la lengua dentro del plástico del bebedero y se parara sobre la placa de aluminio. La placa y el bebedero se conectaban respectivamente a las terminales negativa y positiva de un circuito oscilador monoestable. Cada vez que la rata tocaba el bebedero, el circuito generaba un pulso, el cual se normalizaba posteriormente en duración e intensidad. Este pulso alimentaba el convertidor analógico digital de una computadora la cual almacenaba la información en bins de 30 segundos.

Posteriormente, esta información se compactaba y almacenaba en discos flexibles y en archivos de 15 minutos. Se graficó la frecuencia de ingesta de agua por periodos de 1 hr. expresada como porcentaje de la ingesta por 24 hrs. Inicialmente los datos se graficaban como actogramas dobles "double plot". El actograma es un tipo de registro que consiste de una serie de histogramas individuales ordenados secuencialmente; en cada histograma se representa en las abscisas los intervalos de tiempo externo de registro en que se dividió un día y en las ordenadas la intensidad de la variable estudiada, así como los distintos días de registro arreglados a manera de renglón. En el actograma en doble graficación se repite el mismo actograma pero desfasado un día sobre la escala de las ordenadas, de esta forma se observan consecutivamente en un renglón el día 1 y 2, en el siguiente el día 2 y 3, y así sucesivamente, permitiendo visualizar con facilidad el patrón temporal del fenómeno medido.

Estimación de la hora circádica. Se analizan los registros de actividad conductual de los animales en oscilación espontánea, se escogen cuando menos siete días previos al último día registrado y se estima de manera visual cual es el inicio de actividad en todos esos días. Posteriormente mediante la prolongación de una línea de regresión, se estima cuando el animal va a iniciar su actividad el día que se escoge para la realización de la inyección de 2-Dg. Este análisis es previo a la inyección, y tiene que ser lo más inmediato posible, ya que si existe un retraso de más de un día en la estimación de la hora circádica 12, el margen de error en el cálculo se incrementa por más de una hora.

Una vez definida CT12 a partir del inicio de actividad, se relaciona con el tiempo externo (se ve con que hora geográfica concuerda), a partir de esto, se hacen intervalos cada tres horas para tener un total de 8 horas circádicas a lo largo de las 24 hrs. Una vez obtenida la concordancia entre las 8 horas circádicas y el tiempo externo correspondiente se procede a realizar la inyección.

* Determinación de la actividad metabólica.

El método es derivado de un modelo basado sobre las propiedades bioquímicas de la 2-deoxiglucosa (Sokoloff y cols., 1977) (Fig. 6). La 2-deoxiglucosa es transportada bidireccionalmente entre la sangre y el cerebro por el mismo acarreador que transporta la glucosa a través de la barrera hemato-encefálica (Bidder, 1968; Bachelard, 1971; Oldenford, 1971). Dentro del tejido cerebral es fosforilada por la hexocinasa a 2-deoxiglucosa-6-fosfato (Sols y Crane, 1954). La deoxiglucosa (2-DG) y la glucosa son, por lo tanto sustratos mutuamente competitivos (en el transportador sangre-cerebro y en la fosforilación catalizada por la hexocinasa). La glucosa-6-fosfato se metaboliza (eventualmente a CO₂ y agua, y en menor grado vía hexosa monofosfato), en comparación con la deoxiglucosa-6-fosfato, la cual no puede ser convertida a fructosa-6-fosfato y no es un sustrato de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (Sols y Crane, 1954). La deoxiglucosa-6-fosfato puede ser convertida a deoxiglucosa-1-fosfato y así UDP-Deoxiglucosa y eventualmente a glicoproteínas y glicolípidos; pero estas reacciones son demasiado lentas y en tejidos de mamíferos solo una fracción bastante pequeña de deoxiglucosa-6-fosfato procede hacia estos productos (Nelson y Sokoloff, 1983). La deoxiglucosa-6-fosfato y sus derivados una vez

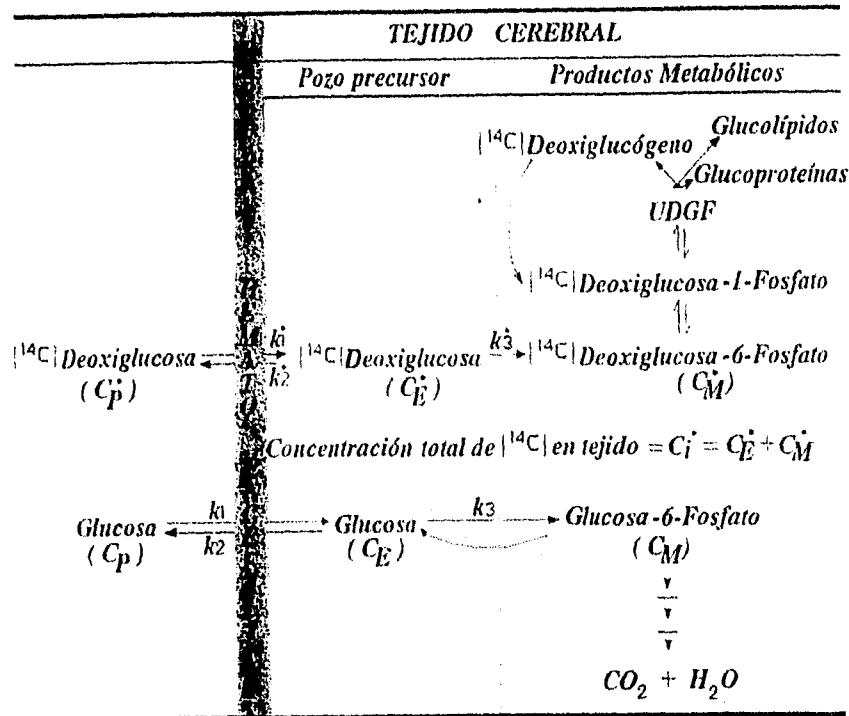


FIGURA 6.- Representación diagramática del modelo teórico. C_i^* representa la concentración total de ^{14}C dentro del tejido cerebral. C_p^* y C_p representan las concentraciones de ^{14}C deoxiglucosa y glucosa en plasma arterial respectivamente. C_E^* y C_E representan las concentraciones respectivas que sirven como sustratos para la hexocinasa en el tejido. C_M^* representa la concentración de ^{14}C deoxiglucosa-6-fosfato en el tejido. Las constantes k_1^* , k_2^* y k_3^* representan los rangos para el acarreador que media el transporte de ^{14}C deoxiglucosa del plasma al tejido, el acarreador que media el transporte retrógrado del tejido al plasma y para la fosforilación de la hexocinasa, respectivamente. Las constantes k_1 , k_2 y k_3 representan los rangos equivalentes para la glucosa. La ^{14}C deoxiglucosa y la glucosa compiten por los acarreadores que transportan a ambas sustancias entre el plasma y el tejido, y por la hexocinasa, la cual las fosforila a hexosas-6-fosfatos (tomada de Sokoloff y cols., 1977).

formados son, por lo tanto, esencialmente atrapados dentro de tejidos cerebrales, el tiempo suficiente para la evaluación del consumo metabólico. Si el intervalo de tiempo es lo bastante corto (por ejemplo menos de una hora), se asume una pérdida de ^{14}C -DG-6-P de los tejidos, así la cantidad de marca radioactiva acumulada en cualquier tiempo dado, siguiente a la introducción de ^{14}C -DG dentro de la circulación, es igual a la integral del rango de fosforilación de ^{14}C -DG por hexocinasa en el tejido durante ese intervalo. Esta integral está relacionada con la cantidad de glucosa que está siendo fosforilada sobre el mismo intervalo, dependiendo del curso temporal de las concentraciones relativas de ^{14}C -DG y glucosa dentro de los bancos precursores, y sobre la constante cinética de Michaelis-Menten para la hexocinasa con respecto a la ^{14}C -DG y la glucosa. En el consumo de glucosa en estado natural, la cantidad de glucosa fosforilada durante este intervalo de tiempo, es igual al flujo en estado estable de glucosa que posteriormente se transforma en energía (ATP y cadena de NADH), este paso es catalizado por la hexocinasa; y el rango neto del flujo de glucosa a través de este paso es igual al rango de utilización de la glucosa (Sokoloff, 1984).

La 2-DG-6-P puede medirse cuantitativamente en autorradiografías hechas en placas sensibles a rayos X, exponiendo éstas a secciones del cerebro de un animal inyectado. Estas autorradiografías son utilizadas para calcular los rangos de concentración de glucosa de todas las estructuras cerebrales visualizadas o, alternativamente para comparar gráficamente los rangos relativos del consumo de glucosa de una zona a otra, ya que las autorradiografías proveen representaciones gráficas de las concentraciones relativas del isótopo dentro de varios tejidos. La diferencia en la proporción de tonos de gris (densidad óptica) de un área particular de la autorradiografía, es proporcional a la cantidad de glucosa consumida en esa área (Sokoloff y cols., 1977).

Se midió la tasa de actividad metabólica de células cerebrales mediante una modificación de la técnica de 2-Deoxiglucosa desarrollada por Sokoloff (1977). Cada animal se inyectó intravenosamente en la cola con una dosis de $125\mu\text{Ci/Kg}$ de peso de 2-DG ($1\text{-}^{14}\text{C}\text{-}2\text{-deoxi- D-Glucosa}$, de actividad específica 50 mCi/mMol , SIGMA). Después de 45 minutos, el animal se decapitó, se le extrajo el cerebro y se congeló rápidamente en isopentano mantenido en hielo seco y posteriormente se almacenó

en un REVCO a -85C. Se procedió a cortar los cerebros a 20µm de grosor en un plano coronal en dirección rostro-caudal. Los cortes fueron colectados inmediatamente en portaobjetos de vidrio cubiertos con gelatina (0.2%) a intervalos de 40µm y divididos en dos series. Los portaobjetos se dejaban secar en una parrilla a 60°C durante cinco minutos. Posteriormente los cortes se ponían en contacto con una película Kodak X-OMAT en cartuchos para placas autorradiográficas donde se "exponían" a temperatura ambiente durante una semana. Las placas se procesaron con revelador y fijador GBX (Kodak), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de la exposición, los cortes se tiñeron con Violeta de Cresilo para realizar el análisis histológico.

Las placas autorradiográficas se analizaron por densitometría en un analizador de imágenes (MCID, Imaging Research Inc.). La densidad óptica de cada sitio en la autorradiografía (de 25 a 100µm) es almacenado en la computadora, se convierten posteriormente a concentraciones de {14C} sobre la base de densidades ópticas de muestras plásticas con una marca de {14C} cuantificada, que después se convierten a una estimación de la utilización de glucosa en µmoles de glucosa/100grm/minuto, por la solución de la ecuación operacional de acuerdo al modelo propuesto por Sokoloff (1977). Posteriormente se utiliza un programa de análisis matemático (Excel) y se grafican los datos de las horas circádicas contra las cifras de 2-Dg incorporadas a los tejidos de interés, en el caso de éste estudio el NSQ intacto y el NSQ del trasplante.

* Tinción de Nissl: los cortes montados en portaobjetos con gelatina (0.2%) se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (70%, 95%, Abs.) y se rehidrataron con el procedimiento inverso, se tiñeron con solución de violeta de cresilo (0.5%) y se diferenciaron y deshidrataron en alcohol etílico, se aclararon con xilol y se cubrieron con Permount.

