



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
ÁREA DE PSICOFISIOLOGÍA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**MECANISMOS NEUROANATÓMICOS Y MOLECULARES
INVOLUCRADOS EN LA CONDUCTA DE ANTICIPACIÓN AL
AMAMANTAMIENTO EN CONEJOS EN DESARROLLO.**

**TESIS PARA OBTENER
EL TÍTULO DE LICENCIADO EN PSICOLOGÍA**

**PRESENTA
BELÉN RAQUEL GONZÁLEZ ULLOA**

**DIRECTOR:
DRA. IVETTE CALDELAS SÁNCHEZ**

CD. UNIVERSITARIA D.F. FEBRERO DEL 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A tí Archy:

Gracias por el apoyo incondicional que me brindaste en todo momento, tú sabes todas las que pase para alcanzar este sueño, esta tesis va dedicada a tí y a nuestro hijo.

Para tí que siempre has estado ahí

Eres la luciérnaga que ilumina mis noches sombrías,

el manantial cuando me invade la sed,

el horizonte claro en mis oscuros atardeceres,

eres lo mejor que me ha pasado en años.

Me das paz con solo escucharme

y confianza en lo que puedo llegar a ser en la vida.

Eres mi amigo, te conocí por casualidad

o solamente porque el destino te ha llevado hasta mí.

Eres todo lo que he anhelado tener,

sabes lo que pienso, siento,

como puedo reaccionar,

por eso quiero agradecerte

y decirte que puedes contar conmigo...

A mí Madre: Gracias por todo el apoyo incondicional durante toda la vida, esta tesis no hubiera sido posible sin tu apoyo

A mí Hermana: Gracias Ivette por todo el apoyo moral e incondicional que siempre me has brindado en todo momento, eres la mejor hermana que pude tener. Esta tesis va dedicada a tí con todo cariño.

A mis Tíos: Carmen, Isabel, María, Cibeles, Ricardo, Carlos y Miguel: gracias por estar ahí en los momentos más duros y también en los más felices de mi vida, por ser el gran pedestal del que pude valerme para realizar este sueño.

A mis primos: Axel, Diana y Edson por escucharme y aprender junto conmigo la teoría S. Freud. Edson, ¿recuerdas el pedúnculo cerebeloso inferior?

A mis amigas: Nitzia, Lucero, Miriam, Sandra Gorostieta, Claudia, Sandra y Nancy: Por brindarme su amistad incondicional y por darle un sentido a mi vida

A mí Directora de Tesis :

Gracias Ivette por ser un excelente guía, por aceptarme en el laboratorio sin saber absolutamente nada del área y por el apoyo incondicional en todo momento.

A la Dra. Robín y Caro: Muchas gracias por el apoyo que me brindaron en mi estancia en el laboratorio y por permitirme conocer a ese gran ser humano que llevan dentro.

A mis compañeros Estrella y Luís: gracias por brindarme su amistad y apoyo, por hacer que las jornadas en el laboratorio estuvieran llenas de vida y fueran más amenas.

A mis sinodales: por sus acertados comentarios para finalizar este proyecto.

Mtro. Alfonso Salgado Benítez

Dra. Irma Yolanda del Río Portilla

Dra. Margarita Martínez Gómez

M. en C. Julio Alejandro Prieto Sagredo

“Este trabajo de tesis se realizó gracias al apoyo de CONACYT No. 48504 y PAPIIT IN226107.”

ÍNDICE

I. ANTECEDENTES

1. Los Ritmos Biológicos	1
2. Ritmos Circadianos.....	2
3. El Núcleo Supraquiasmático, el Principal Marcapaso Circadiano en Mamíferos.....	5
➤ Las Aferencias y Eferencias al NSQ.....	8
➤ La Maquinaria Molecular del NSQ.....	10
4. Otros Osciladores Circadianos.....	12
5. El Desarrollo Temprano del Sistema Circadiano.....	13
5.1 La sincronización No-fótica Durante el Desarrollo.....	14
6. La Ritmicidad Circadiana en Conejos en Desarrollo.....	16
7. Importancia de la Ritmicidad Circadiana en los Procesos Psicológicos.....	21

I. TRABAJO EXPERIMENTAL

1. Objetivos.....	23
2. Hipótesis.....	23
3. Métodos.....	24
➤ Animales.....	24
➤ Tratamiento Experimental.....	24
➤ Condiciones de alojamiento de los animales.....	24
➤ Aislamiento.....	24
➤ Sincronización.....	24
➤ Grupos.....	25
➤ Obtención de cerebros.....	25
➤ Detección de genes reloj.....	25
➤ Análisis de Datos.....	27
➤ Cuantificación de la señal en películas de autorradiografía.....	27
➤ Análisis Estadístico.....	28
4. Resultados.....	29
➤ Perfil de Expresión de Genes Reloj en el NSQ.....	29
➤ Perfil de Expresión de Genes Reloj en el NVHA.....	35
5. Discusión.....	38
6. Conclusiones.....	41
7. Perspectivas.....	41
Referencias.....	42
Glosario.....	51

Abreviaturas.....	53
-------------------	----

RESUMEN

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) muestra una peculiar conducta materna, ya que desde días previos al parto las hembras cavan un nido subterráneo, en donde con su pelaje y algunos otros materiales como pasto y paja, forman un nido en el que las crías permanecen hasta el destete. Además, una vez nacidas las crías, la hembra abandona el nido y solo regresa cada 24 horas para alimentar a sus crías. Diferentes estudios demuestran que horas previas a la llegada de la hembra, las crías comienzan a incrementar su actividad locomotora en el nido y su temperatura corporal, fenómeno que se conoce como **anticipación al amamantamiento**, cabe destacar que las crías siguen anticipando aún cuando no tienen acceso a la hembra durante 72 horas.

El presente trabajo estuvo encaminado a determinar el efecto de la restricción de amamantamiento de 48 horas, sobre el funcionamiento del principal marcapaso circadiano ubicado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) en conejos neonatos. Para tal efecto, fueron utilizados dos grupos de conejos neonatos: Un grupo (CONTROL) fue sincronizado por amamantamiento, permitiendo el acceso de la hembra lactante cada 24 horas del día 1 al 9 de edad, y el segundo grupo (RESTRICCIÓN) inicialmente fueron sincronizados por amamantamiento del día 1 al 7 de edad, seguido por 48 horas sin acceso a la hembra lactante. En el día 9 de edad los sujetos de ambos grupos experimentales fueron sacrificados de la siguiente forma: una hora previa al amamantamiento, en el momento del amamantamiento y dos horas después del amamantamiento. Los cerebros fueron procesados para la detección de los genes reloj *Per1* y *Per2* y *Bmal1* mediante hibridación *in situ* con oligodeoxinucleótidos marcados radioactivamente y fue cuantificada la expresión de estos genes en el NSQ y en el núcleo ventral del hipotálamo anterior (NVHA), estructura que no participa en la generación de fenómenos rítmicos.

En el presente estudio encontramos que el NSQ exhibe un patrón rítmico en la expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en ambos grupos de conejos, aún bajo en condiciones de restricción de amamantamiento, además la fase de expresión de los genes reloj es similar en ambos grupos de neonatos. En contraste, en el NVHA se encontró que sólo *Bmal1* del grupo control exhibe un patrón rítmico, los demás genes bajo estudio no exhiben ritmicidad en ninguna de las condiciones estudiadas.

Estos resultados no sugieren que dado que el NSQ hipotalámico exhibe ritmicidad endógena en los conejos neonatos, es posible que esta estructura que funciona como marcapaso circadiano en un gran número de mamíferos, sea uno de los mecanismos a través del cual los neonatos logran estimar el paso del tiempo, de tal forma que las crías puedan anticipar y predecir la llegada de la hembra, aún en condiciones de ayuno.

I. INTRODUCCIÓN

1. Los Ritmos Biológicos

Uno de los fenómenos más estudiados desde la antigüedad hasta nuestros días, es el de los **Ritmos Biológicos (RB)**, esto se debe a la relevancia que tienen éstos para la supervivencia de cualquier organismo. Los **RB** son aquellos fenómenos que se repiten en intervalos más o menos regulares y predecibles, su ocurrencia puede ser desde un ciclo por segundo, hasta un ciclo por varios años (Pittendrigh, 1981). Estos **RB** se expresan a nivel conductual, bioquímico, fisiológico, molecular, entre otros (Pittendrigh, 1981). Dentro de las características más relevantes de los **RB** podemos encontrar: (1) que son generados de forma endógena por múltiples osciladores distribuidos en todo el organismo, que funcionan de manera coordinada entre sí (Pittendrigh y Daan, 1976) y (2) que pueden ajustarse a los cambios cíclicos del medioambiente.

Los **RB** guardan una estrecha relación con los cambios cíclicos ambientales, esto permite a los organismos adaptarse a su nicho y copiar la organización temporal de su medio ambiente. Cuando el periodo del ritmo se aproxima a un ciclo ambiental, se le antepone el prefijo *circa* (cerca a), de tal forma que existen ritmos que se repiten con una frecuencia diaria, otros, con una frecuencia cercana a la de las mareas, algunos se ajustan al ciclo lunar y finalmente tenemos aquellos que se aproximan al ciclo anual. Estos fenómenos biológicos, se conocen con, el nombre de **ritmos circadianos**, circamareales, circalunares y circanuales respectivamente (Aschoff, 1981).

Existen diversos parámetros que caracterizan a cualquier fenómeno rítmico y que comúnmente son analizados en los **RB**. Uno de estos parámetros es el **periodo** (Fig.1), que se refiere al intervalo de tiempo entre dos puntos de referencia idénticos, la **amplitud**, se refiere a la magnitud de la variación del fenómeno en estudio y se estima obteniendo la diferencia entre el valor máximo (cresta) y el valor mínimo (valle) del ciclo (Fig.1). Otras características importantes para describir a los ritmos son: el **mesor** que indica el promedio de los valores

observados, la **fase** que refiere al momento (hora, día o mes) en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo en estudio y finalmente el **ángulo de fase**, que corresponde a la fase de referencia de dos eventos oscilatorios distintos (Gruart et al. 2002; Moore- Ede et al. 1982, Vega-González, 1993).

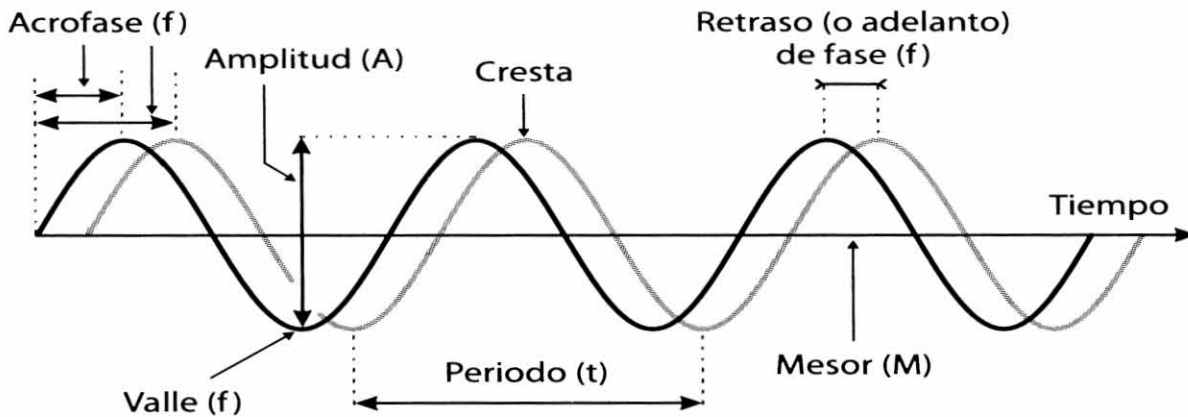


Figura 1. Esquema representativo de los parámetros comúnmente analizados en los ritmos biológicos, definidos en el texto (Tomada de Gruart et al. 2002).

2. Ritmos Circadianos

En el presente estudio nos enfocaremos exclusivamente a los **ritmos circadianos (RC)**, son aquellos cuya ocurrencia es cercana a las 24 horas, es decir, aquellos que muestran un periodo aproximado al ciclo luz-oscuridad (Halberg, 1959). Los RC han sido observados en prácticamente todos los organismos vivos, tanto eucariontes como procariontes de ahí su relevancia funcional (Horton, 2001). Existen muchos ejemplos de RC, tales como: el ciclo actividad-reposo, la temperatura corporal, la concentración en la sangre de potasio, sodio, así como diferentes de hormonas y nutrientes, entre otros parámetros. Tomando como referencia a los RC, se denominan **ritmos ultradianos** a aquellos ritmos que tienen una frecuencia mayor que los circadianos; es decir, que ocurren más de una vez durante un día, ejemplos de ellos la actividad eléctrica cerebral (EGG), los latidos del corazón, la respiración, las etapas de sueño, entre otras; e **infradianos** a aquellos cuya frecuencia es menor a los circadianos, es decir, que requieren más de un día para que se

repitan, por ejemplo el ciclo menstrual o la hibernación entre otros, (Fig. 2) (Gruart et al. 2002).

