

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Fisiología Celular

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR A RYANODINA EN EL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO, SOBRE LA EXPRESIÓN DEL RITMO CIRCÁDICO EN RATAS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

CLARA ROSALVA MÉRCADEO LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS DR. RAÚL ARIAS AGUILAR ROBLERO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2005



COORDINACIÓN

m339799



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

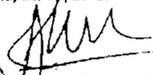
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de enero del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Mercado López Clara Rosalva con número de cuenta 501048800, con la tesis titulada: "Participación del receptor a ryanodina en el núcleo supraquiasmático, sobre la expresión del ritmo circádico en ratas", bajo la dirección del(a) Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero.

Presidente:	Dr. Arturo Hernández Cruz
Vocal:	Dra. María Luisa Fanjul Peña
Secretario:	Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero
Suplente:	Dra. Carolina Escobar Briones
Suplente:	Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 29 de noviembre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Clara Rosalva Mercado López
FECHA: 10/01/05
FIRMA: [Firma]

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Raúl Aguilar Roblero, en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM con el apoyo de los proyectos CONACYT 33034 y DGAPA IN-204800 otorgados al Dr. Raúl Aguilar Roblero y beca de CONACYT 167221 otorgada a Clara Rosalva Mercado López.

Agradezco a mi comité tutorial formado por la Dra. María Luisa Fanjul Peña, Dra. Carolina Escobar Briones, Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Dr. Raúl Aguilar Roblero por sus comentarios para el desarrollo de esta tesis y por su asistencia en los exámenes tutorales.

Mi más profundo agradecimiento a mi tutor el Dr. Raúl Aguilar, que siempre me ha dado su apoyo y compartido sus conocimientos.

AGRADECIMIENTOS

Le dedico esta tesis a mi esposo Roberto Vitela García quién me ha brindado su amor y apoyo incondicional.

A mis padres que siempre me han apoyado en todos mis proyectos y siempre han estado cuando los necesito.

A mis hermanas Isabel y Patricia para que sigan mi ejemplo y continúen con sus estudios hasta el final.

Agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio sus consejos y su amistad: Parménides, Linda, Karla, José Luis, Javier y Vania.

A los miembros del jurado les agradezco los comentarios para el mejoramiento de esta tesis: Dr. Arturo Hernández Cruz, Dra. María Luisa Fanjul Peña, Dra. Carolina Escobar Briones, Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Dr. Raúl Aguilar Roblero.

Resumen

Diversos estudios han demostrado que los ritmos circádicos son generados de manera endógena por un mecanismo molecular en las neuronas del NSQ. También se ha estudiado ampliamente la sincronización de los ritmos por estímulos ambientales, principalmente por la luz, pero son pocos los trabajos que se han llevado a cabo, para determinar los elementos intracelulares que participan en la salida del oscilador para la expresión del ritmo circádico. Se propone que los receptores a ryanodina modulando la dinámica del calcio intracelular participan en la vía de salida intracelular para la expresión de los ritmos circádicos.

El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos que tiene la manipulación farmacológica del canal intracelular de calcio activado por la ryanodina, en las neuronas del núcleo supraquiasmático, sobre la expresión del ritmo circádico de la conducta de ingesta de agua y alimento de la rata.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, mantenidas en oscuridad constante. Se colocaron individualmente en cajas de registro y se dejaron con libre acceso al agua y al alimento. Se registró la conducta de ingesta de agua y alimento a través de un sistema de adquisición de datos automatizado. En el primer experimento antes de iniciar el registro se les implantó una cánula guía, después de quince días se les colocó la bomba miniosmótica subcutánea y el inyector que iba hasta el NSQ. Por medio de éstas se administró de forma crónica las soluciones de prueba durante 14 días a una velocidad de $0.5 \mu\text{l/hr}$. En el segundo experimento no se implantó una cánula guía, sólo se colocó el inyector y la bomba miniosmótica quince días después de haber iniciado el registro. En ambos experimentos durante y después de la infusión de las soluciones se registró la conducta de los animales. El registro tuvo una duración total de cincuenta a cincuenta y cinco días. Las soluciones que se administraron fueron: Líquido cefalorraquídeo artificial (LCR), tetrodotoxina (TTX) $1 \mu\text{M}$, alto potasio 20 mM , ryanodina a 0.1 , 10 y $100 \mu\text{M}$.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron los siguientes:

1. En el experimento uno, que se implantó primero la cánula guía y quince días después el inyector y la bomba miniosmótica, se observaron cambios de fase en todos los grupos después de la introducción del inyector al NSQ. Esto posiblemente se debió a que la implantación del inyector ejerció una estimulación mecánica en el NSQ. Entonces se decidió cambiar de protocolo.
2. En el experimento dos, con el grupo de LCR se comprobó que la implantación del inyector y la bomba miniosmótica no afectan el periodo y la fase del reloj circádico.
3. Durante el tratamiento con TTX, los animales mostraron conducta arritmica. Antes y después del tratamiento el periodo no cambió (24.11 ± 0.07 y 23.86 ± 0.06 respectivamente), y no se observaron cambios de fase significativos antes y después del tratamiento.

4. La administración de alto potasio (20 mM) modificó el tiempo de actividad en la conducta de los animales e indujo un acortamiento del periodo durante el tratamiento.
5. Con el tratamiento de ryanodina a 0.1 μM se observó un efecto parecido al del alto potasio, un acortamiento del periodo y una reducción en el tiempo de la actividad durante y después del tratamiento.
6. La ryanodina a 10 μM induce una salida continua del calcio hacia el citosol, esto no afectó el periodo y fase del ritmo durante su administración, pero sí provocó que la actividad se fraccionará en tres partes. Algunos días antes de finalizar el registro la actividad se volvió a conglomerar.
7. El bloqueo de los canales intracelulares de calcio con la ryanodina a una concentración de 100 μM provocó la desorganización del ritmo circádico, efecto que también se observó con la administración de TTX. Al finalizar el tratamiento hubo un avance de fase y se restableció la actividad.

Con estos resultados se propone un modelo en donde los receptores a ryanodina modulando la dinámica del calcio intracelular, influyen en la actividad eléctrica de las neuronas del núcleo supraquiasmático y la actividad eléctrica influye en la expresión de los ritmos circádicos. Entonces, se deduce que los genes reloj (es decir, el oscilador) modularían de alguna manera la expresión de los receptores a ryanodina que marcan el ritmo circádico de la concentración intracelular de calcio. El calcio influye en diversas funciones celulares, entre ellas la excitabilidad membranal, por lo tanto, el ritmo circádico en la concentración intracelular de calcio induciría cambios circádicos en la excitabilidad membranal, por lo que provocaría cambios en la actividad eléctrica neuronal, y como lo demostraron Schwartz y colaboradores (1987), la actividad eléctrica neuronal modula de alguna manera la expresión del ritmo circádico de la conducta de ingesta de agua. Así, estos elementos constituirían una parte del mecanismo de salida intracelular del ritmo circádico.

Abstract

The ryanodine receptor (RYR) is an intracellular channel for calcium ions, which has been involved in regulating the neuronal activity in the SCN and in the signaling pathway of light entrainment during the early subjective night. The RYR type 2 (RYR2) has a circadian rhythm in the SCN, that peak at CT7. Ryanodine and Caffeine applied around CT7 -9 advanced the clock phase in SCN electrical activity in a hamster brain slice preparation. It is possible that RYR regulation of cytoplasmic Ca⁺⁺ may regulate neuronal excitability as an early step in the output pathway of the clock genes in SCN neurons. As an initial approach to test this hypothesis we studied the effect of altering SCN excitability on the expression of behavioral circadian rhythmicity, we used tetrodotoxin (TTX) and high potassium CSF in order to respectively decrease or increase neuronal excitability by altering the neuronal firing rate. We then studied the effect of pharmacological manipulations of ryanodine receptor in the SCN on the expression of behavioral circadian rhythms.

Male Wistar rats were placed individually in recording cages in constant dim red light with *food* and water ad libitum, the recording room was maintained at 21 ± 2°C. The locomotion and drinking activity were continuously recorded at 5 min bins for fifteen days (basal), then a cannula was implanted on SCN and was connected to mini-osmotic pump filled with either: TTX (1 μM), CSF -high potassium (20 mM), ryanodine (10 μM or 100 μM) or artificial CSF. The infusion was chronic (200 μl at 0.5 μl/h) The recording of activity continued during the infusion and for 20 additional days after the pumps were exhausted.

Animals treatment with TTX showed arrhythmicity in the drinking activity during infusion and return of the rhythm after pump exhaustion, with period and phase similar to the basal recording. High potassium administration provoked shortening of the endogenous period of rhythmicity (τ) which lasted several days after pump exhaustion and eventually return to basal values. Infusion of 10 μM ryanodine resulted a shorten of τ, which return to basal values after pump

exhaustion, while with 100 μ M ryanodine, there were also a phase advance of the rhythm and a shortening of the activity interval (a).

The results found during TTX and high potassium infusion suggest that the period of the behavioral (overt) circadian rhythm may be function of SCN excitability (neuronal firing rate). The return to basal values after the infusion indicates that SCN excitability does not affect the clock mechanism itself. Result induced during RYR infusion suggest that the decrease in intracellular Ca^{++} conductivity (RYR 10 μ M) caused a faster circadian overt rhythmicity (resembling that induced by high potassium), but when the ryanodine receptor was closed (RYR 100 μ M) the circadian clock is also affected since phase shifts and a shortening were found after the infusion was ended.

Índice General

Agradecimientos	
Resumen	
Abstract	
Índice General	
Índice de Figuras	
Índice de Tablas	
Índice de Gráficas	
I. INTRODUCCIÓN	11
1. RITMOS CIRCÁDICOS	11
a. Aspectos históricos	12
b. Conceptos básicos	14
2. SISTEMA CIRCÁDICO	16
a. Sistema cronométrico	16
Núcleo supraquiasmático	16
b. Vía de entrada o de sincronización	19
c. Vía de salida	21
d. Vías de señalización intracelulares en el oscilador	25
3. CALCIO INTRACELULAR	31
4. RECEPTOR A RYANODINA	33
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
III. HIPÓTESIS	37
IV. OBJETIVO GENERAL	38
V. OBJETIVOS PARTICULARES	38
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Experimento 1	39
2. Experimento 2	43
VII. DISEÑO EXPERIMENTAL	46
VIII. RESULTADOS	49
1. Experimento 1	49
a. Histología	49
b. Conducta	49
2. Experimento 2	53
a. Histología	53
b. Conducta	53
IX. DISCUSIÓN	66
X. CONCLUSIONES	71
XI. REFERENCIAS	73

Índice de Figuras

FIGURA 1	15
FIGURA 2	20
FIGURA 3	23
FIGURA 4	27
FIGURA 5	29
FIGURA 6	32
FIGURA 7	34
FIGURA 8	49
FIGURA 9	52
FIGURA 10	53
FIGURA 11	54
FIGURA 12	55
FIGURA 13	56
FIGURA 14	57
FIGURA 15	58
FIGURA 16	59
FIGURA 17	69

Índice de Tablas

TABLA 1	49
TABLA 2	60
TABLA 3	62
TABLA 4	64

Índice de Gráficas

GRÁFICA 1	51
GRÁFICA 2	51
GRÁFICA 3	60
GRÁFICA 4	61
GRÁFICA 5	62
GRÁFICA 6	63
GRÁFICA 7	64
GRÁFICA 8	65

I. INTRODUCCIÓN

1. RITMOS CIRCADIANOS

Los **ritmos biológicos** son una característica fundamental de los organismos vivos, desde los más simples como las bacterias, hasta los más complejos como el hombre. Se denomina ritmo biológico a las oscilaciones periódicas en sistemas vivos, que ocurren en intervalos regulares. Hay una amplia gama de frecuencias en unidades de tiempo que cubren los ritmos biológicos: hay ritmos que oscilan una vez por fracción de segundo (ejemplo, los ritmos en la actividad eléctrica neuronal), hasta ritmos que oscilan una vez cada año (ejemplo, la hibernación). Los ritmos que se aproximan a un ciclo ambiental se les asigna el prefijo latino circa (alrededor de, próximo a), por ejemplo, los ritmos cercanos al ciclo anual son **circanuales**; los ritmos próximos al ciclo de la marea son **circamareales**; los ritmos que se acercan al ciclo lunar son **circalunares**; los ritmos que se repiten con una frecuencia cercana a la del día son **circádicos** o **circadianos** (Aschoff, 1981a). Los ritmos biológicos más estudiados son los circadianos, Franz Halberg en 1959, acuñó el término **circadiano** o **circádico** para referirse a los ritmos con un periodo cercano a las veinticuatro horas y que son generados de manera endógena por el organismo (Aschoff, 1981a).

Hay diversos parámetros que se deben tomar en cuenta para el análisis de los ritmos. Una **oscilación** es un cambio cíclico medible que exhibe una forma de onda y periodo relativamente constante. La **forma de la oscilación**, que es la desviación de la forma respecto a una onda sinusoidal pura. El **periodo** es la duración de un

ciclo completo, es decir, el intervalo entre dos puntos de referencia idénticos, expresado en unidades de tiempo. La **fase** es el tiempo estimado de la ocurrencia para un punto o evento dado. La **amplitud** es la distancia entre el punto máximo y el punto mínimo de un evento periódico. El **ángulo de fase** es la relación constante entre la fase del ritmo endógeno y la fase del ritmo ambiental (Pittendrigh, 1981; Aguilar-Roblero, 1993; Granados et al, 1995).

a. Aspectos históricos

Jean Jaques De Mairan en 1729 se preguntó si los ritmos observados en los organismos vivos eran sólo la influencia del medio ambiente sobre éstos o si el organismo era capaz de generar el ritmo aún sin la influencia del ciclo luz-oscuridad. De Mairan observó la ciclicidad en los movimientos del follaje de una planta sensitiva y demostró que la ritmicidad persistía aún cuando la planta la colocará en donde la luz del sol no podía alcanzarla, lo que sugería que el movimiento de la planta no dependía del ciclo luz-oscuridad. Treinta años más tarde, Duhamel Du Monceau demostró que el fenómeno observado por De Mairan no dependía de la variación en la temperatura. No fue sino hasta 1930 que Erwin Bünning planteó la dependencia genética del periodo de los ritmos en oscilación espontánea (Bünning, 1960; Reinberg y Slomensky, 1993).

A principios del siglo pasado, Augusto Forel sugirió que los organismos poseían una memoria temporal o **Zeitgedächtnis**. Con ese término, Beling y sus discípulos se referían a la naturaleza endógena de los fenómenos de ritmicidad biológica (Aguilar-Roblero, 1993).

Colin Pittendrigh planteó 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, mientras que la organización se refiere a fenómenos dependientes del manejo de información por el organismo. También postuló que los organismos en sus orígenes se sometieron al orden temporal impuesto por el ambiente y conforme éstos evolucionaron dicho orden fue codificado en la información genética, dando origen a su propia organización temporal. Así, las semejanzas entre los ciclos ambientales y los biológicos se explicarían porque inicialmente los últimos dependían de los primeros, mientras que sus diferencias se deberían a las características particulares de los organismos para adaptarse a su ambiente (Pittendrigh, 1981).

Aschoff, Bünning, Halberg y Pittendrigh demostraron la capacidad de los organismos para medir el tiempo. Con estos descubrimientos, el término *Zeitgedächtnis* fue reemplazado por el concepto de **reloj biológico** (Moore-Ede, 1982). El concepto de reloj biológico abarca los siguientes puntos (Pittendrigh, 1981): 1) Es un sistema orgánico capaz de oscilar con un periodo regular; 2) Puede usar dichas oscilaciones como una referencia temporal interna en las actividades del organismo; 3) El sistema es sincronizable por agentes ambientales.

Este sistema permite la adecuada interacción del dominio temporal entre el organismo y su ambiente, además no interviene algún proceso de aprendizaje en la generación de los ritmos biológicos (Pittendrigh, 1981; Reinberg y Smolensky, 1993).

Algunos autores como Pittendrigh o Aschoff, manejan el concepto de reloj biológico como estructuras orgánicas que funcionan como marcapasos u osciladores capaces de imponer periodo y fase a los procesos orgánicos, mientras que otros como Halberg o Reinberg, dicen que 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 los diversos procesos (Aguilar-Roblero, 1993).

b. Conceptos Básicos

Los **ritmos circádicos** son oscilaciones periódicas, que ocurren alrededor de las veinticuatro horas y que pueden observarse en diversos procesos fisiológicos y conductuales de los organismos, por ejemplo, el ciclo sueño-vigilia, los niveles de cortisol en el plasma, la ingesta de agua y alimento (Inouye y Kawamura, 1982; van Esseveldt et al, 2000). Estos ritmos son generados de manera endógena por el organismo, porque cuando se estudian en condiciones experimentales constantes, aislados de señales de tiempo, persisten y presentan una frecuencia cercana a las veinticuatro horas, entonces se dice que están en **libre curso** u **oscilación espontánea** (Pittendrigh, 1981; Moore-Ede, 1982). Cuando los ritmos se estudian bajo condiciones ambientales variables, se hace referencia a la **sincronización**. El ciclo externo que sincroniza al ritmo es llamado **zeitgeber** o **agente sincronizador** (Aschoff, 1981b). Al tiempo del organismo determinado en la condición ambiental constante se le denomina **CT** (circadian time, por sus siglas en inglés), y al tiempo determinado en sincronización se le denomina **ZT** (zeitgeber time, por sus siglas en inglés).

El proceso de sincronización ha sido estudiado ampliamente a través de la **curva de respuesta de fase (CRF)**, el cual es un método donde se le aplica un pulso breve de estímulo al organismo (ya sea luz, un químico o un pulso eléctrico) a diferentes horas de su ciclo circádico, y se mide el cambio de fase en su ritmo (figura 1). La forma en que se cuantifica este parámetro es midiendo la extensión de la diferencia de fase en el estado estable final (Enright, 1981).

La curva se divide en tres segmentos: A) La zona muerta, se aplica un pulso del estímulo y no produce respuesta, B) La zona de retrasos, el estímulo retrasa al reloj (cambio de fase negativa), y C) La zona de avances, el estímulo avanza al reloj (cambio de fase positivo) (Aguilar-Roblero et al, 2004) (figura 1). Las horas e intensidad con que ocurren estos tres cambios, depende de la especie estudiada.

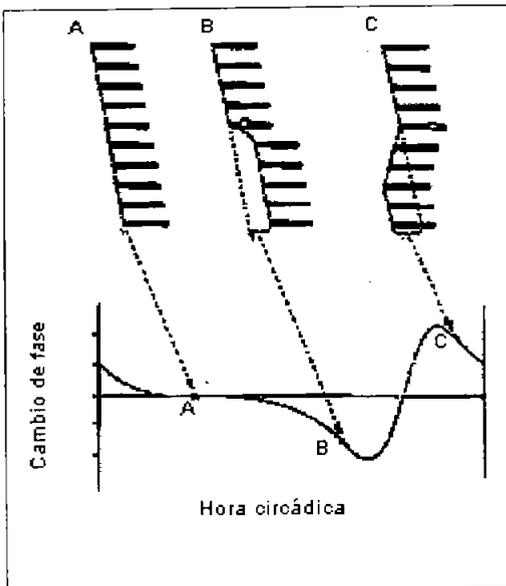


Figura 1. Curva de respuesta de fases. A zona muerta, B zona de retrasos, C zona de avances. El esquema de arriba representa la actividad del organismo observada antes y después del estímulo (Modificada de Moore-Edge, 1982).

