



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE PSICOLOGIA

"PATRON DE EXPRESION DE LOS GENES RELOJ Per1
y Per2 EN EL NSQ DE CONEJOS NEONATOS
SINCRONIZADOS POR AMAMANTAMIENTO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADA EN PSICOLOGIA
P R E S E N T A :
DIANA IRIS TEJADILLA OROZCO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IVETTE CALDELAS SANCHEZ

MEXICO, D. F.

DICIEMBRE 2005

0350545





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA
P R E S E N T A:
DIANA IRIS TEJADILLA OROZCO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ

REVISOR: MTRO. ALFONSO SALGADO BENITEZ

SINODALES: DRA. MARI CORSI CABRERA

DRA. ROBYN ELIZABETH HUDSON

DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo reoeptional.
NOMBRE: Diana Iris tejadilla

Orozco
FECHA: 29 NOV 2005

FIRMA: [Firma]

MÉXICO, DF; 2005



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**“PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS GENES RELOJ
Per1 y Per2 EN EL NSQ DE CONEJOS NEONATOS
SINCRONIZADOS POR AMAMANTAMIENTO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

DIANA IRIS TEJADILLA OROZCO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ

MÉXICO, DF; DICIEMBRE 2005

Esta tesis se realizó con los recursos otorgados al proyecto
de investigación PAPIIT IN200203-3 y al proyecto TWAS 04-155RG/BIO/LA otorgados a
la Universidad Nacional Autónoma de
México.

A la UNAM, por mucho, nuestra máxima casa de estudios.

RECONOCIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Ivette Caldelas Sánchez, por la oportunidad, la confianza, la paciencia, el cariño, por llevarme de la mano y caminar junto conmigo, por la compañía en el quirófano del terror durante las largas noches de experimentos, por consentirme, por las papas adobadas y las ensaladas con quesito de cabra, por adentrarme y explicarme con manzanas lo que es el mundo de los Ritmos Biológicos, por solucionar. ¡Ivette-Einstein has creado un monstruo!

Mtro. Alfonso Salgado Benítez por la pasión con la que hace su trabajo. Por la claridad y calidad al explicar. Por hacer llegar a mi cerebelo sus sugerencias, ayudándome a anticipar lo porvenir.

Dra. Mari Corsi Cabrera por su gentileza y por la confianza en el presente trabajo. Por sus trascendentes y específicos comentarios y por ir más allá de lo que son los ritmos biológicos.

Dra. Robyn Elizabeth Hudson por su apoyo. Por abrir su laboratorio y con ello ampliar mis horizontes sobre la Psicología Fisiológica Experimental Conductual. Por dar luz verde a esta línea de investigación, por sus minuciosas correcciones y el cuidado metodológico a la presente tesis. Por los dulces, las galletitas y las bromas que aligeraban la carga de trabajo.

Dr. César Casasola Castro por su compromiso con la Facultad de Psicología. Por sus perspicaces sugerencias que me ayudaron a profundizar en mis errores. Por templar mi paciencia y poner a prueba mis capacidades.

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios en toda América Latina, la **Universidad Nacional Autónoma de México**.

De la Facultad de Psicología: a la misma Facultad y a todos mis profesores; a mis queridas psicópatas: a Ariadna, a Lia, a Lilian, a Maruchan, a Tañis y a Ana gracias a todas por compartir amistad, conocimientos, viajes, chelas, sentimientos, fiestas; a Jahir, a David de Luna y a Patito, por contribuir en mi formación personal y profesional. A todos, por dejarme entrar en su vida y corazón. Al Doctor Palacios, por incrementar mi interés en la investigación.

Del Instituto de Investigaciones Biomédicas:

Al fabuloso, noble y fiel "conejo europeo".

A la Licenciada Carolina Rojas por su apoyo técnico, emocional y amistoso durante la gestación de esta tesis coneja.

Al Dr. Jesús Chimal Moroy por todos los préstamos (material e infraestructura) además de sus chistes, buen humor y acertados comentarios en la fase experimental de mi trabajo. A todos los miembros de su laboratorio por las buenas charlas en la mesa de experimentos, por compartir conmigo su espacio.

Al Dr. Rodrigo Montufar Cháveznava por el apoyo en el desarrollo del software para el análisis de mis datos con el Método COSINOR.

Al Dr. Steven Reppert por la donación de los plásmidos utilizados en la ISH.

Al Laboratorio de Psicobiología de la Conducta y a todos los miembros de éste: a Emma por sus claras e interesantes explicaciones sobre temas de biología, por su risa contagiosa, por prestarme sus libros, por compartir tiempo y espacio, por las lecciones de perseverancia y paciencia; a Marcos Rosetti y a Luisillo por la excelente selección musical; a Max su apoyo con el material audiovisual; a Belén por apoyarme en las eventualidades y situaciones difíciles; a Estrellita por su buen humor y por sus explicaciones biológicas; a Marco por compartir charlas y su súper libro; a todos por compartir dulces y galletitas, además del espacio y por sus valiosas sugerencias en la exposición del trabajo.

De los Prepos: A Corita por darme alegría y ganas de seguir con lo que sigue, a Itzel por enseñarme fidelidad y nobleza, a Alejandra por darme coraje para tomar mi vocación (la Psicología), a Ángel por sus excelentes consejos y cariño, a Ariana por risueña, a Ilianita por sus locuras, a Francis por derecha, a Toño por sus bromas tontas y sus histerias, a Memo por cariñoso y feminista, a Miguelillo por considerarme siempre, a Humberto por irreverente y cagado, a Italia por siempre recordarme y a todos por quererme, por ser mis amigos a pesar de lo feo y compartir todo lo suyo conmigo.

A los demás importantes: a Sergio, a Paco, a Clorito, a Samantha, a Jani, y a Alma Luz, gracias por llevarme dentro.

De mis raíces:

A mi papito, por enseñarme la importancia de ser universitaria; por darme la seguridad de que si se trabaja siempre puedes obtener lo deseado. Por hacerme reír y por darme coraje para concluir.

A mi Paloma Blanca, mi mamichi, mi amiga, por creer en mí, por apoyarme incondicionalmente en este camino, por su amor.

A Carito, siempre fungiendo como la perfecta hermana mayor con su ejemplo, perseverancia, serenidad, seguridad y tranquilidad en todo lo que hace.

A Michicuchi, mi otra "hermana mayor" por su madurez, su inteligencia y complicidad, por estar siempre que se le necesita.

A Luigi, mi hermanito, por su sencillez, su alegría y respeto hacia las mujeres. Por apoyarme en todo.

A Melmak y Sandy, por ser mis hermanas, quererme y apoyarme siempre.

A Carmen y Carlos, por alentarme siempre a seguir adelante para superarme, por darme su amor.

A Tamara, la Güera y el Jonás por ser mis hermanos de corazón.

A mi mamá Lipa, por enseñarme que siempre se puede ser mejor y estar feliz.

A Amparito por su cariño incondicional, por tenerme confianza.

RESUMEN

En mamíferos la ritmicidad circadiana es evidente desde etapas tempranas del desarrollo, se sugiere que señales cíclicas provenientes de la madre resultan ser las principales señales capaces de sincronizar al sistema circadiano en desarrollo. Se ha demostrado que la conducta de la madre actúa como una potente señal sincronizadora no-fótica en neonatos del conejo europeo ya que la peculiar conducta materna que presenta esta especie tiene lugar cada 24 horas cuando la hembra se presenta por espacio de 3-5 minutos en el nido para amamantar a las crías, mismas que, desde el nacimiento permanecen en oscuridad constante en madrigueras subterráneas. También se ha encontrado en estudios previos que las crías mantenidas bajo estas condiciones presentan ritmos conductuales y fisiológicos sincronizados al horario de amamantamiento. Sin embargo, en la actualidad no existe información sobre los sustratos neuroanatómicos relacionados a este fenómeno, por lo que el presente estudio está encaminado a observar si, al igual que en otras especies, los genes reloj *Per1* y *Per2* se expresan en el sistema nervioso central del conejo europeo, así mismo el estudio está encaminado a obtener el perfil de expresión de éstos genes reloj en el núcleo supraquiasmático (*NSQ*) del hipotálamo (sitio en donde se ubica el marcapaso circadiano de mamíferos) en neonatos alimentados cada 24 horas. Para tal efecto se mantuvo desde el nacimiento a un grupo de animales ($n=54$) en oscuridad continua, del día 1 al 7 de edad, se permitió el acceso de la hembra lactante al nido cada 24 horas para alimentar a las crías. El día 7 de edad se obtuvo el perfil de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* mediante hibridación *in situ*, en secciones coronales de tejido cerebral que contuvieran el *NSQ*. De igual manera, se obtuvo el perfil de expresión de estos genes reloj en un segundo grupo de animales juveniles ($n=40$) de 45 días de edad, mantenidos bajo un ciclo luz-oscuridad (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), con el objeto de observar si el patrón de expresión era similar al de otras especies mantenidas bajo condiciones de iluminación.

Se encontró que los genes reloj *Per1* y *Per2* se expresan abundantemente en diferentes estructuras del sistema nervioso central del conejo europeo, incluyendo el *NSQ*, tal como ha sido reportado en otras especies de mamíferos. En relación a los conejos neonatos mantenidos en oscuridad y que tuvieron acceso a la hembra cada 24 horas, encontramos que el *NSQ* de los neonatos exhibe un patrón rítmico en los niveles de *Per1* y *Per2*. De igual forma, en el grupo de conejos juveniles mantenidos bajo un ciclo luz-oscuridad, encontramos un patrón rítmico en el contenido de mRNA de ambos genes. Estos patrones rítmicos en la expresión de los genes reloj en ambos grupos de conejos, nos sugieren que este núcleo hipotalámico posiblemente ajusta su fase y periodo a estas señales cíclicas ambientales, tal como ocurre en otras especies de mamíferos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCION.....	1
1. Conceptos Básicos.....	1
1.1 Los Ritmos Biológicos.....	1
1.2 El Sistema Circadiano.....	2
1.3 Los Ritmos Circadianos.....	2
2. El Marcapaso Circadiano en Mamíferos.....	3
2.1 Principales Aferencias y Eferencias del NSQ.....	5
2.2 Bases Moleculares de la Ritmicidad Circadiana en Mamíferos.....	6
2.3 Otros Osciladores Circadianos.....	8
3. Ontogenia de los Ritmos Circadianos.....	9
4. Sincronización No-fótica Durante el Desarrollo.....	9
II. ANTECEDENTES.....	10
1. Sincronización No-fótica en Conejos Neonatos.....	10
III. OBJETIVOS.....	14
IV. MATERIALES Y METODOS.....	15
1. Sujetos.....	15
2. Obtención de las Crías.....	15
2.1 Grupo de Neonatos Mantenidos en Oscuridad.....	16
2.2 Grupo de Juveniles Mantenidos Bajo Ciclo Luz- Oscuridad.....	16
2.3 Obtención y Tratamiento del Tejido.....	16
2.4 Detección de los Genes Reloj.....	17
3. Análisis de Datos.....	18
3.1 Cuantificación de la Señal en las Películas de Auto-Radiografía.....	18
3.2 Análisis Estadístico.....	18
V. RESULTADOS.....	19
VI. DISCUSION.....	25
VII. CONCLUSIONES.....	28
VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	29
IX. BIBLIOGRAFIA.....	30
X. ANEXOS.....	38
1. Método COSINOR.....	38
2. Glosario.....	40

I. INTRODUCCIÓN

1. Conceptos Básicos

1.1 Los Ritmos Biológicos

Todos los seres vivos desde procariontes hasta eucariontes, incluido el hombre, despliegan *Ritmos Biológicos (RB)*, que son fluctuaciones rítmicas en procesos fisiológicos, bioquímicos y conductuales que ocurren en los organismos (Pittendrigh, 1981). Los *RB* abarcan una amplia gama de frecuencias (Halberg, 1959) que va desde la actividad electroencefalográfica de cierto tipo de neuronas (cuya frecuencia aproximada es de 0.1 ciclos/segundo) hasta la migración de una especie (cuya frecuencia es de 1vez/cada 365 días).

Si se coloca a los organismos en condiciones constantes de estimulación ambiental (iluminación, temperatura, alimentación y ruido) éstos continúan mostrando ritmicidad* en sus diferentes funciones, lo cual evidencia que ésta ritmicidad se genera de forma endógena por osciladores o relojes biológicos* (Moore-Ede et al., 1982), los cuales además de encargarse de la ocurrencia periódica de diferentes funciones, son sensibles a señales ambientales cíclicas y pueden ajustar su funcionamiento a la ocurrencia de éstas, proceso que se conoce como *Sincronización* (Aschoff, 1981).

Algunas de las principales funciones de los *RB* son permitir a los organismos anticiparse, responder y adaptarse a los cambios cíclicos en su nicho ecológico (Pittendrigh, 1981) debido a que tiene la peculiaridad de fluctuar rítmicamente en una estrecha relación con señales cíclicas ambientales (ciclo luz-oscuridad*, fases lunares, mareas, estaciones). Además cuando se aísla a los organismos de éstas señales el periodo de los *RB* no es exacto a la ocurrencia de dicha señal ambiental, por lo que para denominarlos se agrega el prefijo latino *circa* que significa *alrededor de o próximo a*, y, el sufijo referente a la señal ambiental cíclica con que se sincroniza el ritmo, con lo que podemos encontrar ritmos circadianos*, circalunares*, circamareales* y circanuales* (Aschoff, 1981).

Existen diversos parámetros que comúnmente son analizados en una función rítmica (Fig.1), éstos son: el *período* o intervalo de tiempo entre dos puntos de referencia idénticos y cuyo recíproco es la *frecuencia*; la *amplitud*, que se mide desde el punto máximo hasta el punto mínimo de la oscilación; la *fase* que es el estado instantáneo de una función periódica con relación a una escala de tiempo arbitraria; el *ángulo de fase* también conocido como *relación de fase*, que corresponde a la diferencia entre la fase de referencia de dos eventos oscilatorios distintos (Moore-Ede et al., 1982).

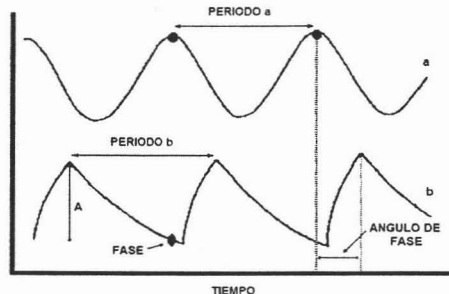


Figura 1.- Esquema representativo de dos oscilaciones (a, b) en la que se muestran los parámetros comúnmente analizados de un ritmo circadiano tales como: la amplitud (A), la fase, el periodo y el ángulo de fase. Para mayor detalle ver texto.

*.- ver Anexo 2.

1.2 El Sistema Circadiano

Es importante enfatizar que los *RB* no son una respuesta pasiva del organismo a fenómenos ambientales cíclicos, sino que, son procesos generados endógenamente por el organismo (Aschoff, 1981) a través del un conjunto de elementos y procesos al que se le conoce como *Sistema Circadiano (SC)**. Éste está integrado por: 1) *elementos oscilatorios*, que poseen la capacidad de generar fluctuaciones rítmicas con un periodo cercano a las 24 horas y que tienen la capacidad de reflejar/representar el paso del tiempo (proceso conocido como *Cronometría**); 2) *receptores sensoriales y vías aferentes*, tienen como función transmitir la información de los cambios cíclicos en el ambiente hacia los elementos oscilatorios para que se establezca el proceso de *Sincronización*; y, 3) *vías eferentes*, que regulan el proceso de la *Transmisión* de la ritmicidad a los efectores para expresar el *Ritmos Circadianos* (RC)* (Moore, 1996).