Una de las principales características que tienen los ritmos circadianos es que son generados de manera **endógena** y **autosostenida** por **osciladores**, esto ha sido ampliamente demostrado en un gran número de especies, en donde se ha observado la persistencia de la ritmicidad cuando son mantenidos en condiciones ambientales constantes, es decir, aislados de cualquier señal cíclica ambiental. Además, bajo estas condiciones es posible conocer el período del oscilador involucrado en la generación del patrón rítmico, estado que se conoce como **oscilación espontánea** (Menaker, 1969).

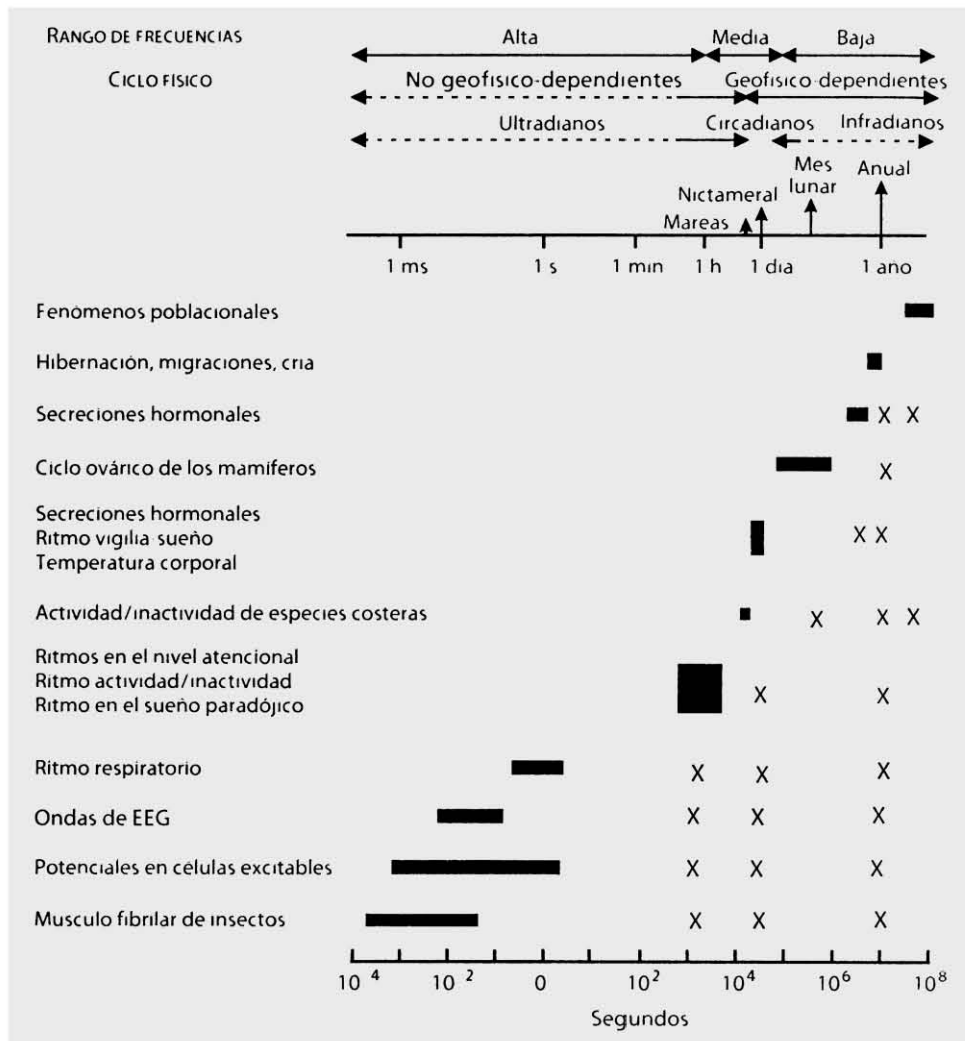


Figura 2. Ejemplos de los distintos ritmos biológicos, clasificados de acuerdo a su frecuencia (alta, media y baja), el ciclo físico (geofísico-dependiente o no), la duración de un ciclo (ultra-, circa- o infradiano), o su relación con algunos fenómenos geofísicos (mareal, nictamareal, lunar y anual). (EEG, electroencefalograma). (Tomada de Gruart et al. 2002).

Los *osciladores circadianos*, son sensibles a las señales cíclicas ambientales y ajustan su funcionamiento a la ocurrencia de estos eventos, propiedad que permite a los organismos predecir los cambios que ocurren en el medio ambiente. Estas señales son conocidas como **sincronizadores o zeitgebers**, del alemán, “*dador de tiempo*” (Aschoff, 1981) y se clasifican de la siguiente forma: a) **Las señales fóticas**, ciclo luz-oscuridad (L:O) que ha sido una de las señales más estudiadas (Aschoff, 1981; Pittendrigh, 1981). (b) **Las señales no fóticas**: señales ambientales que difieren de las luminosas y que son capaces de afectar el funcionamiento de los osciladores circadianos. Entre estas se encuentran la temperatura (predominantemente en ectodermos), el ruido, las interacciones sociales, el alimento, campos eléctricos y la presión atmosférica, entre otras (Moore Ede et al. 1982; Stephan, 2002).

El fenómeno de **sincronización** (Fig. 3) se lleva a cabo cuando los osciladores circadianos ajustan su periodo y fase a la ocurrencia de señales cíclicas ambientales (Aschoff, 1981). Para que este fenómeno de sincronización tenga lugar es necesario: que 1) las señales ambientales sincronizadoras sean regulares y predecibles, 2) 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 periodo del oscilador sea igualado al de la señal sincronizadora (Aschoff, 1981).

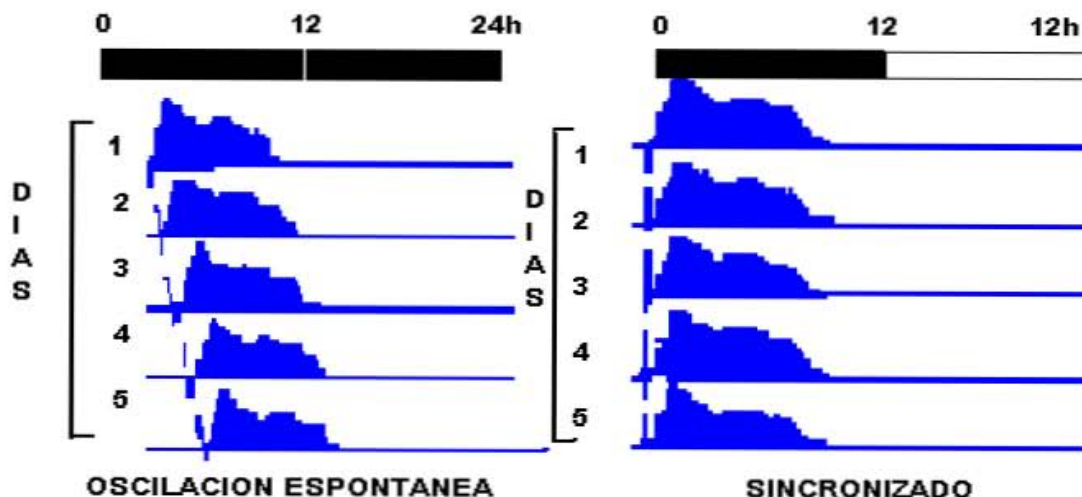


Figura 3. Actogramas ficticios que representan el ritmo de actividad locomotora de un roedor nocturno, en el actograma izquierdo se muestra el patrón en oscilación espontánea y el de la derecha muestra este mismo patrón pero sincronizado a un ciclo luz:oscuridad. La línea discontinua el inicio de la fase de actividad.

3. El Núcleo Supraquiasmático, el Principal Marcapaso Circadiano de Mamíferos

En los mamíferos, el principal marcapaso circadiano ha sido identificado en el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Moore y Leak, 2001). Este núcleo se ubica en el hipotálamo ventral anterior, dorsal al quiasma óptico, rostral a las comisuras supraópticas y ventrolateral al receso quiasmático del tercer ventrículo (Fig.4).

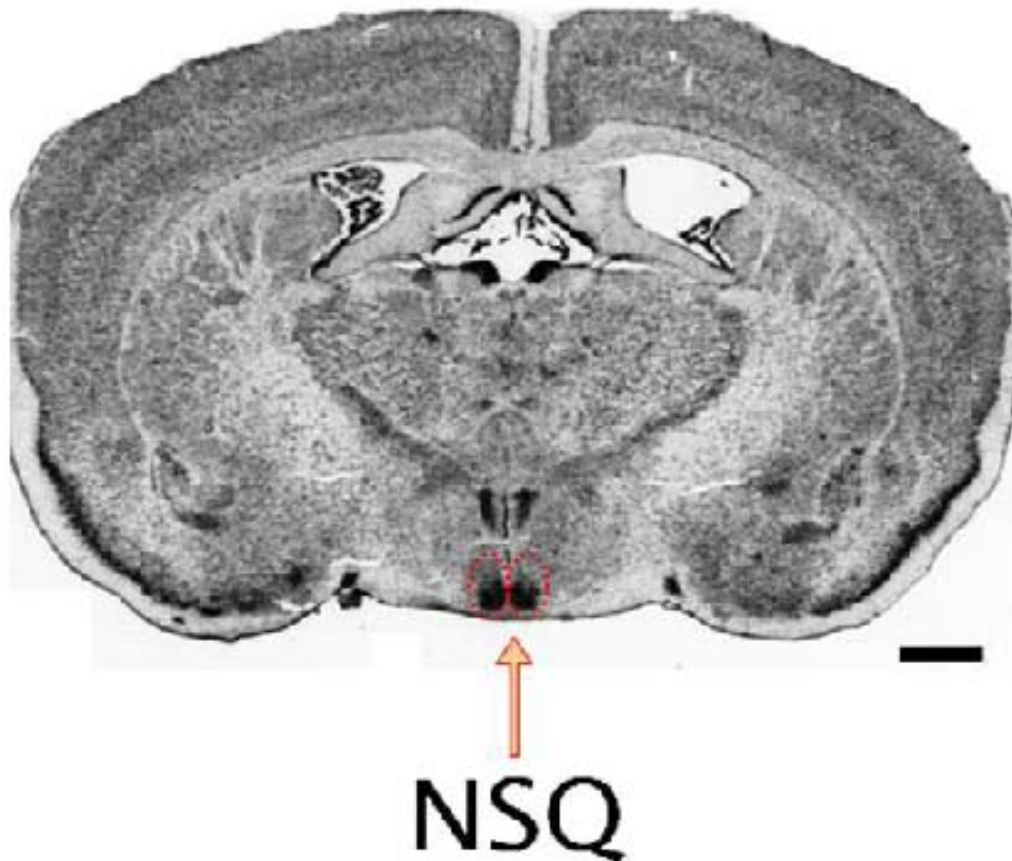


Figura 4. Microfotografía que muestra un corte transversal del hipotálamo del cerebro de conejo europeo (*oryctolagus cuniculus*) obtenido en el día postnatal siete, teñido mediante la técnica de Nissil, en dónde se aprecian los núcleos supraquiasmáticos indicados mediante la flecha (Tomada de Caldelas et al. 2007). La barra indica 200 μ .

Estudios en roedores adultos han mostrado, que las dimensiones de cada NSQ son aproximadamente de 300 μ tanto medio-lateralmente como dorso-ventralmente y 700 μ rostro-caudalmente (Moore y Leak, 2001). Cada núcleo

contiene en promedio entre 10,000 y 12,000 neuronas, con un diámetro de entre 7-12 μ m (Van den Pool, 1980; Reus et al. 1996), además la mayoría de sus axones forman microcircuitos dentro del mismo núcleo (Moore y Leak, 2001).

Dadas sus características anatómicas el NSQ se divide en dos regiones (Fig.5) dorsomedial (DM) o coraza y ventrolateral (VL) o corazón (Moore y Leak, 2001). La región DM del núcleo, se caracteriza principalmente por contener pequeñas neuronas alargadas con un gran núcleo y pocos organelos celulares. Estas neuronas se encuentran muy compactas e interconectadas somáticamente. La región VL de este núcleo, se caracteriza por una densidad baja de neuronas esféricas y un citoplasma rico en organelos celulares. Estas neuronas están rodeadas por células gliales las cuales inervan a todas las neuronas del área VL del núcleo (Moore y Leak, 2001). Se ha sugerido que las áreas DM y VL juegan diferentes papeles en la generación y regulación de la ritmicidad circadiana en mamíferos, debido a las marcadas diferencias en el contenido de neuropéptidos de estas regiones.