2. SISTEMA CIRCÁDICO

Los ritmos circádicos son generados en el organismo de manera endógena por un sistema denominado "sistema circádico", el cual está constituido por tres componentes: 1) El sistema cronométrico, que está formado por un marcapasos u oscilador, opera en ausencia de señales medio ambientales, 2) Una vía de entrada o de sincronización, que transmite las señales del medio ambiente (principalmente la luz) al sistema cronométrico, y 3) Una vía de salida, que transmite la señal generada por el sistema cronométrico.

a. Sistema cronométrico

Actualmente se han identificado en diversos organismos estructuras que funcionan como marcapasos u osciladores. En el molusco, las neuronas basales de la retina (Block y McMahon, 1984); en la polilla, el ganglio cerebral (Aronson, 1993); en las aves y reptiles, la glándula pineal (Takahashi et al, 1980; Menaker y Wisner, 1983); en mamíferos, al núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Moore y Eichler, 1972; Raciman y Brown-Grant, 1977; Stephan y Zucker, 1972).

Núcleo supraquiasmático: El núcleo supraquiasmático es una estructura bilateral, en ratas adultas tiene un volumen de 0.136 mm^3 , está compuesto de aproximadamente 16,000 neuronas, de tamaño pequeño entre 8 y $12 \mu\text{m}$ de diámetro, empaquetadas en forma muy compacta. Se encuentra en la parte anterior ventral del hipotálamo, dorsal al quiasma óptico. En el polo rostral se encuentra dorsal a la comisura supraóptica y en el polo caudal está ventrolateral al receso óptico del tercer ventrículo (Van Den Pol, 1980).

Con base en diferencias morfológicas, el NSQ se puede dividir en una pequeña área rostral y un área larga caudal con una parte dorsomedial y otra ventrolateral (Van Den Pol, 1980). A la parte dorsomedial se le conoce como “concha” (shell), la cual contiene pequeñas neuronas alargadas con núcleos largos, pocos organelos celulares y fuertemente empaquetadas. La parte ventrolateral del NSQ o “centro” (core) se caracteriza por contener una densidad baja de neuronas esféricas, que tienen un citoplasma con abundantes organelos (Leak et al, 1999; Leak y Moore, 2001). Los somas neuronales están separados por células gliales, las cuales encierran completamente las uniones sinápticas dentro de la parte ventrolateral. La comunicación celular es por medio de interacción efáptica, uniones comunicantes, transmisión sináptica o señales neurohumorales (van Den Pol, 1980; van Den Pol y Dudek, 1993).

Las diferencias morfológicas y de organización entre las neuronas del NSQ en las partes dorsomedial y ventrolateral, sugieren que las partes tienen diferentes funciones en la generación y regulación del ritmo circádico. Se ha detectado diferencias en el contenido neuropeptídico en las regiones del NSQ (Van Esseveldt et al, 2000). Las neuronas de la región dorsomedial sintetizan vasopresina (VP) y las neuronas de la región ventrolateral sintetizan el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) (Vandesande et al, 1975; van Den Pol, 1985), el péptido isoleucina histidina (PHI) y el péptido liberador de la gastrina (GRP) (Sims et al, 1980; Card et al, 1981 y 1988). Se han reportado otras sustancias en pequeñas proporciones en ambas regiones: somatostatina, sustancia P, angiotensina II, factor liberador de la corticotropina, encefalina, galanina, factor liberador de la tirotrópina. La mayoría de las neuronas, si no es que todas, sintetizan GABA (Ácido γ -amino butírico) y

colocaliza con algunos de los neuropéptidos mencionados anteriormente (Moore y Speh, 1993).

En mamíferos, el NSQ funciona como un marcapasos al cual se le ha denominado reloj circádico, sus oscilaciones son endógenas y cercanas a las veinticuatro horas (Leak y Moore, 2001). Las evidencias experimentales que demuestran al NSQ como un reloj circádico son las siguientes:

- ◆ En diversas especies estudiadas la lesión bilateral del NSQ suprime el ritmo circádico de diversos procesos conductuales y fisiológicos. Por ejemplo en la rata, la lesión bilateral del NSQ elimina la expresión del ritmo circádico de diversos patrones conductuales y fisiológicos como son: la conducta de ingesta de agua (Stephan y Zucker, 1972), ingesta de alimento (Nagai et al, 1978), sueño (Ibuka y Kawamura, 1975), secreción de corticosteroides (Moore y Eichler, 1972), secreción de la N-acetiltransferasa de la glándula pineal (Klein y Moore, 1979).
- ◆ La estimulación eléctrica o química de estos núcleos induce cambios de fase en el ritmo circádico de la conducta, similar a los provocados por la exposición a la luz (Rusak y Groos, 1982).
- ◆ En registros electrofisiológicos de actividad multiunitaria, persiste el ritmo circádico de la actividad eléctrica en el NSQ aislado (Inouye y Kawamura, 1979; Shibata et al, 1982).

- ◆ El NSQ exhibe ritmicidad circádica en su actividad metabólica. Schwartz y colab. (1977 y 1980) reportaron que la utilización de la 2-Deoxiglucosa por las neuronas del NSQ incrementa durante el día y decae por la noche.
- ◆ La evidencia más relevante que demuestra al NSQ como un reloj circádico es el trasplante del NSQ fetal en los animales lesionados. Con el trasplante los animales lesionados recobran el ritmo circádico de la conducta, además el tejido donador impone su periodo y fase al tejido receptor (Druker-Colin et al, 1984; Aguilar-Roblero et al, 1992).

b. Vía de entrada o de sincronización

La región ventrolateral del NSQ recibe la mayoría de las vías aferentes (van den Pol, 1991): 1)El tracto retino-hipotalámico proveniente de la retina, cuyos principales neurotransmisores son glutamato y PACAP (Castel et al, 1993; Reppert y Weaver, 2002); 2)La vía genículo-hipotalámica proveniente de la hojuela intergeniculada (HIG), que secreta Neuropéptido Y (Albers y Ferris, 1984); 3)La vía que proviene de los núcleos dorsal y medial del núcleo del rafe mesencefálico, que secreta serotonina (Cagampang e Inouye, 1994).

Las neuronas de la parte dorsomedial del NSQ, reciben las siguientes fibras: 1)El tracto corticohipotalámico proviene del sistema límbico, núcleo septal medial, núcleo subículo anteroventral y áreas hipotalámicas adyacentes (área preóptica, núcleo ventromedial, núcleo arcuato, área tuberal) (Moga y Moore, 1997).

La vía de entrada que se ha descrito más ampliamente, es la que sincroniza al NSQ por la luz, llevada a cabo por el tracto retino-hipotalámico. La cantidad de luz ambiental es detectada por fotorreceptores de la retina (figura 2). Se ha demostrado que los clásicos fotorreceptores de la retina, conos y bastones, no son estrictamente necesarios para la sincronización a la luz, ya que los animales ciegos por degeneración congénita de los conos y los bastones, aún son capaces de sincronizarse a la luz (Freedman et al, 1999). Trabajos recientes han demostrado que un tipo de células ganglionares de la retina (CGR), proyectan directamente al NSQ y a la hojuela intergeniculada, estas neuronas ganglionares contienen un fotorreceptor llamado Melanopsina, el cual es necesario para la adecuada sincronización de los ritmos a la luz, y se ha sugerido que es un fotorreceptor circádico (Reppert y Weaver, 2002).

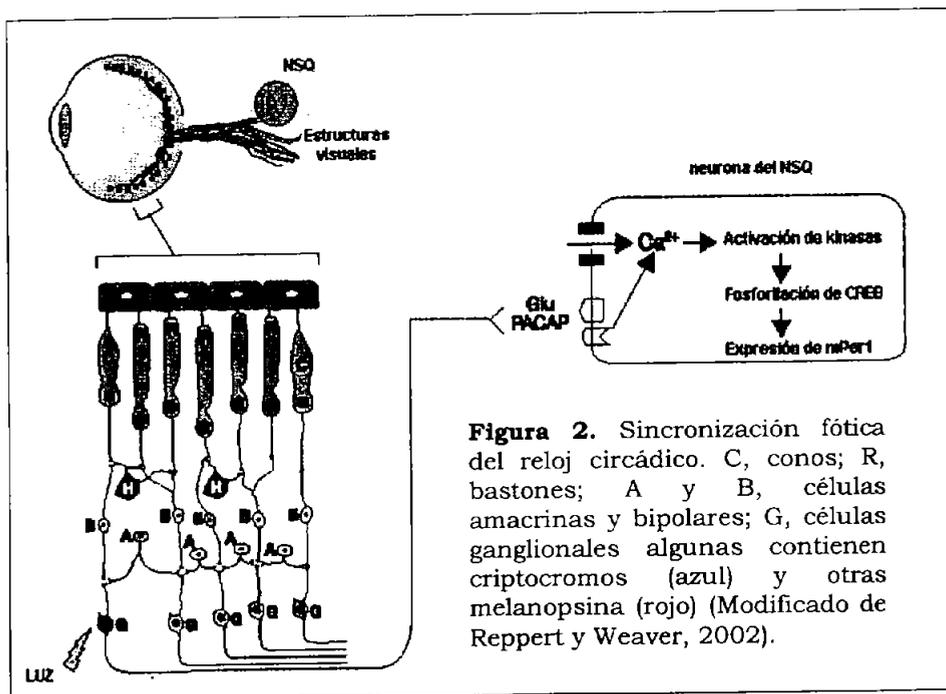


Figura 2. Sincronización fótica del reloj circádico. C, conos; R, bastones; A y B, células amacrinas y bipolares; G, células ganglionares algunas contienen criptocromos (azul) y otras melanopsina (rojo) (Modificado de Reppert y Weaver, 2002).

Algunos axones de las CGR forman el tracto retino-hipotalámico que llega a la región ventral del NSQ. Con un estímulo de luz, se cree que los axones liberan glutamato y el péptido hipofisiario activador de la adenilato ciclasa (PACAP) los cuales, inducen la expresión de genes reloj (Reppert y Weaver, 2002) (figura 2). La respuesta en la vía de señalización intracelular en las neuronas del NSQ, depende del momento del ciclo en que se presenta el estímulo de la luz (Meijer y Schwartz, 2003), el sistema específico de segundos mensajeros que es activado determina la dirección en que el reloj cambiará su fase, estos mecanismos serán explicados en el capítulo de *Vías de señalización intracelulares en el oscilador*.

c. Vía de salida

Muchos trabajos han reportado que la información temporal generada por el NSQ se transmite al organismo para regular los diversos procesos fisiológicos y conductuales rítmicos como la temperatura del cuerpo, locomoción, ingesta de alimento y agua, sueño, secreción hormonal, utilización de oxígeno, producción de corticosterona, etc. Generalmente se considera que la parte ventro-lateral del NSQ, recibe las vías de sincronización, mientras que la dorso-medial contiene la salida de la transmisión del tiempo. Varias neuronas del NSQ proyectan principalmente a diferentes estructuras hipotalámicas para transmitir la información temporal a diferentes ejes funcionales, especialmente el eje hipotálamo-hipofisis, para la secreción rítmica de hormonas (van Den Pol, 1980, 1991; Watts, 1991).

Las principales eferencias (figura 3) que se han descrito del NSQ son las siguientes: 1)Fibras que van hacia núcleos hipotalámicos (zona subparaventricular, paraventricular, área preóptica, área retroquiasmática, región tuberal lateral,

ventromedial, dorsomedial, periventricular, gris periacueductual, premamilar); 2)Proyecciones hacia el sistema limbico (núcleo medial, núcleo septal lateral, núcleo de la cama de la estría terminalis, órgano vasculoso de la lámina terminalis); 3)Vías que van hacia el diencefalo (núcleo paraventricular del tálamo, núcleo dorsal del tálamo, habénula lateral); 4)El tracto genículo-hipotalámico (hojuela intergeniculada); 5)Proyecciones que van al núcleo del rafe (núcleo paratania, gris periacueductual) (van Den Pol, 1980, 1991).

Recientemente se ha propuesto que la unión entre la salida del NSQ y el ritmo circádico en la actividad locomotora es el factor de crecimiento α que actúa como transmisor en la zona subparaventricular hipotalámica (Kramer et al, 2001). También el NSQ puede regular los órganos endócrinos periféricos a través del sistema nervioso autónomo (Simonneaux y Ribelayga, 2003). Actualmente el uso de la técnica de microarreglos del ADNc ayuda a identificar los nuevos genes controlados por el reloj en diversos tejidos (Akhtar et al, 2002; Duffield et al, 2002).

En la rata, los neurotransmisores del NSQ involucrados en la salida del reloj son esencialmente la vasopresina (VP) y el ácido γ -amino butírico (GABA) (Moore y Speh, 1993; Kalsbeek et al, 1995). La VP parece ser un transmisor controlado por los genes reloj porque: 1)Expresa un ritmo circádico en su síntesis y liberación (Reppert, 1985; Murakami et al, 1991; Watanabe et al, 2000); 2)Su gen promotor contiene un "E-box" bajo el control directo de los genes reloj (Jin et al, 1999); y 3)Actúa en el hipotálamo dorsomedial para controlar el ritmo circádico de la síntesis y liberación de la corticosterona (Kalsbeek et al, 1995).

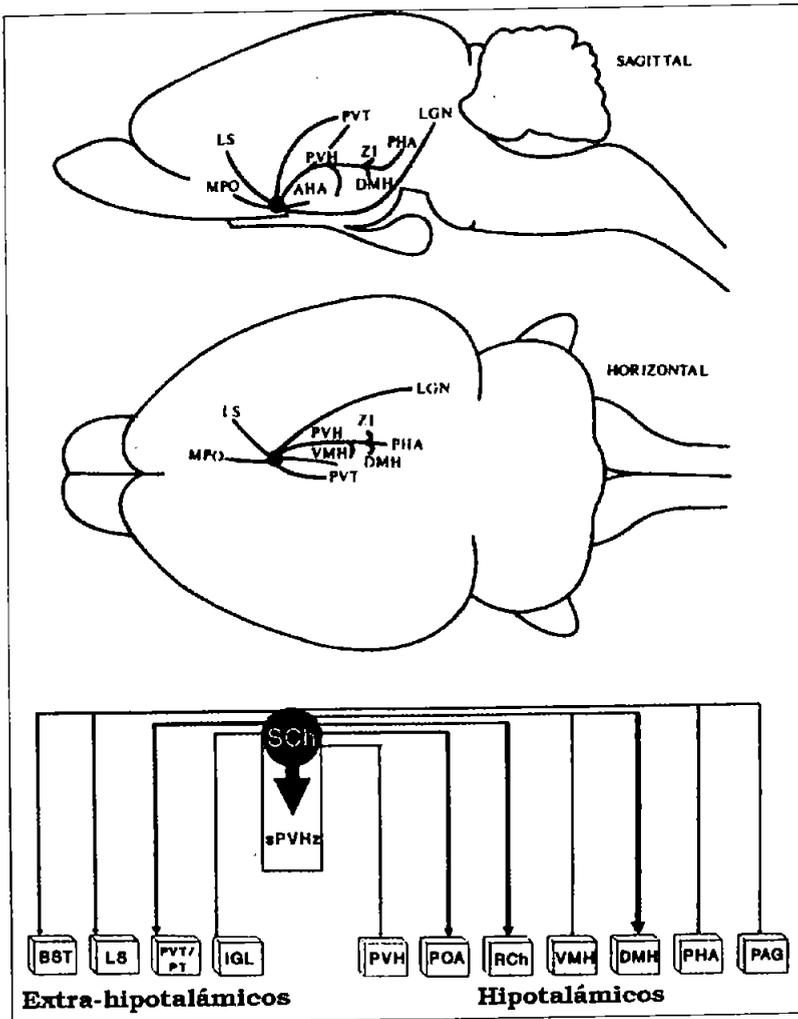


Figura 3. Eferencias del NSQ. BST, núcleo de la cama de la estria terminalis; LS, núcleo septal lateral; PVT/PT núcleo paraventricular del tálamo, núcleo paratánico; IGL, hojuela intergeniculada; sPVH2, zona subparaventricular del hipotálamo; SCH, núcleo supraquiasmático; PVH, núcleo paraventricular del hipotálamo; POA, núcleo del área preóptica; RCh, área retroquiasmática; VMH, núcleo ventromedial del hipotálamo; DMH, núcleo dorsomedial del hipotálamo; PHA, área hipotalámica posterior; PAG, gris periacueductal (Tomada de Watts, 1991)

El GABA es un neurotransmisor comúnmente inhibitorio en el Sistema Nervioso Central, está densamente distribuido en el NSQ, localizado mayormente en los somas neuronales (Moore y Speh, 1993) y terminales sinápticos (Castel et al, 1993; Decavel y van den Pol, 1990). La concentración y la actividad de GABA, la actividad de la enzima que convierte el glutamato en GABA, GAD (ácido glutámico descarboxilasa) y los niveles de ARNm de GABA muestran un ritmo circádico en el NSQ, tanto en condiciones de luz y oscuridad, como en una condición constante de oscuridad (Aguilar-Roblero et al, 1993; Huhman et al, 1996). La participación como modulador de este neurotransmisor es controversial, si se administra GABA a rebanadas que contengan al NSQ durante la noche, tiene un efecto inhibitorio disminuyendo la frecuencia de disparo, pero si se administra durante el día actúa como un neurotransmisor excitatorio, incrementando la frecuencia de disparo (Wagner et al, 1997). Los autores atribuyen este efecto dual a la oscilación intracelular en la concentración de cloro.

El GABA parece estar involucrado en transmitir la señal del NSQ al PVN, la infusión de un antagonista de GABA durante el día subjetivo en el PVN, estimula la síntesis de melatonina, mientras que si la infusión se realiza en la noche subjetiva inhibe la secreción de melatonina (Kalsbeek et al, 2000). Lesiones en el PVN abolen el ritmo de la síntesis de melatonina en la glándula pineal (Klein et al, 1983), y las neuronas del PVN responden a la estimulación eléctrica de las células del NSQ (Hermes et al, 1997). Al parecer el NSQ es un mediador de la síntesis de melatonina, a través del PVN (vía GABA) (Kalsbeek et al, 2000).

d. Vías de señalización intracelular en el oscilador

Estudios funcionales han demostrado que cada neurona del NSQ puede funcionar como un oscilador circádico. Cuando se extrae al NSQ y se aíslan las neuronas, éstas pueden generar ritmos circádicos endógenos en su actividad, por ejemplo en su frecuencia de disparo neuronal (Inouye y Kawamura, 1979; Green y Gillette, 1982; Gross y Hendriks, 1982; Walsh et al, 1995; Ikeda et al, 2003), en el metabolismo de la glucosa (Schwartz y Gainer, 1977; Schwartz et al, 1980); en la secreción de neurotransmisores (Earnest y Sladek, 1986 y 1987), en la expresión de los ARN Bmal, Per (1,2,3) y Cry (1,2) (Honma et al, 1998; Shearman et al, 2000; Reppert y Weaver, 2001; Reppert y Weaver, 2002).