1.3 Los Ritmos Circadianos

En el presente trabajo se abordará el estudio de los *RC*, es decir, aquellos ritmos cuya frecuencia es de una vez cada 24 horas, como consecuencia de su relación con el movimiento de rotación de la tierra (Halberg, 1959). Ejemplos de este tipo de ritmo (Fig.2) son los ritmos de sueño-vigilia, de actividad-reposo, de temperatura corporal, de expresión de algunos genes, de secreción de algunas hormonas (cortisol, melatonina, prolactina) entre otros (Moore-Ede et al., 1982).

En humanos se ha visto que procesos cognitivos, fisiológicos y conductuales como memoria operacional, memoria inmediata, estado de alerta, temperatura oral, secreción de testosterona en hombres, temperatura, ciclo sueño-vigilia, respiración y otros, muestran variaciones a lo largo del día (Golombek, 2002; Valentinuzzi, 2002).

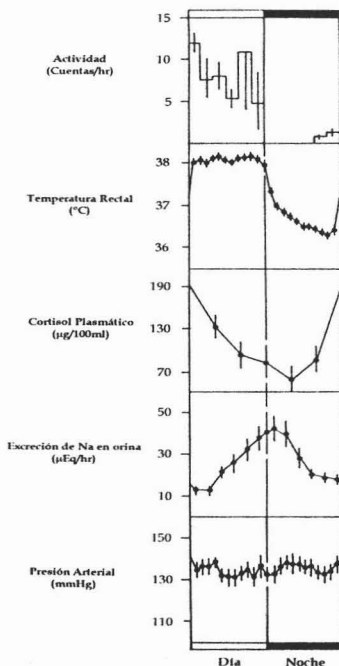


Figura 2.- Variaciones circadianas en diversos parámetros fisiológicos del mono *saimiri sciureus* mantenido en un ciclo luz-oscureidad. Esta especie exhibe ritmos diurnos en variables fisiológicas tales como la actividad locomotora, temperatura rectal, cortisol plasmático y excreción de sodio en orina. En contraste, la presión arterial muestra un patrón ultradiano. Tomada de Moore-Ede et al. 1982.

También existen ritmos cuya frecuencia difiere del rango circadiano, los que presentan una frecuencia mayor a 24 horas se les conoce como *Ritmos Ultradianos*, tal es el caso de la frecuencia respiratoria, la frecuencia cardíaca, la actividad eléctrica cerebral, por mencionar algunos. Mientras que los ritmos que muestran una frecuencia menor a las 24 horas se les conoce como *Ritmos Infradianos*, y tenemos como ejemplo a los ritmos menstrual y reproductivo, entre otros (Enright, 1981).

Como se mencionó anteriormente, el fenómeno de sincronización ocurre cuando los osciladores circadianos ajustan su periodo y fase a la ocurrencia de las señales cíclicas ambientales (Aschoff, 1981). Para que éste fenómeno tenga lugar es necesario: 1) que las señales ambientales sincronizadoras sean regulares y predecibles, 2) que los osciladores internos sean sensibles a dichas señales y 3) que éstas produzcan una corrección diaria de la fase del oscilador, de modo que, el período del oscilador sea igualado al de la señal sincronizadora (Aschoff, 1981).

Las principales señales ambientales sincronizadoras de los *RC* debido a la gran estabilidad en su fase y periodo es el *ciclo luz: oscuridad (L: O)*, a éstas se les conoce como *señales fóticas*, (Aschoff, 1981; Pittendrigh, 1981). Sin embargo, existen otras señales sincronizadoras, conocidas como *no-fóticas*, que también influyen en el funcionamiento del *SC*, tal es el caso de la temperatura ambiental en animales poiquiloterms quienes permanecen expuestos al sol desde horas tempranas de la mañana hasta el atardecer, con el objeto de incrementar su temperatura y contar con suficiente energía para iniciar su actividad (Sweeney y Hastings, 1960). Un número importante de estudios indican que el alimento funciona como un potente sincronizador circadiano no-fótico en roedores (Mistlberger, 1992, Stephan, 2002).

2. El Marcapaso Circadiano en Mamíferos

Hasta la fecha ha sido identificado que el *Núcleo Supraquiasmático (NSQ)* del hipotálamo es una estructura encargada de estimar el paso del tiempo, de generar la organización temporal interna y de ajustar su funcionamiento a la ocurrencia del tiempo geofísico, es decir, este núcleo contiene las características de un marcapaso circadiano (Morin, 1994; Miller et al. 1996; Weaver, 1998). Entre éstas se encuentran estudios en los que lesiones de éste núcleo hipotalámico producen pérdida de la ritmicidad en diferentes parámetros tales como el ritmo sueño-vigilia (Moore-Ede et al., 1982), ingesta de agua (Moore et al. 1967; Stephan y Zucker, 1972), actividad motora (Moore et al. 1967; Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972) y secreción de corticoesteroides (Moore y Eichler, 1972). Posteriormente, en estudios *in vivo* se demostró que el *NSQ* era capaz de oscilar de manera autosostenida ya que mostraba ritmicidad en su actividad metabólica (Schwartz y Gainer, 1977) y eléctrica (Inouye y Kawamura, 1979) aún cuando el núcleo era deafferentado, así como bajo condiciones *in vitro* (Green y Gillette, 1982; Groos y Hendriks, 1982; Shibata et al. 1982). Una de las evidencias más contundentes sobre la relevancia del *NSQ* como marcapaso circadiano se hizo mediante trasplantes de hipotálamo fetal a sujetos arrítmicos por lesión del *NSQ*, en donde, el trasplante fue capaz de restaurar la función rítmica (Drucker-Colin et al. 1984; Matsumoto et al. 1996; Moore et al. 1989). Se ha corroborado que otros tejidos cerebrales, tal como la corteza occipital, no poseen la capacidad de restaurar funciones rítmicas en sujetos lesionados bajo condiciones de oscuridad constante, lo cual indica que la ritmicidad circadiana es una propiedad exclusiva de las neuronas contenidas en el *NSQ* (García-Hernández et al. 1987). De hecho se sabe que cada neurona contenida en el *NSQ* funciona como marcapaso circadiano autónomo (Welsh et al. 1995). En la actualidad continúa siendo motivo de estudio la identificación de los mecanismos bioquímicos y moleculares responsables de la ritmicidad del *NSQ*.

Respecto a la anatomía del NSQ, se trata de una estructura bilateral, ubicada en el hipotálamo ventral anterior, dorsal al quiasma óptico, rostral a las comisuras supraópticas y ventrolateral al receso quiasmático del tercer ventrículo (Fig.3). La densidad de neuronas en el núcleo es una de las más grandes del cerebro de mamíferos, lo que permite identificarlo con facilidad en cortes histológicos del hipotálamo (Moore et al. 2001).

Cada núcleo contiene entre 10,000 y 12,000 neuronas mismas que cuentan con un diámetro de 7-12 μm (Van den Pool, 1980; Moore y Speh, 1993; Reuss, 1996) y la mayoría de sus axones se extienden dentro del mismo núcleo formando microcircuitos (Moore y Leak, 2001).

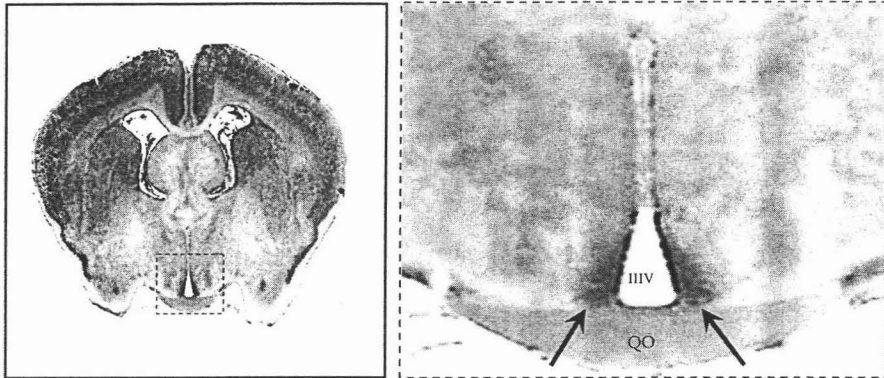


Figura 3.- Microfotografía de una sección coronal de tejido cerebral de conejo europeo neonato, teñido mediante el procedimiento de Nissl (panel izquierdo). En el panel derecho, se muestra una ampliación del hipotálamo basal que incluye los núcleos supraquiasmáticos, los cuales se encuentran dorsales al quiasma óptico (QO) y laterales al tercer ventrículo (IIIIV).

El NSQ posee dos regiones claramente definidas según:

a) Citoarquitectura: en donde la *región dorsomedial (DM)* se caracteriza por presentar una alta densidad neuronal, con células pequeñas y muy compactadas con aposiciones somales en forma de cadena y arborizaciones dendríticas pequeñas (Moore y Leak, 2001). Mientras que la *región ventrolateral (VL)* presenta baja densidad neuronal con células más grandes y menos compactadas, las aposiciones somales ocasionalmente hacen contactos dendrodendríticos y sus arborizaciones dendríticas son más largas (Moore y Leak, 2001).

b) Distribución de péptidos: la región *DM* (Fig. 4) se caracteriza por la presencia de cuerpos neuronales que contienen avidina-vasopresina (AVP), neuroficina y encefalinas. En cuanto a la región *VL* sus neuronas contienen péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés), péptido liberador de gastrina, péptido histidina-leucina y bombesina (Moore y Leak, 2001). En ambas regiones del NSQ se ha corroborado la presencia de neurotensina, angiotensina II, el factor liberador de tirotrófina, el ácido gamma aminobutírico (GABA), somatostatina, sustancia P y calretina (Van den Pool, 1980; Moore y Speh, 1993).

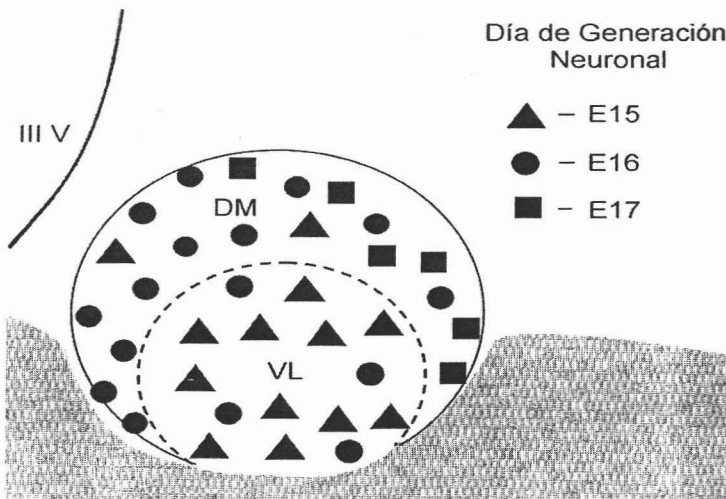


Figura 4.- Esquema representativo de las principales subdivisiones neuroanatómicas que caracterizan al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, la región dorsomedial (DM) y ventrolateral (VL). Asimismo, se muestra la aparición heterocrónica de las células que conforman este núcleo hipotalámico en ratas en donde la neurogénesis de este núcleo ocurre del día embrionario 15 (E15) al 17 (E17). IIV indica el tercer ventrículo. Modificada de Moore y Leak, 2001.

2.1 Principales Aferencias y Eferencias del NSQ

El NSQ recibe información ambiental de la retina a través de dos vías (Fig. 5), una directa que es el *tracto retinohipotalámico (TRH)* el cual parte de un subgrupo de células ganglionares tipo III (Moore, 1995) de la retina inervando predominantemente la región VL del NSQ, en ésta vía participan neurotransmisores como el glutamato y aminoácidos excitatorios (Liou et al. 1986). Existe otra vía indirecta, (Fig. 5) en donde colaterales del TRH se proyectan hacia la *hojuela intergeniculada (HIG)*, de donde parte el *tracto geniculohipotalámico* que inerva primordialmente la región VL del núcleo, en ésta vía participan neurotransmisores como *neuropéptido Y*, *GABA* y *encefalinas* (Harrington et al. 1985).

El NSQ recibe también una densa inervación serotoninérgica (Fig. 5) que se origina de los núcleos del *rafe*, en donde el *rafe medial* inerva al NSQ y el *rafe dorsal* inerva la HIG, éstas inervaciones al parecer están involucradas tanto en la sincronización fótica, como en la no-fótica del NSQ (Azmita y Segal, 1978; Morin, 1999; Caldelas et al. 2005a, b).

De la misma forma el NSQ recibe información de la glándula pineal, el núcleo paraventricular del tálamo (PVT) y el septum lateral (LS por sus siglas en inglés) (Aguilar-Roblero et al. 2002).

Respecto a las eferencias se han descrito proyecciones hacia el PVT, el núcleo geniculado lateral y la HIG (Moore, 1995) involucrando la actividad motora (Johnson et al. 1989). También se ha propuesto que conduce información hacia el *área preóptica hipotalámica*, involucrada en la regulación de sueño, reproducción, homeostasis de fluidos y termorregulación (Watts, 1991; Card y Moore, 1989); igualmente proyecta hacia la *zona subparaventricular talámica* (Card y Moore, 1989) influyendo en la liberación de melatonina por parte de la *pineal*

(Watts, 1991). Por otra parte existe una conexión hacia *tallo cerebral* a la sustancia gris periacueductal y *telencéfalo* a través del *núcleo dorsomedial del hipotálamo*, *núcleo ventromedial del hipotálamo*, *el área retroquiasmática*, *área hipotalámica posterior*, *núcleo paraventricular hipotalámico* modulando el ritmo de corticoesteroides plasmáticos (Card y Moore, 1989) y otras hormonas (Buijs, 1996). Otras proyecciones (Fig. 5) se dirigen al *núcleo de la estría terminal* y *el núcleo paratenial del tálamo* (Aguilar-Roblero et al. 2002).

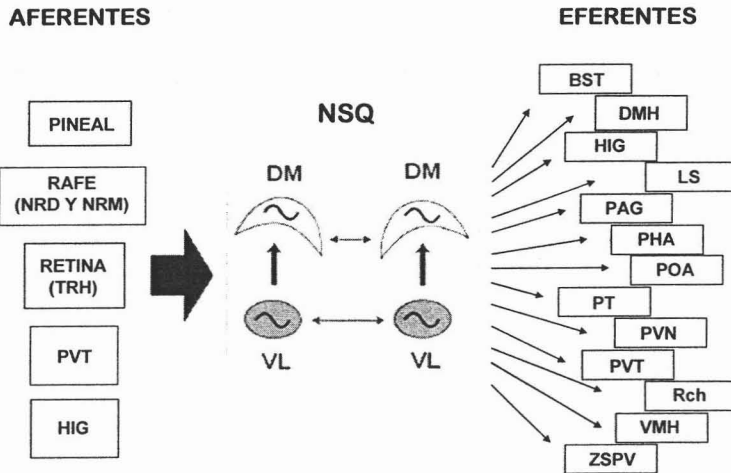


Figura 5. Representación esquemática de las principales aferencias y eferencias que inervan las regiones dorsomedial (DM) y ventrolateral (VL) del núcleo supraquiasmático. Para mayor detalle ver texto. BST núcleo lecho de la estría Terminal, DMH núcleo dorsomedial del hipotálamo, HIG hoja de la estría intergeniculada, LS septum lateral, NRM núcleo rafé medial, NRD núcleo rafé dorsal, PAG sustancia gris periacueductal, PHA área hipotalámica posterior, POA área preoptica hipotalámica, PT núcleo paratenial del tálamo, PVN núcleo paraventricular hipotalámico, PVT núcleo paraventricular del tálamo, Rch área retroquiasmática, TRH tracto retinohipotalámico, VMH núcleo ventromedial del hipotálamo, ZSPV zona subparaventricular talámica. Modificada de Taghert, 2001.