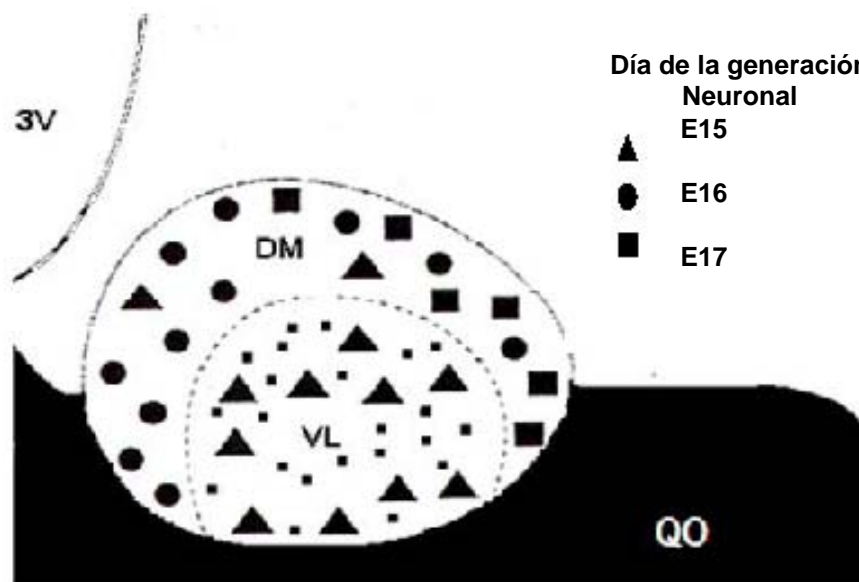


Figura 5. La imagen muestra las subdivisiones neuroanatómicas que caracterizan al núcleo supraquiasmático del hipotálamo, la región Dorsomedial (DM) o coraza y la región Ventrolateral (VL) o corazón, y la formación de neuronas en estas subdivisiones, en el núcleo supraquiasmático de la rata. Las abreviaturas Tercer ventrículo (3V) y Quiasma óptico (QO). Modificada de Moore y Leak, 2001.

células inmunopositivas a diferentes neuropéptidos entre los que se encuentran, la avidina vasopresina (AVP), somatostatina, el factor liberador de corticotropina, neuroficina y encefalinas entre otros (Moore y Leak, 2001). Mientras que el área VL del núcleo se encuentran células inmunopositivas a el péptido vasoactivo intestinal (VIP), péptido histidina leucina (PHL), péptido liberador de gastrina y la bombesina (Moore y Leak, 2001). Además a estos péptidos se pueden sumar la presencia de algunas otras sustancias en ambas regiones del núcleo, como son la presencia de neurotensina, angiotensina II, somatostantina, sustancia P y el ácido gamma aminobutírico (Van den Pool, 1980; Moore y Speh, 1993). Este último y sus receptores juegan un papel importante en la neurotransmisión en el NSQ.

Un gran número de evidencias experimentales demuestran que el NSQ es el principal marcapaso circadiano en mamíferos. Se ha encontrado que lesiones bilaterales de esta región hipotalámica (NSQ), producen la desorganización de diferentes patrones circadianos tales como: el ritmo sueño-vigilia (Moore-Ede et al, 1982), la ingesta de agua (Moore et al. 1967, Stephan y Zucker, 1972), la actividad locomotora (Moore et al. 1967, Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972), la secreción de corticoesteroides (Moore y Eichler, 1972), entre otros. Además es bien conocido que los trasplantes de NSQ fetal a animales previamente lesionados restablece algunos de los ritmos desorganizados por dicha lesión (Sawaki et al,1984; Druker et al 1984), sin embargo, los mecanismos por los cuales el trasplante restaura la ritmicidad se desconocen (Moore y Leak, 2001). Adicionalmente los trasplantes de otros tejidos cerebrales, como la corteza occipital, no tienen la capacidad para restaurar una función rítmica en sujetos con lesiones de NSQ, mantenidos bajo condiciones de oscuridad constante, lo cuál indica que la ritmicidad circadiana parece ser una de las propiedades exclusivas de las neuronas contenidas en el NSQ (García-Hernández et al. 1987).

Numerosas investigaciones han mostrado que el NSQ mantiene su ritmicidad tanto *in vivo*, como en condiciones *in vitro* (Moore y Leak, 2001). El NSQ *in-vivo* exhibe ritmicidad en su actividad metabólica (Schwartz y Gainer, 1997) y eléctrica (Inouye y Kawamura, 1979) aún cuando el núcleo es deafferentado, de

igual forma ocurre en estudios *in vitro* (Green y Gillette, 1982; Groos y Hendrinks, 1982; Shibata et al. 1982). Todas estas evidencias indican que el NSQ funciona como un oscilador circadiano autónomo (Welsh et al. 1995).

3.1 Las Aferencias y Eferencias del NSQ

Una de las principales aferencias al NSQ (Fig. 6) que provee información sobre los cambios diarios de iluminación, es el tracto retino-hipotálamico (TRH), sus axones viajan desde las células ganglionares (CG) tipo III de la retina, las cuales poseen el fotorpigmento melanopsina (Moore, 1995). Estas CG inervan principalmente la parte VL del NSQ, estos axones liberan aminoácidos excitadores tales como, glutamato o N-acetylaspartylglutamato y el péptido hipofisiario activador de la adenilato ciclasa (Liou et al. 1986; Moore y Leak, 2001). La principal función del TRH es proveer información relacionada con la alternancia día-noche al NSQ, permitiendo sincronizar fóticamente la ritmicidad endógena. Una segunda vía se origina de algunas colaterales del TRH e inervan una región del cuerpo geniculado lateral del tálamo llamada hojuela intergeniculada (IGL), la cuál a través del tracto geniculado hipotalámico (TGH) inerva la región VL del NSQ. Este tracto emplea neurotransmisores tales como el neuropéptido Y, encefalinas y GABA (Harrington et al. 1985; Moore y Leak, 2001).

Adicionalmente existe una densa inervación serotoninérgica del cerebro medio al NSQ, se describe está involucrada tanto en la sincronización fótica, como en la no-fótica. El rafe medial inerva al NSQ y el rafe dorsal inerva a la IGL (Caldelas et al. 2005; Challet et al. 2003).

Finalmente, el núcleo paraventricular del tálamo (PVT) también presenta abundantes conexiones recíprocas con el NSQ (Fig.6), de hecho se han reportado que el PVT tiene proyecciones directas hacia el NSQ en ratas (Moga et al. 1995) y en ratones (Abrahamson y Moore, 2001). El glutamato es el principal neurotransmisor de las neuronas del PVT que proyectan al NSQ (Moga et al. 1995), en especies diurnas, como en nocturnas (Novak et al. 2000). Al parecer el PVT participa como modulador de la respuesta del NSQ a la luz, principalmente al final de la noche; adicionalmente el PVT es una vía de entrada de información

visceral y de modalidades no-fólicas hacia el NSQ (Aguilar-Roblero et al. 2004). Se sugiere que tanto la IGL como el PVT son relevos que participan en la transmisión de la información no-fólica (ruidos, temperatura, movimiento) hacia el NSQ, permitiendo que diversos estímulos también puedan ejercer influencia como sincronizador de los ritmos circadianos (Aguilar-Roblero et al. 2004).

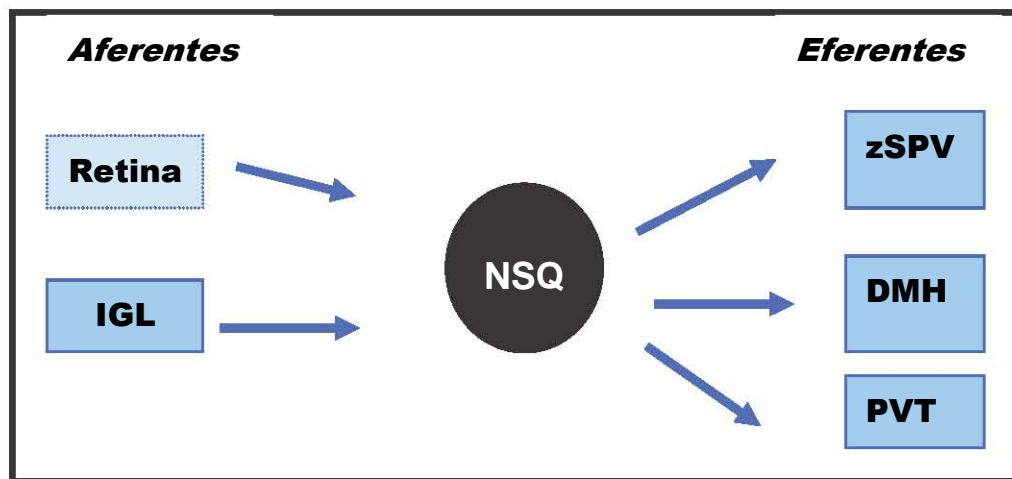


Figura 6. La imagen muestra las principales aferencias y eferencias del núcleo supraquiasmático de la rata. Dentro de las aferencias que inervan al núcleo supraquiasmático encontramos: las células ganglionares de la retina, enviando a su vez colaterales hacia hojuela intergeniculada lateral (**HIL**), sus aferentes viajan desde el núcleo supraquiasmático hasta la zona subparaventricular del hipotálamo (**zSPV**), el núcleo dorsomedial del hipotálamo (**DMH**) y el núcleo paraventricular del tálamo (**PVT**). (Essevelt et al. 2000).

Una de las principales incógnitas que aún siguen sin resolverse, es cómo se transmite la información rítmica del NSQ, al resto del organismo. Las vías eferentes al NSQ se organizan en tres grupos: un grupo de fibras se dirige rostralmente e inerva la región ventrolateral del área preóptica y el septum; otro grupo de fibras cursa dorsal o lateral y se dirigen hacia el tálamo, las fibras dorsales inervan el núcleo paratenial y el tálamo paraventricular (grupo de núcleos intralaminares), mientras que las fibras laterales cursan hacia el cuerpo geniculado ventrolateral y especialmente hacia la hojuela intergeniculada. Finalmente el tercer grupo de fibras se dirige caudalmente hacia el neuropilo en el borde ventrolateral

del núcleo paraventricular del hipotálamo, región denominada zona subparaventricular (zSPV), continuando con el neuropilo medial al núcleo ventromedial, el núcleo dorsomedial, el hipotálamo posterior y terminando en el polo rostral de la sustancia gris periacueductual, mientras que otras fibras cruzan a la región retroquiasmática y terminan en el neuropilo entre el núcleo arqueado y el hipotálamo ventromedial (Moore y Leak, 2001). La gran mayoría de las eferentes hacia el NSQ se dirigen hacia zSPV y ésta a su vez se dirige a los mismos blancos que el NSQ. Por esta razón se ha llegado a proponer que esta unidad está involucrada en la transmisión de la señal de tiempo al resto del sistema nervioso (Moore y Leak, 2001, Essevelt et al. 2000; Reuss, 1996).

3.2 La Maquinaria Molecular del NSQ

En la actualidad se sabe que la generación de la ritmicidad de las células que componen el NSQ es la consecuencia de la oscilación de un conjunto de genes reloj (tres genes *Period*, dos genes *Criptocromos*, dos genes *Dec*, y los genes controlados por el reloj *Gcr*), los cuáles forman asas de retroalimentación transcripción-traducción de forma rítmica (Reppert y Weaver 2001; Okamura, 2003).

El actual modelo molecular (Reppert y Weaver 2001; 2002; Okamura et al. 2002; Kawamoto et al. 2004) propone que los productos dimerizados de los genes *CLOCK/BMAL1*, funcionan como un factor de transcripción el cuál, se une al elemento E-Box en los promotores de los genes *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-erba* (Fig.7). Las proteínas producto de los genes *Per* y *Cry* forman heterodímeros (*PER1/CRY1* o *PER2/CRY2*) que son fosforilados por las caseína cinasa ϵ para estabilizarlos en el citoplasma y que estos no sean degradados (Reppert y Weaver, 2001). Estos heterodímeros, son translocados al núcleo dónde inhiben su propia transcripción, ya que desplazan al complejo *CLOCK/BMAL1* del E-box. Al parecer las proteínas *DEC* también funcionan como reguladores negativos del asa, ya que inhiben la actividad transcripcional de *CLOCK/BMAL1* por competencia con el heterodímero. El periodo de oscilación parece depender principalmente de la tasa de degradación de las proteínas reloj, dicha degradación se relaciona en forma inversa a la formación y fosforilación de dímeros como PER

y CRY, y a su translocación hacia el núcleo (Reppert y Weaver, 2001; Chang y Reppert, 2001; Homma et al. 2002; Okamura, 2003).