DISEÑO EXPERIMENTAL

El número total de animales estudiados fue de 63; de éstos, 33 fueron transplantados a tercer ventrículo y 30 a ventrículo lateral. Después del periodo de recuperación de la cirugía, los sujetos se colocaron en cajas de registro para la conducta de ingesta de agua, donde permanecieron durante por lo menos un mes. Por convención, al inicio de la actividad se la define como la fase CT12; ésta se utilizó como

marcador de fase para el cálculo de la hora a la cual iba a ser inyectado el marcador metabólico (2-DG). El procedimiento utilizado se lleva a cabo de la siguiente manera: se calculó la CT12 de los últimos seis días de registro y se estimó con que hora geográfica iba a coincidir en el día programado para la inyección. A partir de este paso, se decidieron las diferentes horas a las que se iba a aplicar la inyección de 2-DG (Fig. 7). Basándonos en criterios de aspectos cualitativos en cuanto al material histológico obtenido, así como a las autorradiografías procesadas, se escogieron los mejores representantes y con estos se procedió a realizar el siguiente paso. En base a esto, se trabajó con 33 animales, 18 del grupo de transplantes a tercer ventrículo y 15 del grupo de transplantes a ventrículo lateral. Una vez obtenida una estimación de la utilización de glucosa, las medidas densitométricas fueron analizadas estadísticamente por medio de una ANOVA de una vía para la hora circádica de la inyección y las medidas obtenidas de NSQ e hipotálamo anterior tanto para el grupo de animales con transplantes a tercer ventrículo así como para el grupo de transplantes a ventrículo lateral. La prueba estadística utilizada fue la de Duncan porque el número de la muestra se redujo en relación a la cantidad inicial de animales y esto trajo como consecuencia una desigualdad del número de animales por hora circádica evaluada (Fig. 7).

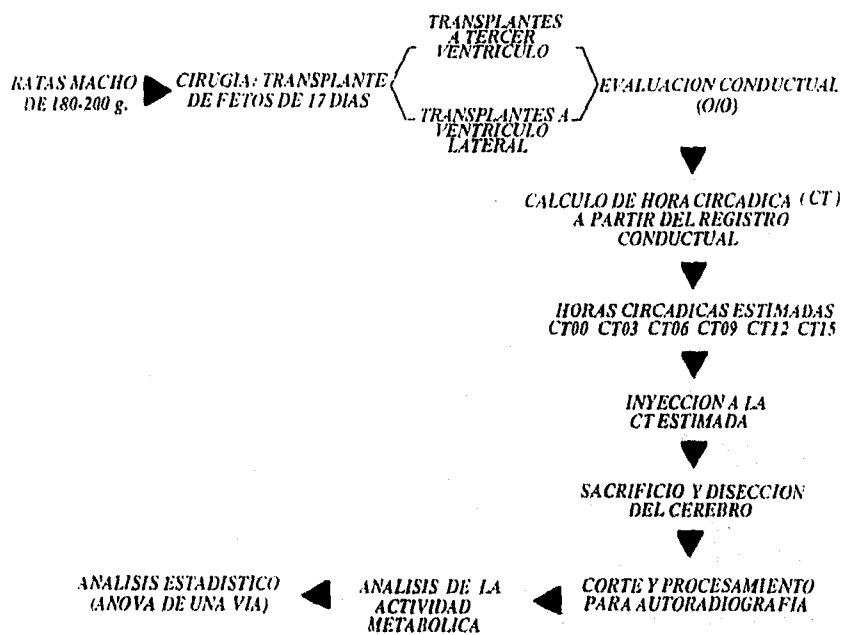


FIGURA 7.- Diagrama de flujo de las diferentes etapas de las que consta el diseño experimental.

RESULTADOS

La tasa de supervivencia de los trasplantes en los 63 animales estudiados, fue de 85%; en animales transplantados en el tercer ventrículo la tasa de supervivencia fue de 93%, mientras que en animales transplantados en el ventrículo lateral fue de 76.66%. Los registros conductuales de los animales estudiados muestran básicamente dos tipos de registros: típicos y atípicos. Los registros típicos a su vez se caracterizan por tener dos subtipos; los unimodales cuya duración tanto de α como ρ es de aproximadamente 12 horas, es decir $\alpha : \rho=1$ (Fig. 8). Y el bimodal cuya fase de inactividad está formada por dos componentes bien definidos en α (Fig. 9). Los registros atípicos muestran tres subtipos: a) divergentes: con un componente de actividad que posteriormente se parte en dos a más componentes (Fig. 10). b) convergentes: en donde dos componentes convergen en uno solo (Fig. 11) y c) cruzados: que se caracterizan por distintos componentes que se separan para luego juntarse sucesivamente (Fig. 12).

Del grupo de animales transplantados en el tercer ventrículo mostraron registros típicos el 48%, y 51.86% atípicos (Fig. 13). La mayoría de registros típicos son unimodales mientras que los atípicos son divergentes. Del grupo de animales transplantados en ventrículo lateral mostraron registros típicos el 66.66%; y el 33% atípicos (Fig. 14). Cabe mencionar que los registros típicos son en su mayoría bimodales y en el caso de los atípicos, la mayoría son convergentes.

En la evaluación de la actividad metabólica, en el grupo de animales con trasplantes en el tercer ventrículo, tanto el NSQ hospedero como el NSQ del trasplante presentan un máximo de actividad metabólica a la CT06 y un mínimo a las CT15 (Tabla I). En el grupo de animales con trasplante en el ventrículo lateral el NSQ hospedero presenta un máximo de actividad a las CT09, mientras que el NSQ transplantado presenta su máximo a las CT15 (Tabla II). Cuando comparamos la actividad metabólica del NSQ hospedero y del NSQ transplantado mediante una prueba de t, se observa una mayor actividad metabólica en este último, tanto en el grupo de trasplantes a tercer ventrículo ($t = -4.77$; $p < 0.001$), como en el grupo de trasplantes a ventrículo lateral ($t = -6.86$; $p < 0.001$).

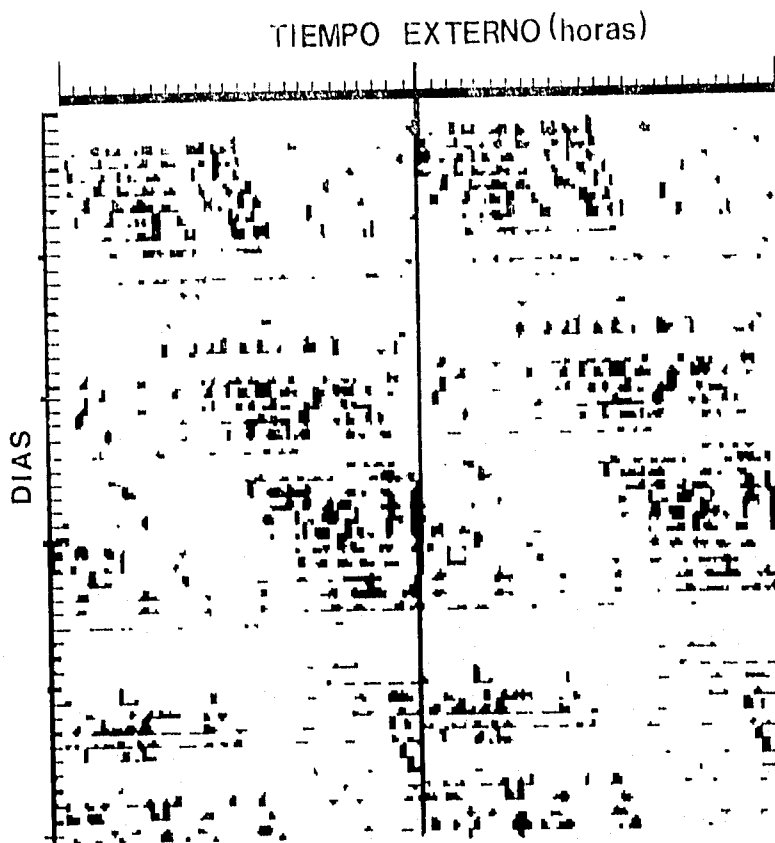


FIGURA 8.- Actograma de actividad en doble graficacion del tipo tipico unimodal.

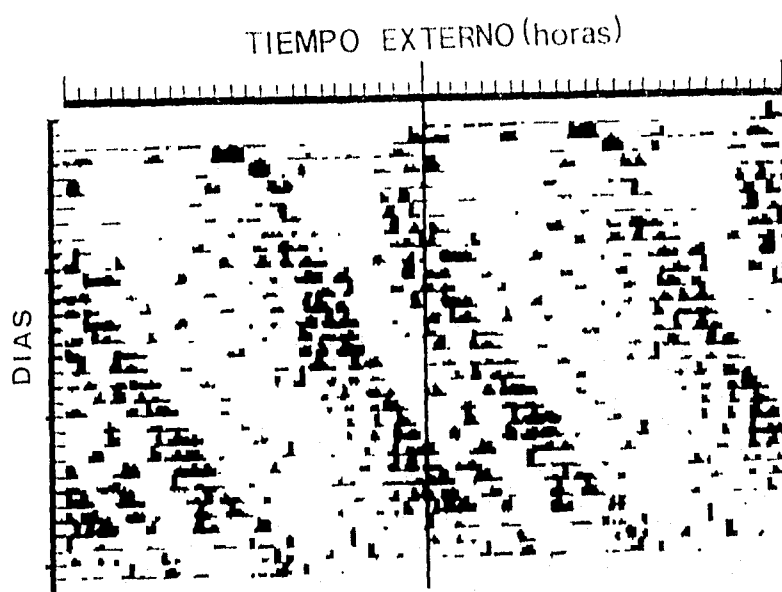


FIGURA 9.- Actograma de actividad del tipo típico bimodal

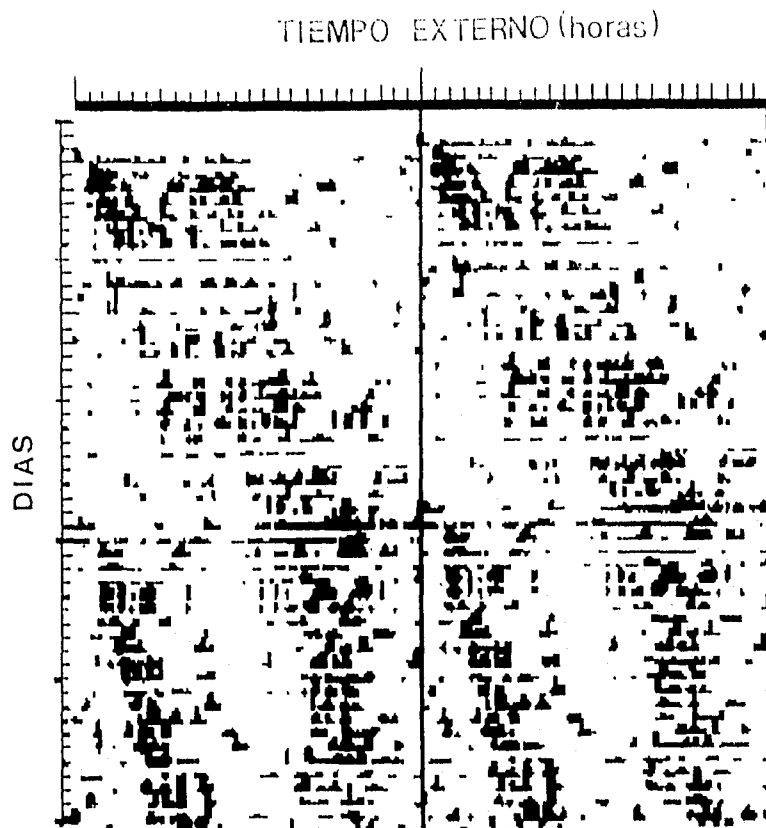


FIGURA 10.- Actograma de actividad del tipo atípico divergente.