2.2 Bases Moleculares de la Ritmicidad Circadiana en Mamíferos

Gracias a estudios moleculares realizados en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) se tiene conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la generación de los RC en diversas especies (Reppert y Weaver, 2001).

Cabe destacar que diferentes grupos taxonómicos (bacterias, hongos, insectos y mamíferos) muestran una característica en común, en donde un grupo de genes denominado genes reloj y sus productos proteicos forman una asa de retroalimentación (Fig. 6), que cuenta con componentes activadores (o factores positivos) e inhibidores (o factores negativos) de la actividad de dos factores de transcripción (Chang y Reppert, 2001; Cabelas et al. 2003;

Okamura, 2003; Gachón et al. 2004; Bell-Pedersen et al. 2005). Además, ésta asa tiene un periodo cercano a 24 horas (Hardin et al. 1990; Chang y Reppert, 2001; Nagoshi et al. 2004).

En mamíferos, después de haber sido identificados los sustratos neuroanatómicos, bioquímicos, y una vez corroboradas las propiedades del NSQ como principal oscilador circadiano, se realizaron estudios sobre las bases moleculares de los RC. Esto último ocurrió hace apenas una década (Reppert y Weaver, 2001).

En el NSQ de roedores, el heterodímero formado por los factores CLOCK y BMAL1 (factores positivos) vía elementos E-box en regiones promotoras de los genes reloj, inician la transcripción de los genes *Period* (*Per1*, *Per2* y *Per3*), los genes *Criptocromo* (*Cry1* y *Cry2*), los genes *Dec* (*Dec1* y *Dec2*) y los genes controlados por el reloj (*KClε*, *VIP*, entre otros). Los productos proteicos de éstos forman dímeros en el citoplasma, para ser translocados al núcleo, tal como es el caso de PER y CRY (Fig. 6), los cuales funcionan como elementos negativos, ya que interactúan con los factores CLOCK y BMAL1 inhibiendo su actividad transcripcional, produciendo un decremento en los niveles de los genes reloj dependientes de éstos factores (Reppert y Weaver, 2001; Chang y Reppert, 2001, Honma et al. 2002, Okamura, 2003). Mientras que PER2 actúa como factor positivo (Fig. 6) promoviendo la transcripción de *Bmal1* (Reppert y Weaver, 2001).

Se ha encontrado que bajo condiciones de oscuridad constante el NSQ muestra variaciones circadianas en los niveles de expresión de genes como *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Dec1*, *Dec2* y *Bmal1* con excepción de *Clock* (Shearman et al. 1997; Tei et al. 1997; Honma et al. 2002; Caldelas et al. 2003).

Si se controlan las condiciones de iluminación o si se aplican pulsos de luz la expresión de los genes reloj es modulada de manera diferencial. Se ha observado que si se aplican pulsos de luz durante la noche subjetiva los niveles de *Per1* y *Dec1* se incrementan (Zylka et al. 1998; Honma et al. 2002; Caldelas et al. 2003), por el contrario *Cry2* se inhibe (Caldelas et al. 2003). Por otra parte la expresión de *Per2* se incrementa solo cuando los pulsos de luz son administrados al inicio de la noche subjetiva (Caldelas et al. 2003). Un caso muy peculiar es el de *Bmal1*, ya que la administración de pulsos de luz durante la noche subjetiva produce una disminución en sus niveles en roedores nocturnos (Tamaru et al. 2000). Sin embargo, en roedores diurnos la expresión de éste gen no es modulado por luz (Caldelas et al. 2003) al igual que los genes *Dec2* y *Per3* (Zylka et al. 1998; Honma et al. 2002). La inducción de los genes dentro del NSQ varía según la región, por ejemplo, la inducción de *Per1* ocurre en la región VL, mientras que *Per2* se induce tanto en la VL como en la DM, éstos dos genes parecen estar involucrados en el reinicio de fase del oscilador (Reppert y Weaver, 2002; Challet et al. 2003; Okamura, 2003).

En relación a señales diferentes a la luz, o sea, las señales no-fóticas, éstas también pueden modular la expresión de los genes reloj en el NSQ, por ejemplo, agonistas serotoninérgicos suministrados en el día subjetivo, producen una disminución en la expresión de *Per1* y *Per2* (Horikawa et al. 2000; Yokota et al. 2000; Caldelas et al. 2005b); otras señales no-fóticas que pueden modular la expresión genética son la presentación de ruedas de actividad (Maywood et al. 1999) y la administración de dietas hipocalóricas (Caldelas et al. 2005c).

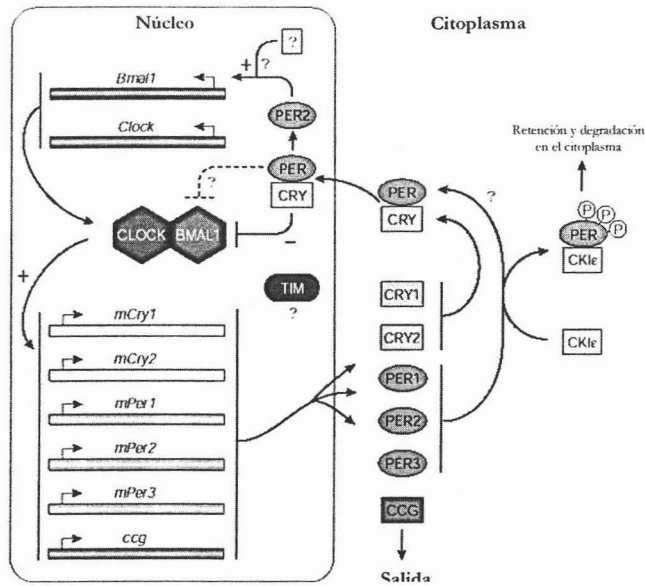


Figura 6.- Modelo de los mecanismos moleculares involucrados en el reloj circadiano de mamíferos. Los factores de transcripción BMAL1 y CLOCK forman heterodímeros que activan la transcripción rítmica de los genes *Per* y *Cry*. Las proteínas PER y CRY forman importantes complejos en el citoplasma para su posterior translocación nuclear. Al parecer, de acuerdo al estado de fosforilación de las proteínas PER puede depender su ubicación celular y estabilidad, se sugiere que este se encuentra regulado por la CKIε. La proteína PER2 regula positivamente la transcripción de *Bmal1* translocando un activador al núcleo y/o actuando como co-activador. Por otra parte las proteínas CRY y posiblemente PER1 regulan negativamente a CLOCK y BMAL1, ya que estas interactúan directamente inhibiendo la transcripción de los genes *Per* y *Cry*. Modificada de Cermakian y Sassone-Corsi, 2000.

2.3 Otros Osciladores Circadianos

Si bien, las neuronas del NSQ son las únicas capaces de mantener la ritmicidad circadiana de forma autosostenida, no son las únicas células en exhibir oscilaciones, los avances en las técnicas moleculares han permitido corroborar que un gran número de tejidos también muestran ésta ritmicidad. Yamazaki et al. (2000) fueron los primeros en describir que tejidos periféricos tales como hígado, pulmón y músculo esquelético exhiben ritmicidad circadiana *in vitro*. También demostraron que es posible producir cambios de fase* en el funcionamiento de éstos órganos, cuando son inducidos cambios de fase fóticos en el NSQ (Yamazaki et al. 2000). También han sido identificados osciladores circadianos en el sistema nervioso central, como la glándula pineal (Bell-Pedersen et al. 2005), el bulbo olfativo (Abe et al. 2002; Granados-Fuentes et al. 2004), el hipotálamo ventral (Abe et al. 2002), la retina (Tosini y Menaker, 1998), entre otras estructuras; sin embargo, la ritmicidad de estas estructuras se atenúa en condiciones *in vitro*. Evidencias que sugieren que el marcapaso circadiano (NSQ) envía información temporal, posiblemente de tipo humoral (Silver et al. 1996; Balsalobre, 2002) a los osciladores periféricos, para acoplar el funcionamiento de éstos al del NSQ y de esa forma mantener un control de fase* adaptativo.

3. Ontogenia de los Ritmos Circadianos

La mayor parte de lo que se conoce sobre ontogenia de la ritmicidad circadiana, se ha estudiado en roedores y se sabe que durante el último tercio de la gestación es cuando comienza la neurogénesis del NSQ, con la aparición heterocrónica de los diferentes tipos celulares y la expresión de genes reloj; por ejemplo, las células que expresan vasopresina en la región *DM* del NSQ aparecen en etapas embrionarias posteriores que aquellas cuyos cuerpos neuronales contienen calbindina, péptido liberador de gastrina, sustancia P y de VIP (Antle et al. 2005). Además, se ha encontrado que el NSQ es un marcapaso circadiano funcional y sincronizable desde antes del nacimiento, ya que en fetos este núcleo exhibe ritmicidad en su actividad metabólica y eléctrica, la cual, además está en fase con la de la madre (Reppert y Schwartz, 1983). Por lo que las señales no-fóticas provenientes de la madre durante etapas tempranas del desarrollo poseen mayor relevancia, de tal forma que pueden actuar como las principales señales sincronizadores del SC de *neonatos* (Reppert et al. 1984), mientras que las señales fóticas van adquiriendo importancia con la edad (Moore, 1996).

En relación a la expresión de diferentes ritmos circadianos también estos aparecen de forma heterocrónica, es decir, aparecen a diferentes momentos del desarrollo. Por ejemplo, en la rata primero aparecen los ritmos de ganancia de peso corporal relacionado con la alimentación, secreción de melatonina generado en la pineal y ritmos endocrinos controlados por la pituitaria. En esta misma especie, los últimos parámetros rítmicos en aparecer son la actividad locomotora, la ingesta de líquidos y el ritmo sueño-vigilia (Davis, 1981). Uno de los parámetros que muestra cambios significativos es la amplitud de los ritmos, la cual aumenta con la edad. Estos cambios durante la ontogenia no quiere decir que la aparición de los ritmos y el incremento en su amplitud estén controlados por diferentes osciladores circadianos, sino que las vías aferentes y eferentes del oscilador no han madurado del todo (Reppert, 1995).

4. Sincronización No-Fótica Durante el Desarrollo

Cabe destacar que las células de NSQ fetal exhiben ritmicidad diurna aún cuando no se han formado las aferencias de la retina (Moore et al. 1989), lo que sugiere que señales provenientes de la hembra, tales como el ritmo de temperatura, actividad-reposo y secreción de hormonas placentarias (Selinger y Levitz, 1969; Davis, 1981), tienen influencia en la ritmicidad del NSQ de los fetos. En diferentes estudios han sido corroborado que el funcionamiento del NSQ fetal, en lo que se refiere a su actividad metabólica (Reppert y Schwartz, 1983), eléctrica (Shibata y Moore, 1987) y los niveles de mRNA de VIP (Reppert y Uhl, 1987) están en fase a los de la madre, datos que indican que el NSQ puede ser sincronizado no-fóticamente *in útero*.

Importantes esfuerzos se han hecho para determinar cuales son las señales provenientes de la hembra que funcionan como agentes sincronizadores no-fóticos en mamíferos. Inicialmente se estudio el papel de hormonas, debido a que *in útero* los fetos están expuestos a una rica fuente hormonal (por ejemplo prolactina, melatonina, corticosterona) que muestran un ritmo robusto en la circulación materna y que, en algunos casos, como el de melatonina, pueden atravesar la placenta y entrar en la circulación del feto (Klein, 1972; Reppert et al. 1979; Zemdegs et al. 1988). Posteriormente, se realizaron estudios en donde a hembras gestantes les fueron lesionadas diferentes glándulas, tales como: la glándula pineal, las glándulas adrenales, la tiroides-paratiroides, la glándula pituitaria y los ovarios maternos, sin embargo las lesiones de estas no tuvieron efectos en la sincronización materno-fetal (Reppert y Schwartz, 1986). Por lo que se sugirió que es un conjunto de señales provenientes la madre (niveles hormonales, niveles de nutrientes en sangre, de actividad, de temperatura, entre otros)

los que actúan como señales sincronizadoras no-fóticas para los fetos (Reppert y Weaver, 1989).

En etapas postnatales se ha descrito que la hembra lactante funge como señal sincronizadora no-fótica de neonatos (Takahashi et al. 1982). Estudios realizados por Deguchi (1975) demostraron que el ritmo de N-acetil transferasa (*NAT*) de neonatos estaba en fase al de hembras nodrizas impuestas. Se sabe que ésta sincronización neonatal no depende de señales fóticas, debido a que también crías ciegas exhiben ritmo de *NAT* y corticoesterona en fase a la hembra nodriza (Hiroshige et al. 1982; Takahashi et al. 1982). Sin embargo, el grado de sincronización puede llegar a diferir entre las crías de una camada. En ratas se ha reportado que si a una misma camada se le presenta como señal sincronizadora no-fótica a dos hembras diferentes, una la madre natural y la otra una hembra nodriza, una parte de la camada continúa mostrando una fase similar en el ritmo de la hembra natural y otra parte a la de la hembra nodriza (Reppert et al. 1984; Davis y Gorski, 1985; Honma et al. 1987).

Estas diferencias observadas en ratas pueden deberse a los cuidados exhaustivos maternos que comúnmente exhibe esa especie. De hecho estudios realizados por Ohta et al. (2002) ponen en evidencia las limitaciones del uso de hembras nodrizas como señal sincronizadora, ya que ésta señal tiene un control deficiente de fase del funcionamiento del *NSQ*, por lo que proponen implementar la privación materna como un modelo más adecuado para el estudio de la sincronización no-fótica en roedores (Ohta et al. 2003).

II. ANTECEDENTES

1. Sincronización No-Fótica en Conejos Neonatos

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es considerado un modelo experimental idóneo para el estudio de la sincronización por señales no-fóticas durante el desarrollo temprano, esto se debe a la peculiar conducta materna que esta especie exhibe. En donde las hembras gestantes excavan madrigueras subterráneas días previos al parto (Fig. 7), las cuales se encuentran aisladas de señales fóticas ambientales, dentro de estas fabrican nidos con paja y su propio pelo (Hudson y Distel, 1982; 1989; Hudson, 1998). Pasados lo 31 días de gestación, las hembras paren dentro de las madrigueras, tan pronto nacen las crías estas se adhieren por unos segundos a los pezones de la madre, finalmente, la hembra sale del nido, cierra la madriguera. Lo más notable de la conducta materna que exhibe esta especie, es que las hembras lactantes regresa cada 24 horas a la madriguera, esta permanece brevemente en el nido para amamantar a las crías (Thompson, 1994). Por lo que los cuidados maternos son muy limitados en esta especie, en comparación a otros mamíferos altriciales en donde las hembras generalmente permanecen en el nido con las crías y muestran exhaustivos cuidados maternos a lo largo del ciclo (Jilge y Hudson, 2001). Cabe destacar que aún bajo condiciones de cautiverio, las hembras continúan exhibiendo este mismo patrón conductual en el que alimentan a las crías cada 24 horas (Jilge, 1995).

El amamantamiento ocurre de la siguiente forma: la hembra entra al nido y se posa sobre las crías a modo de que éstas puedan localizar sus pezones para succionar, postura en la que permanece por espacio de 3 a 5 minutos, antes de nuevamente salir del nido (Hudson y Distel 1982, 1983; Hudson et al. 1996 a y b). La rápida adhesión de los conejos al pezón desata un reflejo neuroendocrino en la madre, común a otros mamíferos, en el que la succión estimula la liberación de oxitocina al flujo sanguíneo y ésta a su vez estimula la liberación de la leche (Hudson et al.1995). A pesar de la reducida posibilidad de ingerir leche cada día, las crías

los que actúan como señales sincronizadoras no-fóticas para los fetos (Reppert y Weaver, 1989).