Los mecanismos intracelulares por los cuales funciona cada neurona del NSQ como oscilador, constan de tres componentes: 1) vía de entrada de sincronización; 2) maquinaria del reloj, por la cual se generan los ritmos circádicos; y 3) señal de salida para la expresión del ritmo circádico.

Diversos trabajos han determinado algunos elementos de estos tres componentes. Schwartz y colaboradores (1987) encontraron que los potenciales de acción determinan la vía de entrada (sincronización) y salida de las neuronas del NSQ. En su trabajo aplicaron tetrodotoxina (TTX, que es un bloqueador de los canales de Na⁺), a las neuronas del NSQ *in vivo*. Los animales cegados que recibieron infusión de TTX presentaron conducta arritmica durante la infusión, regresando a su periodo y fase inicial al terminar el tratamiento. Los animales expuestos a un ciclo de luz - oscuridad, durante la infusión de TTX no se sincronizaron con la luz. Con estos experimentos se comprobó que los potenciales

de acción dependientes de Na^+ , son importantes para la sincronización y expresión del ritmo circádico en la conducta de ingesta de agua de la rata.

Como se mencionó anteriormente las terminales del tracto retino-hipotalámico que forman los axones de las CGR, al parecer liberan glutamato y PACAP. Su unión con el receptor tipo NMDA en las neuronas del NSQ, produce la entrada de calcio (Ca^{++}). El aumento de calcio intracelular en las neuronas del NSQ, induce a la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta $\text{Ca}^{++}/\text{AMPC}$ ($\text{CREB} \rightarrow \text{pCREB}$). Al parecer la interacción de pCREB sobre el elemento de respuesta al AMPc (CRE) localizado en la región promotora de diversos genes blanco, modificaría su expresión para adelantar o retrasar la maquinaria molecular del reloj circádico (Cermakian y Sassone-Corsi, 2002; Golombek et al, 2003).

Diversos trabajos han propuesto las vías intracelulares que se activan por la estimulación de luz para generar los cambios de fase en el reloj circádico (Cermakian y Sassone-Corsi, 2002; Golombek et al, 2003. Como se mencionó anteriormente; el calcio entra a las células del NSQ por la estimulación del receptor del tipo NMDA, este calcio podría unirse a la calmodulina (CaM), el complejo $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$ funcionaría como una quinasa (CaMK-II) que fosforila la proteína de unión al CREB; Otra ruta que podría tomar el calcio es a través de la vía de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK), también llamadas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Se ha reportado que la activación de la vía MAPK/ERK también participa en la fosforilación de CREB; 3) Por último, se ha propuesto que la neurona responde dependiendo de la hora en que se aplique el estímulo luminoso. Si los pulsos de luz se aplican durante la primera mitad de la

noche subjetiva, el calcio que ingresa a la neurona activa directamente los canales de calcio sensibles a la ryanodina (RyR) e induce la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, esta liberación de calcio intracelular provocaría la fosforilación de CREB y al parecer incitaría la expresión del gen Per1 para provocar un retraso de fase. Por otro lado, si el estímulo luminoso se aplica durante la segunda mitad de la noche, la entrada de calcio extracelular induce la síntesis de óxido nítrico, que estimula a la formación de GMP cíclico, el cual activa a la proteína Kinasa G (PKG), que fosforila a la CREB y ésta actúa posiblemente sobre el gen Per2 para dar como resultado un avance de fase (Meijer y Schwartz, 2003; Ding et al, 1997; Aguilar-Roblero et al, 2004) (figura 4).

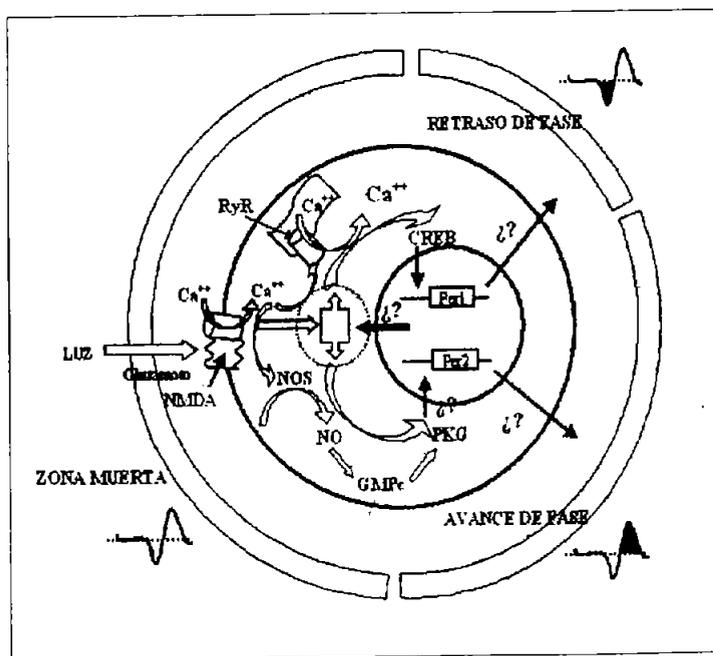
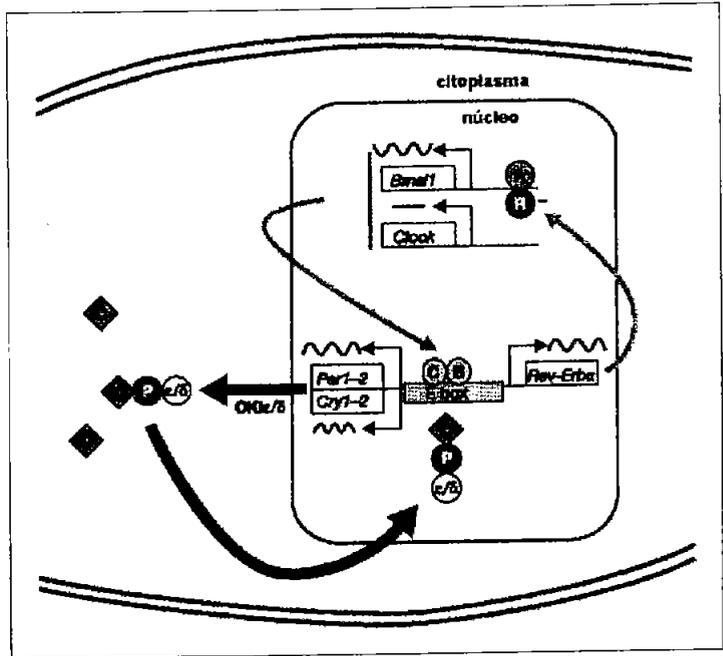


Figura 4. Elementos intracelulares que participan en la sincronización del reloj circádico a la luz (Tomado de Aguilar-Roblero et al. 2004).

En los mecanismos intracelulares del reloj, participa la interacción de asas de retroalimentación transcripcional positivas y negativas, que regulan los ritmos en sus niveles de RNAs y proteínas que participan como la maquinaria del reloj que generan los ritmos circádicos. Los heterodímeros CLOCK-BMAL1 uniéndose al elemento E-box CACGTG activan la transcripción rítmica de dos familias de genes: PER (*mPer1*, *mPer2*, *mPer3*) y de cryptocromo (*mCry1*, *mCry2*). Las proteínas de *mPer* y *mCry* forman un dímero PER-CRY, son fosforiladas por las caseinas kinasas ϵ en el citosol y regresan al núcleo para actuar como reguladores negativos inhibiendo directamente su propia transcripción, desplazando al dímero CLOCK y BMAL1 de su sitio de unión E-box (revisión de Reppert y Weaver, 2002) (figura 5).

Aunque el asa de retroalimentación negativa anteriormente mencionada es suficiente para oscilar por sí misma, a ésta se le sobrepone otra asa de protoalimentación, lo que le permite mayor estabilidad y precisión a la oscilación. Como se indica en la figura 5, el dímero CLOCK-BMAL1 al unirse al promotor E-box induce la transcripción del gene *rev-erba*, la proteína de este gene (REV-ERB α) permite la transcripción de los genes *Bmal1* y *Clock*. Por lo tanto, cuando los complejos PER-CRY desplazan a CLOCK-BMAL1 de su promotor E-box, la disminución en la transcripción de *rev-erba* permite la transcripción de *Bmal1* y *Clock*, restableciendo los niveles de las proteínas BMAL1 y CLOCK y así se repite el ciclo (Aguilar-Roblero et al, 2004).

Figura 5. Mecanismo molecular, por el cual se generan los ritmos circádicos. C círculo, clock; B, Bmal1; C rombo, cry; P, per; ϵ/δ , fosforilada; CKI ϵ/δ , caseína kinasa ϵ que fosforila. El gen Rev-Erba, inhibe la transcripción de Bmal1 (Modificado de Reppert y Weaver, 2002).



Los procesos celulares y moleculares que median los genes reloj sobre las propiedades electrofisiológicas y ritmicidad intrínseca de las neuronas del NSQ, para la expresión del ritmo, han sido poco estudiados. Shibata y Moore (1998) propusieron que el calcio intracelular libre en las neuronas del NSQ participa de manera importante en el ritmo circádico, como por ejemplo, el índice de disparo unitario y la oscilación de la recaptura de la 2-deoxiglucosa, por lo que este ion, podría ser un candidato como mensajero intracelular en el sistema circádico. Se han detectado cambios rítmicos en la concentración de calcio intracelular libre en las plantas del tabaco y *Arabidopsis* (Johnson et al, 1995; Wood et al, 2001), pero se conoce muy poco sobre la dinámica del calcio intracelular en las neuronas del NSQ.

La dinámica del calcio intracelular, depende del calcio extracelular y de los reservorios intracelulares de calcio (principalmente el retículo endoplasmático y la mitocondria). La ATPasa-Ca²⁺, incorpora el calcio a los reservorios, mientras que los receptores a inositol trifosfato (IP₃R) y a ryanodina, se encargan de liberar el calcio de los reservorios al citosol (Berridge et al, 2003). Díaz-Muñoz y colaboradores (1999), demostraron que el receptor a ryanodina tipo 2 (RYR-2), se expresaba con un ritmo circádico en las neuronas del NSQ, tanto en la condición de luz y oscuridad como en luz roja continua, mientras que el IP₃R no presentaba variación temporal en su expresión. Estos mismos autores también reportaron que la ryanodina en una concentración de 10 μM, administrada en rebanadas que contenían al NSQ, inducía un avance de fase en el pico de la frecuencia de disparo de las neuronas del NSQ. Este resultado no es muy claro, ya que la frecuencia de disparo neuronal en la rebanada, sólo se registro durante ocho horas, al día siguiente de la administración del fármaco. Usando el método de análisis de imagen con fura-2AM, Colwell (2000) reportó que el calcio intracelular libre de las células del NSQ exhibía un ritmo circádico, presentando la mayor concentración en el día. Este ritmo se observó tanto en la condición de luz y oscuridad, como en oscuridad continua. La aplicación de TTX (1 μM) abolió el ritmo de la concentración de calcio, por lo que Colwell sugirió que el ritmo observado en la concentración de calcio intracelular era manejado por el ritmo de la actividad eléctrica en las células del NSQ. Ikeda y colaboradores (2003) cuantificaron la concentración de calcio intracelular y simultáneamente registraron la actividad multiunitaria en neuronas del NSQ, usando una proteína fluorescente (cameleon) y un arreglo múltiple de electrodos respectivamente, en rebanadas de ratón que contenían al NSQ. Con estas técnicas

se demostró que el pico de mayor concentración del calcio citosólico precede al pico de mayor actividad multiunitaria por 2-7 hr.

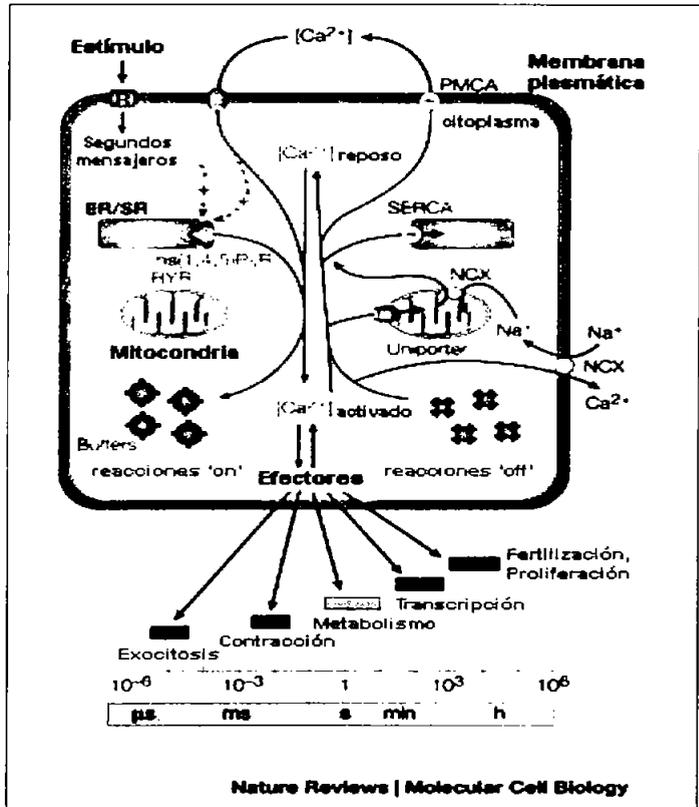
2. CALCIO INTRACELULAR

El calcio intracelular es una señal altamente versátil que opera en un amplio rango temporal para regular muchas funciones celulares. Por ejemplo, sólo en unos cuantos microsegundos activa la excitosis, mientras que para activar la transcripción genética o la proliferación celular requiere de varias horas (Berridge et al, 2000). La célula en reposo tiene una concentración de calcio de 100 nM, pero se activa cuando los niveles aumentan aproximadamente a los 1000 nM. Los niveles de calcio intracelular son determinados por un balance entre las reacciones que activan el calcio (reacciones 'on') y las reacciones para la terminación de la señal del calcio (reacciones 'off'). Hay una diversidad de elementos que participan en este sistema de movilización de calcio intracelular (Berridge et al, 2003) (figura 6).

El calcio que se incorpora al citosol proviene del exterior y de los depósitos intracelulares. La incorporación de calcio a los depósitos intracelulares o/y su salida al exterior es por medio de ATPasas de calcio y transportadores. Del exterior, el calcio se incorpora por medio de canales de calcio dependientes de voltaje y receptores a glutamato; los principales depósitos intracelulares de calcio son el retículo sarcoplásmico (células musculares), retículo endoplásmico y mitocondria, de los cuales, los principales elementos que participan en la liberación de calcio al citosol son: intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, receptor a inositol-1,4,5-trifosfato y receptor

a ryanodina (Berridge et al, 2003). El calcio del citosol activa diversos efectores para las funciones celulares como la excitabilidad membranar, exocitosis, contracción muscular, metabolismo, transcripción, fertilización, proliferación, etc (Berridge et al, 2003).

Figura 6. Dinámica del calcio intracelular. Las reacciones 'on' incorporan el calcio al citosol, las reacciones 'off' sacan el calcio del citosol. Ins(1,4,5)P₃R, receptor a inositol trifosfato; RYR, receptor a ryanodina; PMCA, ATPasa de calcio de la membrana plasmática; SERCA, ATPasa de calcio del retículo sarco(endo)plásmico; NCX, intercambiador Na⁺/Ca²⁺. Tomado de Berridge y colab., 2003.



RECEPTOR A RYANODINA

Los receptores a ryanodina (RYRs) son canales de calcio intracelular, que se encuentran en las membranas del retículo sarcoplásmico (SR) de las células musculares y en el retículo endoplasmático (ER) de los otros tipos celulares. Su función principal es la de sacar el calcio de su depósito intracelular que está en el SR y el ER hacia el citoplasma de la célula. En mamíferos, el RYR es una proteína con un peso molecular de 2.2-2.3 X10⁶ Daltons, está formada por un homotetrámero (figura 7B), cada monómero está constituido por aproximadamente 5000 amino ácidos y con un peso molecular de 550 kDa. Se han clonado, secuenciado y caracterizado tres isoformas del receptor: 1) isoforma 1 (RYR-1) que se expresa mayormente en el músculo esquelético, 2) isoforma 2 (RYR-2) distribuida principalmente en el músculo cardiaco y en el cerebro, e 3) isoforma 3 (RYR-3) que se encuentra en pocas cantidades en páncreas, epitelio del pulmón, cerebro, músculo esquelético y liso. Las tres isoformas son codificadas por tres diferentes genes en diferentes cromosomas (*ryr1*, *ryr2* y *ryr3*) (Coronado et al, 1994; Williams et al, 2001; Wagenknecht y Samsó, 2002).

Los RYRs tienen dos componentes estructurales: a) un componente grande en forma de prisma cuadrado (280 X 280 X 120 Å) y b) otro de menor tamaño que se proyecta, en uno de sus lados en una estructura simétrica de cuatro lados. La estructura más grande representa la región citoplasmática del receptor, mientras que la más pequeña representa la porción transmembranal (Wagenknecht y Samsó, 2002) (figura 7). El estudio de la estructura-función del receptor a ryanodina ha resultado muy complicada; primero, los canales son expresados en organelos

intracelulares, por lo que no son fácilmente accesibles, segundo, es una proteína muy grande (constituye una décima parte del tamaño de un ribosoma), lo cual complica su manipulación genética, así como la selección de los sitios a mutar. Actualmente se utiliza la técnica de microscopía por cryo-electron para determinar la estructura tridimensional del receptor (Wagenknecht y Samsó, 2002; Fill y Copello, 2002) (figura 7A).

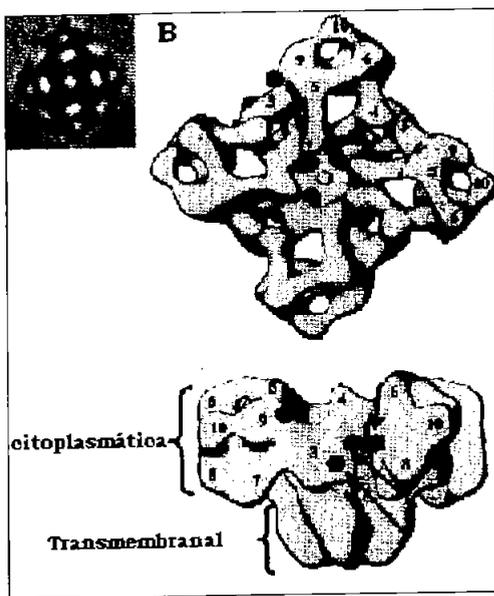


Figura 7. Receptor a ryanodina tipo 2. **A** Estructura del receptor por microscopía cryo-electrónica (Tomado de Liu y colab. 2004). **B** Esquema del receptor a ryanodina (Tomado de Williams y colab., 2001).