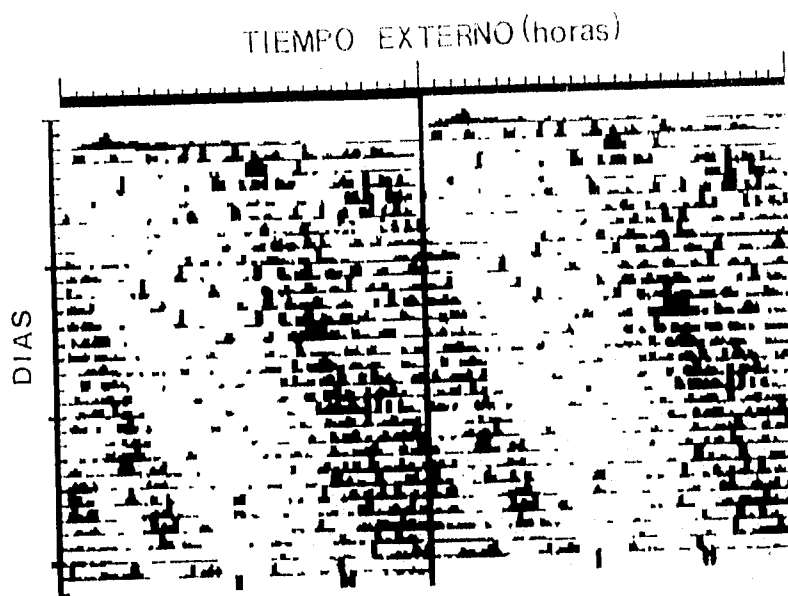


FIGURA 11.- Actograma de actividad del tipo atípico convergente.

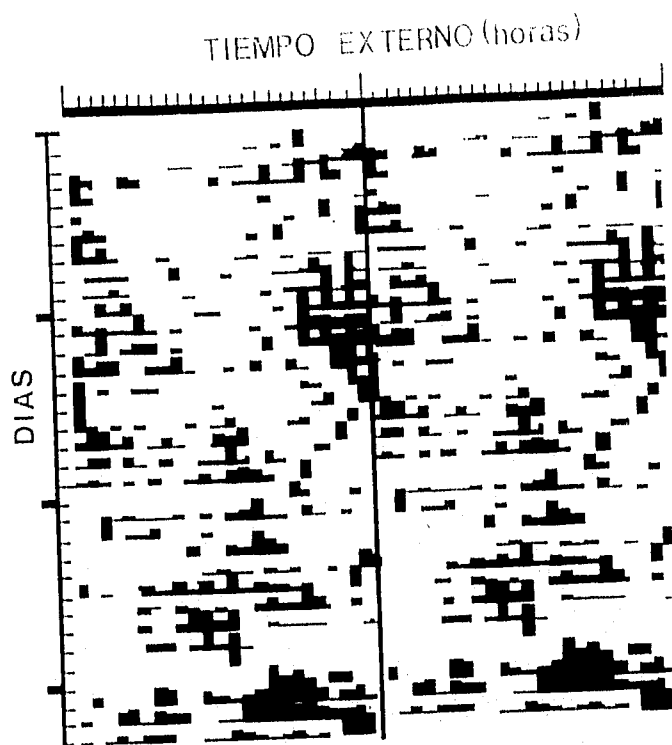


FIGURA 12 .- Actograma de actividad del tipo aiipico en crabs.

CT	N	NSQ HOSPEDERO	ERROR ESTANDAR	NSQ TRANSPLANTADO	ERROR ESTANDAR
			(+/-)		(+/-)
0	3	46.52	0.49	62.52	3.83
3	3	50.84	6.28	61.85	6.51
6	3	64.22	5.33*	69.20	7.17*
9	3	42.46	4.37	47.91	2.28
12	3	45.98	3.33	55.18	9.41
15	3	43.10	4.33	59.25	4.13

TABLA I). Medidas de actividad metabólica (utilización local de glucosa $\mu\text{Mol}/100\text{g}/\text{min}$) a diferentes horas circádicas. $F_{(3,12)} = 5.03$ * prueba de Duncan. $P < 0.05$.

CT	N	NSQ HOSPEDERO	ERROR ESTANDAR	NSQ TRANSPLANTADO	ERROR ESTANDAR
			(+/-)		(+/-)
0	2	53.21	11.7	60.23	6.12
3	2	52.40	6.30	64.16	2.69
6	3	56.06	4.66	70.43	13.1
9	3	67.02	4.85	72.52	9.8
12	3	44.99	5.38	69.20	16.0
15	2	51.42	1.07	79.78	3.76

TABLA II). Medidas de actividad metabólica (utilización local de glucosa $\mu\text{Mol}/100\text{g}/\text{min}$.) a diferentes horas circádicas. $F_{(3,12)} = 5.55$, prueba de Duncan * $P < 0.05$.

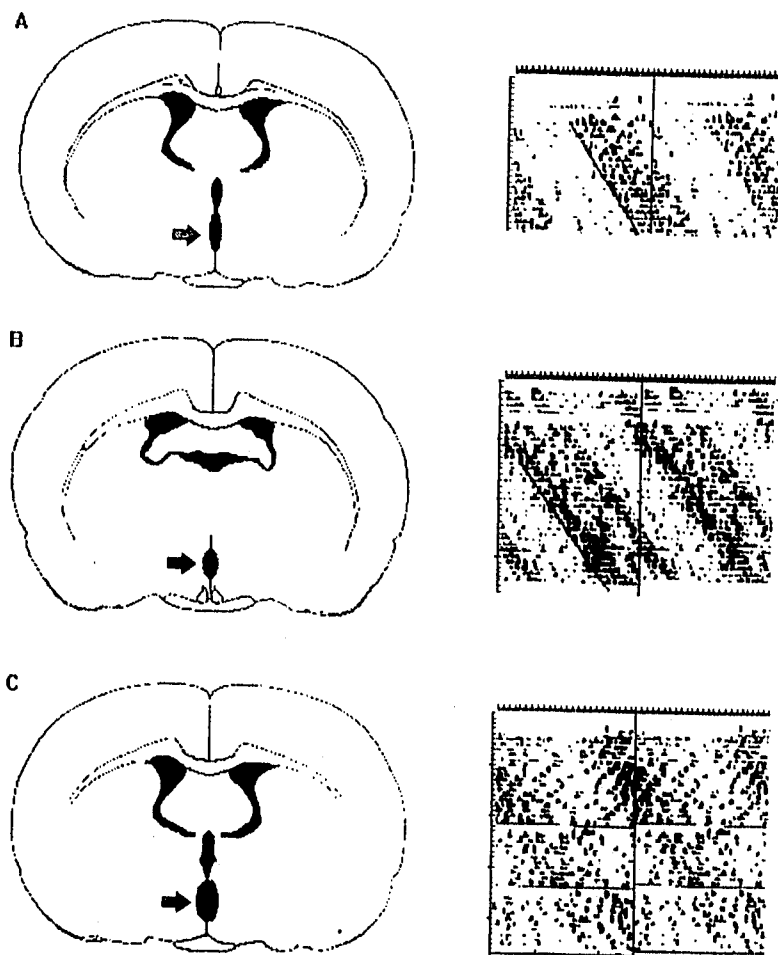


FIGURA 13.- Esquema que relaciona la ubicación del trasplante y los distintos tipos de actogramas en tres sujetos diferentes del grupo de animales transplantados a tercer ventrículo.

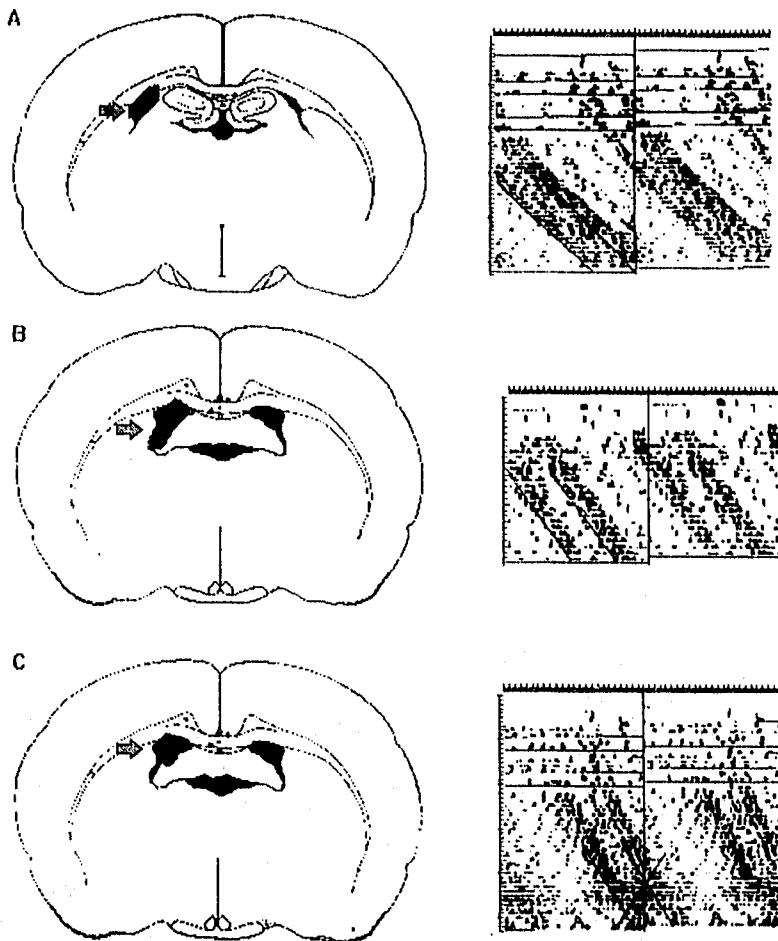


FIGURA 14.- Esquema que relaciona la ubicación del trasplante y los distintos tipos de actogramas en tres sujetos diferentes del grupo de animales transplantados a ventrículo lateral.

Cuando en el grupo de animales de tercer ventrículo comparamos las curvas metabólicas normalizadas del NSQ de los animales receptores con las del NSQ de los transplantes, observamos que ambas curvas presentan la misma fase, es decir tienen el mismo patrón de distribución en lo que se refiere a los valores alcanzados a lo largo de las 24 hrs. (Fig. 15). Haciendo lo mismo en el grupo de animales de transplantes en el ventrículo lateral se observa que ambas curvas presentan diferentes fases en el patrón de distribución de los valores alcanzados a lo largo de las 24hrs. (Fig. 16).

Si se compara el pico del NSQ hospedero del grupo de transplantes en el tercer ventrículo con el grupo de transplantes en el ventrículo lateral, se observa que este último presenta un retraso de fase de tres horas.

DISCUSIÓN

El patrón conductual se caracteriza por presentar dos formas de comportamiento: 1) donde se presenta un solo componente de actividad circádica y 2) donde se presentan componentes circádicos y ultradianos. En el primer caso, la presencia de un solo bloque de actividad puede deberse a que el transplante presente la misma fase de actividad del NSQ hospedero. En el segundo caso, la presencia de más de un componente puede deberse a que el transplante se esté manifestando en forma independiente del oscilador endógeno del animal.

Dentro de los distintos patrones conductuales observados, el patrón típico unimodal puede explicar que el transplante afecta o no afecta la conducta de la siguiente manera. En el primer caso presenta la misma fase que el hospedero.