En etapas postnatales se ha descrito que la hembra lactante funge como señal sincronizadora no-fótica de neonatos (Takahashi et al. 1982). Estudios realizados por Deguchi (1975) demostraron que el ritmo de N-acetil transferasa (NAT) de neonatos estaba en fase al de hembras nodrizas impuestas. Se sabe que ésta sincronización neonatal no depende de señales fóticas, debido a que también crías ciegas exhiben ritmo de NAT y corticoesterona en fase a la hembra nodriza (Hiroshige et al. 1982; Takahashi et al. 1982). Sin embargo, el grado de sincronización puede llegar a diferir entre las crías de una camada. En ratas se ha reportado que si a una misma camada se le presenta como señal sincronizadora no-fótica a dos hembras diferentes, una la madre natural y la otra una hembra nodriza, una parte de la camada continúa mostrando una fase similar en el ritmo de la hembra natural y otra parte a la de la hembra nodriza (Reppert et al. 1984; Davis y Gorski, 1985; Honma et al. 1987).

Estas diferencias observadas en ratas pueden deberse a los cuidados exhaustivos maternos que comúnmente exhibe esa especie. De hecho estudios realizados por Ohta et al. (2002) ponen en evidencia las limitaciones del uso de hembras nodrizas como señal sincronizadora, ya que ésta señal tiene un control deficiente de fase del funcionamiento del NSQ, por lo que proponen implementar la privación materna como un modelo más adecuado para el estudio de la sincronización no-fótica en roedores (Ohta et al. 2003).

II. ANTECEDENTES

1. Sincronización No-Fótica en Conejos Neonatos

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) es considerado un modelo experimental idóneo para el estudio de la sincronización por señales no-fóticas durante el desarrollo temprano, esto se debe a la peculiar conducta materna que esta especie exhibe. En donde las hembras gestantes excavan madrigueras subterráneas días previos al parto (Fig. 7), las cuales se encuentran aisladas de señales fóticas ambientales, dentro de estas fabrican nidos con paja y su propio pelo (Hudson y Distel, 1982; 1989; Hudson, 1998). Pasados los 31 días de gestación, las hembras paren dentro de las madrigueras, tan pronto nacen las crías estas se adhieren por unos segundos a los pezones de la madre, finalmente, la hembra sale del nido, cierra la madriguera. Lo más notable de la conducta materna que exhibe esta especie, es que las hembras lactantes regresa cada 24 horas a la madriguera, esta permanece brevemente en el nido para amamantar a las crías (Thompson, 1994). Por lo que los cuidados maternos son muy limitados en esta especie, en comparación a otros mamíferos altriciales en donde las hembras generalmente permanecen en el nido con las crías y muestran exhaustivos cuidados maternos a lo largo del ciclo (Jilge y Hudson, 2001). Cabe destacar que aún bajo condiciones de cautiverio, las hembras continúan exhibiendo este mismo patrón conductual en el que alimentan a las crías cada 24 horas (Jilge, 1995).

El amamantamiento ocurre de la siguiente forma: la hembra entra al nido y se posa sobre las crías a modo de que éstas puedan localizar sus pezones para succionar, postura en la que permanece por espacio de 3 a 5 minutos, antes de nuevamente salir del nido (Hudson y Distel 1982, 1983; Hudson et al. 1996 a y b). La rápida adhesión de los conejos al pezón desata un reflejo neuroendocrino en la madre, común a otros mamíferos, en el que la succión estimula la liberación de oxitocina al flujo sanguíneo y ésta a su vez estimula la liberación de la leche (Hudson et al.1995). A pesar de la reducida posibilidad de ingerir leche cada día, las crías

logran ingerir el equivalente la 25% de su peso corporal en cada evento de amamantamiento (Hudson y Distel, 1989; Hudson et al. 1996a).

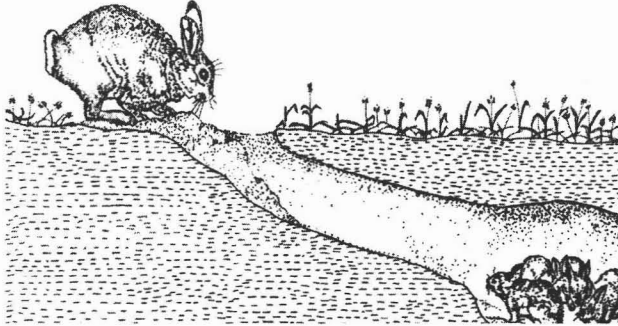


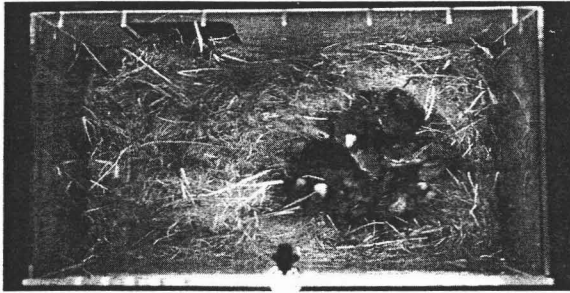
Figura 7.- Representación de la conducta materna del conejo europeo bajo condiciones naturales, para mayor detalle ver texto. Modificada de Mykutowycz, 1968.

Como se trata de un mamífero altricial, estos nacen con escaso pelo, además varios sistemas no se encuentran desarrollados completamente, como es el caso de algunos sistemas sensoriales (Fig. 8), de hecho las crías nacen con canales auditivos y párpados completamente cerrados (Hudson y Distel, 1982; 1989; Hudson, 1998). Asimismo, los neonatos exhiben una escasa coordinación motora y deficiente capacidad termoregulatoria (Hudson y Distel, 1982; 1989; Hudson, 1998). Sin embargo, a pesar de estas deficiencias estudios previos demuestran que el sistema circadiano de conejos neonatos es sincronizable por señales no-fóticas provenientes de la hembra lactante (Hudson y Distel, 1982; 1989; Hudson, 1998; Jilge 1995; Jilge y Hudson, 2001).

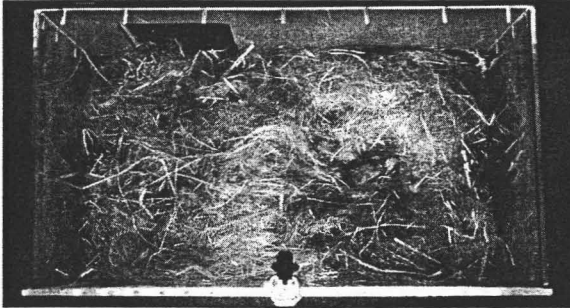


Figura 8.- Fotografía de un conejo europeo neonato de 1 día de edad. Cabe destacar que en esta especie altricial al nacer además de poseer escaso pelo, tienen párpados y conductos auditivos cerrados.

En relación a la sincronización no-fótica por amamantamiento, se ha encontrado que los neonatos exhiben ritmos conductuales sincronizados al evento de amamantamiento (Hudson y Distel, 1982; 1989; Hudson, 1998). En donde los neonatos pasan la mayor parte del tiempo cubiertos por el material del nido (Fig. 9), sin embargo, 1 ó 2 horas previas al amamantamiento, los neonatos empiezan a mostrar un cambio significativo en su actividad y gradualmente se exponen (Fig. 9) saliendo del material del nido (Hudson y Distel, 1982; 1989; Hudson, 1998). Por lo que los neonatos tienen la capacidad de anticipar la llegada de la hembra (Fig. 9).



30 minutos *previos* al amamantamiento



30 minutos *posteriores* al amamantamiento

Figura 9.- Fotografías en las que se muestra la activación conductual de los conejos neonatos dentro del nido 30 minutos previos a la llegada de la hembra (panel superior) y 30 minutos después del amamantamiento cubiertos por el material del nido (panel derecho). Tomada de Hudson y Distel, 1982.

Existen estudios en los que se han explorado los substratos anatómicos que parecen estar involucrados a la *anticipación al amamantamiento* y se ha encontrado que la privación al amamantamiento modifica la expresión de c-Fos en el PVT y en las células magnocelulares del

PVN (Allingham et al. 1998), datos que sugieren la participación de dichas estructuras en el fenómeno de anticipación al amamantamiento.

A nivel fisiológico (Fig.10), también ha sido demostrado que crías de conejo de tan sólo días 4 de edad, exhiben un ritmo de temperatura corporal claramente sincronizado al ciclo impuesto de amamantamiento (Jilge et al. 2000; 2001). En estos estudios han encontrado que 2.5 – 3.5 horas previas al amamantamiento, las crías exhiben un incremento de 0.4-0.6°C en la temperatura corporal, durante el amamantamiento la temperatura corporal se incrementa aún más 0.3-0.6°C, posterior a este evento la temperatura de las crías disminuye abruptamente 1.0-1.5°C entre 1-5 horas (Jilge et al. 2000, 2001). Además, estos cambios en el patrón de temperatura persisten aún cuando las crías no tienen acceso a la hembra lactante durante 72 horas (Jilge et al. 2001). Del mismo modo, Jilge et al. (2000) realizó una serie de experimentos en los que cambio el horario de amamantamiento de los neonatos, con esta manipulación encontró que el ritmo de temperatura corporal se ajustaba al nuevo horario de amamantamiento, claro indicador de que señales no-fólicas provenientes de la madre son capaces de sincronizar el sistema circadiano de conejos neonatos.

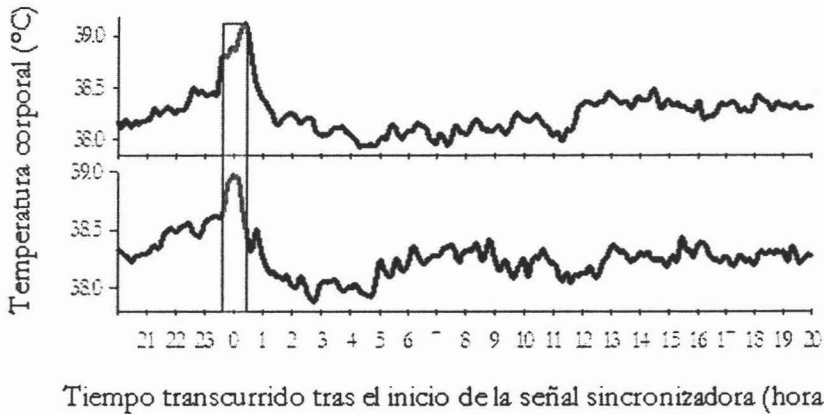


Figura 10.- Gráficas representativas del ritmo de temperatura corporal de un conejo neonato en el día 7 (gráfica superior) y en el día 8 de edad (gráfica inferior), mantenidos en su caja nido y sincronizados no-fóticamente por amamantamiento. La barra indica el momento en que la hembra lactante tuvo acceso a las crías para amamantarlas.

En la actualidad no existen reportes en la literatura en relación a los correlatos anatómicos sobre la influencia del amamantamiento sobre el sistema circadiano de neonatos en ninguna especie, por lo que el presente estudio, mismo que forma parte de una línea de investigación sobre el tema más amplio, es una primera aproximación en la que se explora el funcionamiento del marcapaso circadiano ubicado en el NSQ, de conejos amamantados cada 24 horas.

III. OBJETIVOS

Determinar si los genes reloj *Per1* y *Per2* se expresan en el sistema nervioso central del conejo europeo.

Obtener el perfil temporal de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el núcleo supraquiasmático de conejos neonatos amamantados cada 24 horas.

Obtener el perfil temporal de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el núcleo supraquiasmático de conejos juveniles mantenidos en un ciclo luz-oscuridad de 24 horas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sujetos

El modelo experimental empleado en el presente estudio fue el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) de raza chinchilla, cuyas madres fueron mantenidas bajo un ciclo L: O (16:8, encendido de luces a las 10:00 a.m.), a temperatura ambiental controlada entre 23-27°C y extractor de aire encendido las 24 horas, con acceso a agua y alimento *ad-libitum* (*Harlan Teklad hi-fiber rabbit diet, EUA*). Las conejas fueron alojadas en jaulas de acero inoxidable (120x60x45 cm), las cuales contaban con un riel en la parte media en donde se podía deslizar una lámina para dividir la jaula en dos (Fig.11).

2. Obtención de las Crías

Con la finalidad de obtener el perfil de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ de conejos neonatos y juveniles, fueron utilizados un total de 94 conejos de ambos sexos. La obtención de conejos se realizó de la siguiente manera: fueron programados los apareamientos, en éstos fueron permitidas al menos dos cópulas, posteriormente las hembras fueron alojadas de nueva cuenta en sus jaulas durante todo el periodo de gestación (31 días). Cuatro días previos a la fecha programada de alumbramiento, se introdujo en las jaulas de las hembras una caja nido (28x29.5x30 cm) misma que contaba en una de sus caras con un orificio circular (14 cm de diámetro) que servía como entrada para la hembra (Fig. 11).

De igual forma era depositada paja dentro de la jaula con el objeto de que la hembra la recolectara y la introdujera en la caja nido, para que, junto con el pelo que se arrancara de pecho y flancos, formara el nido.

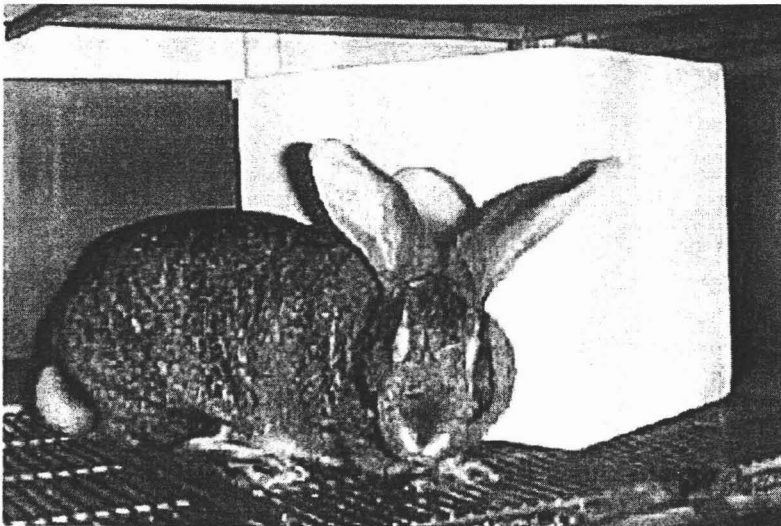


Figura 11.- Imagen en la que se muestra las condiciones en las que fueron alojadas las hembras gestantes. Días previos a la fecha de parto, fueron colocadas las cajas nido dentro de la jaula en la que residían las hembras gestantes, para que estas iniciaran la elaboración del nido.

En algunos casos se indujo el parto mediante la administración de oxitocina (Oxitopisa 1.4 UI/kg peso). El día del parto se estableció como día cero (D0) de edad de los gazapos, ese mismo día fue obtenido el peso corporal de las crías y se ajustaron las camadas con 8 ó 9 neonatos cada una.

Asimismo, el día de nacimiento las camadas fueron asignados de forma aleatoria a uno de los siguientes grupos:

2.1 Grupo de Neonatos Mantenidos en Oscuridad, Amantados Cada 24 Horas

Este grupo estuvo conformado por 54 gazapos neonatos de ambos sexos, los cuales fueron obtenidos de 10 diferentes camadas. El día de nacimiento las crías permanecieron con la madre aproximadamente 6 horas o hasta la ocurrencia del primer evento de amamantamiento, posteriormente se cubrió la caja nido con una funda de tela negra reforzada por dentro, para aislar a las crías de la iluminación ambiental. También fue colocada la lámina divisoria en la jaula para impedir la entrada de la hembra a la caja nido. La sincronización no-fótica de los neonatos se inició el día 1 de edad, permitiendo el acceso de la hembra a la caja nido para amamantar a las crías, esto se realizó removiendo la lámina divisoria y la funda cada 24 horas, dicha manipulación se realizó durante la fase de oscuridad de la hembra (una hora antes del inicio de la fase de luz). Fue elegido ese horario de amamantamiento debido a que en condiciones naturales esta ocurre en dicha fase del ciclo. La sincronización no-fótica por amamantamiento se realizó durante siete días consecutivos (D1 al D7); al séptimo día, los neonatos fueron sacrificados para obtener el perfil de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ. Fue seleccionada ésta edad como día de sacrificio debido a que la apertura de los ojos ocurre aproximadamente el día 9 o 10 de edad, con lo que podemos eliminar la posible influencia de señales fóticas sobre el proceso bajo estudio.