Diversas moléculas se unen al receptor y modifican su estructura funcional, el efecto que ejerzan tales moléculas, depende de su concentración, combinación con algún ion u otra molécula y al tipo de receptor (RYR1, RYR2, RYR3) que se unan. Algunos moduladores de la función del canal son fosforilación, oxidación, calcio, ATP, Magnesio, ryanodina, cafeína, dantroleno, rojo de rutenio, etc (Zucchi y Ronca-

Testoni, 1997; Shoshan-Barmatz y Ashley, 1998; Williams et al, 2001; Fill Copello, 2002).

a)Calcio citosólico: Se ha encontrado que los RYRs tienen sitios de unión para el calcio y que el efecto en la probabilidad de apertura del canal, depende de la concentración de calcio que se le aplique a las células (Williams et al, 2001). El calcio a bajas concentraciones (1-10 μ M), abre el canal y estimula la liberación de calcio, y en concentraciones altas (1-10 mM), cierra el canal e inhibe la liberación de calcio (Fill Copello, 2002).

b)ATP: La adenosina trifosfato (ATP) actúa como ligando en los RYRs. A concentraciones de milimolar estimula la liberación de calcio (Shoshan-Barmatz y Ashley, 1998).

c)Magnesio: El magnesio en concentraciones de milimoles, cierra el canal del RYR y produce una fuerte inhibición en la liberación de calcio. El mecanismo de inhibición del magnesio, parece ser por el desplazamiento competitivo del calcio de sus sitios de estimulación de alta afinidad (Coronado et al, 1994; Shoshan-Barmatz y Ashley, 1998).

d)Estado redox: Varios procesos redox modulan al RYR, los monómeros del receptor contienen de 80 a 100 residuos de cisteína, muchos de éstos son adecuados para la modificación por oxidantes. Recientemente se ha sugerido que el óxido nítrico (ON) podría modular la regulación redox en los RYR (Fill y Copello, 2002).

e)Cafeína: La cafeína en el rango de los milimolares estimula la liberación de calcio y su efecto se potencia con el ATP y se inhibe con el Mg^{2+} y el rojo de rutenio. La cafeína incrementa la probabilidad de apertura de los canales sin cambiar su estado de conductancia. También estimula la unión de ryanodina al receptor incrementando la afinidad del receptor (Coronado et al, 1994; Shoshan-Barmatz y Ashley, 1998).

f)Dantroleno y rojo de rutenio: El dantroleno es una droga que se usa como relajante muscular postsináptico, inhibe la liberación del Ca^{++} en concentraciones de 10 a 90 μM . El dantroleno reduce la tasa máxima de liberación de Ca^{++} sin afectar la sensibilidad del Ca^{++} en el receptor, su acción es más evidente en presencia de cafeína y nucleótidos de adenina (Zucchi y Ronca-Testoni, 1997). El rojo de rutenio es un inhibidor de la liberación de Ca^{++} en el SR en músculo esquelético y cardíaco, es muy efectivo a concentraciones de 1 nM a 20 μM (Coronado et al, 1994; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997).

g)Ryanodina: La ryanodina es un producto natural que se encuentra en plantas del genero *Ryania*, los cuales crecen como arbustos o árboles delgados en bosques tropicales de Centro y Sur de América. Con este componente se identificó y caracterizó el receptor de ryanodina. El efecto en los RYRs, depende de la concentración de ryanodina que se aplique. A concentraciones en el rango de 0.01-1 μM , se estimula la liberación de calcio, en concentraciones de 100-300 μM , se inhibe la liberación de calcio y a concentraciones de 10 μM , se genera un estado de subconductancia en el canal (Coronado et al, 1994).

II. PANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los procesos celulares y moleculares que utilizan las neuronas del NSQ para la transmisión de la señal generada por los genes reloj, han sido poco estudiados. En este trabajo, se plantea que uno de los elementos, que podrían estar participando en la transmisión de la señal en la vía de señalización de las neuronas del NSQ, son los receptores a ryanodina al modificar la dinámica del calcio intracelular, en donde el calcio a su vez estaría alterando la excitabilidad membranal, para la expresión del ritmo circádico en la conducta.

Este elemento sería el primero de una cascada de eventos involucrados en transmitir al organismo las señales de tiempo generadas por el NSQ. Es a partir de estas señales como se programan los diferentes procesos fisiológicos para lograr la organización temporal en el individuo.

Este trabajo se planteó con el fin de estudiar si la manipulación farmacológica de los receptores a ryanodina, altera de manera importante la expresión de los ritmos circádicos de la conducta de ingesta de agua y alimento de la rata.

III. HIPÓTESIS

Si los receptores a ryanodina, participan como un elemento en la vía de salida del reloj circádico, entonces las manipulaciones farmacológicas que se desarrollen sobre los receptores a ryanodina de las neuronas del NSQ, deberá modificar de manera transitoria, la expresión del ritmo circádico in vivo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos que tiene la manipulación farmacológica de los RYRs en la vía de salida de la ritmicidad intrínseca de las neuronas del núcleo supraquiasmático, sobre la expresión del ritmo circádico de la conducta.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de inhibir los potenciales de acción, mediante el tratamiento con tetrodotoxina en una concentración de 1 μM , sobre la expresión del ritmo circádico de la conducta.
2. Analizar el efecto de la excitación membranal, sin modificar la actividad de los RYRs, mediante el tratamiento de LCR en concentraciones de potasio a 20 mM, sobre el ritmo circádico de la conducta.
3. Estudiar el efecto de la estimulación de los RYRs, mediante el tratamiento con ryanodina (0.1 μM), en la expresión del ritmo circádico de la conducta.
4. Determinar el efecto de la activación del estado de subconductancia de los canales de calcio de los RYRs, con el tratamiento de ryanodina (10 μM), en la expresión del ritmo circádico de la conducta.

5. Observar el efecto del bloqueo de los RYRs, mediante el tratamiento continuo y crónico con ryanodina (100 μ M), sobre la expresión del ritmo circádico de la conducta.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Experimento 1

En este experimento el protocolo que se siguió fue el siguiente: Primero se les implantaron las cánulas guía a los animales, posteriormente se introdujeron los animales a registro, después de quince días de registro basal se anestesiaron con éter para introducirles la bomba miniosmótica y colocarles el inyector. Por último se dejaron 30 días más de registro para determinar el efecto de la solución durante la administración (catorce días de infusión) y el efecto después de la administración de la solución (quince días).

Animales. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso inicial de 180 g. Primero se acondicionaron una semana a un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (la luz se prendía a las 6:00 hrs con 400 lux.), posteriormente cada individuo se introdujo en una caja de plástico transparente (50x30x35 cm) con agua y alimento *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en un cuarto sonoamortiguado a una temperatura de $22 \pm 1^\circ$ C, con luz roja constante a 20 lux.

Construcción e implantación de la cánula. Antes de introducir a los animales al registro se les implantó la cánula. Las cánulas guías se elaboraron con agujas del

número 21, la longitud de la cánula fue de ~10 mm y redondeadas en la punta. El inyector se adquirió de las agujas del número 25, con una longitud de ~20 mm y redondeados en la punta. La cánula se insertó en la primera cirugía y se le colocó un mandril de ~12 mm de longitud en el interior, para evitar que la cánula se tapaná y se presentará una infección. El mandril se elaboró con varilla dental del número 25. La inserción de la cánula fue en un ángulo de 90° y 3 mm arriba del núcleo supraquiasmático.

Para la implantación de la cánula, los animales se anestesiaron con hidrato de cloral con una dosis de 400 mg/kg. Las ratas se colocaron en un aparato estereotáxico y se tomaron las coordenadas 2 mm sobre el NSQ, de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998): anteroposterior (AP) + 0.6 mm, lateral (L) 0.0 mm y vertical (V) - 6 mm del cráneo, la barra de los incisivos se colocó en 0. Se hizo el trépano sobre la coordenada correspondiente y se introdujo la cánula hasta la coordenada V. La cánula se fijó con cemento dental al cráneo con cuatro tornillos de acero inoxidable. La cánula guía, sirvió para introducir un inyector conectado a la bomba miniosmótica, por la cual se administró diferentes fármacos (LCR, ryanodina, tetrodotoxina). A los animales se les dio un tiempo de recuperación de dos a tres días, posteriormente se inicio el registro de ingesta de agua durante quince a veinte días (registro basal).

Preparación y colocación de la bomba miniosmótica. Después de los 15-20 días de registro basal, a los animales que expresaron un ritmo circádico con un periodo mayor a las veinticuatro horas, se les implantó la bomba miniosmótica Alzet modelo 2002 (Alza, Palo Alto, CA). La bomba se conectó a la cánula, a través de un tubo de

polyetileno (Tygon microbore tubing ID 0.020 “, wall 0.020”, OD 0.060”), un extremo del tubo se insertó en la bomba, y el otro extremo se conectó al inyector que pasó por la cánula guía y llegó al NSQ. La bomba, el tubo y el inyector se llenaron con líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) que contenía: NaCl 140 mM, KCl 3.5 mM, CaCl₂ 1.3 mM, MgCl₂ 1 mM y buffer Hepes 5 mM a un pH 7.2-7.3. Veinticuatro horas antes de la implantación se prepararon las bombas miniosmóticas con el tubo, y se sumergieron en solución salina al 0.9% en una temperatura de 37°C.

Para la colocación de la bomba, los animales se anestesiaron con eter, se les hizo una pequeña apertura en la piel a nivel de la escápula, la bomba se implantó de forma subcutánea. El tubo de polyetileno que conectó a la bomba con la cánula, se pasó por debajo de la piel del animal y por medio de inyector de acero se insertó a la cánula guía hacia el NSQ. El inyector se fijó a la cánula con pegamento Kola-loca y se cubrió con un capuchón, elaborado con tubos eppendorff, esto para evitar que el animal se quitará el tubo con el inyector. La administración de la solución fue de 200 µl durante 14 días a una velocidad de 0.5 µl/hr. Después de los 14 días, se dejó a los animales otros 20 días más de registro.

Medición de la actividad de ingesta de agua. Para el registro de la ingesta de agua, a las cajas se les colocó una placa de aluminio en el piso, por encima de la placa se le instaló una botella con agua y un bebedero de acero inoxidable cubierto con un tubo de plástico que sobresalía 2 mm, que permitió detectar el instante en que el sujeto tomará agua. La placa y el bebedero se conectaron a un sensor, cada vez que la rata tocaba el bebedero generaba una señal eléctrica que era detectada y recolectada en un concentrador conectado a un sistema de adquisición de datos

automatizado (SiMC, IFC/UNAM). La señal detectada en el bebedero incrementa un contador de eventos, que almacena la frecuencia de eventos en intervalos de 15 min.

Para determinar el periodo circádico se pueden utilizar diversos análisis matemáticos: Cosinor, Periodograma, Demodulación compleja, densidad espectral (Enright, 1981; Vega, 1993). Para este trabajo el periodo se determinó por el **periodograma de χ^2** (Apéndice A).

Los registros obtenidos en este trabajo se graficaron en actogramas de Double-Plot. El **Actograma** es una de las formas más comunes de representar un registro de actividad (en tiempo). Se usa para examinar tanto datos de actividad (α) como de inactividad (ρ), también se puede observar el periodo y la fase de la señal. El Actograma consiste en el ordenamiento consecutivo de gráficas de ocurrencia de eventos. La gráfica en **Doble-Plot** es una técnica que parte del actograma y consiste en que a partir de una captura de datos, efectuada durante un periodo P a intervalos constantes, se agrupan los datos en n subintervalos y se escalan para construir una gráfica de n barras, donde n es un número de intervalos definidos en P. Para observar mejor la ritmicidad se repite al lado izquierdo la misma gráfica, pero recorrida un periodo, sobre la escala de las ordenadas, de esta forma se observa que si la ritmicidad corresponde al periodo P seleccionado, se obtendrá una gráfica sin desfaseamiento, o bien si la ritmicidad es mayor que el periodo propuesto, la gráfica presentará una pendiente negativa, mientras que si es menor presentará una pendiente positiva. De esta forma es posible apreciar el periodo y fase del fenómeno en estudio (Enright, 1981; Vega, 1993).

Histología. Al terminar el experimento se sacrificaron los animales con una sobredosis de anestésico pentobarbital, los sujetos fueron perfundidos por vía transcardiaca con solución salina al 0.9 % seguida de formalina al 10 %. Se extrajo el cerebro y se dejó en formalina durante 1 h, posteriormente se pasó a sacarosa al 10% durante 24 h. Después se colocó en sacarosa al 20% durante 48 h. Por último, el cerebro se pasó a sacarosa al 30% durante 48 h. El cerebro se cortó en un criostato en cortes coronarios de 40 μm , y fueron teñidos con violeta de cresilo para determinar la localización de la cánula.

2. Experimento 2

Como se observaron cambios en el grupo control con el protocolo del experimento 1, se decidió cambiar de protocolo, además el laboratorio cambio de Sistema de registro. También se hicieron prueba sobre el efecto del éter y el pentobarbital en diferentes horas circádicas. En este experimento 2 los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico y se siguió el siguiente protocolo: Primero se introdujeron a registro los organismos para obtener la basal de quince días, después en una sola cirugía se les implanto el inyector (sin cánula guía) y la bomba miniosmótica. Y por último se dejaron treinta y cinco días más para el registro durante y después de la infusión de la solución.

Animales. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso inicial de 180 g. Primero se acondicionaron una semana a un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (la luz se prendía a las 6:00 hrs con 400 lux.), posteriormente cada individuo se introdujo en una caja con agua y alimento *ad libitum*. Las cajas se colocaron en habitaciones

cerradas, en oscuridad constante y se mantuvieron en un cuarto sonoamortiguado a una temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, con luz roja a 50 lux. Se registró la conducta de ingesta de agua y alimento, y al quinceavo día de que se presentará un registro constante de la conducta, se procedió a la implantación de la cánula.

Implantación de la cánula. Se utilizaron cánulas guía 26GA 5 mm de la marca plastic-one. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico con una dosis de 30 mg/kg. Las ratas se colocaron en un aparato estereotáxico, la cánula se colocó en un ángulo de 90° , en el NSQ y se tomaron las siguientes coordenadas de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998): anteroposterior (AP) + 0.4 mm, lateral (L) 0.0 mm y vertical (V) - 8.5 mm del cráneo, la barra de los incisivos se colocó en 0. Se hizo el trépano sobre la coordenada correspondiente y se introdujo la cánula hasta la coordenada V. La cánula se fijó con cemento dental al cráneo con cuatro tornillos de acero inoxidable. La cánula guía se conectó directamente a la bomba miniosmótica, por la cual se administró las diferentes soluciones (LCR, ryanodina, tetrodotoxina, ALTO K).

Preparación y colocación de la bomba miniosmótica. Una vez fija la cánula se implantó la bomba miniosmótica Alzet modelo 2002 (Alza, Palo Alto, CA), de forma subcutánea sobre la escápula izquierda. La bomba se conectó a la cánula, a través de un tubo de polietileno (Tygon microbore tubing ID 0.020 “, wall 0.020”, OD 0.060”), un extremo del tubo se insertó en la bomba pegándolo con kola-loca, y el otro extremo se conectó a la cánula guía. La bomba, el tubo y la cánula se llenaron con: tetrodotoxina ($1 \mu\text{M}$); ryanodina (100, 1 ó $0.1 \mu\text{M}$), líquido cefalorraquídeo artificial (LCR - NaCl 140 mM, KCl 3.5 mM, CaCl_2 1.3 mM, MgCl_2 1 mM y buffer

Hepes 5 mM a un pH 7.2-7.3) o alto potasio (ALTO K - NaCl 120 mM, KCl 20 mM, CaCl₂ 1.3 mM, MgCl₂ 1 mM y buffer Hepes 5 mM a un pH 7.2-7.3). Veinticuatro horas antes de la implantación se prepararon las bombas miniosmóticas con el tubo para su activación, y se sumergieron en solución salina al 0.9% en una temperatura de 37°C.

La administración de la solución fue de 200 µl durante 14 días a una velocidad de 0.5 µl/hr. Después de los 14 días, se dejó a los animales otros 15 - 20 días más de registro.

Medición de la actividad de ingesta de agua y alimento. Los animales se colocaron en cajas de acrílico transparentes de 50X50X35 cm., donde se monitoreo la ingesta de agua y alimento de manera continua. El piso de la caja era una placa de aluminio conectado a tierra y la botella de agua estaba conectada a un sensor, cuando la rata tocaba al bebedero cerraba el circuito y generaba una señal eléctrica que se colectaba en un sistema de computadora de adquisición de datos automatizado (Omni-Alva UNAM-lab. Cronobiología v 1.1). La señal era integrada en intervalos de 2 minutos. En la pared de la caja estaba unido un comedero con dos carriles de sensores, uno de cada lado del comedero, cada vez que la rata introducía la cabeza al comedero, se cerraba el circuito y mandaba una señal eléctrica al sistema de adquisición de datos. Los registros obtenidos se procesaron en el programa DISPAC, para la obtención de actogramas en Double-Plot.

Histología. Al terminar el experimento se sacrificaron los animales con una sobredosis de anestésico pentobarbital, los sujetos fueron perfundidos por vía

transcardiaca con solución salina al 0.9 % seguida de formalina al 10 %. Se extrajo el cerebro y se dejó en formalina durante 1 h, posteriormente se pasó a sacarosa al 10% durante 24 h. Después se colocó en sacarosa al 20% durante 48 h. Por último, el cerebro se pasó a sacarosa al 30% durante 48 h. El cerebro se cortó en un cryostato en cortes coronarios de 40 μm , y fueron teñidos con violeta de cresilo para determinar la localización de la cánula.

VII. DISEÑO EXPERIMENTAL

Experimento 1

El ritmo de ingestión de agua se registró en seis grupos, con diferentes tratamientos.

- 1) Grupo anestesiado con éter (ETER): A estos animales no se les introdujo la cánula sólo entraron a registro y se anestesiaron con éter en diferentes tiempos.
- 2) Grupo sin transfusión de líquido (SHAM): a este grupo se le implantó la cánula y posteriormente el inyector sin la transfusión de algún líquido.
- 3) Grupo control (LCR): Los animales fueron tratados con líquido cefalorraquídeo artificial a 37°C.
- 4) Grupo tratado con ryanodina en una concentración de 100 μM (RYA 100 μM).
- 5) Grupo tratado con ryanodina en una concentración de 0.1 μM (RYA 0.1 μM).
- 6) Grupo tratado con tetrodotoxina a una concentración de 1 μM (TTX).

Experimento 2

En el experimento 2, primero se anestesió a un grupo de animales que estaban en registro, en diferentes horas circádicas, para determinar si el pentobarbital sódico tendría un efecto en la expresión del ritmo circádico de la conducta de ingesta de agua.

El ritmo de la conducta de ingestión de agua y alimento se registró en los siguientes grupos:

- 1) Grupo control (LCR): Los animales fueron tratados con líquido cefalorraquídeo artificial. (n = 6)
- 2) Grupo tratado con tetrodotoxina a una concentración de 1 μM (TTX). (n = 4)
- 3) Grupo tratado con alto potasio (20 mM). (n = 7)
- 4) Grupo tratado con un fármaco facilitador del receptor: ryanodina 0.1 μM . (n = 5)
- 5) Grupo tratado con un fármaco que afecta la conductancia del canal del receptor: ryanodina 10 μM . (n = 5)
- 6) Grupo tratado con un fármaco bloqueador del receptor: ryanodina 100 μM . (n = 4)

En cada uno de ellos se tomó el registro de la conducta en tres segmentos: 10 - 15 días de registro basal, antes del tratamiento (**A**); 14 días de registro durante el tratamiento (**T**); 15 - 20 días de registro después del tratamiento (**D**). En cada uno de los segmentos se midió:

a) El periodo por el periodograma de χ^2 ,

b) Se determinó el cambio de fase ($\Delta\Phi$) de **A** a **T** ($\Delta\Phi_1$); de **T** a **D** ($\Delta\Phi_2$); y de **A** a **D** ($\Delta\Phi_3$).