El patrón típico bimodal sugiere estar reflejando a los dos osciladores involucrados (NSQ hospedero y transplantado), esto es congruente con el modelo de dos osciladores propuesto por Daan y Berde (1978) y con el reporte de Daan y Pittendrigh (1976).

En los patrones atípicos las observaciones pueden deberse a:

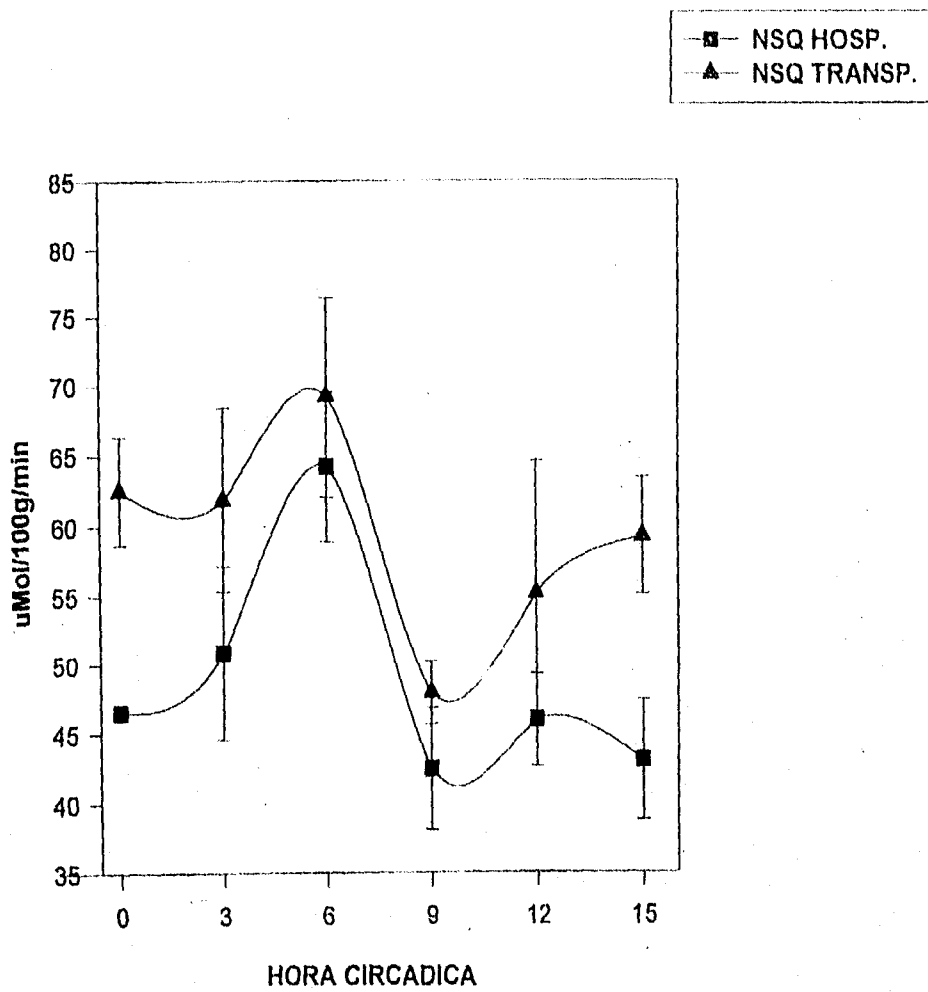


FIGURA 15.- Curvas de actividad metabólica del grupo de animales transplantados a III ventrículo. En el eje de las ordenadas las unidades de actividad metabólica se dan en $\mu\text{Mol}/100\text{g}/\text{min}$. El eje de las abscisas corresponde a las distintas horas circádicas (CT).

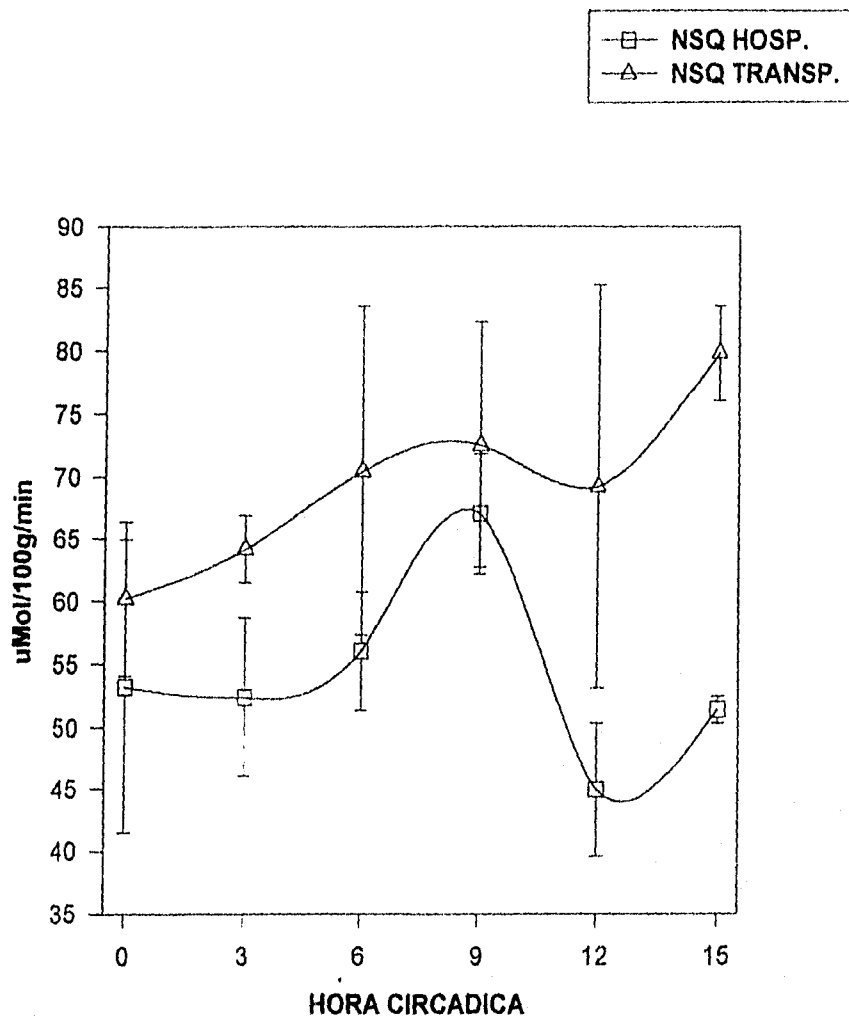


FIGURA 16.- Curvas de actividad metabólica del grupo de animales transplantados en el ventriculo lateral. En el eje de las ordenadas las unidades de actividad metabólica se dan en $\mu\text{Mol}/100\text{g}/\text{min}$. El eje de las abscisas corresponde a las diferentes horas circádicas (CT).

A) que el trasplante no afecta al sistema encargado de generar la conducta en si misma, sino que induce un desfase del ciclo del oscilador hospedero y que esto se manifiesta por un fenómeno de coordinación relativa interna. En pocas palabras, que está existiendo una interacción entre los relojes.

B) que el trasplante tenga una fase distinta a la del NSQ hospedero y que no afecte directamente a éste, sino que induzca un cambio en algún sitio de la salida del sistema del hospedero (Fig. 17-A).

Los cambios de actividad metabólica del NSQ hospedero observados a lo largo de las 24 hrs. corroboran las observaciones realizadas por otros grupos de investigación en lo que respecta al consumo circádico de 2-DG (Schwartz, 1977; Schwartz y Reppert, 1983; Newman y Hospod, 1986). En lo que se refiere a los cambios de actividad metabólica a lo largo de las 24 hrs. del trasplante de NSQ, no solo corroboran la viabilidad del trasplante, sino también los cambios día/noche reportados previamente (Aguilar Roblero y cols., 1992; Serviere y cols., 1994), sugiriendo además un ritmo endógeno del NSQ transplantado.

Los registros de actividad metabólica son más elevados en el trasplante en comparación con el NSQ hospedero; esto puede deberse a: 1) que durante el procedimiento quirúrgico se desencadene una gliosis reactiva provocando la elevación de la tasa metabólica del trasplante; 2) que la deafferentación implícita en el proceso de transplantación elimina circuitos inhibitorios de regulación, elevándose la actividad neural del trasplante y por consiguiente la actividad metabólica y 3) que el tejido fetal todavía está en proceso de diferenciación involucrando una actividad celular más elevada, ya que existen reportes de que la actividad metabólica disminuye con la edad (Sacher y Duffy, 1978), por lo cual no sería sorprendente que dicho proceso se inicie desde la gestación.

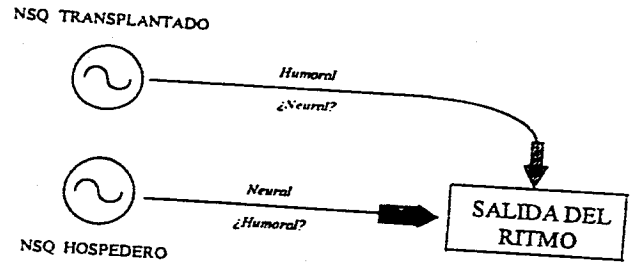
Ya que se ha documentado que el trasplante de NSQ funciona como oscilador (Drucker Colln y cols., 1984; Sawaki y cols., 1984; Aguilar Roblero y cols., 1986; 1992; Lehman y cols., 1987; Ralph y cols., 1991), el desfase observado en la actividad metabólica entre el NSQ hospedero y el NSQ transplantado entre el grupo de trasplantes a tercer ventrículo sugiere que el fenómeno se trata de un proceso de acoplamiento entre osciladores (Fig. 17-B) similar al propuesto por Pittendrigh (1976).

Se entiende por acoplamiento a la capacidad de un sistema oscilatorio con un periodo y una fase propia de ajustar estos parámetros a otro sistema oscilatorio con un periodo propio pero similar al primero. En un sistema de dos osciladores acoplados la estabilidad de acoplamiento depende: 1) del periodo característico de cada uno de los osciladores, pudiendo éstos ser disectados en ausencia de acoplamiento y 2) de la fuerza de acoplamiento que existe entre ambos osciladores. Las características del sistema acoplado varían con la relación de fase inicial entre ambos osciladores, lo cual determina el periodo resultante y el tiempo de actividad del sistema (Pittendrigh, 1976).

En los animales con trasplante en el tercer ventrículo encontramos registros conductuales con uno o dos componentes de actividad. Los registros con un solo componente podrían sugerir un caso de acoplamiento unilateral, donde la fase que se manifiesta es de uno de los osciladores. Los registros de dos componentes de actividad pueden sugerir un caso de acoplamiento bilateral, con estados de equilibrio estables e inestables (Daan y Berde, 1978), manifestándose como ya se mencionó en un fenómeno de coordinación relativa interna. Es interesante hacer notar que cuando dos ritmos están desacoplados internamente, éstos mantienen cierta interacción residual; cuando pasan por cierta relación de fase, éstos pueden o no acelerarse no siendo un estado óptimo, y se alcanza una relación de fase inestable: este fenómeno se repite en el tiempo de forma continua (Moore-Ede y Sulzman, 1984). Esta interacción fue identificada por Czeisler en 1978 como "coordinación relativa interna", la cual es análoga a la coordinación relativa externa observada entre un zeitgeber ambiental y el sistema circádico cuando la fuerza de la señal no es suficiente para producir la sincronización (Von Holtz, 1939).