2.2 Grupo de juveniles mantenidos bajo un ciclo luz-oscuridad (L: O)

Conformado por 40 conejos de ambos sexos de 45 días de edad, los cuales fueron obtenidos de 7 diferentes camadas. Desde el día de nacimiento estos animales fueron mantenidos con la hembra y bajo el mismo ciclo de iluminación de la hembra lactante. El día 25 de edad los conejos fueron destetados y colocados en grupos de 15 sujetos en cada jaula, con libre acceso a agua y alimento. Con la finalidad de sincronizar fóticamente a éste grupo, estos fueron mantenidos en ciclo L: O (16 horas de luz y 8 de oscuridad) hasta el día 45 de edad. El día 45 los sujetos fueron sacrificados para obtener el perfil de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ.

2.3 Obtención y tratamiento del tejido

Los sujetos de ambos grupos fueron sacrificados cada 3 horas para cubrir un ciclo completo, es decir, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 (de tres a cinco sujetos por grupo) horas tras el inicio de la señal sincronizadora, que para el caso de los neonatos fue el momento que tuvo acceso la hembra a la caja nido (9:00 a.m. hora geográfica) y para los juveniles sincronizados fóticamente fue el inicio de la fase de luz (10:00 a.m. hora geográfica). Cabe hacer mención que los sujetos de una misma camada fueron sacrificados a lo largo del ciclo, tratando de abarcar los 8 puntos de muestreo.

Para la obtención de tejido cerebral, los sujetos fueron eutanizados en una cámara de CO₂, pesados y posteriormente decapitados para extraer el cerebro (Fig. 12). El tejido fue inmediatamente congelado (con 2-Metil-butano, JT Baker, USA) y mantenido a -20°C.

Posteriormente con la ayuda de un crióstato fueron obtenidas secciones coronales de 16 μm de espesor las cuales fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y estériles (Fig. 12). Las laminillas se mantuvieron almacenadas a -70°C hasta el momento de elaborar la detección de genes reloj *Per1* y *Per2* mediante Hibridación *In Situ* (HIS).

2.4 Detección de los genes reloj

Fue implementada la técnica de hibridación *in situ*, debido a que la detección de estos genes es considerado un eficiente marcador funcional del NSQ.

Para realizar la detección de los genes reloj *Per1* y *Per2*, fueron utilizados plásmidos amablemente donados por el Dr. Steven M. Reppert (Massachusetts General Hospital y Harvard Medical School, EUA, investigador pionero en el área). Mediante un procedimiento estándar los plásmidos fueron incorporados a bacterias competentes DH5 α , después las células transformadas fueron sembradas para obtener colonias de bacterias con el plásmido insertado. Posteriormente, estas bacterias con el plásmido insertado fueron amplificadas, incubadas a 37°C , en agitación orbital durante 12 horas, para luego realizar el lisado del plásmido, utilizando para ello, un kit de Midi-Prep (Quiagen Plasmid Midi Kit, EUA). Una vez obtenido el plásmido lisado con una concentración de $1\mu\text{m}/\mu\text{l}$, se realizó la linearización del plásmido, durante 12 horas, mediante enzimas de restricción (éstas fueron seleccionadas de acuerdo al gen y si era sentido* o anti-sentido*). Se corroboró la linearización del plásmido por medio de electroforesis.

Finalmente, se realizó la transcripción *in vitro* de la sonda mediante un kit de transcripción SP6/T7 (Maxi script *in Vitro* transcription kit SP6/T7, Ambion Inc., EUA), y uridina marcada con un radionúclido ^{35}S (α -thio)-trifosfato, además, se usaron enzimas polimerasas las cuales fueron elegidas según el plásmido, en el caso de *Per1* fue utilizada SP6 para la sonda sentido y T7 para la sonda anti- sentido. Mientras que para *Per2* fue utilizada T7 para la sonda sentido y SP6 para la sonda anti- sentido.

Mediante un protocolo estándar las sondas fueron purificadas. Una vez obtenida la sonda, ésta fue cuantificada en un contador de centelleo (Gene Quant pro *RNA/DNA* Calculador, 80-2110-89/99, Amershan Pharmacia Biotech, EUA) descartando aquella cuyo valor no se encontrara dentro del rango 500,000-1,000,000 dpm*/ $1\mu\text{l}$ de sonda.

Siguiendo una técnica estándar se realizó la HIS (Caldelas et al. 2003), primero se realizó la *pre-hibridación*, en la que se trato el tejido de la siguiente forma: primero se fijo el tejido con paraformaldehído al 4%, luego se permeabilizó con trietanolamina 1M, se acetiló con un amortiguador Tris(hidroximetil)aminometano y Glicina, finalmente el tejido se deshidrató mediante concentraciones crecientes de etanol (Fig. 12). Posteriormente, se realizó la hibridación (Fig. 12), por lo que se cubrió el tejido con la sonda marcada radiactivamente y se dejó hibridando durante 12 horas a 54°C . Pasado éste tiempo se retiró la sonda y realizaron los baños de astringencia o post-hibridación (Fig. 12) utilizando para ésta concentraciones decrecientes y a diferentes temperaturas de un amortiguador cloruro de sodio, citrato de sodio, finalmente se deshidrató el tejido mediante concentraciones crecientes de etanol.

Posteriormente se dejó secar las laminillas y fueron acomodadas en casetes de autoradiografía colocando sobre éstas una película durante 20 días, a temperatura ambiente (Fig. 12). Transcurrido éste tiempo se reveló la película para observar el precipitado de moléculas de plata y se procedió a cuantificar ésta marca mediante un programa de análisis de imágenes (MCID, Image Research Inc., Canadá).

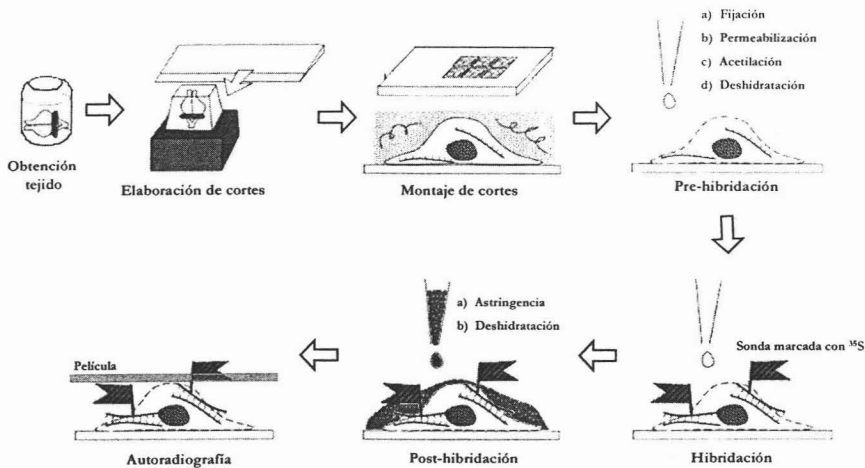


Figura 12.- Representación esquemática de la detección de genes reloj mediante hibridación in situ, con oligodeoxinucleótidos marcados radiactivamente. Para mayor detalle ver texto.

Cabe destacar que los cerebros de los dos grupos experimentales fueron procesados al mismo tiempo, utilizando la misma sonda radioactiva, las mismas temperaturas y los mismos tiempos de exposición en la auto-radiografía.

3. Análisis de Datos

3.1 Cuantificación de la Señal en las Películas de Auto-Radiografía

Se hizo la medición de los niveles de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* mediante el programa MCID (Image Research Inc., Canadá), el parámetro que se obtuvo fue la densidad óptica relativa de las películas. Al valor obtenido cuantificando la expresión en el NSQ se le sustrajo el valor del fondo correspondiente al hipotálamo adyacente. Cada punto de muestreo contaba con al menos 4 sujetos, de los cuales se cuantifico al menos tres cortes. Posteriormente se obtuvo el promedio por sujeto y después el promedio por cada punto del ciclo muestreado. Se reportó media y error estándar.

3.2 Análisis Estadístico

Con la finalidad de establecer si hay diferencias significativas en los niveles de expresión de genes reloj a lo largo del ciclo, se aplicó una ANOVA de una vía para cada uno de los genes bajo estudio.

También se realizó un ajuste COSINOR Medio (ver Anexo I), es decir, se ajustaron los datos obtenidos a una función cosenoidal para determinar:

- 1) Porcentaje de ritmicidad del perfil de expresión.
- 2) Amplitud del ritmo.
- 3) Acrofase de expresión.

V. RESULTADOS

Con la finalidad de comprobar que la restricción del acceso a las crías por parte de la hembra no tuvo influencia en el crecimiento de los neonatos, se pesó a éstos el D0 y el D7 y se constató que en ambos días muestran un promedio de peso de $53.6 \pm 9.3\text{gr}$ para el D0 y, de $110.8 \pm 26.7\text{gr}$ para el D7, valores que están dentro del rango normal según lo reportado en otros estudios elaborados por Hudson et al. (1996a) y Drummond et al. (2000).

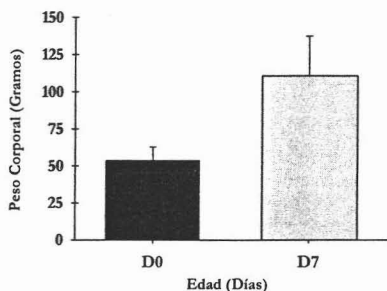


Figura13.- Promedio de peso corporal de los conejos neonatos los días 0 y 7 de edad.

En las películas de auto-radiografía observamos una expresión de los genes *Per1* y *Per2* en diferentes estructuras del sistema nervioso central tales como el hipotálamo anterior ventral (en donde se ubica el NSQ), el núcleo paraventricular hipotalámico, la corteza piriforme y el bulbo olfativo (Fig. 14).

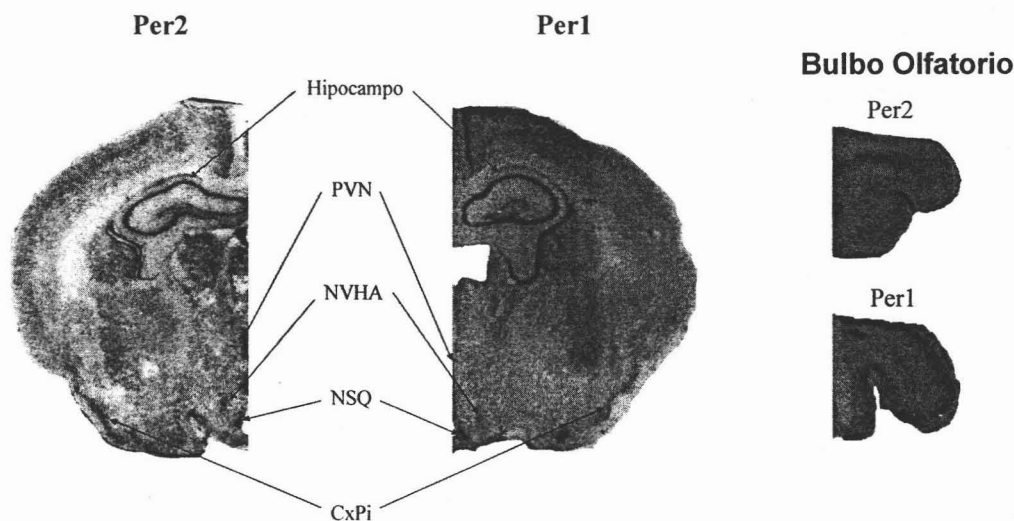


Figura14.- Micrografías representativas de la expresión de *Per1* y *Per2* en diferentes estructuras del sistema nervioso central de conejos neonatos. Tales como el Hipocampo, el núcleo ventral del hipotálamo anterior (NVHA), el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), la corteza piriforme (CxPi), el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) y el bulbo olfativo.

En secciones coronales cerebrales (Fig. 15) fue evidente una abundante expresión de *Per1* y *Per2*, en el NSQ. La expresión de estos genes reloj en el sistema central del conejo fue específica, debido a que no se observó señal con la sonda sentido.

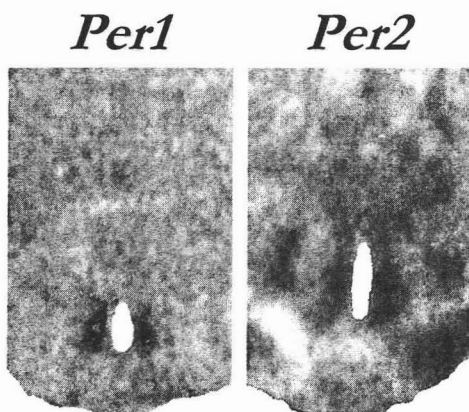


Figura 15.- Expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ de conejos neonatos. La detección de estos genes se realizó mediante hibridación in situ con oligodeoxinucleótidos marcados radiactivamente.

Conejos Neonatos Mantenidos en Oscuridad, Amantados Cada 24 Horas

Se encontró una abundante expresión de los genes *Per1* y *Per2* en el NSQ de conejos neonatos mantenidos bajo condiciones de oscuridad continua y que tuvieron acceso cada 24 horas a la hembra lactante (Fig. 15a). En la obtención del perfil temporal de expresión de estos genes en este grupo de neonatos, encontramos que los niveles de expresión de estos genes reloj cambia a lo largo del tiempo, lo cual fue corroborado estadísticamente (F: 6.30; $P < 0.005$ y F: 4.5; $P < 0.004$ para *Per1* y *Per2* respectivamente) y mediante el ajuste COSINOR se observó que la expresión de ambos genes mostrará más de un 70% de ritmicidad (Tabla 1).

	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>
Mesor	0.03	0.05
Acrofase (horas)	8.18	10.00
Ritmicidad	72.2%	79.5%
Región de Confianza	6.5	9.73
F	5.79	5.79

Tabla 1: Resultados del ajuste a COSINOR de la expresión de los genes *Per1* y *Per2* en el núcleo supraquiasmático de conejos neonatos de 7 días de edad mantenidos en oscuridad continua y amantados cada 24 horas .

En este grupo de neonatos también encontramos que los niveles de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ fueron altos después de que la hembra lactante tuvo acceso a las crías (Fig. 16a y b), 10 horas después a este momento comenzaron a disminuir de forma significativas los niveles de mRNA de ambos genes reloj (Fig. 16b).

Por otra parte, la acrofase de expresión de *Per1* ocurrió 8.2 horas posteriores al momento en que la hembra tuvo acceso a las crías, mientras que para *Per2* ocurrió 10 horas después (Fig. 16a y b; Tabla 1). En este grupo de animales fue evidente que el máximo niveles de expresión de *Per1* ocurrió aproximadamente 2 horas antes que el de *Per2*.

Grupo de juveniles mantenidos bajo un ciclo luz-oscuridad (L: O)

Respecto a la expresión de los genes *Per1* y *Per2* en el NSQ de conejos juveniles mantenidos bajo un ciclo luz: oscuridad, encontramos que los niveles de expresión de estos genes reloj cambia a lo largo del tiempo, lo cual fue corroborado estadísticamente ($P < 0.05$; F: 3.49 y $P < 0.007$; F: 5.06, para *Per1* y *Per2* respectivamente) y mediante el ajuste COSINOR, se observó que los niveles de expresión de ambos genes mostraron más de un 90% de ritmicidad (Tabla 2).