El cambio de fase se determinó midiendo la diferencia entre las líneas ajustadas del periodo,

c) Se analizó la arquitectura del ritmo, el cual consiste en la duración de la actividad (α) y su estabilidad (varianza - $\sigma\alpha$), la duración de la inactividad (ρ) y su estabilidad (varianza - $\sigma\rho$).

Los parámetros se compararon entre los tres segmentos del registro (antes, durante y después del tratamiento) de un mismo grupo y entre los seis grupos, mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey post-hoc si se requería.

Los datos obtenidos en la conducta de ingesta de agua se sumaron a los de la ingesta de alimento, para obtener sólo un análisis.

VIII. RESULTADOS

Experimento 1.

Histología: En la mayoría de los animales se observó que el inyector se encontraba anterior al NSQ. De 26 animales, 4 tuvieron la cánula arriba del NSQ y 3 tenían daño en el NSQ.

Conducta: En la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos de los seis grupos experimentales.

GRUPOS	PERIODO (τ)			CAMBIO DE FASE ($\Delta\Phi$)		
	antes	durante	después	$\Delta\Phi_1$	$\Delta\Phi_2$	$\Delta\Phi_3$
ETER	25.01 \pm 0.08		25.1 \pm 0.06	0		
SHAM	24.8 \pm 0.11		24.7 \pm 0	-0.1 \pm 0.87		
LCR	24.7 \pm 0.09	24.5 \pm 0.12	24.8 \pm 0.08	-0.7 \pm 0.9	0	-0.7 \pm 0.9
TTX	24.42 \pm 0.14		24.7 \pm 0.29			4.8 \pm 3.4
RYA 100 μ M	24.7 \pm 0.12	24.4 \pm 0.07	24.6 \pm 0.12	-0.4 \pm 0.8	-1.1 \pm 0.71	-0.8 \pm 1.02
RYA 0.1 μ M	24.7 \pm 0.14	24.4 \pm 0.13	24.8 \pm 0.12	-0.7 \pm 0.45	-0.8 \pm 1.09	-1.5 \pm 1.5

Tabla 1. Resumen de los resultados obtenidos en cada uno de los grupos experimentales. El periodo se tomó por el periodograma de χ^2 (DISPAC). Periodo y cambio de fase medido en horas. Promedio \pm error estándar.

En ningún grupo experimental se percibieron cambios en el periodo (Gráfica 1), pero sí se registraron cambios de fase (Gráfica 2) en los grupos SHAM, LCR, TTX, RYA (0.1 y 100 μ M). Con el grupo SHAM se observaron retrasos de fase en la transición, antes y durante el tratamiento ($\Delta\Phi_1$), esto implica que la introducción del inyector posiblemente inducía una estimulación mecánica sobre el NSQ. En los grupos tratados con ryanodina a 0.1 y 100 μ M ocurrió un retraso de fase al término del tratamiento ($\Delta\Phi_2$) (figura 8).

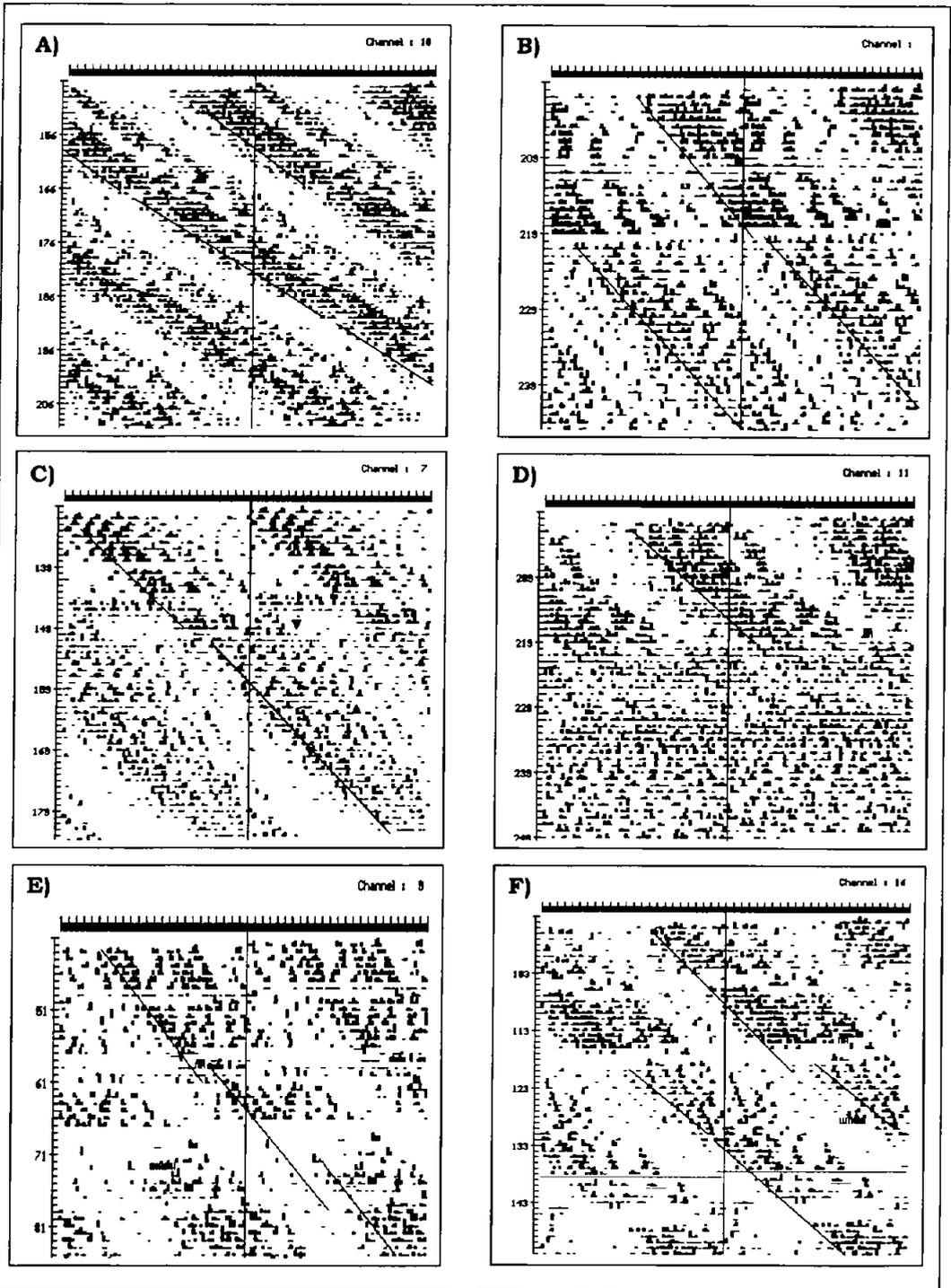
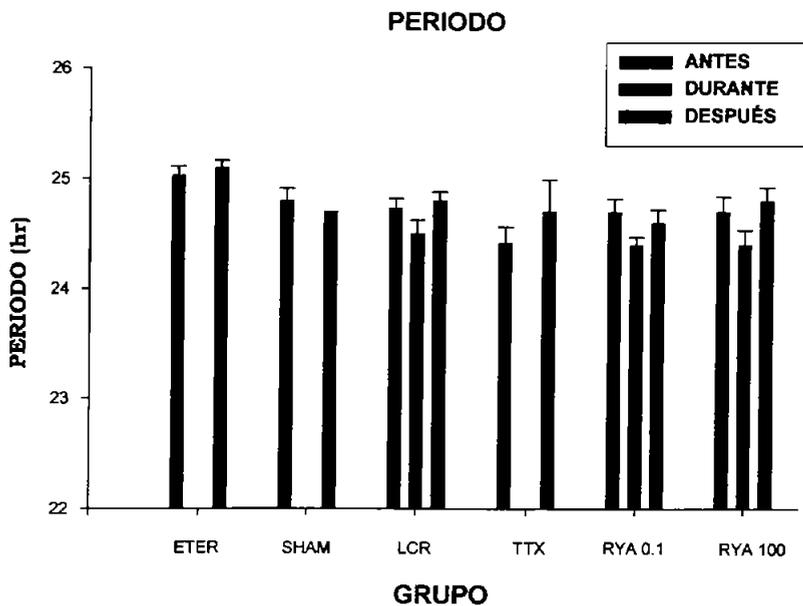
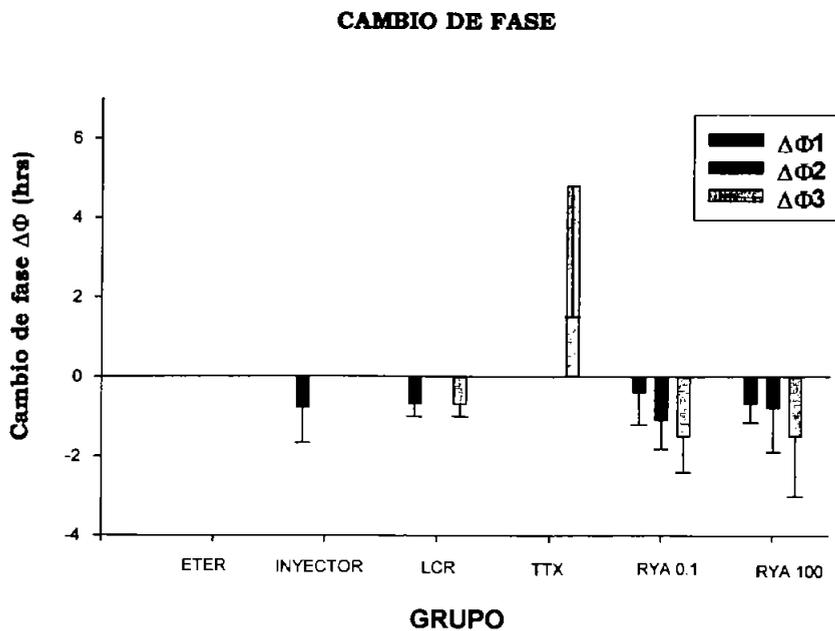


Figura 8. Actogramas del experimento 1. A)Grupo Éter, B)Grupo SHAM, C)Grupo LCR, D)Grupo de TTX, E)Grupo RYA 0.1 μM , F)Grupo RYA 100 μM . ▼ Inicio del tratamiento. ▲ Final del tratamiento.



Gráfica 1. Promedio del periodo de cada uno de los grupos del experimento 1.



Gráfica 2. Promedio de los cambios de fase de cada uno de los grupos del experimento 1.

Como se observaron cambios de fase por la implantación del inyector se cambio el método para la introducción de la cánula. También se cambió el hidrato de cloral por el pentobarbital, por lo que se probó el efecto del pentobarbital sobre el ritmo circádico de la conducta, a diferentes horas circádicas (figura 9)

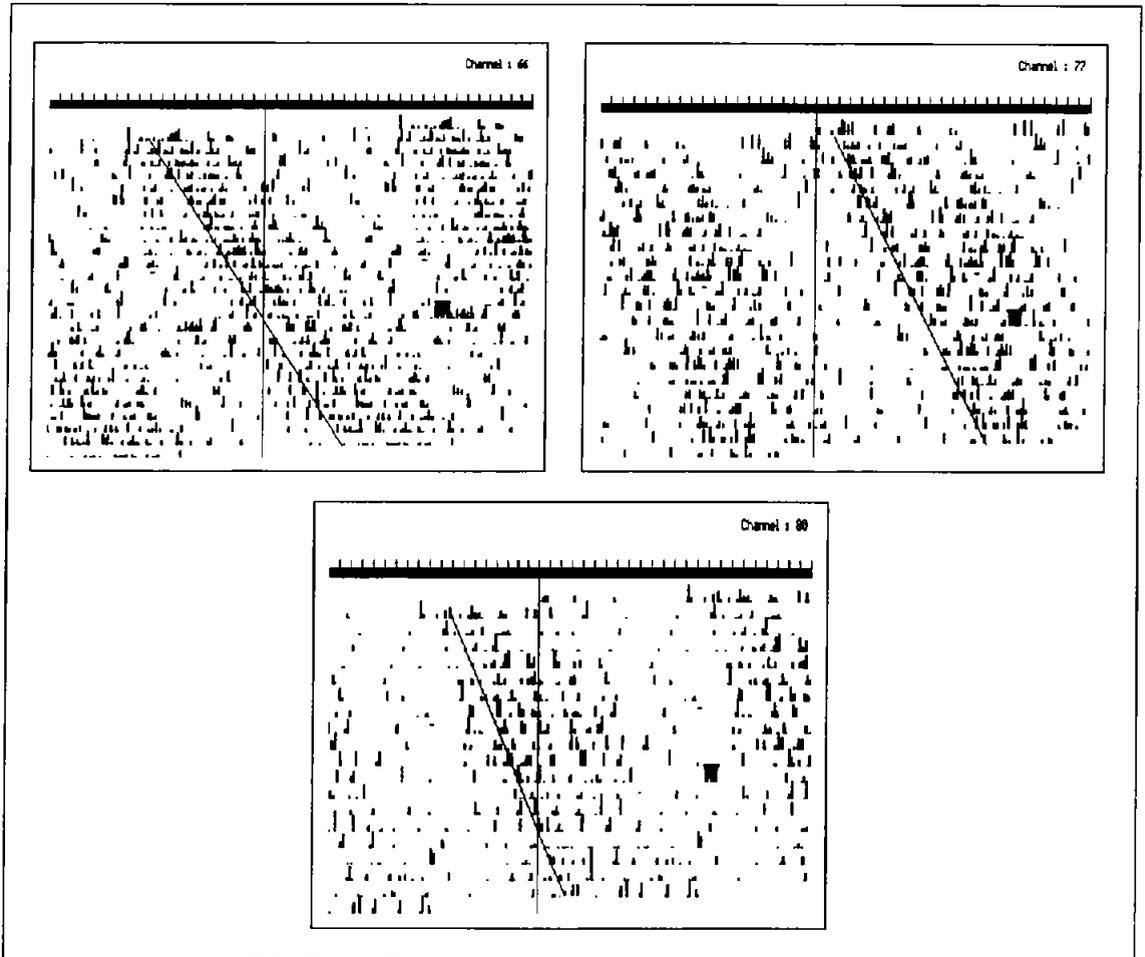


Figura 9. Actogramas del efecto del pentobarbital sódico sobre la conducta de ingesta de agua, en diferentes horas circádicas. ▼ Aplicación del anestésico.

Experimento 2.

Histología: De los 50 animales implantados, 26 tenían la punta del microinyector entre los núcleos supraquiasmáticos, 2 en la parte anterior de los núcleos, 2 en sólo un núcleo, 1 en la parte posterior de los núcleos y 29 sujetos tenían fuera la punta del microinyector de los núcleos supraquiasmáticos. Para el análisis de resultados, sólo se tomaron en cuenta los animales que presentaron la punta de la cánula en el NSQ (n = 31). En el siguiente esquema se representa las zonas donde se encontró la punta de las cánulas.

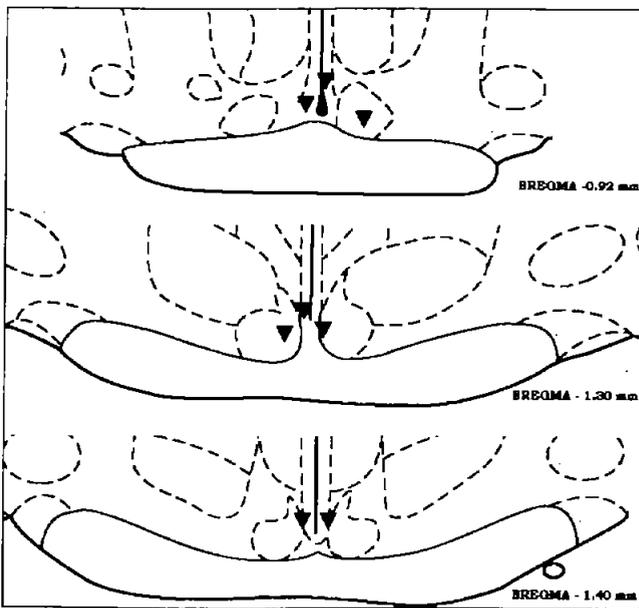


Figura 10. Representación en esquema de las zonas donde se encontró las puntas de las cánulas. Punta de la cánula ▼

Conducta: Todos los animales mostraron un ritmo circádico en libre corrimiento durante el registro basal. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una clara diferencia en la conducta del ritmo circádico durante la administración de las soluciones: TTX, alto potasio, ryanodina 0.1, 10 y 100 μM . En el grupo control de

líquido cefalorraquídeo se demuestra que no hay efecto en el ritmo circádico de la conducta, por la cirugía realizada en el animal para implantar la cánula y la bomba miniosmótica (figura 11). En las siguientes figuras (11, 12, 13, 14, 15 y 16) se representa en actogramas la suma del ritmo circádico de la conducta de ingesta de agua y alimento de la rata.

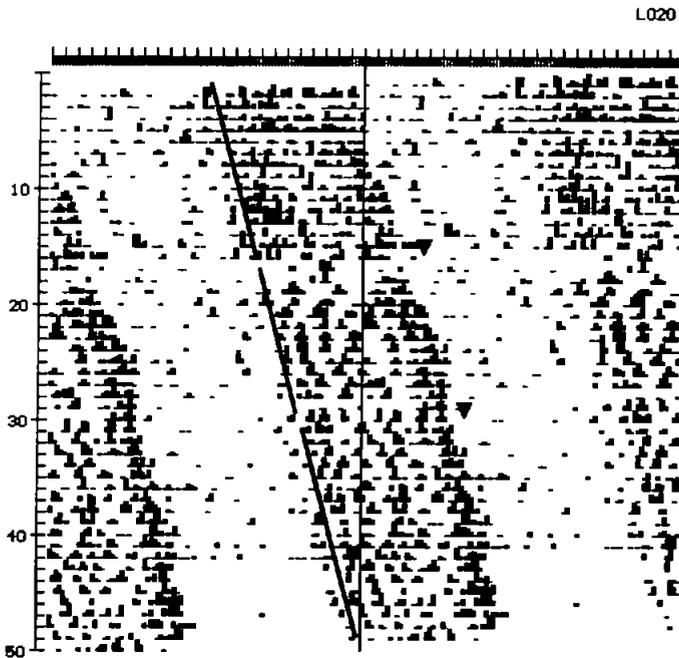


Figura 11. Actograma de un animal tratado con líquido cefalorraquídeo. Las flechas indican la aplicación y terminación del tratamiento.

Durante el tratamiento con TTX (figura. 12) se observó que el ritmo circádico de las conductas registradas se desorganiza, pero después de que finaliza el tratamiento, regresa el ritmo circádico con su periodo y fase en el que se encontraba antes de iniciar el tratamiento.