El desfase observado en la actividad metabólica del NSQ hospedero y del NSQ transplantado en el grupo de animales con trasplantes al ventrículo lateral, sugieren que la señal acopladora del hospedero es incapaz de alcanzar al NSQ del trasplante (sea sináptica o humoral), o alternativamente, que la señal alcance el trasplante pero sea débil para producir acoplamiento. La ausencia de acoplamiento entre el NSQ hospedero y el NSQ transplantado indica que éste último está fuera del control del NSQ hospedero.

A



B

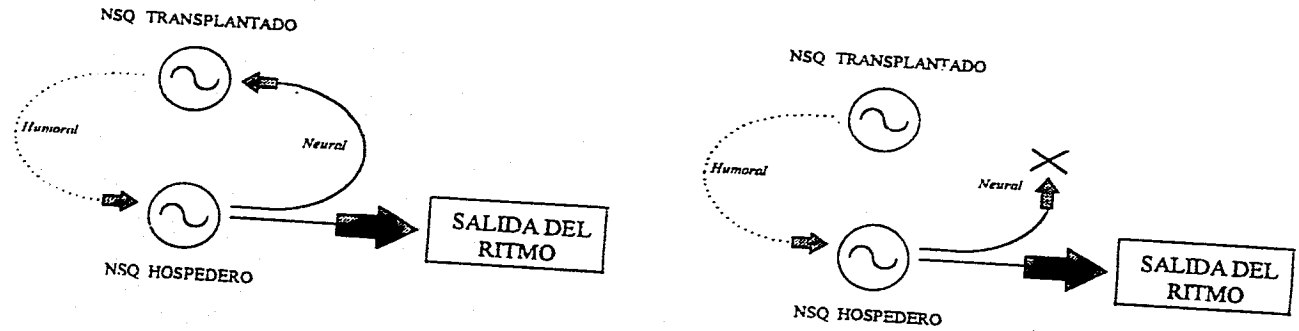


FIGURA 17.- Esquema que ilustra las posibles mecanismos de interacción de los osciladores en el modelo experimental. A) Ilustración de la interacción entre el NSQ transplantedo y el efector de la conducta del hospedero, tanto en el grupo de animales con transplante a tercer ventrículo así como en el grupo de animales con transplante a ventrículo lateral. B) Mecanismos de acoplamiento entre el NSQ transplantedo y el NSQ hospedero. Del lado izquierdo se muestra las posibles formas de interacción en el grupo transplantedo a tercer ventrículo. Del lado derecho se muestra las posibles formas de interacción en el grupo transplantedo a ventrículo lateral (ver discusión).

La variación alta en la tasa de actividad metabólica en los puntos de los trasplantes con respecto a la hora circádica, sugiere que el NSQ hospedero es poco efectivo para regular la fase del NSQ transplantado; estos resultados son congruentes con los que reporta Serviere (1994).

También, podemos ver que en este grupo hay un desfase en el máximo de la actividad metabólica del NSQ hospedero de CT06 a CT09; esto podría sugerir que se están reflejando influencias del NSQ transplantado hacia el hospedero.

En otros experimentos donde se lesiona parcialmente el NSQ y se coloca un trasplante de NSQ de una cepa de diferente periodo, los resultados observados en los registros conductuales sugieren que la interacción no es a nivel del marcapaso, sino que es a nivel de las vías de salida del sistema porque se sugiere que se establecen conexiones entre el trasplante y el núcleo paraventricular talámico; y es a éste nivel donde se observa la manifestación tanto del NSQ huésped como del NSQ transplantado (Davis y Menaker, 1980; Menaker y Vogelbaum, 1993). Los registros conductuales de animales con trasplante a ventrículo lateral, pueden estar mostrando un fenómeno similar donde la interacción a nivel de los osciladores no se da; pero sin embargo, como se mencionó anteriormente, a nivel de la salida del sistema los distintos osciladores pueden estar representados por los diferentes componentes de actividad observados. Basados en evidencia indirecta de medidas de actividad locomotora, se ha sugerido que el reloj circádico se reajusta (reset) inmediatamente después de un cambio de fase (Pittendrigh y Daan, 1976). A pesar de que la actividad metabólica del NSQ sea un índice más directo de la actividad del marcapaso que los índices endócrinos o conductuales, no necesariamente reflejan los mecanismos centrales del marcapaso (Serviere y cols., 1994), ya que se ha visto que el mecanismo de reloj puede estar relacionado más específicamente con expresión genómica o síntesis de proteína (Dunlap, 1993; Hall, 1990; Rensing y Hardeland, 1990).

A pesar de que los ritmos circádicos en sistemas neurales están bien documentados, el mecanismo de transmisión de la información del periodo y la fase han recibido poca atención. Se han reportado ritmos circádicos en el rango neural de disparo (Schmith, 1973; Koizumi y Nishino, 1976), la concentración de neurotransmisores como la 5-hidroxitriptamina (Henry y cols.,

1977), norepinefrina (Manshardt y Wurtman, 1968; Reis y cols., 1968; Bobillier y Mouret, 1971) y dopamina (Bobillier y Mouret, 1971). También se han reportado prominentes ritmos circádicos de una variedad de hormonas en el plasma que incluyen la hormona del crecimiento (Weitman, 1976), prolactina (Saain y cols., 1972), cortisol (Weitman y cols., 1971) y testosterona (Lincoln y cols., 1974) entre otras. Se sabe además que el NSQ puede producir señales difusibles ya que se ha evaluado el ritmo de VP (Earnest y Sladek, 1987) y de VIP (Shinohara y cols., 1995) en rebanadas. Así mismo, hay evidencias de transmisión circádica por vías neurales del hipotálamo a la glándula pineal (Axelrod, 1974), hígado (Black y Reis, 1971) y del hipotálamo con ciertos núcleos del tallo cerebral (Moore, 1978).

Como los ritmos circádicos normalmente se sincronizan con zeitgebers ambientales y como se acoplan internamente unos con otros, tiene que haber un mecanismo de comunicación temporal dentro del animal. Las vías más obvias de transmisión de la información del periodo y la fase deben tener relación con la actividad rítmica de sistemas neurales y endócrinos.

La glándula pineal podría tener una acción relevante como acoplador interno, ya que se ha reportado que la pinealectomía induce el fenómeno de partición en hamsters (Aguilar Roblero y Vega González, 1993) y la disociación en múltiples componentes ultradianos en ratas (Cassone, 1992). El hecho de que la glándula pineal sea productora y secretora de varias hormonas y neuropéptidos, y que algunas de éstas se relacionen con fenómenos de iluminación nos sugieren que algunas estas sustancias o bien otras aún no identificadas, podrían estar involucradas en el fenómeno de acoplamiento. Serviere y colaboradores (1994) señalan que "el posible papel de alguna señal secretada por la glándula pineal, en éste proceso queda descartada porque en hamsters sin lesión de NSQ y trasplantes de NSQ fetal a tercer ventrículo de animales previamente pinealectomizados, se ve que existe acoplamiento". Sin embargo, el autor no toma en cuenta que la retina produce melatonina y que la producción de ésta incrementa sustancialmente después de la pinealectomía (Steinlechner y cols., 1987). Por otro lado, otra serie de evidencias sugieren control humoral como la recuperación de actividad locomotora en animales con lesión de NSQ con trasplantes de NSQ encapsulados en los cuales se elimina la posibilidad de comunicación neural con el hospedero (Lehman y cols., 1995). También en este sentido Weish y cols.

(1995), reportan que en cultivos de NSQ, los relojes circádicos operan en ausencia de disparo neural, y entre los posibles mecanismos no sinápticos una de las posibilidades es que el ritmo circádico de melatonina producida o por retina o por pineal, normalmente retroalimenten a las células del NSQ y las acoplen (Mc. Arthur y cols., 1991; Cassone y cols., 1993; Reppert y cols., 1994).

Se ha reportado que la administración farmacológica de melatonina es capaz de sincronizar ritmos circádicos en oscilación espontánea en ratas (Cassone y cols., 1986; Redman y cols., 1982), así como de hámsters previamente lesionados y posteriormente transplantados con NSQ fetal (Romero y Silver, 1989). También se han encontrado receptores a melatonina en el NSQ de roedores (Reppert y cols., 1982; Vanseck y cols., 1987; Weaber y cols., 1989) y que la lesión del NSQ previene el efecto sincronizador de melatonina exógena (Cassone y cols., 1986). Se ha indicado que la actividad metabólica del NSQ en ratas decrece durante la noche subjetiva en presencia de melatonina (Cassone y cols., 1988) y que provoca cambios de fase en la actividad eléctrica del NSQ in vitro (Mc. Arthur y cols., 1991). Las observaciones previas apoyan la hipótesis de que la melatonina podría funcionar como acoplador interno.

La lesión del núcleo dorsal del rafe muestra efectos análogos a la pinealectomía, potenciando los efectos de la luz continua sobre la ritmicidad circádica (Levine y cols., 1986). A pesar de toda esta información, hace falta realizar estudios que permitan encontrar las vías y las sustancias involucradas en el acoplamiento entre osciladores en el sistema circádico. A partir del presente estudio pueden plantearse varios procedimientos experimentales que nos permitan abordar los mecanismos fisiológicos del acoplamiento. Por ejemplo, se puede realizar transplantes a ventrículo lateral donde los osciladores se encuentran desacoplados y someter al sistema a pulsos de luz evaluando este fenómeno por medio de C-fos, esperando que los osciladores se acoplen; otro experimento puede realizarse en animales pinealectomizados y extirpados de la glándula de Harper, en los cuales se transplante NSQ fetal y se le den pulsos de melatonina. También en animales transplantados, realizar curvas de respuesta de fase evaluando la actividad metabólica con 2-DG o con C-fos. Por otro lado, también se pueden realizar transplantes de pineal (como oscilador atenuable) y ver si estos se enfatizan con el NSQ.

CONCLUSIONES

- Se corrobora que los trasplantes de NSQ fetal son osciladores circádicos.
- Ya que los trasplantes de NSQ fetal colocados en el tercer ventrículo se enfatizan metabólicamente con el hospedero y los trasplantes de NSQ fetal colocados en el ventrículo lateral, no se enfatizan metabólicamente con el mismo, se puede sugerir que en los primeros la interacción predominante entre los osciladores es de tipo neural, mientras que en los animales con trasplante en ventrículo lateral, la interacción entre osciladores puede darse de forma humoral por el desplazamiento del pico de actividad metabólica del NSQ hospedero (de CT 06 a CT 09 con respecto al grupo con trasplantes a tercer ventrículo).
- El presente modelo experimental se podría proponer para el estudio del acoplamiento de osciladores circádicos, ya que permite rastrear los posibles mecanismos involucrados en éste proceso, así como el papel que desempeñan otros núcleos involucrados en el sistema circádico.