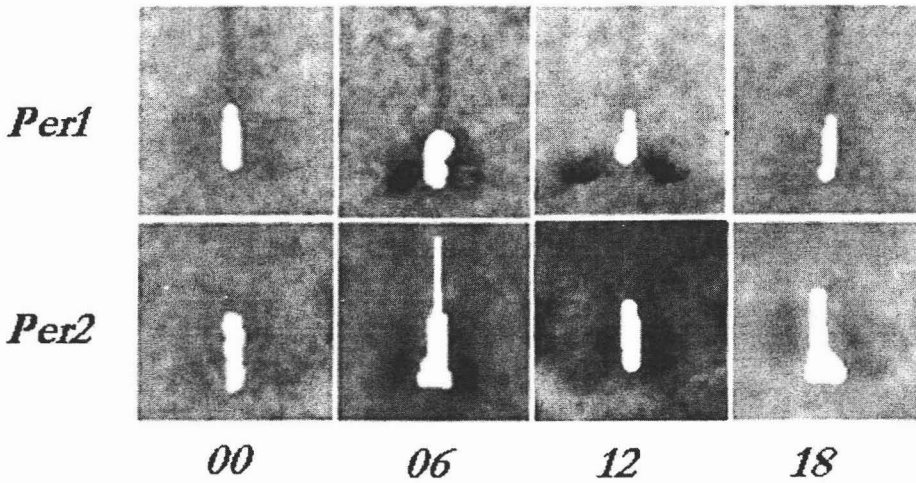
	<i>Per1</i>	<i>Per2</i>
Mesor	0.025	0.04
Acrofase (horas)	6.30	10.54
Ritmicidad	90.8%	93.2%
Región de Confianza	19.3	12.4
F	6.9	6.9

Tabla 2: Resultados del ajuste a COSINOR de la expresión de los genes *Per1* y *Per2* en el núcleo supraquiasmático de conejos juveniles sincronizados a un ciclo luz-oscuridad.

Además, en este grupo de conejos juveniles mostraron niveles de expresión los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ altos durante la fase de luz (Fig. 17a), mientras que durante la fase oscura disminuyeron de forma significativa (F: 3.49; $P < 0.05$ y F: 5.06; $P < 0.007$, para *Per1* y *Per2* respectivamente).

En relación a la acrofase de expresión de los genes reloj bajo estudio, el ajuste COSINOR reveló que el nivel máximo ocurrió 6.30 horas después del inicio de la fase de luz para *Per1*. Mientras que, para *Per2* ocurrió 10.54 horas después del inicio de la fase de luz (Fig. 17b; Tabla 2). Es decir, la acrofase de expresión de *Per1* ocurrió aproximadamente 4 horas antes que la de *Per2*.

a



b

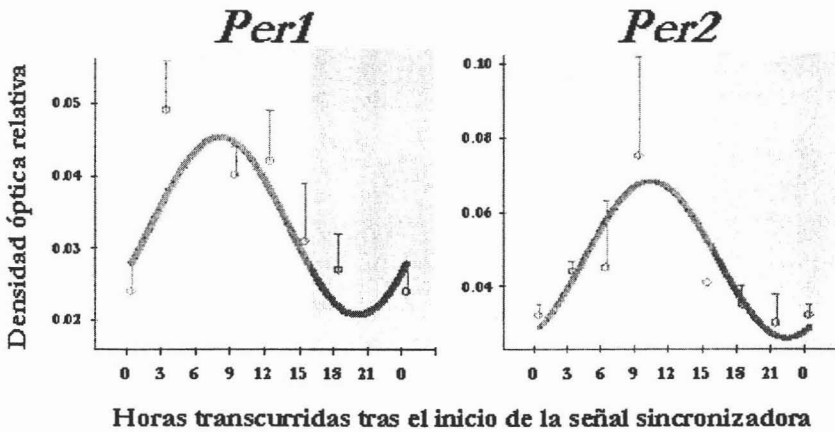
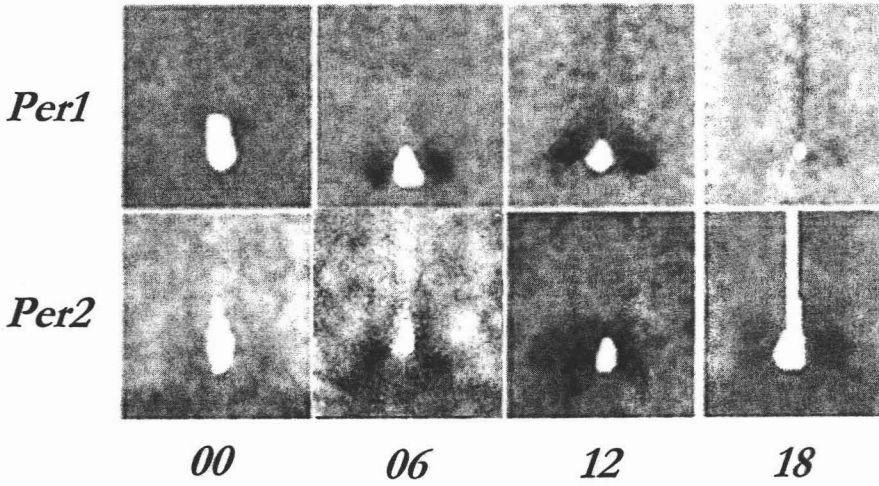


Figura 16.-

Expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ de conejos neonatos de 7 días de edad mantenidos en oscuridad continua y con acceso a la hembra lactante cada 24 horas (indicado con 0). [a] Fotomicrografías representativas de la expresión de *Per1* y *Per2* a diferentes fases del ciclo, en el NSQ de conejos neonatos. [b] Perfiles de los niveles de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ de este mismo grupo de animales, ajustados a una función senoidal (media \pm E.E.). La zona oscura de la gráfica indica la noche subjetiva mientras que la zona clara indica el día subjetivo.

a



b

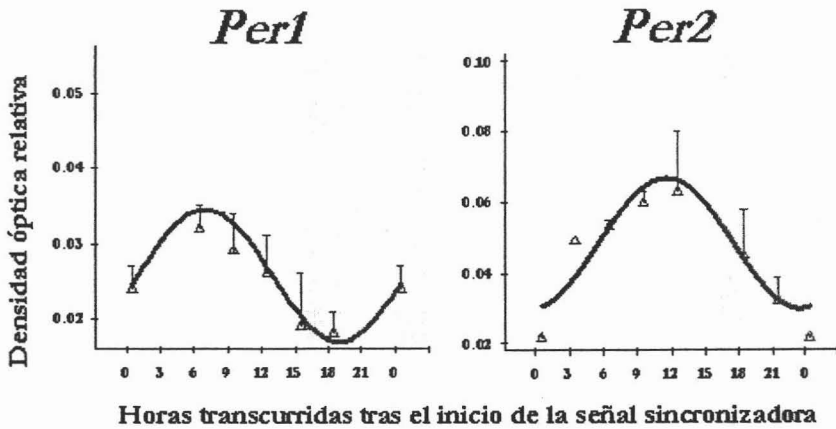


Figura 17.-

Expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ de conejos juveniles mantenidos bajo un ciclo luz: oscuridad (16:8). [a] Fotomicrografías representativas de la expresión de *Per1* y *Per2* a diferentes fases del ciclo en este núcleo hipotalámico. [b] Perfiles de los niveles de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el NSQ de este mismo grupo de animales, ajustados a una función cosenosoidal (media \pm E.E.). La zona oscura de la gráfica indica la noche subjetiva, mientras que la zona clara, el día subjetivo.

Una de las diferencias más notorias en la expresión de *Per1* y *Per2* en el NSQ de los conejos neonatos y los juveniles, fueron los niveles de mRNA medidos en ambos grupos de animales, en donde el mesor* de los conejos neonatos fue superior al obtenido en los juveniles, en el caso de *Per1* se observó una diferencia de aproximadamente del 16% entre ambos grupos de conejos, mientras que para *Per2* fue aproximadamente del 12%.

Sin embargo, llama la atención que la acrofase de expresión tanto de *Per1* como de *Per2* fueron similares en ambos grupos de animales, ya que la acrofase en la expresión de ambos genes de los neonatos mantenidos en oscuridad continua, así como, de los juveniles mantenidos bajo un ciclo luz- oscuridad, ocurre dentro de las 10 primeras horas tras la presentación de la señal sincronizadora (presencia de la hembra en el nido o el inicio fase de luz). Sin embargo, difieren las latencias en la ocurrencia de la acrofase de expresión de *Per1* y *Per2*, ya que fue menor para el caso de los neonatos sincronizados no-fóticamente (2 horas), en relación a la de los juveniles sincronizados fóticamente (4 horas).

VI. DISCUSION

Se sabe que existe expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en especies tales como hámsteres sirios (Yamamoto et al. 2001), ratas Wistar (Abe et al. 2002; Granados-Fuentes et al. 2004), ratones (Wilsbacher et al. 2002) y en *arvicantis Ansorgei* (Caldelas et al. 2003); esto sugiere que, al igual que en otras especies de mamíferos, homólogos de los genes reloj *Per1* y *Per2* también se expresan en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Un hallazgo importante en la presente investigación es la detección de los genes reloj *Per1* y *Per2* en diferentes estructuras del cerebro del conejo europeo, entre estas se encuentran el hipotálamo anterior ventral, el núcleo paraventricular hipotalámico, el núcleo paraventricular talámico, el hipocampo, la corteza piriforme, el bulbo olfativo y, en particular, el núcleo supraquiasmático (*NSQ*) sitio del principal marcador circadiano en mamíferos. Se observó que la expresión de estos genes reloj en el *NSQ* conejo es similar a la observada en otras especies, la única diferencia es que la expresión se observa en cortes más rostrales en comparación a otros mamíferos, debido a que el *NSQ* en conejos inicia en secciones más anteriores del hipotálamo y su extensión en el eje rostro-caudal es de aproximadamente 900 μ m.

En relación al perfil de expresión de los genes reloj en el *NSQ* de conejos juveniles mantenidos bajo un ciclo luz-oscuridad, mostraron un evidente patrón diurno en la expresión *Per1* y *Per2*, en donde los niveles de mRNA fueron altos durante la fase de luz y disminuyeron de forma significativa durante la fase oscura.

En los últimos años ha sido estudiado exhaustivamente el impacto de señales fóticas sobre el funcionamiento del marcapaso circadiano y actualmente se cuenta con un gran número de evidencias sobre cómo esta señal sincronizadora actúa sobre la maquinaria molecular del *NSQ* de roedores (Reppert y Weaver, 2001) y cabe destacar que el perfil de expresión obtenido en los conejos juveniles mantenidos bajo un ciclo luz-oscuridad, muestra estrechas similitudes con el descrito en otras especies (Reppert y Weaver, 2001). En el presente estudio, los conejos juveniles fueron mantenidos bajo un fotoperiodo largo (16 horas de luz, 8 de oscuridad), bajo estas condiciones observamos que la acrofase de *Per1* y *Per2* en el *NSQ* ocurre durante la fase de luz, además encontramos que primero ocurría el pico de expresión de *Per1* y 4 horas después se ocurría el de *Per2*. Resultados similares han sido reportados en roedores adultos sincronizados por fotoperiodos largos, en donde la mayor abundancia de mRNA en el *NSQ* tienen lugar durante la fase de luz, al igual que en los conejos juveniles primero ocurre el pico de expresión de *Per1* (Tournier et al. 2003; Sumová et al. 2003; Carr et al. 2003) y 3 ó 4 horas después ocurre el pico de expresión de *Per2* (Tournier et al. 2003; Carr et al. 2003). Los resultados en éste trabajo revelan que el perfil de expresión de los genes *Per1* y *Per2* en el *NSQ* de conejos europeo juveniles mantenidos en un ciclo L: O muestra estrechas similitudes con otras especies de mamíferos. Asimismo los datos sugieren que la expresión de los genes reloj en el *NSQ* de conejos también son modulados por señales sincronizadoras fóticas, tal como ocurre en un gran número de mamíferos, en una condición que ha sido exhaustivamente estudiada (Reppert y Weaver, 2001), es decir bajo la influencia de señales sincronizadoras fóticas.

En relación a los conejos neonatos que tuvieron acceso a la hembra cada 24 horas, y con base en el promedio de los pesos corporales obtenidos de estos, fue evidente que esta manipulación no tuvo efectos significativos en la ganancia de peso corporal, debido a que estudios previos realizados en la misma cepa de conejos reportan pesos corporales similares a los obtenidos en nuestros animales el día 7 de edad (Hudson et al. 1996a). Resultados que concuerdan también con las observaciones hechas en campo, donde las hembras lactantes no permanecen en el nido, pero las crías muestran un incremento sucesivo en su peso corporal.

En relación al perfil de expresión de los genes reloj en el *NSQ* del grupo de neonatos mantenidos en oscuridad continua con acceso a la hembra lactante cada 24 horas durante 7

días consecutivos, se observó un patrón rítmico en la expresión de *Per1* y *Per2* en el NSQ, donde los niveles del mRNA de ambos genes comenzaron a incrementarse 3 horas después de que la hembra tuvo acceso al nido, alcanzando sus niveles máximos entre 8 y 10 horas posteriores a este suceso. Finalmente, los niveles de ambos genes reloj disminuyeron de forma significativa entre 18 y 21 horas tras la presencia de la hembra en el nido. Estos patrones rítmicos en la expresión de *Per1* y *Per2* nos sugieren, que el funcionamiento del NSQ de los conejos neonatos puede estar sincronizado por señales no-fólicas provenientes de la hembra lactante. Existen evidencias experimentales que demuestran que en el conejo europeo las señales provenientes de la hembra lactante funcionan como potentes señales sincronizadoras no-fólicas (Jilge y Hudson, 2001), lo cual ha sido corroborado a nivel conductual (Hudson y Distel 1982, 1989), así como a nivel fisiológico (Jilge et al. 2000, 2001), por lo que se tiene evidencias a diferentes niveles de funcionamiento, sobre la eficacia de estas señales sincronizadoras no-fólicas del sistema circadiano del conejo europeo en desarrollo. Sin embargo, se requiere elaborar otras manipulaciones experimentales para corroborar que cambios de fase de esta señal no-fólica, produce también cambios en el funcionamiento del NSQ, así como establecer la naturaleza de las señales provenientes de la madre que funcionan como señales sincronizadoras, estudios que están en proceso.

Estudios recientes realizados por Ohta et al. (2002, 2003) abordaron el estudio de la sincronización no-fólica en neonatos de ratas ciegas por enucleación, en esta especie encontraron que, debido a los intensos cuidados maternos propios de esta especie, la privación materna funciona como una señal no-fólica más eficaz que la presentación continua de hembras nodrizas. Además, reportan que esta señal no-fólica es capaz de sincronizar la maquinaria molecular del NSQ de neonatos de ratas, donde los máximos niveles de expresión de *Per1* y *Per2* ocurren entre 4 y 8 horas después de que las crías tuvieron acceso a la hembra lactante (Ohta et al. 2003).

En el presente estudio, utilizando el modelo natural de sincronización no-fólica, en el que cada 24 horas la hembra lactante tiene acceso al nido, encontramos resultados similares, en donde la expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* del NSQ están en fase al horario de acceso de la hembra al nido, lo cual apoya la idea de la relevancia de señales sincronizadoras no-fólicas en etapas tempranas del desarrollo.