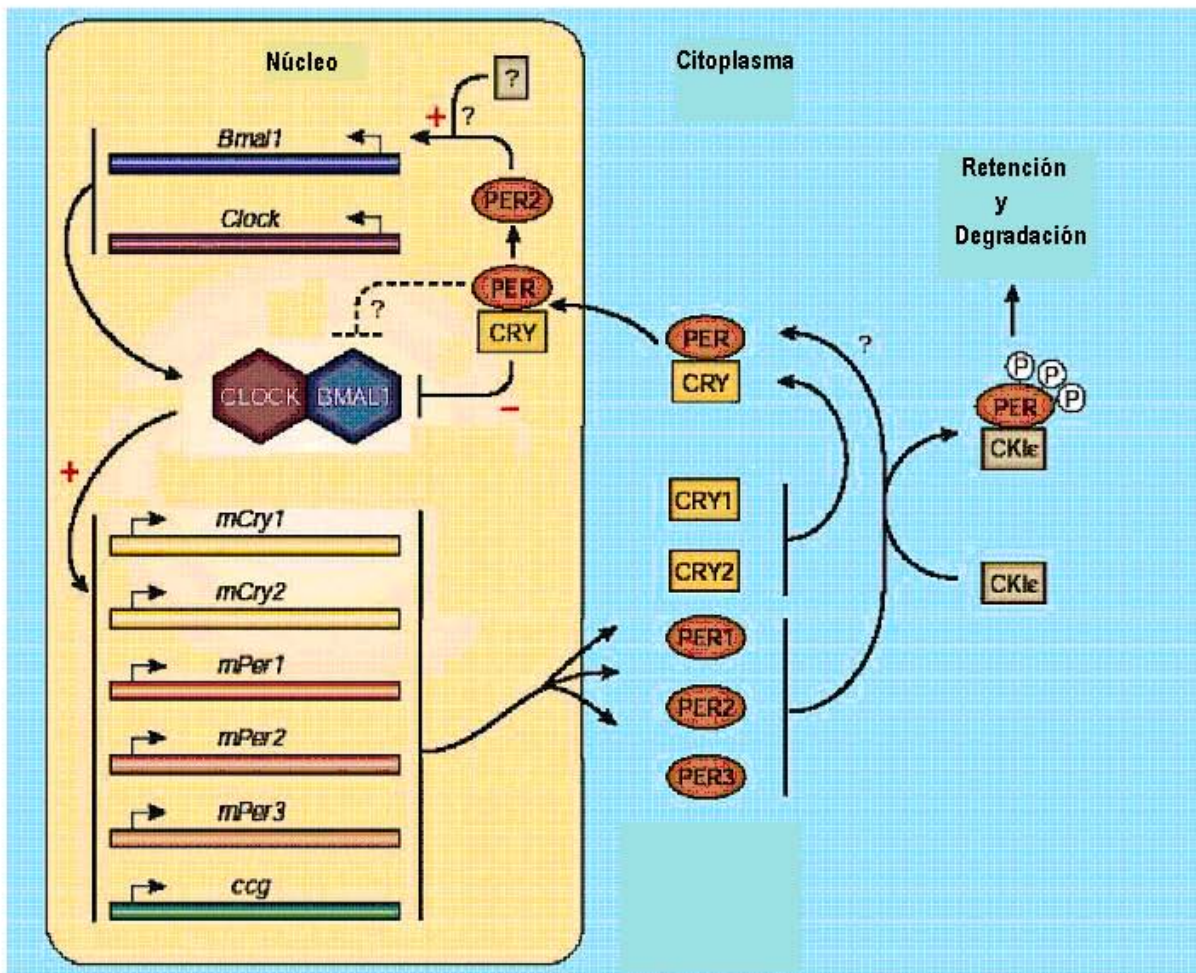


Figura 7. Modelo molecular de los mecanismos involucrados en el reloj circadiano de los mamíferos. Para mayor detalle ver texto. Modificada de Cermakian y Sassone-Corsi, 2000.

Aunque el asa de retroalimentación negativa previamente descrita es suficiente para oscilar por sí misma, a ésta se sobrepone otra asa de protoalimentación (retroalimentación positiva), lo que brinda mayor estabilidad y precisión a la oscilación. Como se ha mencionado anteriormente el dímero *CLOCK/BMAL1* también está encargado de la transcripción del gen *rev-erbα*; el producto de este gen, la proteína *REV-ERBα* es capaz de inhibir la transcripción de

los genes *Bmal1*, *Clock* y *Cry1*. Por lo tanto, cuando los complejos *PER1/CRY1* o *PER2/CRY2* desplazan a *CLOCK/BMAL1* de la E-box, la disminución en la transcripción de *Rev α* conduce a la transcripción de *Bmal1* y *Clock*, reestableciendo los niveles de las proteínas *CLOCK* y *BMAL1* y asegurando que el ciclo se repita (Van Gelder et al. 2003; Isojima et al. 2003; Okamura, 2003; Kawamoto et al. 2004).

Se sugiere que los eventos post-traduccionales tales como el estado de fosforilación proteico, las interacciones y la ubicación subcelular de proteínas contribuyen en la generación del asa molecular con un período cercano a las 24 horas (Reppert y Weaver, 2001).

4. Otros Osciladores Circadianos

En la actualidad es bien conocido que existen otros osciladores circadianos distribuidos en el organismo de los mamíferos (Schibler et al. 2003; Balsalobre, 2002). Se ha observado que los genes que están involucrados en la generación de la ritmicidad circadiana del NSQ, también se expresan en otras áreas cerebrales, en órganos periféricos y aún en líneas de cultivos celulares. Todos estos expresan oscilaciones circádicas *in vitro* solo por pocos días sin recibir ninguna señal del NSQ (Yamazaki et al. 2000; Okamura, 2003). Dentro de las estructuras que exhiben ritmicidad circadiana podemos encontrar al bulbo olfatorio (Granados et al. 2004), al riñón, al hígado los pulmones, el corazón, el páncreas (Yamazaki et al. 2005), la retina (Tosini y Menaker, 1998). Sin embargo, la extirpación de estos tejidos no altera la expresión de la ritmicidad circadiana (Gruart et al. 2002).

También existe otro oscilador circadiano que tiene una gran relevancia funcional tanto en vertebrados inferiores; esta es la glándula pineal, la cuál tiene como función primordial la secreción de la hormona melatonina. En casi todos los mamíferos, se ha observado que la melatonina presenta un ritmo circadiano en la síntesis de está hormona (Moore y Leak, 2001). En mamíferos, esta hormona tiene como función proporcionar información al organismo sobre la duración del ciclo luz-oscuridad, además de ser un asa de retroalimentación negativa para el

disparo neuronal del NSQ capaz de sincronizar los ritmos (Aguilar-Roblero et al. 2004).

5. El Desarrollo Temprano del Sistema Circadiano

El desarrollo del sistema circadiano ha sido predominantemente estudiado en roedores. Durante el desarrollo embrionario, la pared diencefálica del tubo neural se divide en cuatro áreas, de las cuáles, de la zona ventral celular es de la que emerge el hipotálamo y todas las neuronas hipotálamicas incluyendo las del NSQ, estas son formadas a partir del epitelio germinal del diencéfalo ventral, justo en la matriz germinal inmediata al quiasma óptico (Altman y Bayer, 1978, 1986). En ratas, el NSQ es visible en el día embrionario (E) 16 y distinguible como una unidad el día E17. Entre el día E17 y el día postnatal (P) 10 el núcleo puede visualizarse con una apariencia adulta. Sin embargo las regiones DM y VL son distinguibles hasta el día postnatal P6 (Moore et al.1989). De igual forma durante etapas prenatales comienzan a desarrollarse las aferencias fóticas al NSQ aproximadamente el día E15; entre los días E16 y E17 comienza la formación del quiasma óptico y los tractos ópticos (Moore y Leak, 2001). Simultáneamente, se inicia la formación de las proyecciones terminales del núcleo, el núcleo geniculado lateral y el colículo superior (Moore y Leak, 2001). Inicialmente, las proyecciones son dispersas y la maduración de las conexiones sinápticas ocurren en etapas tempranas postnatales entre el día P20-21 (Moore et al.1989).

Una vez iniciada la etapa post-mitótica el marcapaso hipotalámico es funcional, debido a que las células de este núcleo exhiben ritmicidad tanto en su actividad metabólica, en su actividad eléctrica, así como en la síntesis de vasopresina que se observa en la región DM del NSQ, a partir del día P21 (Reppert y Weaver, 1989).

Evidencias experimentales indican que tan pronto como el NSQ es funcional, este es también sensible y sincronizable por señales no-fóticas maternas. Es importante mencionar que las células del NSQ fetal exhiben ritmicidad diurna aún cuando no se han formado las aferencias de la retina (Moore et al. 1989), sugiriendo de esta forma que las señales provenientes de la madre,

tienen una influencia importante sobre la ritmicidad del NSQ de los fetos (Davis, 1981). De hecho estudios por Reppert y Schwartz, 1983, mostraron que la actividad metabólica del NSQ fetal esta enfasada al de la madre gestante. Además se ha encontrado que en hembras gestantes ciegas, la actividad metabólica del NSQ de los embriones muestran ritmicidad y además está en fase con la oscilación espontánea de la madre (Reppert y Schwartz, 1983). Por otra parte, se ha encontrado que la destrucción del NSQ materno en las etapas tempranas de la gestación, produce la pérdida de la relación de fase entre los fetos, tanto en la actividad metabólica, como eléctrica del NSQ (Reppert y Weaver, 1989). Sin embargo, mediante la administración de agonistas dopaminérgicos, melatonina o restricción de alimento a madres arrítmicas por destrucción del NSQ, es posible sincronizar el marcapaso circadiano de los fetos, por lo que esta sincronización no-fótica no depende de la integridad del NSQ materno (Reppert y Weaver, 1989). En la actualidad continúa siendo motivo de estudio el dilucidar cuáles son las señales sincronizadoras no-fóticas del NSQ fetal, y al parecer se trata de señales redundantes provenientes de la hembra gestante (Reppert y Weaver, 1989).

5.1 La Sincronización No-Fótica Durante el Desarrollo

Estudios realizados por Reppert y Weaver (1989), indican que durante la gestación y etapas tempranas postnatales, las señales no-fóticas provenientes de la hembra resultan ser las principales señales sincronizadoras del sistema circadiano de las crías, en comparación con las señales fóticas, las cuáles juegan un papel importante durante la vida adulta (Reppert, 1995).

En mamíferos la primera exposición a un ambiente rítmico ocurre *in-utero* en donde los fetos pueden experimentar un ambiente de estimulación rítmica no-fótica proveniente de la hembra, tales como fluctuaciones diarias en niveles hormonales y nutrientes, así como de la actividad de la madre y motilidad uterina (Caldelas et al. 2005). En mamíferos altriciales al momento de nacer, el sistema visual aún no es funcional, por lo que el sistema circadiano de neonatos podría ser particularmente sensible a señales no-fóticas maternas.

Actualmente es bien conocido que en etapas tempranas postnatales, roedores mantenidos bajo condiciones diarias de iluminación u oscuridad constante, así como en neonatos ciegos, exhiben ritmos sincronizados a hembras nodrizas (Reppert et al. 1984; Hastings et al. 1998; Ohta 2003). Esto ha demostrado la relevancia que tienen las señales no-fólicas como agentes sincronizadores (Caldelas et al. 2005). Aunado a esto, se ha encontrado que en roedores un ritmo artificial de ausencia y presencia de la hembra lactante funciona como una eficaz señal sincronizadora (Caldelas et al. 2005).