BIBLIOGRAFÍA

- Aghanian G., Bloom F., Sheand M., Electron microscopy of degeneration within the serotonin pathway of rat brain. *Brain Res.* 13: 266-273, 1984.
- Aguilar Roblero R., Origen del patrón circádico de ingesta de agua inducido por trasplantes de tejido fetal, en ratas con lesión del núcleo supraquiasmático. Tesis de Maestría. U.A.C.P.yP. del C.C.H. U.N.A.M. México, 1986.
- Aguilar Roblero R., Estudios morfológicos y funcionales sobre trasplantes del núcleo supraquiasmático fetal. Tesis de Doctorado. U.A.C.P.yP. del C.C.H. U.N.A.M., México, 1989.
- Aguilar Roblero R., and Drucker Colín R., The role of suprachiasmatic nuclei in the regulation of circadian rhythms in mammals. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos.* 35: 35-51, 1987.
- Aguilar Roblero R., Drucker Colín R. and Moore R., The effects of neural Grafts of the circadian rhythms of water drinking in NSQ-lesioned rats. *Chronobio. Internat.* 9: 1-19, 1992.
- Aguilar Roblero R., García Hernández F., Aguilar R., Arankowsky G., and Drucker Colín R., Suprachiasmatic nucleus transplants function as endogenous oscillator only in constant darkness. *Neurosc Lett.* 69: 47-62, 1986.
- Aguilar Roblero R., García Hernández F., Aguilar R., and Drucker Colín R., Cortical grafts in III ventricle of suprachiasmatic lesioned rats induced recovery of photoperiod on drinking rhythm. *Neurosc. Abst.* 11: 384-, 1985.
- Aguilar Roblero R., Morin P., and Moore R., ¿Is the fetal NSQ sufficient to induce rhythm recovery when transplanted to NSQ- lesioned hamsters? *Neurosc. Abst.* 14: 49-, 1988.
- Aguilar Roblero R., and Vega González A., Splitting of locomotor circadian rhythmicity in hamsters facilitated by pinealectomy. *Brain Res.* 229. 1993.

- Aguilar Roblero R., Verduzco L., Rodríguez C., Méndez J., Morán J., Pérez de la Mora R., Circadian rhythmicity y GABAergic system in the suprachiasmatic nuclei of rat. *Neurosc. Lett.* 157: 199-202, 1993.
- Albers H., Gerall A., Axelson F., Effects of reproductive state on circadian periodicity in the rat. *Physiol. Behav.* 26: 21-25, 1981.
- Albers H., Neuropeptide Y: role in light-dark cycle intrainment of hamsters circadian rhythms. *Neurosc. Lett.* 50: 163-168, 1984.
- Albers H., Ferris C., Neuropeptide Y: role in light-dark cycle intrainment of hamsters circadian rhythms. *Neurosc. Lett.* 50: 168-173, 1984.
- Albers H., Liou S., Ferris C., Stopa E., and Zoeller T., Neurochemistry of circadian timing. In: Chapter 14 of *Suprachiasmatic Nucleus, The Mind Clock*. D. Klein, R. Moore and Reppert S. (Eds.) Oxford University Press New-York, 1991.
- Anton Tay F., Chou C., Anton S., Wurtman R., Brain serotonin concentration: evaluation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science*, 162: 277-278, 1968.
- Aschoff J., *Handbook of behavioral neurobiology. Biological Rhythms.* 4, Plenum press, New-York, 1984.
- Aschoff J., Survival value of diurnal rhythms. *Symp. Zool. Soc. London* 13: 79-98, 1964.
- Aschoff J., A survey of biological rhythms. In *Biological Behaviour*. Eds Aschoff. 3-10, 1986.
- Aschoff J., Weber A., The circadian system of man. In *Biological Rhythms*. Eds. Aschoff. New-York Plenum press, 1981.
- Aschoff J., Gerkema M., On diversity and uniformity of ultradian rhythms. In: *Physiology and Behaviour*. Springer-Verlag, 1985.
- Assenmacher J., CNS structures controlling circadian neuroendocrine and activity rhythms in rats. In: *Vertebrate Circadian System* Ed. by J. Aschoff, S. Daan and G. Groos: Berlin, Springer-Verlag, 1982.

- Axelrod J., The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*. 184: 1341-1348, 1974.
- Bachelard H., Clark A., Thompson M., *Biochem. J.* 132: 707-715, 1971.
- Barker C., and Billingham R., Immunologically privileged sites. *Adv. Immunol.* 25: 1-54, 1977.
- Berk L., and Finkelstein J., An autoradiographic determination of efferent projections of suprachiasmatic nucleus of hypothalamus. *Brain Res.* 226: 1-13, 1981.
- Besharse J., Luvonne P., Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature* 305: 133-135, 1983.
- Binkley S., Brielly H., N-acetyltransferase in chick retina. Circadian rhythms controlled by environmental lighting are similar to the pineal gland. *J. Comp. Physiol.* 139: 103-108, 1980.
- Bidder T., *J. Neurochem.* 15: 867-874, 1968.
- Bittman E., Jnassen J., Hegarty C., Photoperiodic regulation of pulsatile luteinizing hormone release in intact but not in castrated male golden hamsters. *Neuroendocrinol.* 47: 434-439, 1992.
- Bjorklund A., Neural transplantation an experimental tool with clinical possibilities. *Trends in Neurosc.* 14: 319-323, 1991.
- Bjorklund A., Nornes H., and Gage F., Cell suspension transplants of noradrenergic locus coeruleus neurons in rat hippocampus and spinal cord: reinnervation and transmitter turnover. *Neurosc.* 18: 685-, 1988.
- Bjorklund A., Lindvall D., Issacson O., Brundin P., Wictorin K., Strecker R., Clarke D., and Dunnet S., Mechanisms of action of intracerebral implants: studies on nigral and striated grafts to lesioned striatum. *Trends in Neurosc.* 10: 509-516, 1987.
- Bjorklund A., Schmith R., and Stenevi U., Functional reinnervation of neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from the substantia nigra. *Cell Tissue Res.* 212: 39-45, 1980.
- Blackmore W., and Franklyn J., Transplantation of glial cells in CNS. *Trends in Neurosc.* 14: 323-328, 1991.

- Block M., Zucker J., Circadian rhythms of rats locomotor activity after lesions of the raphe nuclei. *J. Comp. Physiol.* 109: 235-247, 1976.
- Bojis R., Intra and extra-hypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Harbor Symp. Quantit. Biol.* 25: 249-256, 1978.
- Bon N., Combes A., Szafarek A., Aschemacher Y., Efferents extrahypothalamie du noyau supra-chiasmaticus chez la rat. *C. R. Academic Science.* 297: 347-350, 1983.
- Campbell C., Turek F., Cyclic function in mammals ovary. In Aschoff J., Eds. *Handbook of behavioural neurobiology: Biological Rhythms.* New-York Plenum press, 1981.
- Campbell C., and Ramaley J. Retino-hypothalamic projections: correlations with onset of the adrenal rhythm in infant rats. *Endocrin.* 94 1201-1209, 1974.
- Card J., Bretcha Ñ., Karten H., and Moore R., Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polipeptide-containing cells and processes in the supra-chiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J. of Neurosc.* 1: 1289-1303, 1981.
- Card J., Bretcha Ñ., and Moore R., Immunohistochemical localization of avian pancreatic polipeptide-like immunoreactivity in the rat hypothalamus. *J. and Comp., Neurol.* 217: 123-126, 1983.
- Card J., and Moore R., The supra-chiasmatic nucleus of golden hamster: immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. *Neurosc.* 13: 415-431, 1984.
- Card J., and Moore R., Ventral geniculate nucleus efferents to the rat supra-chiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polipeptide-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 206: 390-396, 1982.
- Cassone V., The pineal gland influences rat circadian activity rhythms in constant light. *J. of Biol. Rhythms.* 7: 27-40, 1992.
- Cassone V., Roberts M., and Moore R., Melatonin inhibits metabolic activity in the rat supra-chiasmatic nucleus. *Neurosc. Lett.* 81: 29-34, 1987.

- Cassone V., Menaker M., ¿Is the avian circadian system a neuroendocrine loop? *J. Exp. Zool.* 232: 539-549, 1984.
- Cassone V., Warren W., Brooks D., Liu J., Melatonin, the pineal gland and circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 8: 73-81, 1993.
- Cassone V., Roberts M., and Moore R., Effects of melatonin on the 2-deoxy-glucose within the rat suprachiasmatic nucleus. *Am J. of Physiol.* 255: 332-337, 1988.
- Coldman D., Scalia F., and Cabrales E., Lights and electron microscopic observation on the anterograd transport of horseradish peroxidase in the optic pathway of mouse and rat. *Brain Res.* 102. 156-163, 1976.
- Coleman G., Harper J., Clarke D., Armstrong S., Evidence for separate meal associated oscillator in the rat. *Physiol. Behav.* 29: 107-115, 1982.
- Cwłory G., Sieradzan K., Vrbova G., Transplants of embryonic motoneurons to adult spinal cord: survival innervation abilities. *Trends of Neurosc.* 14: 355-358, 1991.
- Daan S., and Berde C., Two coupled oscillators: simulations of the circadian pacemaker in mammalian activity rhythms. *J Theor. Biol.* 70: 297-313, 1978.
- Dabbs M., Age and seasonal variation in serum testosterone concentration among men. *Chronobiol. Intern.* 7: 245-249, 1990.
- Decoursey P., and Buggsy J., Circadian rhythmicity after neural transplant to hamster third ventricle; specificity of suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 500: 263-275, 1989.
- Donham R., Stelson M., The pupubertal golden hamsters and the transmission between daily and strous cycle hormone rhythms. *Biol. Reprod.* 44. 1108-1112, 1991.
- Drucker Colin R., Aguilar roblero R., Garcia Hernández F., Fernández Cansino F., Bermudez Rattoni F., Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythms recovery of lesioned rats. *Brain Res.* 311. 353-357, 1984.
- Dunlap J., Genetic analysis of circadian clock. *Ann. Rev. Physiol.* 55: 683-728: 1993.

- Donnet S., Cholinergic grafts, memory and ageing. *Trends in Neurosc.* 14: 371-376, 1991.
- Earnest D., Sladek D., Gash D., and Weigand S., Transplantation of subtypes of vasopressin neurons in to Brattleboro rats: suprachiasmatic grafts generate circadian vasopressin rhythms in the cerebrospinal fluid. *Soc. Neurosc., Abst.*, 13. 212-, 1987.
- Earnest D., Sladek D., Circadian rhythms of vasopressin release from individual suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Res.* 1986.
- Ebihara S., Kawamura H. The role of pineal gland and the suprachiasmatic nucleus in control of circadian locomotor rhythms in java sparrow. *J. Comp. Physiol.* 141: 207-214, 1981.
- Elliot J., Goldman B., Reception of photoperiodic information by fetal siberian hamsters: role of the mother pineal gland. *J. Exp. Zool.* 252: 237-244, 1989.
- Flood D., and Gibbs F., Species difference in the circadian 2-deoxy-glucose uptake by suprachiasmatic nuclei. *Brain Res.* 232: 200-205, 1982.
- Folkard S., Hume K., Minors D., Rhouse J., and Watson S., Independence of circadian rhythms in alertness from sleep-wake cycle. *Nature* 313: 678-679, 1985.
- Folkard S., Minors D., and Waterhouse J., Is there more one circadian clock in humans? *J. Physiol. London* 357: 341-356, 1983.
- Folkard S., Weber R., and Widgrober C., Multioscillatory control of circadian rhythms in human performance. *Nature* 305: 223-226, 1983.
- Freed W., Poltorak M., Becker J., Intracerebral adrenal medulla transplants a review. *Exp. Neurol.* 110: 139-, 1990.
- Fuchs J., and Moore R., Development of circadian rhythmicity and light responsiveness in the rat suprachiasmatic nucleus: a study using the 2-deoxy-glucose method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1204-1208, 1980.