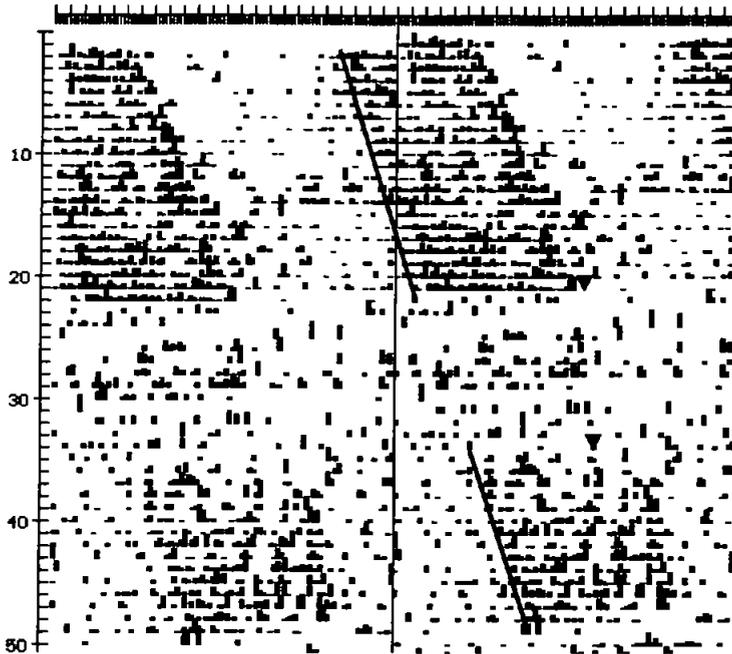


Figura 12. Actograma de un animal tratado con TTX ($1 \mu\text{M}$). Las flechas indican la aplicación y terminación del tratamiento.

Con el tratamiento de alto potasio (20 mM) los animales se observó un ligero acortamiento del periodo durante el tratamiento, en la mayoría de los casos no regresó el periodo a su estado basal (gráfica 3). Además se registró una disminución en el tiempo de actividad (α), durante y después del tratamiento (figura 13). En algunos casos ($n = 3$) se notó que en los últimos cinco días el periodo y tiempo de actividad eran parecidos a los cuantificados antes del tratamiento.

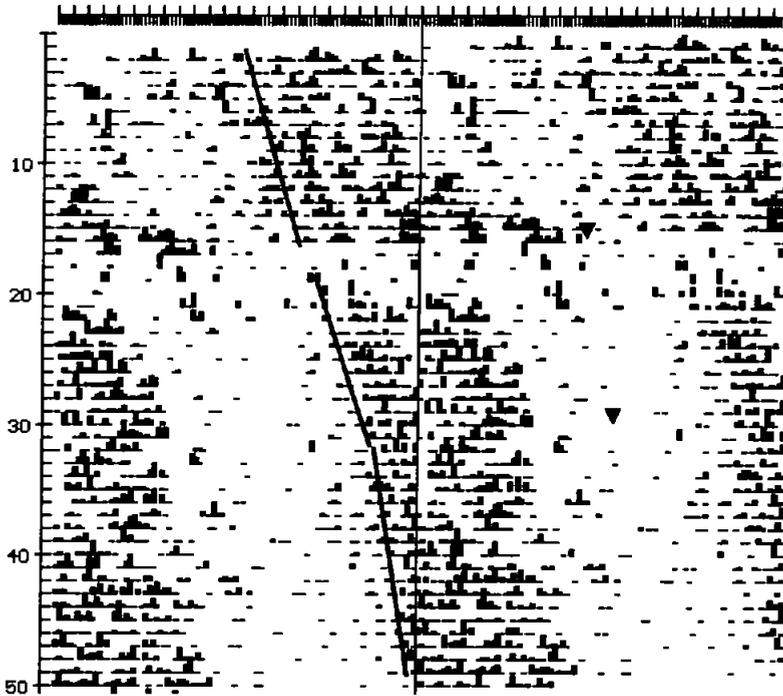


Figura 13. Actograma de un animal tratado con alto potasio (20 mM). Las flechas indican la aplicación y terminación del tratamiento.

La administración de la ryanodina a una concentración de $0.1 \mu\text{M}$ tiene efectos parecidos a la administración de TTX, se observó una tenue desorganización del ritmo durante la administración del fármaco, posteriormente se acorta el tiempo de la actividad (α) durante y después el tratamiento (figura 14).

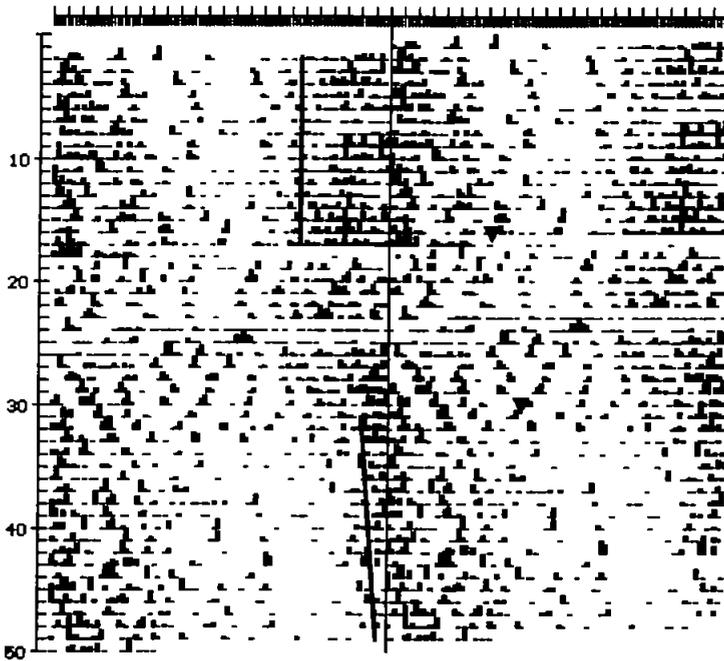


Figura 14. Actograma de un animal tratado con ryanodina ($0.1 \mu\text{M}$). Las flechas indican la aplicación y terminación del tratamiento.

En la figura 15 se muestra que cuando se altera la conductancia del canal intracelular de calcio con la ryanodina a $10 \mu\text{M}$, se fracciona la actividad en el ritmo circádico durante y después del tratamiento, pero tres días antes de que terminara el registro, se observó la agrupación de la actividad. En las gráficas no se observaron diferencias en cuanto a su periodo, cambio de fase y arquitectura del ritmo, pero es evidente en todos los sujetos tratados con ryanodina $10 \mu\text{M}$, que su ritmo circádico se fracciona en tres segmentos.

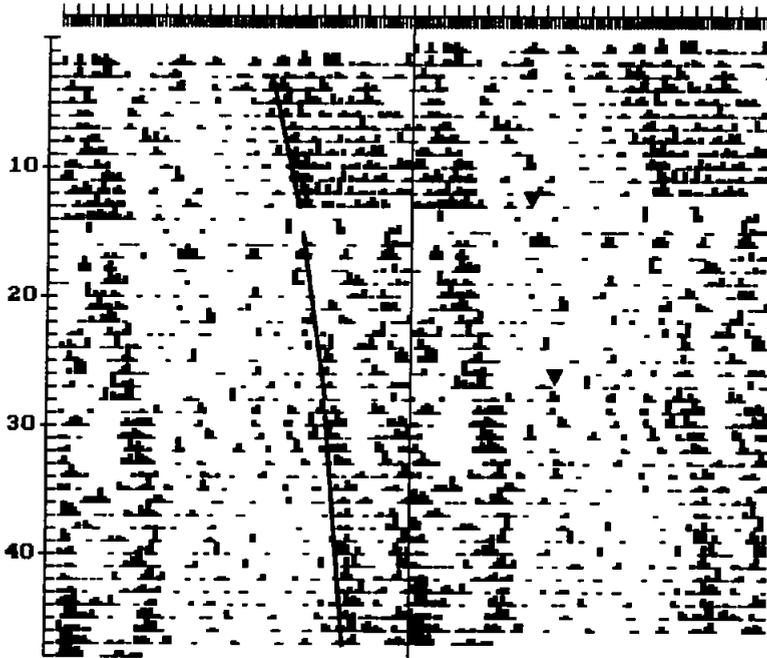


Figura 15. Actograma de un animal tratado con ryanodina ($10 \mu\text{M}$). Las flechas indican la aplicación y terminación del tratamiento.

El bloqueo del canal intracelular de calcio, por la administración de la ryanodina a una concentración de $100 \mu\text{M}$, ocasionó la dispersión de la actividad durante la infusión del fármaco. Al finalizar el tratamiento se observó un avance de fase y se volvió a conglomerar la actividad (figura 16).

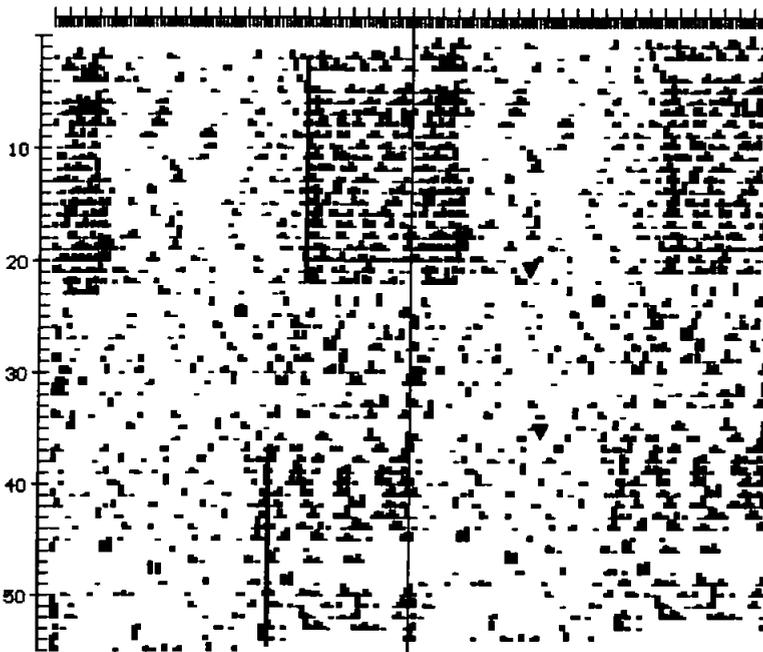
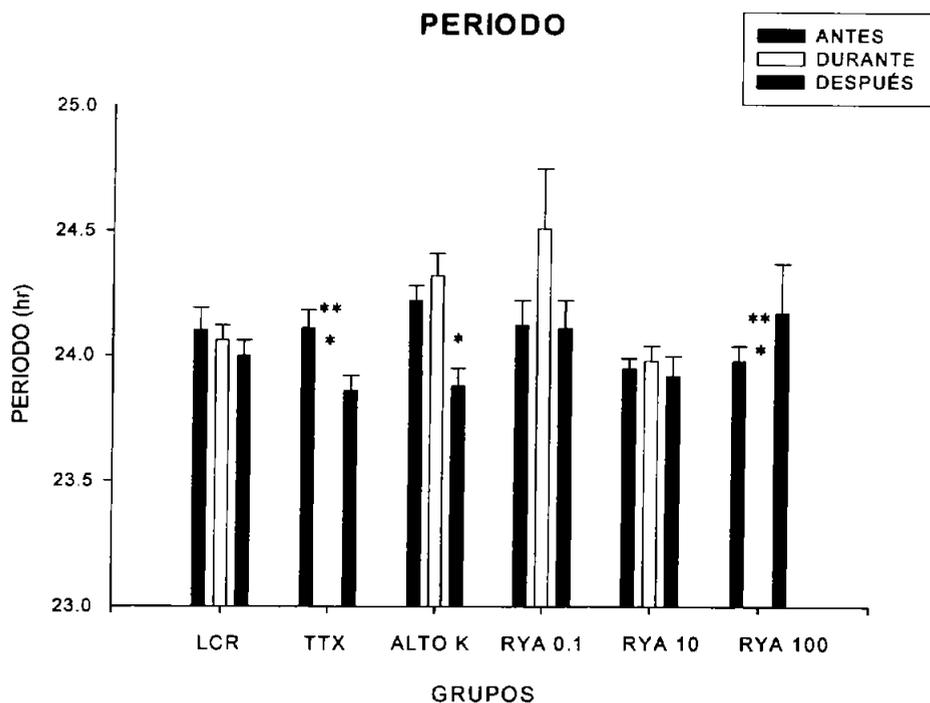


Figura 16. Actograma de un animal tratado con ryanodina (100 μM). Las flechas indican la aplicación y terminación del tratamiento.

En la siguiente tabla (2) se muestran los valores del periodograma de χ^2 y el cambio de fase en cada uno de los grupos experimentales: LCR (n = 5), TTX (n = 5), ALTO K (n = 5), RYA 0.1 μM (n = 5), RYA 10 μM (n = 5) y RYA 100 μM (n = 5). El periodograma de χ^2 no detectó el periodo en los grupos de TTX y RYA 100 μM , y en los grupos de TTX y ALTO K se detectó un acortamiento del periodo después del tratamiento

GRUPOS	PERIODOGRAMA χ^2			CAMBIO DE FASE		
	antes	durante	después	$\Delta\Phi_1$	$\Delta\Phi_2$	$\Delta\Phi_3$
LCR	24.10 \pm 0.09	24.06 \pm 0.06	24.00 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
TTX	24.11 \pm 0.07		23.86 \pm 0.06			0.19 \pm 0.19
ALTO K	24.22 \pm 0.06	24.32 \pm 0.09	23.88 \pm 0.07		0.00 \pm 0.00	-0.39 \pm 0.39
RYA 0.1 μM	24.12 \pm 0.10	24.51 \pm 0.24	24.11 \pm 0.11		-0.81 \pm 0.73	0.60 \pm 1.06
RYA 10 μM	23.95 \pm 0.04	23.98 \pm 0.04	23.92 \pm 0.08	0.00 \pm 0.00	-0.69 \pm 0.61	0.15 \pm 0.99
RYA 100 μM	23.98 \pm 0.06		24.17 \pm 0.20			4.00 \pm 0.80

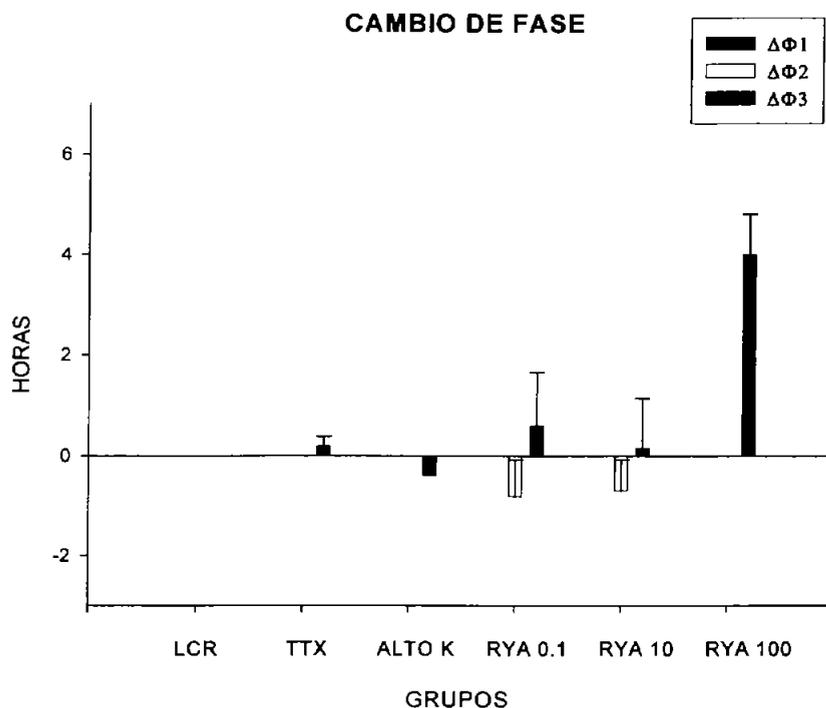
Tabla 2. Periodo y cambio de fase medido en horas. Promedio \pm error estándar.



Gráfica 3. Periodo obtenido por el periodograma de χ^2 , antes, durante y después del tratamiento en cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.05$ (entre A, T, D) ** $p < 0.05$ (entre los grupos)

En general se detectaron pequeños cambios de fase en todos los grupos, excepto en el de LCR, el mayor cambio de fase se observó en el grupo tratado con

RYA 100 μM , (4 ± 0.8 hrs), en los demás grupos sólo se vieron pequeñas variaciones no significativas (gráfica 4).



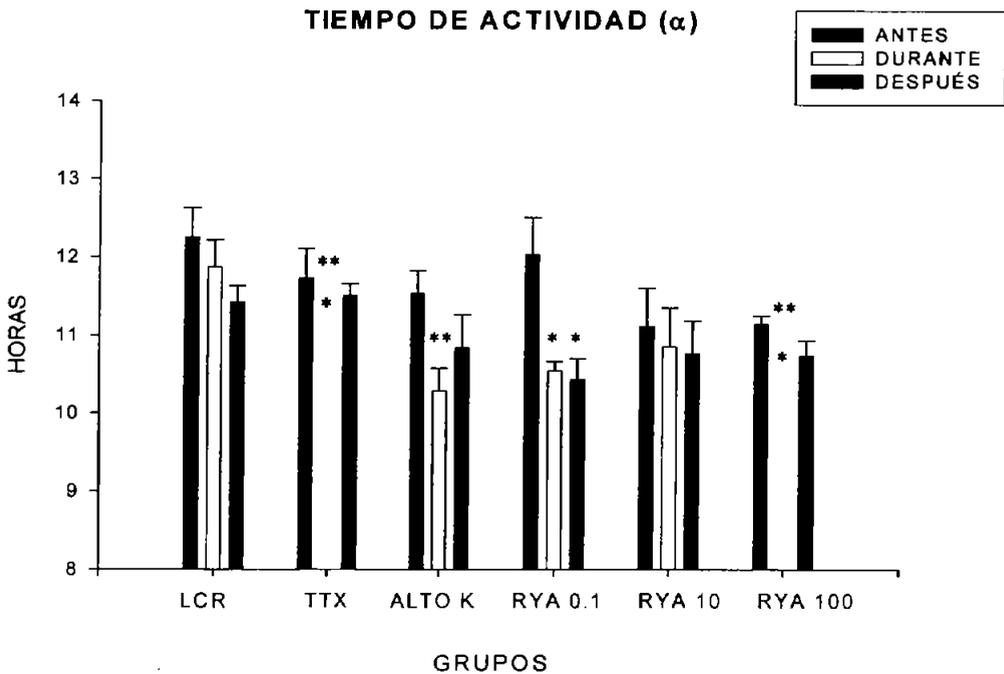
Gráfica 4. Promedio del cambio de fase entre las transiciones de antes, durante y después del tratamiento ($\Delta\Phi 1$, $\Delta\Phi 2$, $\Delta\Phi 3$) en cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.05$ (entre $\Delta\Phi 1$, $\Delta\Phi 2$, $\Delta\Phi 3$) ** $p < 0.05$ (entre los grupos)

En las tablas 3 y 4 se muestran los datos obtenidos de la arquitectura del ritmo en los tres segmentos de cada uno de los grupos experimentales. La duración de la actividad se vio afectada con los tratamientos de TTX, ALTO K y RYA 0.1 μM . Durante la administración de tetrodotoxina se dispersó la actividad, por lo que no se puede determinar la duración de la actividad; con la administración de ALTO K y

RYA 0.1 μM se acorto el tiempo de actividad, manteniéndose este efecto aún después del tratamiento (gráfica 5).