En el periodo postnatal, al parecer se refuerza la relación de fase que fue establecida durante el periodo prenatal (Takahashi et al, 1989); esto se debe a que la hembra lactante funge como una señal sincronizadora no-fótica del sistema circadiano de las crías (Takahashi et al. 1982). De hecho Deguchi (1975) encontró que las hembras nodrizas pueden tener cierta influencia en la actividad de N-acetil transferasa (NAT) en la glándula pineal de las crías, ya que observo que el ritmo de NAT estaba en fase al de las hembras nodrizas, que además este ritmo sincronizado persiste aún cuando las crías son mantenidas en oscuridad constante. Además la sincronización neonatal en la actividad de NAT no depende de las señales fóticas, ya que en crías ciegas se ha observado que el ritmo de NAT y de corticoesterona se encuentran en fase a la hembra nodriza (Takahashi, 1982). Existen reportes en los que son empleadas hembras nodrizas mantenidas bajo fotoperiodos que difieren de la madre natural, en estas observaron que parte de la camada muestra una fase similar al de la hembra natural y la otra parte presenta la fase de la hembra nodriza (Reppert et al. 1984; Homma et al. 1987). Reportes que evidencian que el modelo propuesto de sincronización no-fótica mediante la administración de hembras nodrizas en ratas es limitado, lo cuál puede deberse a los exhaustivos cuidados maternos que exhibe esta especie. De acuerdo con Ohta y Col. 2002, en ratas la presentación continua de hembras nodrizas es una señal deficiente para el control de la fase del NSQ, sin embargo la de la privación materna resulta un modelo más eficaz para el estudio de la sincronización no-fótica en roedores (Ohta et al.2003)

6. La Ritmicidad Circadiana en Conejos en Desarrollo

El conejo Europeo (*Oryctolagus cuniculus*), es un modelo que nos ofrece una gran oportunidad para el estudio de la sincronización no-fótica de mamíferos en desarrollo, ya que esta especie se caracteriza por exhibir una peculiar conducta materna (Fig. 8). Desde el nacimiento las crías son mantenidas en una madriguera subterránea, la hembra con su propio pelo y algunos otros materiales forma un nido en el que permanecen las crías, cabe destacar que los neonatos permanecen bajo condiciones de oscuridad continua y la única señal sincronizadora proviene de la hembra lactante, la cual muestra un ritmo circadiano en su conducta de amamantamiento (Zarrow et al. 1965; Hudson y Distel, 1982; 1989; Jilge, 1995).

Es importante mencionar que las crías de conejo son altricias al momento del nacimiento, los neonatos en la primera semana de nacimiento se caracterizan por no tener pelo, poseer ojos y canales auditivos cerrados (Fig. 9), y contar una capacidad limitada para responder a la estimulación auditiva (Gottlieb, 1971), cambios de luz (Ripisardi et al. 1975) y con una insuficiente capacidad termorregulatoria (Wishaw et al. 1979). Es de llamar la atención que en cada evento de amamantamiento las crías de conejo tienen la capacidad de ingerir del 10 al 30% leche equivalente a su peso corporal (Denenberget et al; 1963,1997; Hudson y Distel, 1983, 1989).

Debido al corto periodo de tiempo que la hembra visita a sus crías, los cuidados maternos que exhibe esta especie son muy limitados en comparación con otros mamíferos, como es el caso de los roedores, en donde las hembras muestran exhaustivos cuidados maternos.

Por lo que el amamantamiento es sin duda el evento más importante para las crías del conejo y todas las conductas en el nido parecen dirigirse a asegurar el consumo suficiente de leche en los 3 o 4 minutos disponibles al día, una característica importante que hace más eficiente la búsqueda del pezón y el consumo de leche, es la feromona materna (Hudson y Distel, 1984; Hudson y Distel, 1990), que parece estar involucrada en el alertamiento de las crías al momento del amamantamiento, aún desde el primer día.

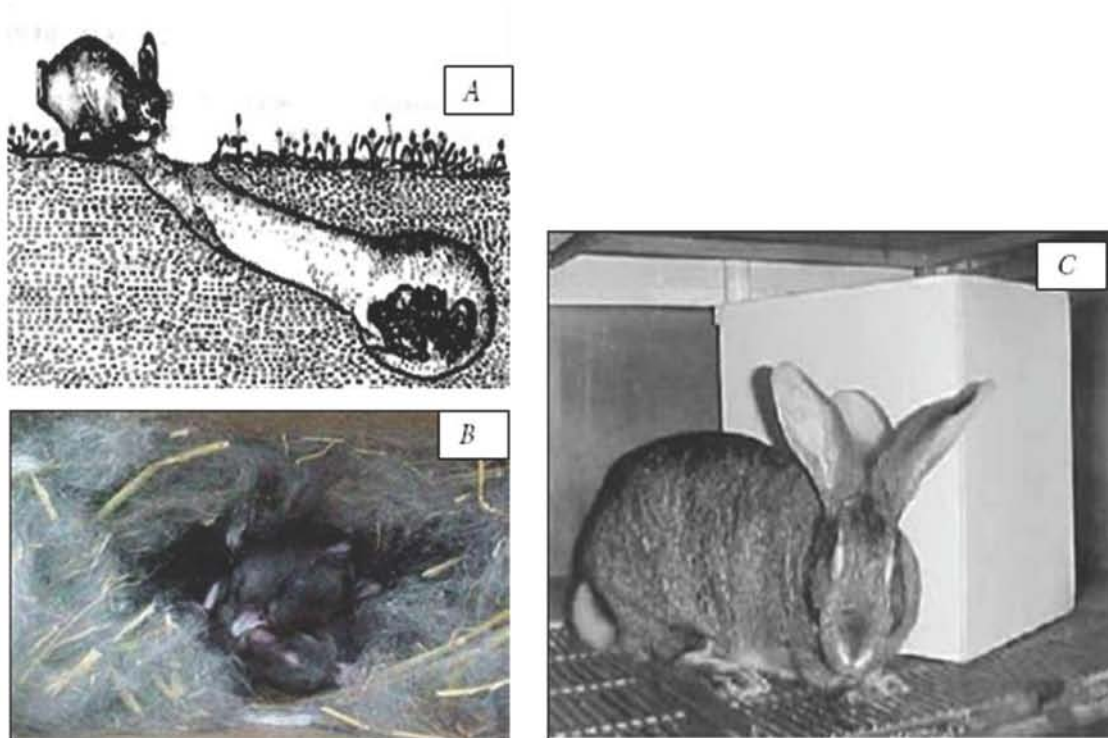


Figura 8. Esquema (A) muestra la representación de la conducta materna del conejo Europeo al entrar al nido en condiciones naturales, (B) muestra el nido formado por la hembra con crías recién nacidas. La fotografía(C) muestra las condiciones de cautiverio, en dónde las hembras siguen exhibiendo su particular conducta materna.



Figura 9. La fotografía muestra una cría de conejo de 1 día de edad, cabe destacar que esta especie es altricia, nace con escaso pelo, con canales auditivos y párpados totalmente cerrados. (Tomada de Tejadilla 2006).

Aunado a esto se ha observado, que las crías del conejo, son capaces de **anticipar** la llegada de la hembra lactante (Jilge y Hudson, 2001), mostrando a nivel conductual incrementos en su actividad general dentro del nido, así como a nivel fisiológico, exhibiendo cambios en la temperatura corporal que preceden al amamantamiento, lo cuál permite a las crías incrementar su actividad locomotora antes de la llegada de la hembra y optimizar el tiempo en que se alimentan. Este fenómeno de anticipación persiste aún cuando las crías son privadas del acceso a la hembra durante 72 horas (Jilge et al. 2001).

Como se mencionó, horas previas a la llegada de la hembra las crías incrementan su actividad locomotora y comienzan a descubrirse (Fig. 10) del material del nido (Hudson y Distel, 1982), incrementando los niveles de corticoesterona plasmática (Rovirosa et al. 2005) y de temperatura corporal (Jilge et al. 2000). Al aproximarse el evento del amamantamiento las crías muestran un incremento en la sensibilidad a las vibraciones y al tacto, reaccionando hasta al más pequeño disturbio incrementando su actividad y sus vocalizaciones. Las crías saltan en el nido poniendo su hocico debajo de la panza de la hembra con la finalidad de buscar rápidamente el pezón (Hudson y Distel, 1983).

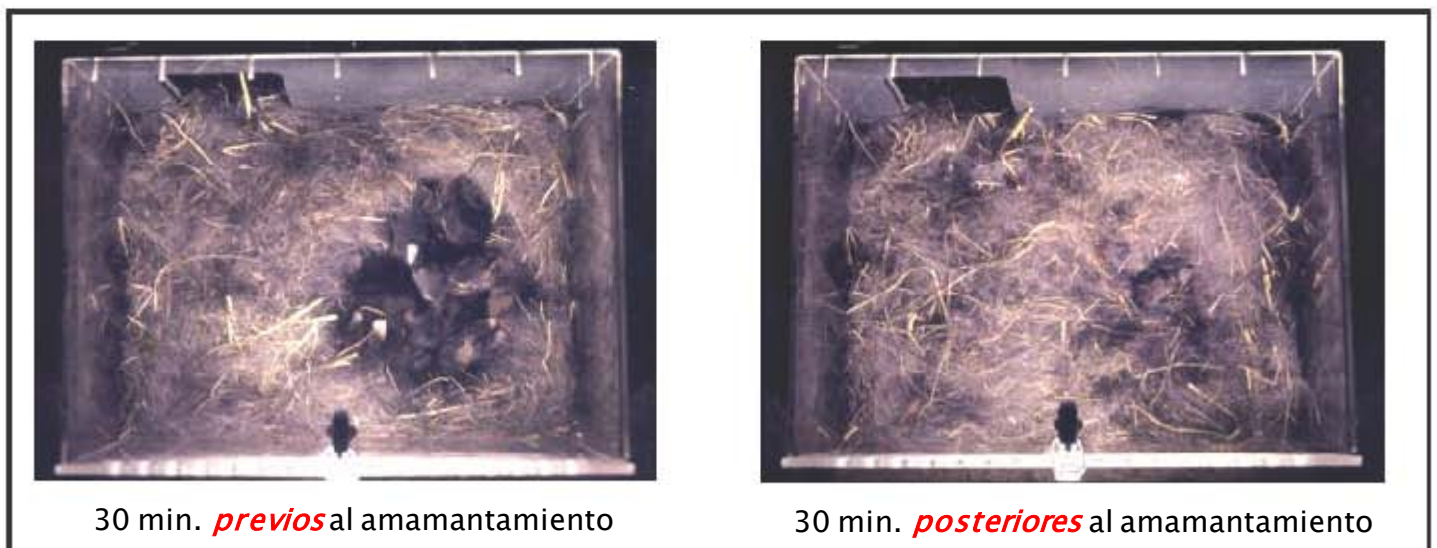


Figura 10. La imagen muestra el fenómeno de anticipación al alimento en conejos neonatos 30 minutos anteriores a la llegada de la hembra (panel izquierdo) y 30 minutos posteriores al amamantamiento en donde las crías se encuentran cubiertas por el material del nido (panel derecho). Tomada de Hudson y Distel, 1982.

El evento del amamantamiento finaliza con un salto abrupto de la hembra fuera del nido y con el desprendimiento inmediato de los pezones de la hembra por parte de las crías. Aproximadamente después de treinta segundos, las crías excavan vigorosamente debajo del material del nido, para cubrirse (Fig. 10), tratando siempre de mantenerse juntos y así maximizar el contacto corporal, para mejorar su deficiente capacidad termorregulatoria (Hudson y Distel, 1989).

Los estudios realizados por Gilge (2000) corroboraron que los neonatos de conejo son capaces de anticipar el momento de amamantamiento a nivel fisiológico, estos estudios los realizó monitoreando el ritmo de temperatura corporal a partir del día 4 al 28 de edad. En estos estudios Gilge (2000) sugiere la existencia de dos componentes que conforman el patrón rítmico de la temperatura corporal en conejos neonatos amamantados cada 24 horas: el primero es un **componente anticipatorio (endógeno)**, el cuál 2.5 a 3.5 horas antes del momento del amamantamiento las crías exhiben un incremento en la temperatura de 0.4 a 0.6 °C (Fig. 11), aumento que persiste aún cuando las crías no tienen acceso a la madre. El segundo es uno **componente (exógeno)** que comienza de 4 a 8 minutos después del comienzo de la ingestión de la leche en dónde la temperatura incrementa de 0.3 a 0.6 °C, el cuál es seguido por un abrupto decremento en la temperatura (Fig. 11). Este componente exógeno parece explicarse debido a los componentes de la leche, la cuál es rica en energía (13.1% grasa, 12.39% de proteína, 1.9% de lactosa; Patton 1994), causando un diferente pero adicional pico termogénico. Cuando los neonatos son mantenidos por 48 horas en ayuno se ha encontrado la persistencia del incremento anticipatorio, mientras que el incremento adicional (pico termogénico) desaparece bajo estas condiciones (Gilge et al. 2000).