- Fuller C., Lydic R., Sulzman F., Albers H., Tepper B., Moore-Ede M., Circadian rhythm of body temperature persist after suprachiasmatic lesions in the squirrel monkey. *Am. J. Physiol.* 241: 385-391, 1981.
- Gage F., Kawajja M., and Fisher L., Genetically modified cells: applications for intracerebral grafting. *Trends in Neurosc.* 14: 328-334, 1991.
- Garris D., Direct septo-hypothalamic projections in the rat. *Neurosc. Lett.* 13: 83-, 1979.
- Gerkema M., Daan S., Ultradian rhythms in behaviour. Berlin, Springer-Verlag, 1985.
- Gibson M., Harlton H., Perlow M., Zimmerman E., Davies T., Krieger D., Preoptic area brain grafts in hipogonadal female mice abolish effects at congenital hypothalamic gonadotropin-release hormone deficiency. *Endocrinol.* 114: 949-951, 1984.
- Gibson M., Krieger D., Perlow M., Zimmerman S., Ferin M., and Charlton H., Hypothalamic brain transplants reverse hypogonadism in male mutant mice with gonadotropin-release hormone deficiency. *Transaction of association of American Physicians.* 114: 1938-1940, 1982.
- Gibson M., Charlton H., Perlow M., Zimmerman E., Davies J., Krieger D., Preoptic area brain transplants in hipogonadal female mice abolish effects of congenital hypothalamic gonadotropin releasing hormone deficiency. *Endoc.* 114: 1938-, 1984.
- Goldman D., Elliot J., Photoperiodism and seasonality in hamsters: role of pineal gland. In: Stetson M.H. Processing of environmental information in vertebrates. New York Springer-Verlag, 1988.
- Green D., and Gillette R., Circadian Rhythms of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245: 1998-2000, 1982.
- Groos G., and Hendricks J., Circadian rhythm in electric discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosc. Lett.* 34: 283-288, 1982.
- Groos G., and Hendricks J., Regularity firing neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Experientia* 35: 1597-1598, 1979.

- Guillemin R., Hypothalamic hormones: Releasing and inhibiting factors. In Neuroendocrinology. D:T: Krieger and Hughes, 1980.
- Guldner F., Synaptology of the rat suprachiasmatic nucleus. Tissue Res. 165: 509-544, 1976.
- Guldner F., Synapses of optic nerve afferents in the rat suprachiasmatic nucleus. II Structural variability as revealed by morphometric examination. Cell Tiss. Res. 194: 37-54, 1978.
- Gwinner E., Circannual systems. In: Aschoff J., Eds. Biological Rhythms. New York Plenum press, 1981.
- Gwinner E., Effects of pinealectomy on circadian locomotor activity rhythms in european starlings. J. Comp. Physiol. 126: 123-129, 1976.
- Halberg F., Tong Y., Johnson E., Circadian system phase: an aspect of temporal morphology, procedures and illustrative examples. In: Cellular Aspects of Biorhythms. Berlin, Springer-Verlag, 1967.
- Hall C., Genetic of circadian rhythms. Annual Rev. Genet. 24: 659-697, 1990.
- Hamm H., Menaker M., Retinal rhythms in chick: circadian variation in melatonin and serotonin N-acetyltransferase activity. Proc. Natl. Acad. USA 77: 4498-5002, 1980.
- Harrington M., Decoursey P., Bruce D., and Buggsy J., Circadian pacemaker (SCN) transplants into lateral ventricles fail to restore locomotor rhythmicity in arrhythmic hamsters. Soc. Neuros. Abst. 13: 213-, 1988.
- Hendrickson A., Wagoner E., and Cowan W., An autoradiographic and electron microscopic study of retino hypothalamic connections. Z. Zellforsch Mikrosk. Anat. 135: 1-26, 1972.
- Hery M., Faudon M., Dusticier G., Hery F., Daily variations of serotonin metabolism in the suprachiasmatic nucleus of rat: influence of stradiol impregnation. J. Endoc. 94: 157-166, 1982.
- Honma H., and Hiroshige T., Internal synchronization among several circadian rhythms in rat under constant light. Am. J. of Physiol. 235: 243-249, 1978.

- Honma H., Von Goetz C., and Aschoff J., Effects of restricted daily feeding in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res.* 235: 905-913, 1983.
- Hoorneman E., and Bojrs R., Vassopressin fiber pathways in the rat brain following suprachiasmatic nucleus lesioning. *Brain Res.* 243: 235-241, 1982.
- Hoirton T., Stachecki S., Stetson M., Maternal transfer of photoperiodic information in siberian hamsters; peripubertal reproductive development in the absence of maternal photoperiodic signals during gestation. *Biol. Reprod.* 42: 441-449, 1990.
- Inouye J., and Kawamura H., Persistence of circadian rhythmicity in mammals hypothalamic "islands" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5962-5966, 1979.
- Inouye J., and Kawamura H., Characteristics of circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Physiol.* 146: 153-160, 1982.
- Kam L., Moverg G., Effects of raphe lesions on the circadian pattern of wheel running in the rat. *Physiol. Behav.* 18: 213-217, 1977.
- Kavalier M., The pineal organ and circadian organization of teleost fish. *Re. Can. Biol.* 38: 281-292, 1979.
- Kawato M., and Susuki R., Two coupled neural oscillators as a model of circadian pacemaker. *J. Theoret. Biol.* 86: 547-575, 1980.
- Klein D., Smoot R., Weller J., Higa S., Markey S., Creed G., Jacobowitz D., Lesion of the paraventricular nucleus area disrupt the suprachiasmatic cord circuit in the melatonin rhythm generating system. *Brain Res. Bull.* 10: 647-, 1983.
- Klein D., and Weller J., Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science.* 177: 532-533, 1972.
- Krieger D., Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Endocrinol.* 106: 649-654, 1980.

- Koustouzis T., Emerich D., Borlogan C., Freeman T., Cashill D., Sanberg P., Cell transplantation for central nervous system disorders. *Crit Rev. In Neurobiol.* 8(3): 125-162, 1994.
- LA Vail M., Rod outer segment disk shedding in the rat retina: relationships to cycling lighting. *Science* 194: 1071-1073, 1976.
- Laitman R., Turek F., The effects of pinealectomy on the entrainment of locomotor activity rhythms in sparrows maintained on various short days. *J. Comp. Physiol.* 134: 339-343, 1979.
- Lehman M., and Ralph M., Modulation and restitution of circadian rhythms. Functional neural transplantation. Edited by S. Dunnet and A. Bjorklund. Raven Press, New-York, 1994.
- Lehman M., Silver R., Bittman E., Anatomy of the suprachiasmatic nucleus grafts. In: Klein D.C. Moore R., Reppert S., Eds. *The suprachiasmatic nucleus: the mind clock.* New York, Oxford University Press, 1991.
- Lehman M., Silver R., Gladstone W., Hahn R., Gibson M., and Bittman E., Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization with the host brain. *J. of Neurosci.* 7: 1626-1638, 1987.
- Lehman M., LeSauter J., Kim C., Berriman S., Tresko P., Silver R., ¿How do fetal grafts of the suprachiasmatic nucleus communicate with the host brain? *Cell Transplant.* 4: 75-81, 1995.
- Levine J., Rossenwaser A., Yanovski A., Adler N., Circadian activity rhythms in rats with midbrain raphe lesions. *Brain Res.* 1986.
- Lincoln D., Porter D., Timing of photoperiod and the hour of birth rats. *Nature.* 260: 780-783, 1976.
- Liou S., Shibata S., Iwasaki K., and Ueki S., Optic nerve stimulation induced increase of release of 3H / glutamate and 3 H GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 16: 527-531, 1986.
- McArthur A., Gillette M., and Prosser R., Melatonin resets the suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* 565: 158-161, 1991.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Meibach R., and Siegel A., Efferents connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res.* 124: 197-224, 1977.
- Menaker M., Binkley S., Neural and endocrine control of circadian rhythms in vertebrates. In: *Biological Rhythms*. Edited by J. Aschoff. New York Plenum Press, 1981.
- Mitsberger R., Reischschafen A., Recovery of anticipatory activity to restricted feeding in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiol. Behav.* 33: 227-258, 1994.
- Morin L., Cummings L., Effects of surgical or photoperiodic castration testosterone replacement or pinealectomy on male hamsters running rhythmicity. *Physiol. Behav.* 26: 825-838, 1981.
- Moore R., The suprachiasmatic nucleus, circadian rhythms and regulation of brain peptides. In: *Neurosecretion and Brain Peptides B.*, Martin, S., Reichlin, K., Bick, New York, 1981.
- Moore R., Card J., and Riley J., The suprachiasmatic hypothalamic nucleus: Neural ultrastructure. *Neurosc. Abst.* 6: 758- , 1980.
- Moore R., and Klein D., Visual pathway the central neural control of circadian rhythm in the pineal N-acetyltransferase activity. *Brain Res.* 71: 17-33, 1974.
- Moore R., Organization and fiction of central nervous system circadian oscillator, suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Federation Proc.* 42: 2783-2789, 1983.
- Moore R., The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system . Magistretti P.J. (de), *Circadian rhythms, discussions in neuroscience*. Elsevier Science Publishers, B.V. , 1992.
- Moore R., and Eichler V., Loss of the circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic nucleus lesions in the rat. *Brain Res.* 42: 201-206, 1972.
- Moore R., and Lenn N., A retino-hypothalamic projection in the rat. *J. Comp. Neurol.* 46: 1-14, 1972.
- Moore-Ede M., Sulzman F., and Fuller C., *The clocks by time us: Physiology of the circadian timing system*. Harvard University Press. Boston Mass., 1982.
- Moore-Ede M., and Sulzman F., Internal temporal order. In: *Biological Rhythms*, edited by J. Aschoff. New-York Plenum Press, 1981.

- Mosko S., and Moore R., Neonatal suprachiasmatic nucleus lesions effects on the development of circadian rhythms in rat. *Brain Res.* 164: 17-38, 1979.
- Newman G., and Hospod F., Rhythms of suprachiasmatic nucleus 2-deoxy-glucose uptake in vitro. *Brain Res.* 149: 345-350, 1986.
- Nishino H., and Koisumi K., Response of neurons in the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus to putative transmitters. *Brain Res.* 112: 45-59, 1977.
- Olderford W., *Am. J. Physiol.* 221: 1629-1638, 1963.
- Pang S., Yu S., Tang P., A diurnal rhythm of N-acetylserotonin in the retina of rats. *Neurosci. Lett.* 21: 190-200, 1981.
- Paxinos G., *The rat in the stereotaxic coordinates.* Academic Press, New-York. 1986.
- Pengelley E., Asmundson S., Barnes B., Aloia R., Relationships of light intensity and photoperiod to circannual rhythmicity in the hibernating ground squirrels. *Comp. Biochem. Physiol.* 53a: 273-277, 1976.
- Perlow M., Freed W., Sieger A., Olson A., Wyatt R., Brain transplants reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamin system. *Science* 204: , 1979.
- Perlow M., and Al E., Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamin system. *Science* 204: 643-647, 1979.
- Phillips J., Mikulka J., The effects of restricted food access upon locomotor activity in rats with suprachiasmatic nuclei lesions. *Physiol. Behav.* 23: 257-262, 1979.
- Pickard G., and Turek W., The suprachiasmatic nuclei: ¿two circadian clocks? *Brain Res.* 268: 201-210, 1983.
- Pittendrigh C., *Circadian rhythms and the circadian organization of living systems.* Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 25: 159-185, 1960.
- Pittendrigh C., and Bruce V., *Photoperiodism and related phenomena in plant and animals.* Am. Assoc. Adv. Science, R.B. Withrow, Washington, D.C. 1959.