ARQUITECTURA DEL RITMO						
GRUPOS	TIEMPO DE ACTIVIDAD (α)			VARIANZA ($\sigma\alpha$)		
	antes	durante	después	antes	durante	después
LCR	12.25 \pm 0.37	11.87 \pm 0.34	11.42 \pm 0.21	0.64 \pm 0.09	0.89 \pm 0.39	1.36 \pm 0.86
TTX	11.73 \pm 0.37		11.51 \pm 0.15	0.49 \pm 0.18		0.40 \pm 0.10
ALTO K	11.54 \pm 0.28	10.28 \pm 0.24	10.84 \pm 0.42	0.90 \pm 0.35	0.97 \pm 0.39	1.13 \pm 0.37
RYA 0.1 μM	12.03 \pm 0.47	10.54 \pm 0.11	10.43 \pm 0.27	0.57 \pm 0.19	0.88 \pm 0.30	0.52 \pm 0.20
RYA 10 μM	11.11 \pm 0.49	10.85 \pm 0.44	10.76 \pm 0.42	0.34 \pm 0.07	2.58 \pm 1.88	0.29 \pm 0.08
RYA 100 μM	11.14 \pm 0.10		10.73 \pm 0.18	1.26 \pm 0.47		0.87 \pm 0.37

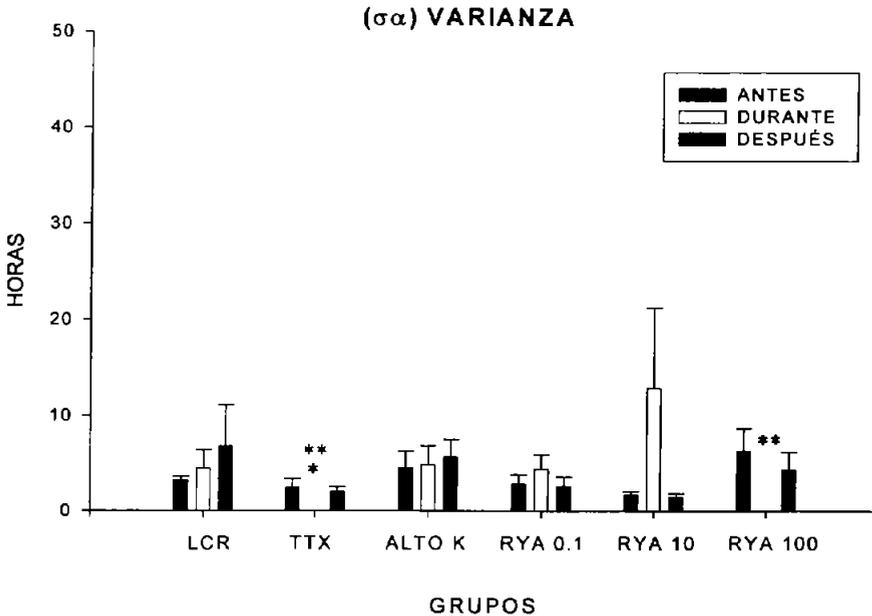
Tabla 3. Duración de la actividad y su varianza en horas. Promedio \pm error estándar.



Gráfica 5. Duración de la actividad (α) en cada uno de los grupos experimentales.

* $p < 0.05$ (entre A, T, D) ** $p < 0.05$ (entre los grupos)

La varianza de la actividad ($\sigma\alpha$) indica la variación del tiempo de la actividad que hay entre los días promediados. En este parámetro sólo se observó un incremento de la variación en el grupo de RYA 10 μM durante el tratamiento (gráfica 6).



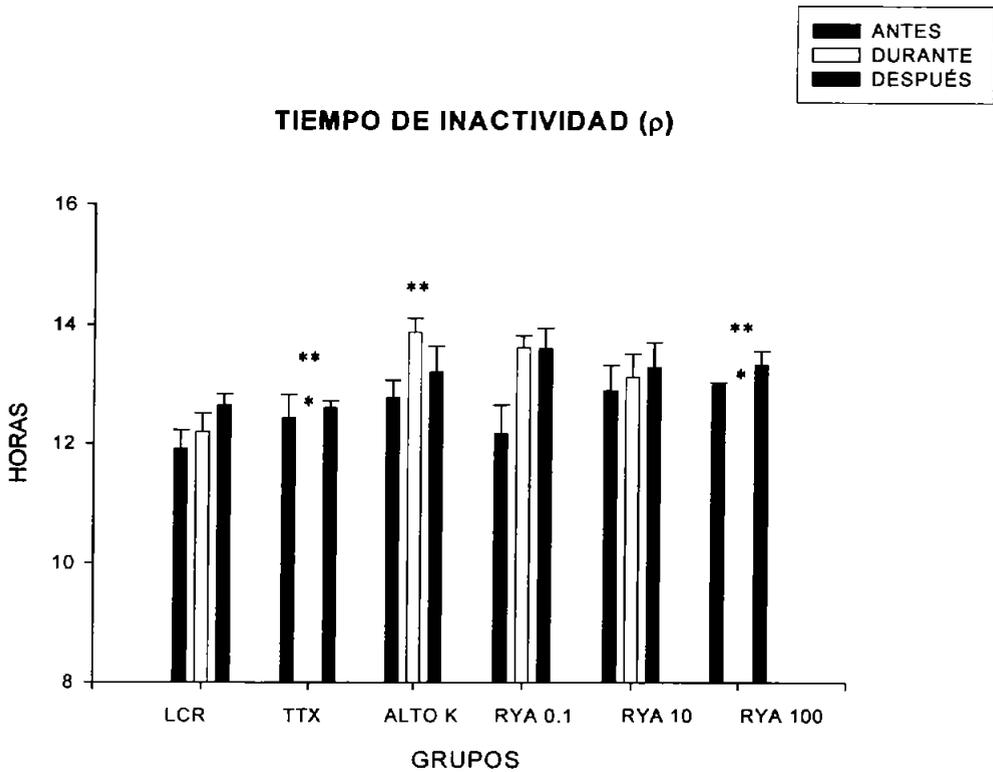
Gráfica 6. Variación de la actividad ($\sigma\alpha$) en cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.05$ (entre A, T, D) ** $p < 0.05$ (entre los grupos)

En el tiempo de inactividad no se obtuvieron cambios, excepto en el grupo de TTX durante el tratamiento, donde no se podía determinar ese parámetro (gráfica 7). La varianza de la inactividad sólo se vio afectada en el grupo de RYA 10 μM durante el tratamiento y se observa mucha variación en la basal del grupo de RYA 0.1 μM (gráfica 8).

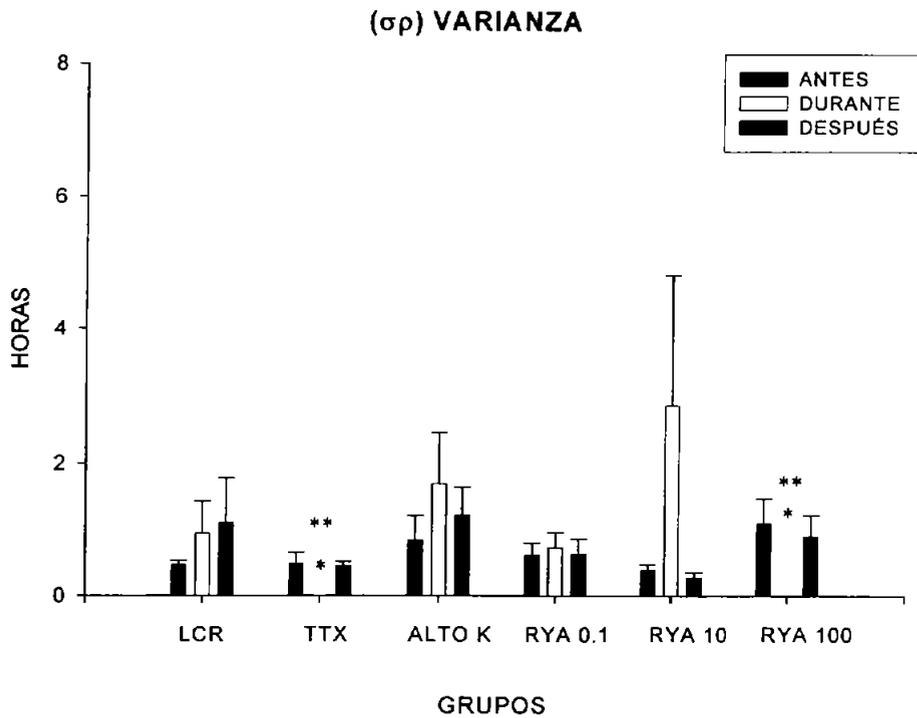
ARQUITECTURA DEL RITMO

	TIEMPO DE INACTIVIDAD (ρ)			VARIANZA ($\sigma\rho$)		
	antes	durante	después	antes	durante	después
LCR	11.92 ± 0.31	12.20 ± 0.31	12.65 ± 0.19	0.47 ± 0.06	0.95 ± 0.48	1.11 ± 0.67
TTX	12.44 ± 0.39		12.61 ± 0.11	0.49 ± 0.16		0.45 ± 0.06
ALTO K	12.78 ± 0.29	13.88 ± 0.23	13.21 ± 0.44	0.84 ± 0.37	1.69 ± 0.76	1.22 ± 0.42
RYA 0.1 μM	12.17 ± 0.48	13.63 ± 0.19	13.61 ± 0.34	0.62 ± 0.18	0.73 ± 0.23	0.63 ± 0.23
RYA 10 μM	12.90 ± 0.42	13.12 ± 0.40	13.29 ± 0.42	0.39 ± 0.09	2.86 ± 1.95	0.28 ± 0.08
RYA 100 μM	12.99 ± 0.04		13.33 ± 0.23	1.10 ± 0.37		0.90 ± 0.32

Tabla 4. Duración de la inactividad y su varianza en horas. Promedio \pm error estándar.



Gráfica 7. Duración de la inactividad (ρ) en cada uno de los grupos experimentales.
 * $p < 0.05$ (entre A, T, D) ** $p < 0.05$ (entre los grupos)



Gráfica 8. Variación de la inactividad ($\sigma\rho$) en cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.05$ (entre A, T, D) ** $p < 0.05$ (entre los grupos)

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de este trabajo muestran que la manipulación farmacológica de los receptores a ryanodina y la alteración de la excitabilidad membranal con un bloqueador de los canales de sodio (TTX) y un despolarizador de la membrana (ALTO K), modifican de manera evidente la expresión del ritmo circádico de la conducta. En algunos casos esta alteración es de manera transitoria (TTX, RYA 0.1 μM y RYA 10 μM), días después de finalizado el tratamiento regresa el ritmo circádico a su condición anterior a la manipulación. En otros casos el efecto del fármaco (ALTO K y RYA 100 μM) permanece aún después de varios días de lavado, no se puede concluir que el efecto es permanente porque sólo se tomaron 15-20 días después del termino del tratamiento, se tendría que tomar más días (al menos 30) para determinar si el efecto es permanente.

En el trabajo de Schwartz y colaboradores (1987) se determinó que los potenciales de acción de las neuronas del NSQ constituían un elemento que participa tanto en la vía de entrada como en la vía de salida del reloj circádico. se utilizó un protocolo similar al reportado por Schwartz, a los sujetos se les implantó una cánula en el núcleo supraquiasmático y se les prefundió TTX de manera crónica durante 14 días. Como se observo en la figura 12, la administración de la TTX interrumpe el ritmo circádico de la conducta, si no hay potenciales de acción las células no pueden expresar un ritmo circádico en la conducta, Schwartz le llamó a los potenciales de acción: manecillas del reloj.

Además de la tetrodotoxina que inhibe los potenciales de acción, se utilizó una solución con alto potasio para despolarizar la membrana. La administración de alto potasio a las células del núcleo supraquiasmático ocasionó un acortamiento del periodo durante y después de su administración, una reducción del tiempo de actividad y también se observa un retraso de fase dos días después de implantada la bomba, no se puede asegurar si este cambio de fase se dio inmediato a la implantación o por el cambio de periodo, ya que todos los animales implantados con cualquier solución no presentaban registro dos días después de la operación, posiblemente debido a que la infusión afectó algunas fibras neuronales cercanas al tercer ventrículo anteroventral que regulan la sed (Anderson y Rundgren, 1982) o simplemente por los efectos de la cirugía.

El incremento en la excitabilidad membranal por la aplicación de ALTO K de forma crónica, acorta el periodo del día, lo cual es un indicativo de que el día del reloj es más corto, es decir, el reloj avanza más rápido, no sabemos si se trata sólo del mecanismo de salida de la célula o si se afectó a la maquinaria del reloj (mecanismo de transcripción-traducción), o se tarda en recuperar la célula del tratamiento crónico. Al parecer en los actogramas y en la gráfica (figura 13 y gráfica 3) el periodo se queda corto aún después del tratamiento con ALTO K, pero se necesitarían más días (al menos otros 15) para determinar si el periodo regresa a sus valores anteriores al tratamiento o si el efecto fue permanente.

Como se mencionó en los antecedentes, el calcio intracelular participa en muchos procesos celulares, como son: metabolismo, liberación de neurotransmisores, potencial membranal, etc., además del calcio (Colwell, 2000),

estas funciones celulares presentan un ritmo circádico en las neuronas del NSQ, estudios anteriores han propuesto que la dinámica del calcio intracelular participa en la modulación de estos cambios rítmicos (Díaz-Muñoz y colab. 1999; Ikeda et al, 2003). De los diversos mecanismo que se encargan de regular la dinámica del calcio intracelular, se ha reportado que los canales intracelulares sensibles a la ryanodina, que liberan calcio al citosol, se expresan de manera circádica sólo en las neuronas del NSQ (Díaz-Muñoz et al, 1999). En los resultados de este trabajo se encontraron cuatro efectos principales por la manipulación farmacológica de los receptores a ryanodina: 1)Desorganización del ritmo (condición arrítmica), 2)Fragmentación del ritmo 3)Acortamiento del periodo y, 4)Acortamiento del tiempo de actividad. Inhibir la liberación de calcio, ocasiona una condición arrítmica en la conducta de los sujetos (figura 16), esto podría deberse a que el bloqueo continuo en la liberación de calcio interrumpe la condición rítmica de la concentración calcio intracelular. Se ha reportado que la alteración de calcio intracelular altera la actividad eléctrica de las neuronas del NSQ (Díaz-Muñoz et al, 1999; Ikeda et al, 2003), por lo que se puede deducir que la alteración del ritmo de la concentración de calcio intracelular modifica la actividad eléctrica de las neuronas del NSQ.

La fragmentación del ritmo que se observó al administrar la ryanodina en una concentración de 10 μ M, nos indica que hay un desacoplamiento entre las neuronas. Estudios que se han realizado sobre el desacople entre osciladores en ratones, muestran una bipartición del ritmo denominado “splitting”, el cual es una evidencia de osciladores múltiples circádicos (Watanabe et al, 2003). La desorganización eléctrica de las células del NSQ podría estar provocando que se desfasen las neuronas entre sí. El grupo de Schwartz (2000) registró dos picos de

actividad electrofisiológica (alrededor de 4 hr) en cultivo de rebanadas de hamster que contenían al NSQ, esta conducta rítmica en splitting no es un reflejo de los genes reloj (Watanabe et al, 2003).

La liberación rítmica del calcio intracelular proporcionada por los receptores a ryanodina podrían modular de manera directa o indirecta los canales de potasio activados por calcio en las neuronas del NSQ (Walsh et al, 1995). De manera indirecta el calcio se puede unir a la calmodulina para activar de forma rítmica las proteínas kinasas que fosforilan canales iónicos voltaje dependientes como es el caso de los canales de calcio tipo L o canales de potasio, de esta manera modular la actividad eléctrica de las neuronas del NSQ.

Con los resultados de este trabajo se propone que los receptores a ryanodina, modulando el ritmo circádico de la dinámica de calcio intracelular, de alguna forma alteran la excitabilidad membranal de las neuronas del NSQ, al cambiar la actividad eléctrica neuronal se modifica la expresión del ritmo circádico de la conducta, tal vez, desacoplando a las células o desorganizando su ritmo en la frecuencia de disparo neuronal, pero sin alterar las propiedades intrínsecas del reloj (figura 13).

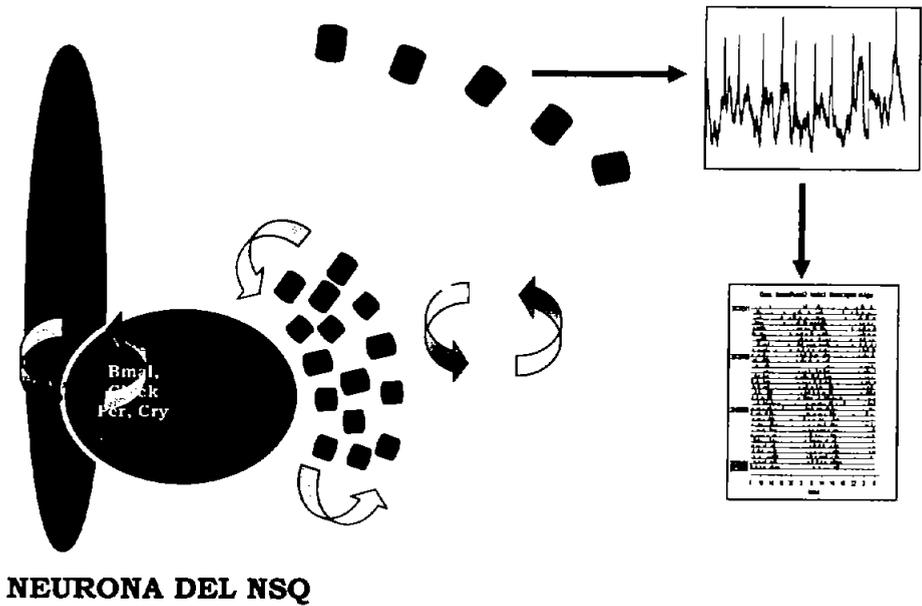


Figura 17. Modelo de la participación del receptor a ryanodina y dinámica del calcio intracelular en la expresión del ritmo circádico.

En nuestro laboratorio actualmente se está registrando el potencial de membrana, la frecuencia de disparo y los sinápticos para determinar específicamente la forma en cómo influye la manipulación farmacológica de los receptores a ryanodina en estos parámetros. A futuro también se planea determinar cuáles son los canales transmembranales que son modulados por el calcio para la expresión del ritmo circádico de las neuronas del núcleo supraquiasmático.