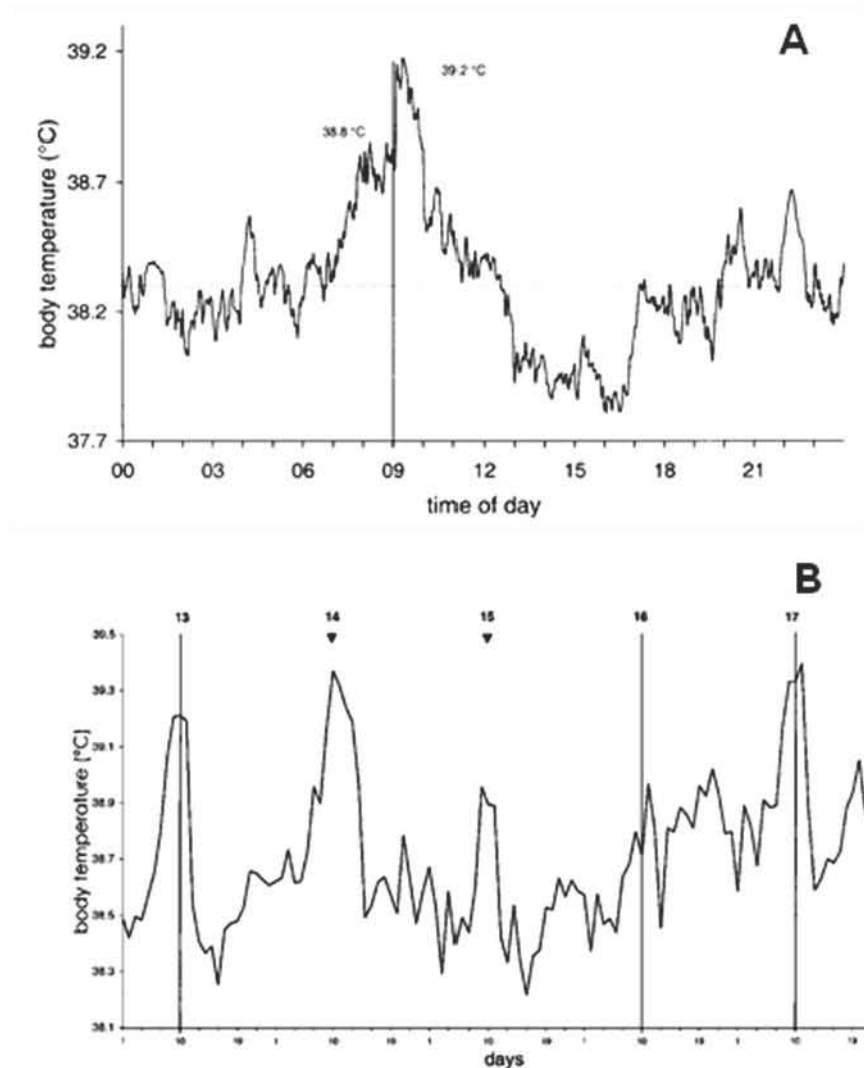


Figura 11. Graficas representativas: (A) del ritmo de temperatura corporal de una cría de conejo alimentada cada 24 horas (la línea vertical indica el momento de amamantamiento) y (B) de un neonato mantenido en ayuno durante 48 horas (indicado por los triángulos) Tomado de Jilge et al. 2000 y Jilge y Hudson 2001.

Evidencias experimentales de nuestro grupo de investigación indican que la maquinaria molecular del NSQ es sensible y sincronizable a las señales no-fólicas maternas. En crías de 7 días los genes reloj *Per1*, *Per2*; *Bmal 1*, exhiben un patrón diurno en el NSQ (Caldelas et al. 2007; Caldelas et al. enviado). En este trabajo, también se encontró que núcleo ventral del hipotálamo anterior (NVHA) muestra expresión rítmica de los genes reloj *Bmal1* y *Cry1* (Caldelas et al. 2007) Se sabe que el NVHA esta implicado en el control de la temperatura corporal (Kobayashi, 1986; Curras et al. 1991), mantenido a su vez conexiones recíprocas con las neuronas termosensitivas del área preóptica medial y el núcleo de la estria

terminalis. Por otra parte también hemos encontrado que cambios en el horario de amamantamiento, producen cambios de fase tanto en el patrón de expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en el NSQ de conejos neonatos, como en el ritmo de temperatura corporal (Caldelas et al. enviado, Caldelas et al. en prensa).

En el caso del fenómeno de anticipación al amamantamiento, no hay estudios que indiquen si estructuras hipotalámicas involucradas en la generación de la ritmicidad circadiana también participan en el fenómeno de anticipación en animales mantenidos en ayuno.

7. Importancia de la Ritmicidad Circadiana en los Procesos Psicológicos

Desde etapas prenatales, así como en etapas tempranas postnatales, las señales provenientes de la madre tienen una relevancia fundamental para la supervivencia de los neonatos, en particular en mamíferos altriciales, como es el caso del hombre. Esta información rítmica de la madre es transmitida a los críos desde que estos se encuentran *in útero*, de hecho el ambiente del feto es obviamente cíclico, ya sea por que el universo humoral al que está sometido (los niveles de ciertas hormonas, el paso de nutrientes), o por los cambios de comportamiento materno, ocurren de forma rítmica. Estudios con infantes prematuros y recién nacidos a término, han evidenciado una eventual presencia de componentes rítmicos en el rango circadiano de frecuencias, particularmente el ciclo sueño-vigilia, los cuales sugieren un proceso iniciado en las últimas semanas (Tenreiro et al. 1991).

Durante estas primeras etapas del desarrollo tiene lugar el ajuste fino en cuanto el funcionamiento del sistema nervioso central, como es el caso de la apoptosis, además durante estos periodos críticos del desarrollo el sistema nervioso es sensible a ser alterado por diferentes factores epigenéticos. Se sabe que durante estas etapas del desarrollo, también ocurre la maduración del sistema circadiano, en donde se forman las principales aferencias y eferencias del NSQ, es posible que durante estas etapas las señales no-fólicas maternas jueguen un papel preponderante en el establecimiento de conexiones relevantes para el sistema circadiano. En la actualidad no se sabe cuál es el efecto de la ausencia de

señales rítmicas en etapas tempranas del desarrollo y su impacto a nivel neuroanatómico, molecular y de comportamiento de los infantes.

En la actualidad es bien sabido que un gran número de procesos psicológicos poseen un componente circadiano, tal como es el caso del aprendizaje, en dónde se han corroborado relaciones importantes entre el reloj biológico y diversas estructuras cerebrales. En roedores, las eferencias del NSQ se dividen en hipotalámicas y unas pocas eferencias extra-hipotalámicas. De estas últimas, algunas se dirigen de una forma muy directa hacia el hipocampo y la amígdala (Watts, 1991). Se cree que otras vías más indirectas podrían ser los núcleos de rafe (NR) y los núcleos coeruleus (NC) que producen serotonina y noradrenalina, respectivamente, con un patrón rítmico. Tanto los núcleos de rafe como los núcleos coeruleus mandan proyecciones hacia el hipocampo (Kolen et al. 1989). Estas vías NSQ-NR/NC-Hipocampo podrían determinar la liberación rítmica de serotonina y noradrenalina en el hipocampo. Por su parte se sabe que estos neurotransmisores afectan los mecanismos celulares esenciales para la potenciación a largo plazo, proceso que se considera como una de las bases fisiológicas del aprendizaje (Rosenzweig 1996). En la actualidad no se tiene información sobre el desarrollo de estas eferencias, así como los posibles efectos de factores epigenéticos sobre el funcionamiento coordinado de estas estructuras.

En adultos, ha sido bien establecida la relación del sistema circadiano y algunas las psicopatologías, en particular aquellas que involucran desórdenes de la afectividad o emocionalidad; en la mayoría de los casos estas se caracterizan a por presentar patrones anormales en los ritmos circadianos, o más genéricamente, en la estructura temporal. Para mencionar algunos, en la depresión unipolar y bipolar (Asberg et al, 1976), la depresión estacional (Lewy, 1988), la depresión melancólica (Frazer et al, 1986), la anorexia nerviosa (Delvenne, 1992), la esquizofrenia (Van Cauter, 1986) se han observado ritmos circadianos anormales, tanto en el comportamiento, como en la fisiología. Por lo tanto, la prevalencia de los trastornos cronobiológicos en las patologías afectivas sugiere que en el sistema circadiano puede haber pistas importantes acerca de la etiología y los tratamientos de las enfermedades.

II. TRABAJO EXPERIMENTAL

1.OBJETIVOS

➤ General

Determinar el efecto de la privación materna de 72 horas sobre el funcionamiento de diferentes núcleos hipotalámicos.

➤ Específicos

Conocer el efecto de la privación materna de 72 horas sobre el perfil de expresión de los genes *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo.

Conocer el efecto de la privación materna de 72 horas sobre el perfil de expresión de los genes *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en el núcleo ventral del hipotálamo anterior.

2.HIPÓTESIS

Los osciladores circadianos poseen la capacidad de generar oscilaciones de forma autosostenida con un periodo cercano a 24 horas, en ausencia de señales rítmicas ambientales. Si el núcleo supraquiasmático y el núcleo ventral del hipotálamo anterior están involucrados en la generación y mantenimiento del patrón anticipatorio al amamantamiento en conejos neonatos, la expresión rítmica de los genes reloj *Per1*, *Per2*, *Bmal1* en estos núcleos hipotalámicos persistirán bajo condiciones de ausencia del evento de amamantamiento.

3.MÉTODOS

3.1 Animales

Se emplearon 60 crías, obtenidas de 9 camadas de diferentes hembras de conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) de raza chinchilla. Los cuáles fueron criados y mantenidos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

3.2 Tratamiento Experimental

➤ Condiciones de alojamiento de los animales

Las hembras fueron alojadas en jaulas individuales (12x60x45 cm de alto), las cuáles contaban con un riel en la parte media dónde se podía desplazar una lámina que separaba a la jaula en dos. Las hembras estuvieron albergadas en un cuarto con un ciclo 18 horas de luz / 6 horas de oscuridad (el encendido de la luz fue a las 10am). La temperatura ambiente fue mantenida a 20+/- 2⁰C, con humedad relativa entre 40-60%; con alimento (Conejos Engorda, Malta Cleyton, México) y con agua *ad libitum*. Para la formación del nido se les proporciona paja y una caja de acrílico opaca (28 x 29.5 x 30cm de alto), con una abertura de 14 cm de diámetro, la cuál fue proporcionada a las hembras gestantes 4 días anteriores al parto (el cuál se calcula a partir del día de apareamiento).

➤ Aislamiento

Después del parto, el cuál solo lleva unos pocos minutos en los conejos (Hudson et al. 1999), fueron pesados y permanecieron con sus madres durante seis horas para que está exhibiera las conductas maternas necesarias. Después de este tiempo, las crías se dejaron en la caja nido y se separaron de la hembra por medio de la lámina corrediza; las cajas nido fueron cubiertas con una funda plástica que impedía el paso de la luz al nido.

➤ Sincronización

El día del parto fue considerado como día postnatal 0 (P0). El siguiente día (P1), 30 minutos antes del encendido de las luces y con ayuda de una lámpara roja (que irradia 10 lux en el cuarto de la colonia y 2 luxes hacia la caja nido; la luz fue medida YK-10LX, Lutron, Electronic Enterprise Co; Taipei, Taiwán) fue

removida la cubierta de la caja nido cuidadosamente para no perturbar a las crías, la lámina que separaba a las crías fue abierta para permitir el acceso a la madre para que las alimentara a sus crías. Una vez que la hembra finalizará y saliera de la caja nido, esta de nueva cuenta fue cubierta y colocada la lámina divisora que separaba la hembra de las crías. Cada 24 horas se realizó el mismo procedimiento, para sincronizar a los neonatos.

➤ **Grupos**

Los neonatos fueron asignados a dos grupos: el **Grupo Control** alimentado por la madre cada 24 horas del día P1 a P9 y el **Grupo de Ayuno**, el cual fue alimentado por la madre cada 24 horas de P1 a P7, posterior a esto los neonatos permanecieron en ayuno los días P8 y P9.

➤ **Obtención de cerebros**

Con la finalidad de obtener el perfil de expresión de los genes reloj en el hipotálamo de los neonatos, fueron sacrificados de la siguiente forma: 1 hora antes del amamantamiento (8:30am), durante el horario de amamantamiento (9:30am) y 2 (11:30am), 9 (18:30pm) y 21 (6:30am) horas posteriores al amamantamiento (para formar 8 grupos de 5 y 6 conejos cada uno). Los conejos fueron sacrificados en una cámara de CO₂, pesados y decapitados. Los cerebros fueron retirados bajo luz normal, congelados en isopentano y guardados a -20 °C. Estos cerebros fueron cortados en un criostato, se obtuvieron secciones coronales a 20μ a nivel del hipotálamo anterior y el NSQ. Las secciones fueron montadas en portaobjetos preparados y almacenados a -70°C, hasta el momento de la realización de la hibridación *in-situ*.