Diferentes estudios indican que el NSQ de roedores adultos se sincroniza a señales no-fólicas tales como la restricción hipocalórica de alimento (Caldelas et al. 2005) y la administración de melatonina (Poirel et al. 2003). Asimismo, se ha encontrado que la administración aguda de algunos fármacos o manipulaciones de los animales que producen cambios de fase a nivel conductual, también modulan la expresión de los genes reloj en el NSQ, tales como agonistas serotoninérgicos (Horikawa et al. 2000; Caldelas et al. 2005b), neuropéptido Y (Maywood et al. 2002); exposición a ruedas de actividad (Maywood et al. 1999; Yanielli et al. 2002) entre otros. Por lo que es evidente que la actividad del NSQ puede ser modulada por señales no-fólicas, aún en edades adultas cuando el sistema circadiano es predominantemente sensible a señales fólicas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, los genes *Per1* y *Per2* se expresan en diferentes estructuras del sistema nervioso central del conejo europeo. Entre estas, encontramos una abundante expresión de estos genes reloj en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, sitio en el que se ubica el principal marcapaso circadiano de mamíferos. Asimismo, en este núcleo hipotalámico encontramos un patrón rítmico en la expresión de estos genes tanto en conejos juveniles mantenidos en un ciclo luz-oscuridad, como en conejos neonatos mantenidos en oscuridad continua y que cada 24 horas la hembra lactante tuvo acceso al nido. Perfiles de expresión que corresponden a conejos juveniles sincronizados por señales fólicas y a neonatos sincronizados por señales no-fólicas.

Es importante notar que si bien éste estudio se enfoca al estudio de la ritmicidad en procesos biológicos básicos, no debemos olvidar que para el campo de la Psicología, es de

suma importancia contar con un mayor conocimiento de los procesos que ocurren en los organismos esto será de mucha ayuda para en un futuro aplicar éste tipo de conocimientos en casos clínicos, por ejemplo, el estudio de las características rítmicas en diversas patologías y casos clínicos, como es el caso de la depresión, el trastorno de retraso de fase familiar, el *jetlag*, los accidentes causados por falta de atención en trabajadores con horarios de trabajo variables o mixtos, el trastorno por déficit de atención, el efecto de un determinado fármaco en casos de cáncer, un mejor desempeño de los alumnos al impartir las clases de determinada duración coincidiendo con los ritmos de atenci

VII. CONCLUSIONES

1. Los genes reloj *Per1* y *Per2* se expresan abundantemente en el sistema nervioso central de conejos.
2. Conejos neonatos mantenidos en oscuridad constante y con acceso cada 24 horas a la hembra lactante, muestran un patrón rítmico en los niveles de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el núcleo supraquiasmático.
3. Conejos juveniles mantenidos bajo un ciclo luz-oscuridad, muestran un perfil diurno en los niveles de expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2* en el núcleo supraquiasmático.

VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ◆ Realizar estudios de cambio de fase del horario de amamantamiento, para corroborar que el NSQ responde y se sincroniza a señales no-fólicas durante el desarrollo temprano.
- ◆ Identificar los mecanismos que participan en la anticipación al amamantamiento.
- ◆ Identificar que señales presentes durante el evento de amamantamiento funcionan como señales sincronizadoras no-fólicas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abe M, Herzog ED, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M, Block GD (2002) Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.* 22: 350-356.

Aguilar-Roblero R, Granados-Fuentes D, Caldelas I, Salazar-Juárez A, Escobar C (2002) Bases neurales de la cronobiología humana: El sistema circadiano distribuido. En: Golombek D (Ed.) *Cronobiología humana: ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad* (67-83). Argentina: Universidad Nacional de Quilmas.

Allingham K, von Saldern C, Brennan PA, Distel H, Hudson R (1998) Endogenous expression of c-Fos in hypothalamic nuclei of neonatal rabbits coincides with their circadian pattern of suckling-associated arousal. *Brain Res.* 783: 210-218.

Antle M, LeSauter J, Silver R (2005): Neurogenesis and ontogeny of specific cell phenotypes within the hamster suprachiasmatic nucleus. *Dev. Brain Res.* 157: 8-18.

Aschoff J (1981) A survey of biological rhythms. En: Aschoff J (Ed.) *Handbook of Behavioral Neurobiology.* (Vol.4, pp. 3-10) New York: Plenum Press.

Azmita EC, Segal M (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal median raphe in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179: 641-668.

Balsalobre A (2002) Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 309: 193-199.

Bell-Pedersen B, Cassone V, Earnest D, Golden S, Hardin P, Thomas TL, Zoran M (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat. Rev. Genet.* 6: 544-56.

Buijs RM (1996) The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus. *Prog. Brain Res.* 111: 229-40.

Caldelas I, Poirel V-J, Sicard B, Pévet P, Challet (2003) Circadian profile and photic regulation of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of a diurnal mammal, *Arvicanthis ansorgei*. *Neuroscience* 116: 583-591.

Caldelas I, Chimal-Monroy J, Martínez-Gómez M, Hudson R (2005a) Non-photocircadian entrainment in mammals: A brief review and proposal for study during development. *Biol. Rhythms Res.* 36: 23-37.

Caldelas I, Challet E, Saboureau M, Pévet P (2005b) Light and melatonin inhibit in vivo serotonergic phase advances without altering serotonergic-induced decrease of *Per1* expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *J.Mol. Neurosci.* 25: 53-63.

Caldelas I, Feillet CA, Dardente H, Eclancher F, Malan A, Gourmelen S, Pévet P, Challet E (2005c) Timed hypocaloric feeding and melatonin synchronize the suprachiasmatic clockwork in rats, but with opposite timing of behavioral output. *Euro. J. Neurosci.* 22: 921-929.

- Card J, Moore R (1989) Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J. Comp. Neurol.* 284: 135-147.
- Carr A, Johnston JD, Semikhodskii AG, Nolan T, Cagampang FRA, Stirland JA, Loudon AS (2003) Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. *Current Biol.* 13: 1543-1548.
- Cermakian N, Sassone-Corsi P (2000) Multilevel regulation of the circadian clock. *Nature Rev.* 1: 59-67.
- Challet E, Caldelas I, Graff C, Pévet P (2003) Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol. Chem.* 384: 711 -719.
- Chang DC, Reppert S (2001) The circadian clocks of mice and men. *Neuron* 29: 555-558.
- Davis FC (1981) Ontogeny of circadian rhythms. En: Aschoff J (Ed.) *Handbook of Behavioral Neurobiology* (4: 257-274) New York: Plenum Press.
- Davis FC, Gorski RA (1985) Development of hamster circadian rhythms: prenatal entrainment of the pacemaker. *J. Biol. Rhythms* 1: 77-89.
- Deguchi T (1975) Ontogenesis of a biological clock for serotonin:acetyl coenzyme A N-acetyltransferase in pineal gland of rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72: 2814-2818.
- Drucker-Colin R, Aguilar-Roblero R, García-Hernández F, Fernández-Cansino F, Bermudez-Rattoni F (1984) Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythms recovery of lesioned rats. *Brain Res.*, 311: 353-357.
- Drummond H, Vázquez E, Sánchez-Colón S, Martínez-Gómez M, Hudson R (2000) Competition for milk in the domestic rabbit: survivors benefit from littermate deaths. *Ethology* 106: 511-526.
- Enright JT (1981) Data analysis. En: Aschoff J (Ed.) *Handbook of Behavioral Neurobiology* (4: 21-38) New York: Plenum Press.
- Gachon F, Nagoshi E, Brown SA, Ripperger J, Schibler U (2004) The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Cromosoma* 113:103-12.
- García-Hernández F, Aguilar-Roblero R, Drucker-Colín R (1987) Transplantation of the fetal occipital cortex to the third ventricle of SCN-lesioned rats induces a diurnal rhythm in drinking behavior. *Brain Res.* 418: 193-197.
- Golombek D (2002) Introducción: La máquina del tiempo. En: Golombek D, (Ed.) *Cronobiología Humana. Ritmos y Relojes Biológicos en la Salud y en la Enfermedad* (19-29) Argentina: Universidad Nacional de Quilmes Ediciones.
- Green DJ, Gillette R (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245: 198-200.
- Groos G, Hendriks J (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurons recorded in vitro. *Neurosci. Lett.* 34: 283-288.

Granados-Fuentes D, Salazar A, Vergara P, Escandón J, Vega A, Aguilar-Roblero R, (1995) Los ritmos circádicos en mamíferos, conceptos, implicaciones y bases biológicas. En: Velázquez J (Ed.) *Temas Selectos de Neurociencias* (433-458) M

Granados-Fuentes D, Prolo LM, Abraham U, Herzog ED (2004) The suprachiasmatic nucleus entrains, but does not sustain, circadian rhythmicity in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* 24: 615-619.

Halberg F (1959) Physiologic 24-hour periodicity: general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Vitamin-Hormon-Fermentforsch* 10: 225-296.

Hardin PE, Hall JC, Rosbash M (1990): Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343: 536 – 540.

Harrington ME, Nance DM, Rusak B (1985) Neuropeptide Y immunoreactivity in the hamster geniculo-suprachiasmatic tract. *Brain Res. Bull.* 15: 465-72.

Hiroshige T, Honma K, Watanabe K (1982) Prenatal onset and maternal modifications of the circadian rhythm of plasma corticosterone in blind infantile rats. *J. Physiol.* 325: 521-532.

Honma K, Honma S, Shirakawa T, Hiroshige T (1987) Phase setting of circadian locomotor rhythm of infant rats. *Am. J. Physiol.* 252: R256-R61.

Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y, Honma K (2002) Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419: 841-844.

Horikawa K, Yokota S, Fuji K, Akiyama M, Moriya T, Okamura H, Shibata S (2000) Nonphotic entrainment by 5-HT_{1A/7} receptor agonist accompanied by reduced Per1 and Per2 mRNA levels in the suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.* 20: 5867-5873.

Hudson R, Distel H (1982): The pattern of behaviour of rabbit pups in the nest. *Behaviour* 79:255-271.

Hudson R, Distel H (1983): Nipple location by newborn rabbits: Behavioral evidence for feromonal guidance. *Behaviour* 85: 260-275.

Hudson R, Distel H (1989) The temporal pattern of suckling in rabbit pups: a model of circadian synchrony between mother and young. En: Reppert SM, (Ed.) *Development of Circadian Rhythmicity and Photoperiodism in Mammals*.(83-102) Boston: Perinatology Press.

Hudson R, Distel H (1995) On the nature and action of the rabbit nipple-search pheromone: review. En: Apfelbach R, Müller-Schwarze D (Eds.) *Chemical Signals in Vertebrates VII Advances in the Biosciences* (93: 223-232) Oxford: Elsevier Science.

Hudson R, Schaal B, Bilko R, Altbäcker V (1996): Just three minutes a day: the behavior of young rabbits viewed in the context of limited maternal care, En: Lebas F (Ed), *Proc 6th World Rabbit Congress* (2: 395-403): Lempdes, Toulouse: Assoc. Francaise de cuniculture.

Hudson R (1998) Potential of the newborn rabbit for circadian rhythms research. *Biol. Rhythms Res.* 29: 546-555.

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

Jilge B (1995) Ontogeny of the rabbit's circadian rhythms without an external zeitgeber. *Physiol. Behav.* 58: 131-140.

Jilge B, Kuhnt B, Landerer W, Rest S (2000) Circadian thermoregulation in suckling rabbit pups. *J. Biol. Rhythms* 15: 329-335.

Jilge B, Hudson R (2001): Diversity and development of circadian rhythms in the European rabbit. *Chronobiol. Internat.* 18: 1-26.

Jilge B, Kuhnt B, Landerer W, Rest S (2001) Circadian thermoregulation in suckling rabbit pups and their does. *Lab. Anim. Sci.* 35: 1-10.

Johnson R, Moore R, Morin L (1989) Retinohypothalamic projections in the rat and hamster demonstrated using cholera toxin. *Brain Res.* 462: 301-312.

Klein DC (1972) Evidence for the placental transfer of 3 H-acetyl-melatonin. *Natl. New Biol.* 237: 117-8.

Liou SY, Shibata S, Ukei S (1986) Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamato and 3H-asparate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 16: 527-531.

Matsumoto S, Basil J, Jetton A, Lehman M, Bittman E (1996) Regulation of the phase and period of circadian rhythms restored by suprachiasmatic transplant. *J. Biol. Rhythms.* II: 145-162.

Maywood ES, Mrosovsky N, Field MD, Hastings JW (1999) Rapid down-regulation of mammalian Period genes during behavioral resetting of the circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 26: 15211-15216.

Maywood E S, Okamura H, y Hastings MH (2002) Opposing actions of neuropeptide Y and light on the expression of circadian clock genes in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Euro. J. Neurosci.* 15: 216–220.

Miller JD, Morin LP, Schwartz WJ, Moore RY (1996) New insights into the mammalian circadian clock. *Sleep* 19: 641-667.

Mistleberger RE (1992) Nonphotic entrainment of circadian activity rhythms in suprachiasmatic nuclei ablated hamsters. *Behav. Neurosci.* 102: 192-202.

Moore-Ede M, Sulzman FM, Fuller CA (1982) Characteristics of circadian clocks. En: The clocks that time us: physiology the circadian timing system. *Harvard University Press, Cambridge.* 31-112.

Moore RY, Heller A, Wurtman RJ, Axelrod J (1967) Visual Pathway mediating pineal response to environmental light. *Science* 155: 220-223.

Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 42: 201-206.

Moore RY, Shibata S, Bernstein M (1989) Developmental anatomy of the circadian system. En: Reppert SM (Ed.) *Developmental of Circadian Rhythmicity and Photoperiodism in Mammals. Research in Perinatal Medicine* (IX: 1-24) Boston: Perinatology Press.

Moore RY, Speh JC (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* 150: 112-116.

Moore RY (1995) Organization of the mammalian circadian system. CIBA Found Symp. 183: 88-106.

Moore RY (1996) Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog. Brain Res.* 111: 103-119.

Moore RY, Leak RK (2001) Suprachiasmatic nucleus. En: Takahashi JS, Turek FW, Moore RY (Eds.) *Circadian Clocks* (12: 141-171) New York: Kluwer Academic Plenum Publishers.

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

Morin LP (1999) Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. *Ann. Med.* 31: 12-33.

Mykytowycz R (1968): Territorial parking by rabbits. *Scic Amer* 218: 116-126.

Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F (2004) Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* 119: 693-705.

Okamura H (2003): Integration of mammalian circadian clock signals: from molecule to behavior. *J. Endocrinol.* 177: 3-6.

Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K (2002) Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expression in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with the developmental stage. *Euro. J. Neurosci.* 15: 1953-1960.

Ohta H, Honma S, Abe H, Honma K (2003) Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *Euro. J. Neurosci.* 17: 1628-1634.

Pittendrigh CS (1981) Circadian systems: General perspective. En: Aschoff J (Ed.) *Handbook of Behavioral Neurobiology* (4: 57-80) New York: Plenum Press.

Poirel VG, Boggio V, Dardente H, Pevet P, Masson-Pevet M, Gauer F (2003) Contrary to other non-photocues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Neurosci.* 120: 745-755.

Reppert SM, Chez RA, Anderson A, Klein DC (1979) Maternal-fetal transfer of melatonin in the non-human primate. *Pediatr. Res.* 13: 788-791.

Reppert SM, Schwartz WJ (1983) Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science* 220: 969-971.

Reppert SM, Coleman R, Heath H, Swedlow J (1984) Pineal N-acetyltransferase activity in 10-day-old rats: a paradigm for studying the developing circadian system. *Endocrinol.* 115: 918-925.

Reppert SM, Schwartz WJ (1986) Maternal endocrine extirpations do not abolish maternal coordination of the fetal circadian clock. *Endocrinol.* 119: 1763-1767.

Reppert SM, Uhl GR (1987) Vasopressin messenger ribonucleic acid in supraoptic and suprachiasmatic nuclei: appearance and circadian regulation during development. *Endocrinol.* 120: 2483-2487.

Reppert S, Weaver D (1989) Maternal transduction of light-dark information to the fetus. En: Smotherman WP, Robinson SR (Eds.) *Behavior of the Fetus (78-81)*, New Jersey: Telford, Caldwell.