- Pittendrigh C., Bruce V., Rosenweig N., and Rubin M., A biological clock in neurospora. *Nature* 184: 169-170, 1959.
- Pittendrigh C., and Dann S., A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents structure: a clock for all seasons. *J. Comp. Physiol.* 106: 333-355, 1976.
- Ralph M., and Lehman M., Transplantation: new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends in Neurosc.* 14: 362-366, 1991.
- Ralph M., and Lehman M., Transplantation: new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. *Trends in Neurosc.* 14(8), 1991.
- Redman J., Armstrong S., and Niq K., Free running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219: 1089-1091, 1983.
- Redman J., Circadian effects of melatonin in rats: an update. In Y., Toitou and P. Pevet (Eds.) *Proceedings of International Symposium of Melatonin and Pineal Gland.* Elsevier, Geneva, 1993.
- Rensing L., Hardeland R., The cellular mechanism of circadian rhythms. A view on evidence, hypotheses and problems. *Chronobiol. Intern.* 7: 353-370, 1990.
- Reppert S., Weaver D., Evisawa T., Cloning and characterization of mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13: 1177-1182, 1994.
- Reppert S., and Schwartz W., Functional activity of the suprachiasmatic nuclei in the fetal primate. *Neurosc. Lett.* 46: 145-149, 1984.
- Reppert S., and Schwartz W., The suprachiasmatic nuclei of the fetal rat: characterization of functional clock using ¹⁴C-labeled deoxy-glucose. *J. Neurosc.* 4: 1677-1682, 1984.
- Reppert S., and Schwartz W., Maternal coordination of fetal biological clock in utero. *Science* 220: 969-971, 1983.
- Ribak C., and Petters A., An autoradiographic study of the projections from the lateral geniculate body of the rat. *Brain Res.* 92: 341-368, 1975.

- Romero M., Silver R., Time course of peptidergic expression in fetal suprachiasmatic nucleus transplanted into adult hamster. *Brain Res.* 57: 1-6, 1990.
- Romero M., and Silver R., The course of peptidergic expression in the suprachiasmatic nucleus transplanted into third ventricle in age matched intact hamster. *Soc. Neurosc. Abst.* 14: 50-, 1988.
- Rosentein J., Adrenal medulla grafts produce blood-brain barrier dysfunction. *Brain Res.* 414: 192-196, 1987.
- Rossenwasser A., Adler N., Structure and function in circadian timing system: evidence for multipled coupled oscillators. *Neurosc. Biobehav. Rev.* 10: 431-448, 1986.
- Rusak B., and Zucker Y., Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Behav.* 59: 449-526, 1979.
- Rusak B., and Groos G., Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science* 215: 1407-1409, 1982.
- Saavedra J., Palkowits M., Brown-Stein M., and Axelrod J., Serotonin distribution in the nuclei of rat hypothalamus and preoptic region. *Brain Res.* 77: 157-165, 1974.
- Saitoh Y., Matsui Y., Nihonmatsu Y., Kawamura H., Cross-species transplantation of the suprachiasmatic nucleus from rats to siberian chipmunks with suprachiasmatic lesions. *Neurosc. Lett.* 77: 132-, 1991.
- Sattinoff E., Prosser R., Suprachiasmatic nuclear lesions eliminated circadian rhythms of drinking and activity, but not body temperature. *J. Biol. Rhythms.* 3: 1-22, 1988.
- Sawaki Y., and Kawamura H., Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into the rats with complete bilateral lesions. *Neurosc. Res.* 1: 67-72, 1984.
- Scharrer B., Peptidergic neurons: facts and trends. *Gen. Comp. Endocrin.* 34: 50-62, 1978.
- Schmidt R., Lindval M., and stenevi U., Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspension: a new approach for neural transplantation to the deep brain sites. *Brain Res.* 218: 347-356, 1981.
- Schwartz W., Reppert M., Neural regulation of circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosc.*, 5: 2771-2778, 1985.

- Schwartz W., Davidsen L., and Schmith C., In vivo metabolic activity of putative circadian oscillator, the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Neurol.* 189: 157-167, 1980.
- Schwartz W., and Gainer H., Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C labeled deoxy-glucose uptake as a functional marker. *Science* 197: 1089-1091, 1977.
- Schwartz W., Reppert M., Eagan S., and Moore-Ede M., In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res.* 214: 184-187, 1980.
- Serviere J., Gendrot G., LeSauter J., and Silver R., Host reset phase of grafted suprachiasmatic nucleus: a 2-DG study of time course of entrainment. *Brain Res.* 665: 168-176, 1994.
- Serviere J., Gendrot G., Le Sauter J., and Silver R., Host resets phase of grafted suprachiasmatic nucleus: influence of the implant site, tissue specificity and pineal secretion. *Neurosc. Lett.* 176: 80-84, 1994.
- Shibata S., Oomura Y., Kita H., and Kattori K., Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic slice. *Brain Res.* 247: 154-158, 1982.
- Shinohara K., Honma S., Katsuno Y., Abe H., and Honma K., Two distinct oscillators in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92: 7396-7400, 1995.
- Sims K., Hoffman D., Said S., and Zimmerman E., Vasoactive intestinal polipeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunological study. *Brain Res.* 186: 165-183, 1978.
- Sofroniew M., and Wiendl A., Projections from the parvocellular vasopressin and neuropeptide Y-containing neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Am. J. Anat.* 153: 391-430, 1980.
- Sollars P., Kimble D., Cross-species transplantation of fetal hypothalamic tissue restores circadian locomotor rhythms to the SCN-lesioned host. *Neurosc. Abst.* 14: 49-, 1988.
- Sols A., Crane R., *J. Bio. Chem.* 210: 581-595, 1954.
- Soper B., Weich R., Hypothalamic and extrahypothalamic mediation of pulsatile discharges of luteinizing hormone in the ovariectomized rat. *Endocrinol.* 160: 348-355, 1980.

- Sotello C., and Alvarado-Mallart R., The construction of cerebellar circuits. *Trends in Neurosc.* 14: 347-350, 1991.
- Steinlechner S., Siedel A., Klingenspor M., Heldmair G., Compensatory increase of retinal melatonin after pinealectomy. In: Trentini G., De Gaetani C., Pevet P. (Eds.) *Fundamentals and clinics in pineal research.* Raven Press New-York, 1987.
- Stenevi U., Bjorklund A., and Svendgaard N., Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Res.* 114: 1-20, 1976.
- Stephan F., Berkley K., Moss R., Efferent connections of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosc. &* 2625-2641, 1981.
- Stephan U., Zucker Y., Circadian rhythms y drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1583-1586, 1972.
- Stopa E., King J., Lydic R., Schoene W., Human brain contains vasopressin and vasoactive intestinal polipeptide in the suprachiasmatic region. *Brain Res.* 297: 159-163, 1984.
- Sudgen D., Morris D., Changes in regional levels of triptophan, 5-hidroxyindol acetic acid dopamine and noradrenaline after pinealectomy in the rat. *J. Neurochem.* 32: 1593-1595, 1979.
- Swann J., Turek F., Transfer from long to short days reduces the frequency of pulsatile luteinizing hormone release in intact but not in castrated male golden hamsters. *Neuroendocrinol.* 47: 343-349, 1988.
- Swanson L., and Cowan W., The efferent connections of suprachiasmatic nucleus on hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 160: 1-12, 1975.
- Takahashi S., and Zats M., Regulation of circadian system of the house sparrow, Passer domesticus. *J. Neurosc.* 2: 815-828, 1982.
- Terstein P., Goldman A., O'Brien P., Evidence for both local and central regulation of rat rod outer segment disk shedding. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19: 1268-1273, 1980.
- Thorpe P., The presense of retinohypothalamic projection in the ferret. *Brain Res.* 85: 343-346, 1975.

- Turek F., and Van Cauter E., The physiology of reproduction, second edition. Raven Press New York, 1994.
- Underwood H., The pineal and circadian rhythms. In: The Pineal Gland Ed. by R. Reiter, Raven Press New York, 1984.
- Underwood H. Circadian organization in lizards: Phase responses curves of pinealectomy. Am. J. Physiol. 244: 857-864, 1983.
- Van Cauter E., Diurnal and ultradian rhythms in human endocrine system. A mini review. Horm. Res. 34: 45-53, 1990.
- Van Cauter E., Physiology and pathology of circadian rhythms. In: Edwards C.W. Lincoln D.W. (Eds.) Recent advances in endocrinology and metabolism. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.
- Van Cauter E., Aschoff J., Endocrine and other physiological rhythms. In: De Groot L. Eds. Endocrinology. Philadelphia USA, 1989.
- Van den Pol A., and Powley T., A fine grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. Neurosci. 15: 1049-1085, 1985.
- Van den Pol A., The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of the rat intrinsic anatomy. J. Comp. Neurol. 191: 661-702, 1980.
- Van den Pol A., and Tsujimoto K., Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus recorded intracellularly in vitro. Neurosci. Lett. 1992.
- Veldhuis J., Tranmanesh A., Lizarralde G., Thompson M., Amplitude modulation of burstlike model of cortisol secretion subserves the circadian glucocorticoid rhythm. Am. J. Physiol. 257: 1989.
- Veldhuis J., Johnson M., Operating characteristics of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in men: circadian, ultradian and pulsatile release of prolactin and its temporal coupling with lutt. J. Clin. Endocrinol. Metab. 67: 116-123, 1988.

- Vogelbaum M., Galef J., Menaker M., Factors determining the restoration of circadian behavior by hypothalamic transplants. *J. of Neuro. Transp. and Plastic.* 4: 4-, 1993.
- Watanabe A., and Hirushige T., Phase relation Between episodic fluctuations of spontaneous locomotor activity and plasma corticosterone in rats with supracliasmatic nuclei lesions. *Neuroendoc.* 33: 52-59, 1981.
- Watts A., Swanson L., and Watts G., Efferents projections of the supraciasmatic nucleus: Studies using retrograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoaglutine in the rat. *J. Comp. Neurol.* 258: 204-229, 1987.
- Weaver D., Reppert S., Maternal melatonin communicates day-length to the fetus in Djungarian hamsters. *Endoc.* 119: 2861-2863, 1986.
- Weaver A., Ribkees S., And Reppert S., Localization and carachterization of melatonin receptors in rodent brain by in vitro autoradiography. *J. of Neurosc.* 9: 2581-2590, 1989.
- Weber R., Fractional desynchronization of human circadian rhythms. A method of evaluating entrainment limits and function independences. *Pfl. Archv.* 395: 128-137, 1983.
- Weish D., Logothestis D., Meisler M., Reppert S., Individual neurons dissociated from rat express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 7: 685-709, 1995.
- Weitman E., Zimmerman J., Czeittker C., Ponda J., Cortisol secretion is inhibited during sleep in normal man. *J. Clin. Endoc. Metab.* 56: 352-358, 1983.
- Winder H., Brudin P., Immunological aspects of grating in the mammalian central nervous system. A review and speculative synthesis. *Brain Res. Behav.* 13: 287-324, 1988.
- Winfree A., Biological rhythms and behavior of population of coupled oscillators. *J. Theor. Biol.* 16: 15-42, 1967.
- Winfree A., Biological clocks. Scientific Amrican Books, Inc., New York, 1987.
- Zucker Y., Fitzgerald M., and Morin P., Sex differentiation of the circadian system in the golden hamster. *Am. J. Physiol.* 238: 97-101, 1980.

-Zucker Y., Boshes M., Circannual body weight rhythms of ground squirrels: role of gonadal hormones.

Am J. Physiol. 243: 546-551, 1982.