➤ **Detección de genes reloj**

La detección de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* se realizó mediante la técnica de hibridación *in-situ* (HIS) como a continuación se describe (Fig. 12). Se utilizaron plásmidos, amablemente donados por el Dr. Steven M. Reppert (Hospital General de Massachussets). Mediante un procedimiento estándar los plásmidos fueron incorporados a bacterias competentes DH5α, después las células transformadas fueron sembradas para obtener colonias de bacterias con el plásmido insertado. Posteriormente las bacterias con el plásmido insertado fueron

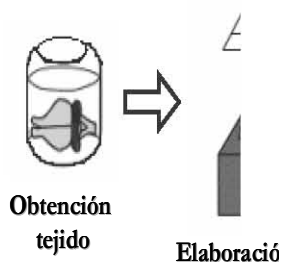
amplificadas, por lo que fueron incubadas a 37⁰C en agitación orbital durante 12 horas, para luego realizar el lisado de los plásmidos, utilizando para ello un kit de Midi-Prep (Quiagen Plasmid Midi-Kit, EUA). Una vez obtenido el plásmido lisado con una concentración de 1 µg/µl, se realizó la linearización del plásmido, durante 12 horas, mediante enzimas de restricción (éstas fueron seleccionadas de acuerdo al gen si era sentido o antisentido). Se corroboró la linearización del plásmido mediante una electroforesis.

Finalmente, se realizó la transcripción *in-vitro* de la sonda mediante un kit de transcripción SP6/T7 (Maxi script in Vitro transcripción kit SP6/T7, Ambion Inc; EUA) y uridina marcada con un radionúclido ³⁵S (α-thio)-trifosfato, además se usaron enzimas polimerasas que se eligieron de acuerdo al plásmido, en el caso del gen *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 para la anti-sentido SP-6. Finalmente para el gen *Bmal1* se utilizo T7 para la sonda sentido y para la sonda anti-sentido SP6.

Mediante un protocolo estándar las sondas fueron purificadas y su concentración fue cuantificada en un contador de centelleo descartando aquellas sondas cuyo valor no se encontrara dentro del rango 500,000-1,000, 000 dpm/1µl de sonda.

Siguiendo una técnica estándar se realizó la HIS (Caldelas et al. 2003), primero se realizo la prehibridación (Fig. 12), en la que se trato el tejido de la siguiente forma: primero se fijo el tejido con paraformaldehido 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. Posteriormente se realizó la hibridación, en la cual se cubrió el tejido con la sonda marcada radioactivamente y se dejo hibridando por 12 horas a 54⁰C. Pasado éste tiempo se retiró la sonda marcada radiactivamente y se realizaron los baños de astringencia utilizando para ésta concentraciones decrecientes y a diferentes temperaturas de un amortiguador cloruro de sodio, citrato de sodio y finalmente se deshidrató el tejido mediante concentraciones crecientes de etanol.

Posteriormente se dejaron secando las laminillas y fueron acomodadas en cassetes de autorradiografía colocando sobre estas una película (Kodak Biomax) durante 20 días, a temperatura ambiente. Transcurrido éste tiempo se reveló la película para observar el precipitado de las moléculas de plata.



Película

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

3.3 Análisis de Datos

Cuantificación de la Señal en las Películas de Auto-Radiografía

Se hizo la medición de los niveles de expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* mediante el programa MCID (Image Research Inc; Canadá) el parámetro que se obtuvo fue la densidad óptica relativa (DOR) de las películas. Al valor obtenido cuantificado la expresión en el NSQ y del NVHA, se le sustrajo el valor de fondo correspondiente al hipotálamo adyacente. Cada punto de muestreo

contaba con al menos 5 sujetos, de los cuáles se cuantificaron 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.

Análisis Estadístico

El método empleado para conocer las características de la ritmicidad de ambos grupos de animales fue el método COSINOR.

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.

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

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

En donde *ti* 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.

4.RESULTADOS

Cabe destacar, que en condiciones experimentales las crías sobreviven sin daño alguno ante ayunos de dos ciclos, de hecho se ha descrito que en condiciones naturales las crías son privadas de alimento frecuentemente debido a la competencia entre hermanos de camada por el acceso al alimento [Hudson, 1998]. Con la finalidad de comprobar si la restricción del acceso a las crías por parte de la hembra no tuvo influencia en el crecimiento de los neonatos, fue obtenido el peso corporal de éstos los días P0 y P9. Para el día P9 el peso promedio de los neonatos del grupo control fue de 135.6 ± 18.1 gr, mientras que de los del grupo ayuno fue 123.6 ± 5.6 gr. Basados en los pesos corporales de los neonatos encontramos, al igual que en previos reportes, que el estado de los neonatos no se vio comprometida por el procedimiento experimental empleado, en casos aislados hubo decesos.

Encontramos una robusta expresión de los genes *Per1*, *Per2* y *Bmal1*, en el NSQ y en el NVHA de los neonatos, tal como lo habíamos demostrado en estudios previos en nuestro grupo de investigación (Fig. 13)

Perfil de Expresión de Genes Reloj en el NSQ

En el perfil temporal de expresión de *Per1* en el NSQ de los neonatos sincronizados por amamantamiento del día P1-P9, encontramos que exhibe un patrón diurno en su expresión, cuya ritmicidad fue de 94.5%. La máxima abundancia de este gen ocurrieron 3.1 horas posteriores al horario de amamantamiento, posteriormente los niveles de *Per1* comienzan a disminuir 9

horas después observándose los niveles más bajos de la expresión de este gen aproximadamente 21 horas posteriores al amamantamiento, la disminución fue de aproximadamente 20.7% en relación a los niveles observados en la acrofase (Fig. 14 y Tabla 1).

En relación a la expresión del gen *Per 2* en el NSQ, encontramos que este también exhibe un patrón diurno en su expresión en este grupo de animales amamantados cada 24 horas. El análisis COSINOR indicó que el perfil de expresión de *Per2* en el NSQ posee una ritmicidad de 94.4%. Los máximos niveles de expresión de *Per2* ocurrieron 6 horas posteriores al momento del amamantamiento, los niveles comienzan a disminuir aproximadamente 10 horas después del momento de amamantamiento, los niveles más bajos de la expresión de este gen ocurrieron aproximadamente 21 horas posteriores al amamantamiento, la disminución fue de aproximadamente el 37% en relación a los niveles observados en la acrofase (Fig. 14 y Tabla 1).

En relación al perfil de expresión gen *Bmal1* en el NSQ de los neonatos del grupo control, encontramos que éste también exhibe un patrón diurno en su expresión, cuya ritmicidad fue de 97.2%. Los niveles máximos de abundancia del gen *Bmal1* ocurrieron aproximadamente 23.1 horas posteriores al horario de amamantamiento, los niveles comienzan a disminuir 5 horas después del momento del amamantamiento. Los niveles más bajos de la expresión de este gen se observaron 11 horas después de ocurrido el amamantamiento, la disminución fue de aproximadamente 27.5% en relación a los niveles observados en la acrofase (Fig. 14 y Tabla 1).

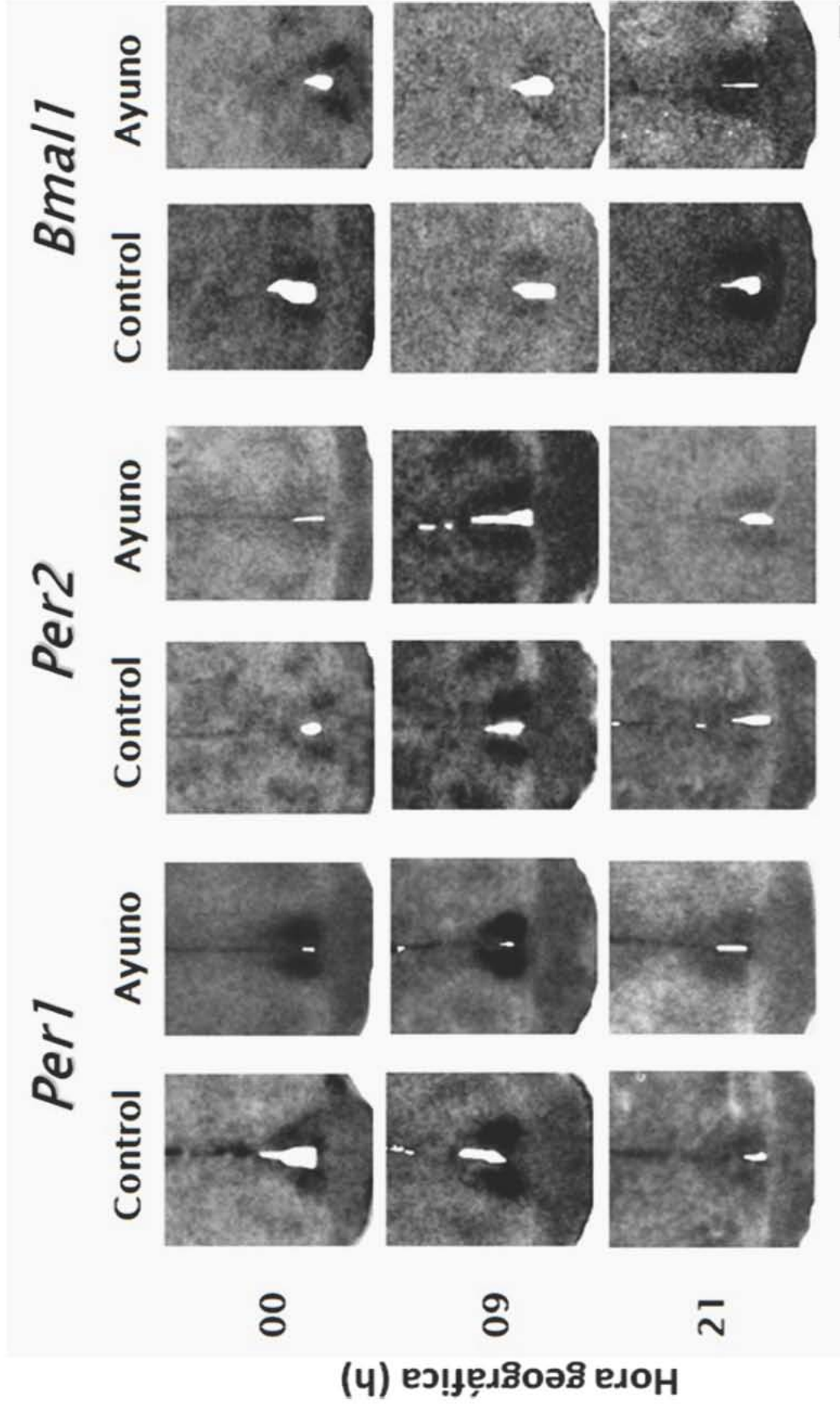
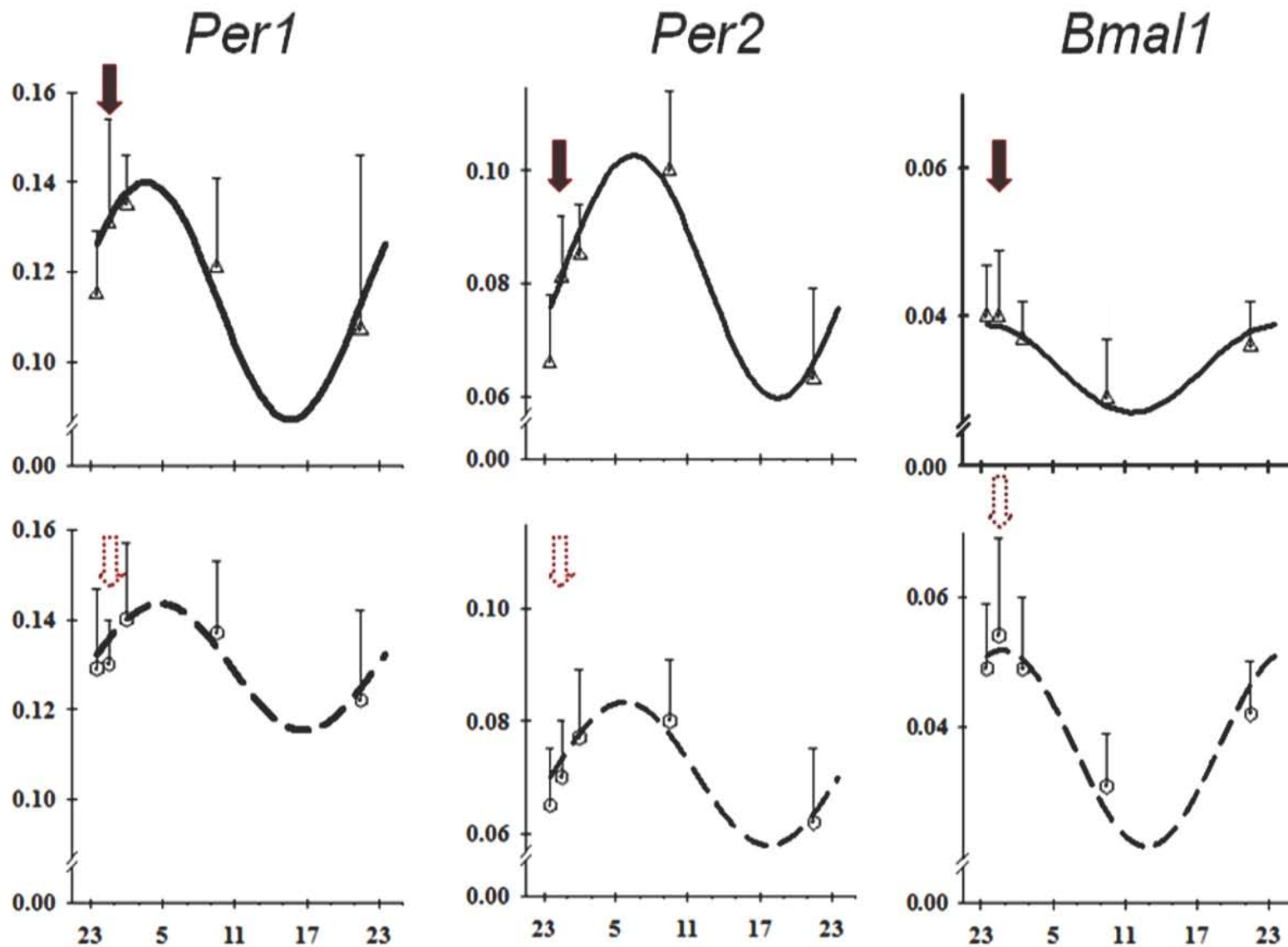