Reppert SM (1995) Interaction between the circadian clocks of mother and fetus. *Circadian Clocks and Their Adjustment*. Wiley, Chichester, Ciba Foundation Symposium 183 Pp. 211.

Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Ann. Rev. Physiol.* 63: 647-676.

Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 419: 935-941.

Reuss S (1996): Components and connections of the circadian timing system in mammals. *Cell Tissue Res.* 285:353-378.

Schwartz WJ, Gainer H (1977) Suprachiasmatic nucleus: Use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197: 1089-1091.

Selinger M, Levitz M (1969) Diurnal variation of total plasma estriol levels in late pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29: 005-997.

Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Reppert SM (1997) Two period homologs: Circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron* 19: 1261-1269.

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

Shibata S y Moore RY (1987) Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 431, 2: 311-315.

Silver R, LeSauter J, Tresco P, Lehman M (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382: 810-813.

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

- Stephan FK (2002) The "other" circadian system: Food as a zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* 17: 284-292.
- Sumová A, Jác M, Sládek M, Šauman I, Illnerová H (2003) Clock gene daily profiles and their phase relationship in the rat suprachiasmatic nucleus are affected by photoperiod. *J. Biol. Rhythms* 18: 134-144.
- Sweeney B, Hastings JW (1960) Effect of temperature upon diurnal rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 25: 87:104.
- Taghert PH (2001) How does the circadian clock send timing information to the brain? *Cell & Dev. Biol.* 12: 329-342.
- Takahashi K, Hayafuji C., Murakami N (1982) Foster mother rat entrains circadian adrenocortical rhythm in blinded pups. *Am. J. Physiol.* 243: E443-E449.
- Tamaru T, Isojima Y, Yamada T, Okada M, Nagai K, Takamatsu K (2000) Light and glutamate-induced degradation of the circadian oscillating protein BMAL1 during the mammalian clock resetting. *J. Neurosci* 20: 7525-7530.
- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukahara C, Ozawa R, Hirose M, Sakaki Y (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene. *Nature* 389: 512-516.
- Thompson HV (1994) The rabbit in Britain. En: (Eds.) Thompson HV, King CM. *The European Rabbit, The History and biology of successful colonizer* (64-107) Oxford: Science Publications.
- Tosini G, Menaker M (1998) The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* 789: 221-228.
- Tournier BB, Menet JS, Dardente H, Poirel VJ, Malan A, Masson-Pévet M, Pévet P, Vuillez P (2003) Photoperiod differentially regulates clock genes' expression in the suprachiasmatic nucleus of Syrian hamster. *Neuroscience* 118: 317-22.
- Touitou Y, Haus E (1994) Chronobiology in laboratory medicine. En: Touitou Y, Haus E (Eds.) *Biologic rhythms and clinical and laboratory medicine.* (10: 685-690), Alemania: Springer-Verlag, Berlin.
- Valentinuzzi V (2002) Ritmos en procesos de aprendizaje y memoria. En: Golombek D, (Ed.) *Cronobiología Humana. Ritmos y Relojes Biológicos en la Salud y en la Enfermedad* (189-205) Argentina: Universidad Nacional de Quilmes.
- Van den Pool AN (1980) The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: intrinsic anatomy. *J. Comp. Neurol.* 191: 661-702.
- Watts AG (1991) The efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: anatomical insights into the control of circadian rhythms. En: Klein DC, Moore RY, Reppert SM (Eds.) *Suprachiasmatic Nucleus, The Mind's Clock* (77-106) New York: Oxford University Press,.
- Weaver D (1998) The suprachiasmatic nucleus: A 25-year retrospective. *J. Biol. Rhythms* 13: 100-112.

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14: 697-706.

Wilsbacher LD, Yamazaki S, Herzog ED, Song E, Radcliffe LA, Abe M, Block G, Spitznagel E, Menaker M, Takahashi JS (2002): Photic and circadian expression of luciferase in *mPeriod1-luc* transgenic mice *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 489-494.

Yamamoto S, Shigeyoshi Y, Ishida Y, Fukuyama T, Yamaguchi S, Yagita K, Moriya T, Shibata S, Takashima N, Okamura H (2001): Expression of the *Per1* Gene in the Hamster: Brain Atlas and Circadian Characteristics in the Suprachiasmatic Nucleus. *J. Comp. Neurol.* 430: 518-532.

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block G, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 288: 682-685.

Yannielli P C, McKinley B J, yHarrington M. E. (2002): Is novel wheel inhibition of *Per1* and *Per2* expression linked to phase shift occurrence? *Neuroscience* 112: 677-685.

Yokota SI, Horikawa K, Akiyama M, Moriya T, Ebihara S, Komuro G (2000) Inhibitory action of brotizolam on circadian and Light-induced *Per1* and *Per2* expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Br. J. Pharmacol.* 131: 1739-1747.

Zemdegs IZ, McMillen IC, Walker DW, Thorburn GD, Nowak R (1988) Diurnal rhythms in plasma melatonin concentrations in the fetal sheep and pregnant ewe during late gestation. *Endocrinol.* 123: 284-289.

Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 20: 1103-1110.

X. ANEXOS

1. Método COSINOR

Las series de tiempo sirven como base para la detección y en su caso para la descripción y cuantificación de fenómenos rítmicos, métodos cuantitativos para el análisis de éstos fenómenos tienen su origen principalmente en las matemáticas y física.

Halberg y sus colaboradores (1973, En: Reinberg y Smolensky, 1993) desarrollaron una técnica para el análisis de series de tiempo, denominado método *COSINOR*, mediante el cual es posible la obtención de tres parámetros:

- La *amplitud* (A) es el valor de la distancia entre el punto más alto (acrofase) y el punto más bajo (batifase) de una oscilación. Utilizado frecuentemente cuando se comparan diversas oscilaciones. Cuando se utiliza el método *COSINOR*, es numéricamente igual a la mitad de la extensión del cambio para un periodo considerado.
- El *mesor* (M), es la media del ritmo ajustado. Cuando el intervalo de muestreo de los datos es constante, M es igual a la media aritmética.
- La *acrofase*, se refiere al tiempo estimado para alcanzar el valor máximo de un ritmo validado para un periodo en consideración. Cuando se usa el método *COSINOR*, la *acrofase* representa el tiempo de la cresta para el mejor ajuste de los datos.

Este método se realiza a través del ajuste de la serie de tiempo por mínimos cuadrados a una función cosenoidal. Con base al siguiente modelo:

$$y(t_i) = M + A \cos(\omega t_i + \Phi)$$

En donde t_i tiempo, M mesor, A amplitud, ω frecuencia angular ($\omega=2\pi/\tau$, τ periodo, $1/\tau$ frecuencia), Φ acrofase.

Se seleccionó la función coseno, debido a que el coseno de cero, es uno, lo que proporciona una referencia de fase sencilla.

Con base en el tipo de datos recolectados debe ser utilizado *COSINOR* sencillo o *COSINOR* medio. El *COSINOR* medio es el procedimiento original aplicable para la estimación de los parámetros A y Φ , cuando se trata con tres o más series de tiempo biológicas, éste método es comúnmente aplicado para estimar las características del ritmo de un grupo o una población. El *COSINOR* sencillo es aplicable a una serie de tiempo compuesta de datos de un individuo (datos serialmente dependientes) o a un grupo de individuos (datos serialmente independientes). Cuando se trata de datos de un grupo de sujetos individuales, las series de tiempo se colocan una al final de la otra, con la opción de ajustar los datos dentro los primeros valores relativos. Para datos serialmente dependientes sólo el *COSINOR* sencillo es el método apropiado.

La aplicación del método *COSINOR* ofrece grandes ventajas para la cuantificación de fenómenos rítmicos, ya que:

- a) Permite probar objetivamente la hipótesis de que la amplitud del ritmo difiere de cero; usualmente la evidencia para la detección de un ritmo es aceptado mediante una prueba F , cuando la probabilidad ($P \leq 0.005$) de que A sea cero (Touitou y Hous; 1994).
- b) Así mismo este método estima los límites de confianza para la dispersión de la acrofase.
- c) También proporciona una aproximación de mejor ajuste o bondad de ajuste, como lo es el porcentaje de ritmicidad (PR). La mayoría de los ritmos biológicos no se asemejan de manera exacta a una función coseno, por lo que es importante determinar el porcentaje de datos incluidos en dentro de los límites de confianza.
- d) El método es idóneo cuando se trata con series de tiempo cortas.

- e) Más aún con el *COSINOR* el muestreo de datos no necesita ser fijo, ni constante; lo cual significa que los datos perdidos así como cuando se realizan muestreos por intervalos diferentes, son bien tolerados.
- f) Éste método también puede ser utilizado en diferentes periodos de prueba, con diversos armónicos, que en muchas ocasiones son necesarios para una completa descripción de la forma de la onda del ritmo.

Por otra parte éste método posee varias desventajas, ya que cuando se utiliza el método *COSINOR* en éste se asume que los datos están normalmente distribuidos alrededor de cada uno de los puntos de muestreo. Esto puede ser probado examinando los valores residuales resultantes del ajuste de la función de aproximación. Una de sus más marcadas deficiencias, es que para su aplicación es necesario conocer de manera a priori el periodo del ritmo, ya que éste método únicamente permite validar a un periodo dado.

**ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA**

2. Glosario

- **Acoplamiento:** proceso mediante el cual un oscilador ajusta su periodo y fase al de otro oscilador o marcapaso endógeno, para lograr el funcionamiento coordinado entre osciladores.
- **Acrofase:** tiempo estimado para alcanzar el valor máximo de un ritmo validado para un periodo en consideración.
- **Amplitud:** es el valor de la distancia entre el punto más alto (acrofase) y el punto más bajo (batifase) de una oscilación. Utilizado frecuentemente cuando se comparan diversas oscilaciones.
- **Angulo de fase:** valor sobre la abscisa que corresponde a la diferencia entre la fase de referencia de dos eventos oscilatorios distintos, dada en grados o cualquier otra fracción del periodo completo con referencia a un punto arbitrario definido con un valor cero. Puede ser dado en unidades de tiempo si la longitud del periodo es establecida.
- **Autosostenido:** capacidad de los ritmos biológicos para exhibir oscilaciones que no se atenúan al colocar al organismo bajo estimulación ambiental constante.
- **Cambio de fase:** desplazamiento de una oscilación a lo largo del eje temporal. Puede ocurrir instantáneamente o después de varios cíclicos transitorios.
- **Ciclo:** sucesión de acontecimientos que tienen lugar de forma repetitiva siempre en el mismo orden sin tener en cuenta el tiempo en que tienen lugar.
- **Ciclo luz-oscuridad:** sucesión de tiempo que tiene una duración de 24 horas y que se encuentra referido al movimiento de rotación de la tierra y que implica el día y la noche.
- **Control de fase:** ajuste de la fase de un ritmo en relación con una señal ambiental.
- **Cronometría:** estimación o valoración del tiempo biológico.
- **Densidad óptica relativa:** corresponde a una medida de intensidad de negro referenciado a un estándar relativo.
- **Desincronización:** pérdida en la relación previamente existente de la señal sincronizadora y un ritmo endógeno, mostrando cada uno diferentes periodos.
- **Desacoplamiento:** pérdida en la relación de fase existente entre dos o más ritmos endógenos mostrando cada uno diferentes periodos.
- **Día subjetivo:** horas de tiempo circadiano que corresponden al día en el tiempo geográfico.
- **Fase:** estado instantáneo de una oscilación dentro de un periodo, representado por el valor de la variable y todas sus derivadas en el tiempo.
- **Fotoperiodo:** duración del lapso de iluminación en un ciclo de luz-oscuridad.
- **Frecuencia:** número de veces que se repite un evento rítmico en un intervalo de tiempo. Es el recíproco del periodo.
- **HG:** hora geográfica, escala de tiempo que nos rige mundialmente.
- **Infradiano:** ritmo biológico con una frecuencia menor (periodo mayor) de 24 hrs.
- **Marcapaso circadiano:** entidad funcional capaz de mantener oscilaciones autosostenidas, que a su vez, se sincroniza a estímulos ambientales y se acopla a otros ritmos endógenos.
- **Mesor:** valor medio de un ritmo ajustado a función senoidal.
- **Noche subjetiva:** horas de tiempo circadiano que corresponden a la noche en el tiempo geográfico.
- **Oscilador o reloj biológico:** cualquier sistema biológico capaz de generar cambios cíclicos.

- **Oscilar:** presencia de un patrón recurrente dentro de cierto margen de regularidad en una variable física o biológica.
- **Oscilación espontánea:** estado de un ritmo circadiano en ausencia de agentes sincronizadores durante el cual se manifiesta el periodo endógeno del oscilador.
- **Periodo:** intervalo de tiempo que ocurre entre dos puntos de referencia idénticos de una oscilación.
- **Porcentaje de ritmicidad o bondad de ajuste:** se refiere al grado de ritmicidad de una señal, de acuerdo a la dispersión de los datos en relación al mesor.
- **Ritmicidad:** orden acompasado en la sucesión o acaecimiento de las cosas o eventos.
- **Ritmo:** ciclo que ocurre en un intervalo de tiempo constante y previsible. Este puede ser endógeno o exógeno según es generado por el propio organismo o no.
- **Ritmo biológico:** fluctuación rítmica en procesos determinantes para la supervivencia de los organismo.
- **Ritmo circadiano:** ritmo biológico autosostenido que presenta oscilaciones con capacidad de mantenerse en condiciones constantes, cuya frecuencia es próxima a la duración de un día completo. El término circadiano hace referencia a los ritmos cuya duración de la frecuencia se encuentra entre las 20 y las 28 horas como consecuencia de sincronizarse con el movimiento de rotación de la tierra.
- **Ritmo circannual:** ritmo biológico autosostenido cuya ocurrencia se relaciona con el movimiento de traslación de la tierra (365 días).
- **Ritmo circamareal:** ritmo biológico autosostenido cuya ocurrencia se relaciona con los movimientos cíclicos de las mareas.
- **Ritmo circalunar:** ritmo biológico autosostenido cuya ocurrencia se relaciona con el ciclo lunar (28 días).
- **Ritmo diurno:** fluctuación rítmica con un periodo cercano a 24 horas.
- **Ritmo endógeno:** patrón rítmico generado en el interior del organismo y que se caracteriza por ser autosostenido.
- **Ritmo exógeno:** patrón rítmico generado por influencias de señales cíclicas ambientales sobre el organismo, no es autosostenido.
- **Ritmo infradiano:** aquel que presenta una frecuencia inferior a la duración de un día completo y un periodo superior a 28 horas.
- **Ritmo ultradiano:** aquel que presenta una frecuencia superior a la duración de un día completo (24 horas) así como un periodo inferior a 20 horas.
- **RNA Antisentido:** molécula de RNA que hibrida con secuencias complementarias de RNA, por lo que sirve para detectar mRNA específico.
- **RNA Sentido:** Molécula de RNA que no hibrida ya que posee las mismas secuencias de nucleótidos que codifica la misma región.
- **Sincronización:** Capacidad de un oscilador de adecuar su periodo y su fase a la de señales cíclicas ambientales. Para que se lleve a cabo, es necesario el reconocimiento del organismo a determinada señal ambiental.
- **Sistema Circadiano:** con junto de estructuras (elementos, receptores y vías) cuya misión es organizar los ritmos de determinados procesos fisiológicos.
- **Transitorio:** Curso temporal de un ritmo endógeno, entre dos o más estados de oscilación estables
- **Ultradiano:** Ritmo biológico con una frecuencia mayor (periodo menor) a 24 hrs.
- **Zeitgeber:** Fenómeno cíclico capaz de influir en el funcionamiento de osciladores. También son conocidos como señales sincronizadoras.
- **Zeitgeber Time (ZT):** tiempo del sincronizador (zeitgeber). Cantidad de horas de 60 minutos, posteriores a la aplicación del zeitgeber.