XI. CONCLUSIONES

- La perfusión de la solución *per se* en el organismo, no produce efectos sobre el ritmo circádico de la conducta.
- La eliminación de los potenciales de acción en las neuronas del núcleo supraquiasmático, por la administración crónica de la tetrodotoxina (1 μM), suprime la expresión del ritmo circádico de la conducta. Cuando se deja de administrar la TTX, el ritmo circádico aparece con el periodo y fase anterior a la administración del fármaco. Esto es un indicativo de que la maquinaria del reloj (el asa de retroalimentación transcripción-traducción) no se modificó.
- El incremento en la excitabilidad membranal con la administración crónica de alto potasio induce a un acortamiento del periodo y tiempo de actividad en el ritmo circádico de la conducta, lo que sugiere una aceleración en el reloj. Con estos resultados no se puede deducir si este efecto es sólo por la activación continua de los canales de la membrana plasmática o si hubo una modificación genética. En algunos animales el periodo retornó a su valor anterior a la administración del alto potasio y en otros se mantuvo el periodo con el valor que adquirió durante la administración.
- La inducción de la liberación de calcio por los canales intracelulares de calcio sensibles a la ryanodina, con la ryanodina a una concentración de 0.1 μM durante catorce días, tiene un efecto parecido al del alto potasio, un acortamiento del periodo

y una reducción en el tiempo de la actividad durante y el tratamiento. Este efecto apoya nuestra hipótesis de que la liberación del calcio intracelular al citosol por los receptores a ryanodina influyen sobre la excitabilidad membranal y ésta a su vez en la expresión del ritmo circádico de la conducta.

- La liberación continua calcio hacia el citosol, por la administración de la ryanodina en una concentración de 10 μM durante catorce días, no afectó el periodo y fase del ritmo durante su administración, pero sí provocó que la actividad se fraccionará en tres partes. Se sugiere que este fraccionamiento en el ritmo se deba a una desincronización de las neuronas del NSQ, como se observa en el “splitting”
- El bloqueo de los canales intracelulares de calcio con la administración crónica de ryanodina a una concentración de 100 μM provocó la desorganización del ritmo circádico, efecto que también se observó con la administración de TTX. Este resultado nos sugiere que el bloqueo en la liberación de calcio por los receptores a ryanodina afecta la inducción de los potenciales de acción, que a su vez bloquea la expresión del ritmo circádico de la conducta.
- Los resultados de este trabajo aportan más evidencias para probar la hipótesis de que los receptores a ryanodina modulando la dinámica del calcio intracelular son elementos que participan en la transmisión de la señal del oscilador (los genes reloj) a la membrana neuronal para la salida de la expresión del ritmo circádico.

XII. REFERENCIAS

- Aguilar-Roblero R.**, R. Drucker-Colín y R. Y. Moore. 1992. Behavioral and morphological studies of fetal neural transplants into SCN-lesioned rats. *Chronobiol Int* 9(4): 278-296.
- Aguilar-Roblero R.** 1993. Teorías básicas de los ritmos biológicos. *Psiquis* 6: 121-132.
- Aguilar-Roblero R.**, L. Verduzco-Carbajal, C. Rodríguez, J. Mendez-Franco, J. Morán y M. Pérez de la Mora. 1993. Circadian rhythmicity in the GABAergic system in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *Neurosci Lett* 157: 199-202.
- Aguilar-Roblero R.**, C. Mercado, P. Guadarrama y J. L. Chávez. 2004. Aspectos celulares y moleculares del núcleo supraquiasmático: El reloj circadiano del mamífero. En *Fisiología celular y molecular. Principios y conceptos*. M. E. Hernández y A. Ortega (Eds). Universidad Veracruzana, SMCF. Xalapa, Ver., México. Pág. 183-194.
- Aguilar-Roblero R.**, P. Guadarrama, C. Mercado y J. L. Chávez. 2004. El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. En *Temas selectos de neurociencias II*. J. Velázquez Moctezuma Coordinador. UAM. México, D. F. Pág. 321-329.

Akhtar R. A., A. B. Reddy, E. S. Maywood, J. D. Clayton, V. M. King, A. G. Smith, T. W. Gant, M. H. Hastings y C. P. Kyriacou. 2002. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Curr Biol* 12: 540-550.

Albers H. E. y C. F. Ferris. 1984. Neuropeptide Y: role in light-dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neurosci Lett* 50(1-3): 163-168.

Anderson B. y M. Rundgren. 1982. Thirst and its disorders. *Annu Rev Med* 33: 231-239.

Aronson B., D. Bell-Pedersen, G. Block, N. Bos, J. Dunlap, A. Eskin, N. Garceau, M. Geusz, K. Johnson, S. Khalsa, et al. 1993. Circadian rhythms. *Brain Res Rev* 18: 315-333.

Aschoff J. 1981a. A Survey on Biological Rhythms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York, USA. Pág. 3-8.

Aschoff J. 1981b. Freerunning and Entrained Circadian Rhythms. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York, USA. Pág. 81-92.

- Berridge M. J.**, M. D. Bootman y H. L. Roderick. 2003. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 4: 517-529.
- Berridge M. J.**, P. Lipp y M. D. Bootman. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1: 11-21.
- Block G. D.**, y D. G. McMahon. 1984. Cellular analysis of the Bulla ocular circadian pacemaker system. III. Localization of the circadian pacemaker. *J Comp Physiol A Sens Neural Physiol* 155: 387-395.
- Bünning, E.** 1960. Biological Clocks: Cold Spring Harvard Simposium on Quantitative Biology Vol. 25 The Biological Laboratory, New York. USA. Pág. 1-9.
- Cagampang F. R.** y S. T. Inouye. 1994. Diurnal and circadian changes of serotonin in the suprachiasmatic nuclei: regulation by light and an endogenous pacemaker. *Brain Res* 639(1): 175-179.
- Card J. P.**, N. Brecha, H. J. Karten y R. Y. Moore. 1981. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci* 1(11): 1289-1303.
- Card J. P.**, S. Fitzpatrick-McElligott, I. Gozes y Jr. Baldino. 1988. Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine-

and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res* 252: 307-315.

Castel M., M. Belenky, S. Cohen, O. P. Ottersen, J. Storm-Mathisen. 1993. Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 5(4): 368-81.

Cermakian N. y P. Sassone-Corsi. 2002. Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. *Curr Opinion Neurobiol* 12: 359-365.

Colwell C. S. 2000. Circadian modulation of calcium levels in cells in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 12: 571-576.

Coronado R., J. Morrissette, M. Sukhareva y D. Vaughan. 1994. Structure and function of ryanodine receptors. *Am Physiol Society* 266: C1485-C1504.

Decavel C. y A. Van den Pol. 1990. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol* 302: 1019-1037.

De la Iglesia H. O., J. Meyer, A. Jr. Carpino y W. J. Schwartz. 2000. Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* 290(5492): 799-801.

- Díaz-Muñoz M.**, A. R. Dent, D. Granados-Fuentes, A. C. Hall, A. Hernández-Cruz, M. E. Harrington y R. Aguilar-Roblero. 1999. Circadian modulation of the ryanodine receptor type 2 in the SCN of rodents. *NeuroReport* 10: 481-486.
- Ding J. M.**, G. F. Buchanan, S. A. Tischkau, D. Chen, L. Kuriashkina, L. E. Faiman, J. M. Alster, P. S. McPherson, K. P. Campbell y M. U. Gillette. 1998. A neuronal ryanodina receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature* 394: 381-384.
- Ding J. M.**, L. E. Faiman, W. J. Hurst, L. R. Kuriashkina y M. U. Guillete. 1997. Ressetting the biological clock: Mediation of nocturnal CREB phosphorylation via light, glutamate and nitric oxide. *J Neuroscience* 17: 667-675.
- Drucker-Colin R.**, R. Aguilar-Roblero, F. Garcia-Hernández, F. Fernández-Cancino, F. Bermudez Rattoni. 1984. Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Res* 311(2): 353-357.
- Duffield G. E.**, J. Best, B. Meurers, A. Bittner, J. Loros y J. Dunlap. 2002. Circadian programs of transcriptional activation, signaling and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol* 12: 551-557.
- Earnest D.** y D. Sladek. 1986. Circadian rhythms of vassopressin release from individual suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Res* 382: 129-133.

Enright J. T. 1981. Methodology. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York, USA. Pág. 11-20.

Fili M. y J. A. Copello. 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev* 82: 893-922.

Freedman M. S., R. J. Lucas, B. Soni, M. von Schantz, M. Muñoz, et al. 1999. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 284: 505-507.

Golombek D., G. Ferreyra, P. Agostino, A. Murad, M. Rubio, G. Picio, M. Katz, L. Marpegan y T. Bekinschtein. 2003. From light to genes: moving the hands of the circadian clock. *Front Biosc* 8: s285-293.

Granados D., A. Salazar, P. Vergara, J. Escandón, A. Vega y R. Aguilar-Roblero. 1995. Los ritmos circádicos en mamíferos: conceptos, implicaciones y bases biológicas. En: Temas selectos de neurociencias. J Velázquez (Ed.) UAM, México. Pág. 433-458.

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

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

Hardin P. 2000. From biological clock to biological rhythms. *Genome biology* 1(4): 1023.1-1023.5.

Hermes M, E. Coderre, R. Buijs y L. Renaud. 1996. GABA and glutamate mediate rapid neurotransmission from suprachiasmatic nucleus to hypothalamic paraventricular nucleus in rat. *J Physiol* 496: 749-757.

Honma S, M. Ikeda, H. Abe, Y. Tanahashi, M. Namihira, K. Honma y M. Nomura. 1998. Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 250(1): 83-87.

Huhman K. L., A. C. Hennessey y H. E. Albers. 1996. Rhythms of glutamic acid decarboxylase mRNA in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 11: 311-316.

Ikeda M., T. Sugiyama, C. S. Wallace, H. S. Gompf, T. Yoshioka, A. Miyawaki y C. N. Allen. 2003. Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca²⁺ in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* 38: 253-263.

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

- Inouye J.** y H. Kawamura. 1982. Characteristics of circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol* 146: 153-160.
- Jin X,** L. P. Shearman, D. Weaver, M. Zylka, G. de Vries y S. Reppert. 1999. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell* 96(1): 57-68.
- Johnson C. H.,** M. R. Knight, T. Kondo, P. Masson, J. Sedbrook, A. Haley y A. Trewavas. 1995. Circadian oscillation of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants. *Science* 269: 1863-1865.
- Kalsbeek A.,** R. Buijs, M. Engelman, C. Wotjak y R. Landgraf. 1995. In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 682: 75-82.
- Kalsbeek A,** M. Garidou, I. Palm, J. Van Der Vliet, V. Simonneaux, P. Pevet y R. Buijs. 2000. Melatonin sees the light: blocking GABA-ergic transmission in the paraventricular nucleus induces daytime secretion of melatonin. *Eur J Neurosci* 12(9): 3146-3154.
- Klein D. C.** y R. Y. Moore. 1979. Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 174 (2): 245-262.

Klein D. C., R. Smoot, J. Weller, S. Higa, S. Markey, G. Creed y D. Jacobowitz. 1983.

Lesions of the paraventricular nucleus area of the hypothalamus disrupt the suprachiasmatic leads to spinal cord circuit in the melatonin rhythm generating system. *Brain Res Bull* 10(5): 647-652.

Kramer A., F. C. Yang, P. Snodgrass, X. Li, T. E. Scammell, F. C. Davis, C. J. Weitz.

2001. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 294(5551): 2511-2515.

Leak R. K., J. P. Card y R. Y. Moore. 1999. Suprachiasmatic pacemaker

organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res.* 819(1-2): 23-32.

Leak R. K. y R. Y. Moore. 2001. Topographic organization of suprachiasmatic

nucleus projection neurons. *J Comp Neurol* 433(3): 312-334.

Meijer J. H. y W. Schwartz. 2003. In search of the pathways for Light-Induced

pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms* 18: 235-249.

Menaker M. y S. Wisner. 1983. Temperature-compensated circadian clock in the

pineal of *Ann Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(19): 6119-6121.

Moga M. M. y R. Y. Moore. 1997. Afferents to the suprachiasmatic nucleus shown

by anterograde and retrograde tracing studies. *J Comp Neurol* 389: 508-534.

Moore R. Y. y B. Eichler. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42 (1): 201-206.

Moore R. Y. y J. C. Speh. 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150: 112-116.

Moore-Ede M. C., F. M. Sulzman y C. A. Fuller. 1982. The clocks that time us: Physiology of the circadian timing system. Harvard University Press, USA. Pág. 448.

Murakami, N, M. Takamura, K. Takahashi, K. Utunomiya, H. Kuroda y T. Etoh. 1991. Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res* 545(1-2): 347-350.

Nagai K., T. Nishio, H. Nakagawa, S. Nakamura y Y. Fukuda. 1978. Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food-intake. *Brain Res* 142(2): 384-389.

Paxinos G. y C. Watson. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. London.

Pittendrigh C. S. 1981. Circadian Systems: Entrainment. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York, USA. Pág. 93-126.

Pittendrigh C. S. 1981. Circadian Systems: General Perspective. En: Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. 4 Biological Rhythms. Plenum Press, New York, USA. Pág. 57-80.

Raisman G., y K. Brown-Grant. 1977. The 'suprachiasmatic syndrome': endocrine and behavioural abnormalities following lesions of the suprachiasmatic nuclei in the female rat. *Proc R Soc Lond Biol Sci* 198 (1132): 297-314.

Reinberg A. y M. Smolensky. 1993. Introduction to Chronobiology. En: Biological Rhythms and Medicine. A. Reinberg y M. Smolensky Eds. Springer-Verlag, New York, USA. Pág. 23-46.

Reppert S. 1985. Circadian rhythm of cerebrospinal fluid vasopressin; characterization and physiology. En: vasopressin. Schrier RW Eds.. Raven Press, New York, USA. Pág. 455-464.

Reppert S. y D. Weaver. 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 63: 647-676.

Reppert S. y D. Weaver. 2002. Coordination of timing in mammals. *Nature* 418: 935-941.

- Rusak B.** y G. Groos. 1982. Suprachiasmatic stimulation phase shifts rodent circadian rhythms. *Science* 215(4538): 1407-1409.
- Shearman L. P.**, S. Sriram, D. Weaver, E. Maywood, I. Chaves, B. Zheng, K. Kume, C. Lee, G. van der Horst, M. Hastings y S. Reppert. 2000. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* 288(5468): 1013-1019.
- Schwartz W. J.** y H. Geiner. 1977. Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucosa uptake as a functional marker. *Science* 197: 1089-1091.
- Schwartz W. J.**, M. Reppert, S. Eagan y M. Moore-Ede. 1980. In vivo metabolic activity of the suprachiasmatic nuclei: a comparative study. *Brain Res* 214: 184-187.
- Schwartz W. J.**, R. A. Gross y M. T. Morton. 1987. The suprachiasmatic nuclei contain a tetrodotoxin-resistant circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci* 84: 1694-1698.
- Shibata S.**, Y. Oomura, H. Kita y K. Hattori. 1982. Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res* 247 (1): 154-158.

- Shibata S.** y R. Y. Moore. 1988. Electrical and metabolic activity of suprachiasmatic nucleus neurons in hamster hypothalamic slices. *Brain Res* 438(1-2): 374-378.
- Shibata S.** y R. Y. Moore. 1994. Calmodulin inhibitors produce phase shifts of circadian rhythms in vivo and in vitro. *J. Biol Rhythms* 9(1): 27-41.
- Shoshan-Barmatz V.** y Ashlet, R. 1998. The structure, function, and cellular regulation of ryanodine-sensitive Ca⁺ release channels. *Int rev cytology* 183: 185-270.
- Simonneaux V.** y C. Ribelayga. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin síntesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55(2): 325-395.
- Sims K. B.,** D. L. Hoffman, S. I. Said y E. A. Zimmerman. 1980. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in mouse and rat brain: an immunocytochemical study. *Brain Res* 186(1): 165-183.
- Stephan F. K.** y I. Zucker. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 69(6): 1583-1586.

- Takahashi J. S.,** H. Hamm y M. Menaker. 1980. Circadian rhythms of melatonin release from individual superfused chicken pineal glands in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (4): 2319-2322.
- van Den Pol A. N.** 1980. The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic anatomy. *J Comp Neurol* 191: 661-702.
- van Den Pol A. N.** y K. L. Tsujimoto. 1985. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* 15(4): 1049-1086.
- van Den Pol A. N.** 1991. The suprachiasmatic nucleus: Morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. Parte II Cap. 2. En: Suprachiasmatic nucleus. The mind's clock. D. C. Klein, R. Y. Moore y S. M. Reppert. (Eds). Oxford University Press. New York. USA. Pág. 17-50.
- van Den Pol A. N.,** S. M. Finkbeiner y A. H. Cornell-Bell. 1992. Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro. *J Neurosci* 12: 2648-2664.
- van Den Pol A. N.** y F. E. Dudek. 1993. Cellular communication in the circadian clock, the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 56 (4): 793-811.

- van Esseveldt L. E., M. N. Lehman y G. J. Boer.** 2000. The suprachiasmatic nucleus and the circadian time-keeping system revisited. *Brain Res Rev* 33: 34-77.
- Vandesande F., K. Dierickx y J. DeMey.** 1975. Identification of the vasopressin-neurophysin producing neurons of the rat suprachiasmatic nuclei. *Cell Tissue Res* 156 (3): 377-380.
- Wagenknecht T y M. Samsó.** 2002. Three dimensional reconstruction of ryanodina receptors. *Front Biosc* 7: d1464-d1474.
- Wagner S., M. Castel, H. Gainer y Y. Yarom.** 1997. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 387: 598-603.
- Walsh I. B., R. J. van den Berg y W. J. Rietveld.** 1995. Ionic current in cultured rat suprachiasmatic neurons. *Neuroscience* 69: 915-929.
- Watanabe K., J. Vanecek y S. Yamaoka.** 2000. In vitro entrainment of the circadian rhythm of vasopressin-releasing cells in suprachiasmatic nucleus by vasoactive intestinal polypeptide. *Brain Res* 877(2): 361-366.
- Watanabe T., T. Yoshimura, D. G. McMahon y S. Ebihara.** 2003. Unimodal circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus of behaviorally splitting mice. *Neurosc Letters* 345: 49-52.

Watts A. G. 1991. The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: Anatomical insights into the control of circadian rhythms. Parte II Cap 4. En: Suprachiasmatic nucleus. The mind's clock. D. C. Klein, R. Y. Moore y S. M. Reppert (Eds). Oxford University Press. New York. USA. Pág. 77-106.

Williams A., D. West y R. Sitsapesan. 2001. Light at the end of the Ca²⁺-release channel tunnel: structures and mechanisms involved in ion translocation in ryanodine receptor channels. *Quarterly rev biophysics* 34(1): 61-104.

Wood N. T., A. Haley, M. Viry-Moussaid, M. Johnson, A. H. van Der Luit y A. J. Trewavas. 2001. The calcium rhythms of different cell types oscillate with different circadian phases. *Plant Physiol* 125: 787-796.

Zhang L. R. Aguilar-Roblero, R. A. Barrio y P. K. Maini. 1995. Rhythmic firing patterns in SCN: The role of circuit interactions. *Int. J. Bio-Medical Computing* 38: 23-31.

Zucchi R. Y S. Ronca-Testoni. 1997. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: Modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacol Rev* 49(1): 1-51.