Figura 13. Micrografías representativas de la expresión de genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en el núcleo supraquiasmático (NSQ) de conejos neonatos. La detección de estos genes se realizó mediante hibridación *in situ* con oligodeoxinucleótidos marcados radiactivamente. La barra indica 100 μ . Las elipses indican la ubicación del NSQ.



Tiempo en relación al amamantamiento (h)

Figura 14 Gráficas del perfil temporal de expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en el núcleo supraquiasmático de conejos de 9 días de edad mantenidos en un ciclo oscuridad continua. Los neonatos del **grupo control** (líneas continuas) tuvieron acceso a la hembra lactante cada 24 horas para ser amamantados del día 1 al 9 postnatal. Mientras que el **grupo de ayuno** (líneas discontinuas) fueron amamntados cada 24 horas del día 1 al 7 de edad y permanecieron sin acceso a la hembra durante los días postnatales 8 y 9. Las flechas indican el momento en que la hembra visita a las crías para alimentarlas.

NSQ

Per1

	CON	AYU
Acrofase	3.1	4.2
Ritmicidad	94.5%	96.9%
P	0.001	0.0004

Per2

	CON	AYU
Acrofase	6.0	5.2
Ritmicidad	94.4%	98.4%
P	0.001	0.0001

Bmal1

	CON	AYU
Acrofase	23.1	24.3
Ritmicidad	96.3%	97.2%
P	0.0006	0.0003

Tabla 1. Tablas de los resultados del ajuste COSINOR de los niveles de expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en el núcleo supraquiasmático de los neonatos del grupo control (CON) y grupo mantenido en ayuno (AYU).

En el grupo de animales que fueron sincronizados por amamantamiento del día P1 a P7 y se mantuvieron sin acceso a la hembra lactante los días P8 y P9 encontramos que el NSQ de estos exhibe un patrón circadiano en la expresión de los tres genes bajo estudio.

En este grupo de neonatos bajo ayuno, el NSQ muestra un patrón circadiano en la expresión del gen *Per1* exhibe, cuya ritmicidad fue de 96.9%, en donde los niveles máximos de expresión ocurrieron 4.2 horas posteriores al horario de amamantamiento, los niveles comienzan a disminuir aproximadamente 9 horas después al supuesto momento del amamantamiento, observándose los niveles más bajos de la expresión de *Per1* a 21 horas posteriores al supuesto momento del amamantamiento, la disminución fue de aproximadamente 12.8% en relación a los niveles observados en la acrofase (Fig. 14 y Tabla 1).

En cuanto a la expresión del gen *Per2* en el NSQ de este mismo grupo de neonatos mantenidos en ayuno, encontramos que este gen también exhibe un patrón circadiano en su expresión, cuya ritmicidad fue de 98.4%. La máxima abundancia de *Per2* en el NSQ ocurrieron aproximadamente 5.2 horas posteriores al supuesto momento de amamantamiento, los niveles comienzan a disminuir 11 horas posteriores al supuesto momento del amamantamiento, observándose los niveles más bajos del gen *Per2* 21 horas posteriores al supuesto momento del amamantamiento, la disminución fue de aproximadamente 22.5% en relación a los niveles observados en la acrofase (Fig. 14 y Tabla 1).

Finalmente, encontramos que la expresión del gen *Bmal1* en el NSQ de los neonatos en ayuno también exhibe un patrón circadiano en su expresión, cuya ritmicidad fue de 97.2%. La mayor abundancia de *Bmal1* en el NSQ ocurrieron 24.3 horas posteriores al supuesto momento del amamantamiento, los niveles comienzan a disminuir 5 horas después al supuesto momento del amamantamiento, observándose los niveles más bajos de la expresión de *Bmal1* 9 horas posteriores al supuesto momento del amamantamiento, la disminución fue de aproximadamente 42.5% en relación a los niveles observados en la acrofase (Fig. 14 y Tabla 1).

Perfil de Expresión de Genes Reloj en el NVHA

En el perfil de expresión de estos genes *Per1*, *Per2*, *Bmal1* en el NVHA de los neonatos del grupo control sincronizados por amamantamiento del día P1-P9, para el grupo de ayuno de P1-P7 y sin acceso a la hembra lactante P8 y P9, se encontró lo siguiente:

En lo que se refiere a la expresión de *Per1* y *Per2* en el NVHA de los neonatos amamantados cada 24 horas, no se detectaron cambios rítmicos en la expresión de estos dos genes, en ambos casos tanto el porcentaje de ritmicidad (menor al 75%), como la probabilidad estadística (<0.05) estuvieron fuera del rango para ser considerados como fenómenos rítmicos. Por otra parte, encontramos una importante dispersión de los niveles de expresión en los diferentes momentos del día (Fig. 15 y Tabla 2). Por el contrario, la expresión de *Bmal1* en el NVHA de los conejos que fueron amamantados cada 24 horas, en estos si fue encontrado un perfil diurno de este gen, en donde la expresión de este gen exhibió una ritmicidad del 99.2% en los neonatos del grupo control. Los niveles máximos de expresión de *Bmal1* ocurrieron 16.4 horas posteriores al momento del amamantamiento, los niveles comienzan a disminuir 23 horas después observándose los niveles más bajos de la expresión de este gen a 2 horas posteriores al amamantamiento, la disminución fue de aproximadamente 40% en relación a los niveles observados en la acrofase (Fig. 15 y Tabla 2). Por lo que encontramos que el NVHA posee en perfil diferencial en la expresión de los genes reloj, en donde solo *Bmal1* exhibe ritmicidad diurna.

En relación al grupo de ayuno, en donde los neonatos no tuvieron acceso a la hembra lactante los días P8 y P9, ninguno de los genes bajo estudio exhibieron ritmicidad circadiana (Fig. 15 y Tabla 2). En todos los casos el porcentaje de ritmicidad (menor al 75%), y la probabilidad estadística (<0.05) estuvieron fuera del rango para ser considerados como fenómenos rítmicos. Por otra parte, encontramos una importante dispersión de los niveles de expresión en los diferentes momentos del día (Fig. 15 y Tabla 2).

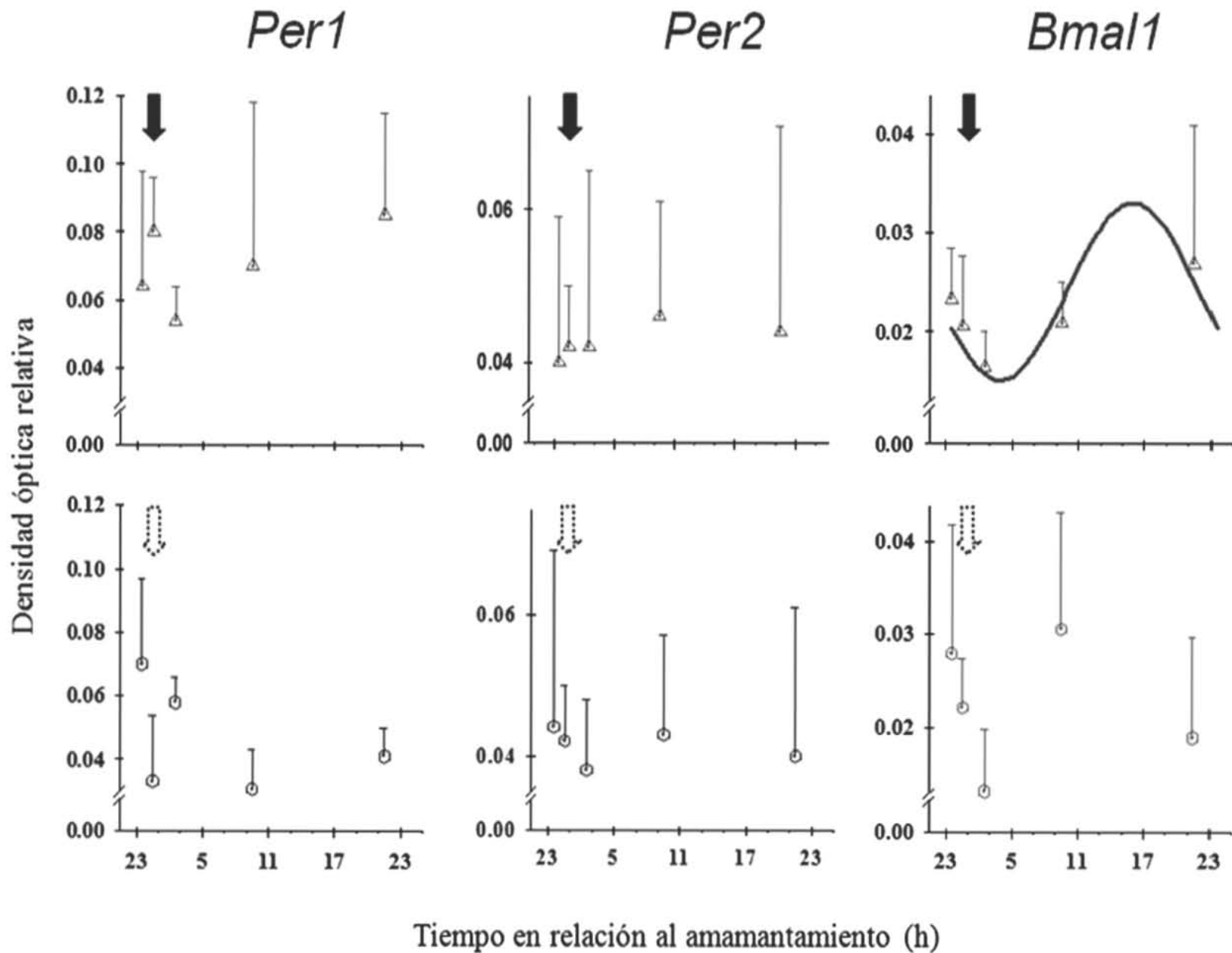


Fig. 15 Gráficas de la expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en núcleo ventral del hipotálamo anterior (NVHA) de conejos de 9 días de edad mantenidos en un ciclo oscuridad continua, (grupo control) con acceso a la hembra lactante para ser amamantados cada 24 horas los 9 días (panel superior) las flechas indican el momento en que la hembra visita a las crías para alimentarlas. En el panel inferior se muestra la expresión de estos mismos genes en el NVHA de de neonatos sin acceso a la hembra durante los días postnatales 8 y 9, (grupo de avuno).

NVHA

Per1

	CON	AYU
Acrofase	----	----
Ritmicidad	68.5 %	12.2%
P	N.S.	N.S.

Per2

	CON	AYU
Acrofase	----	----
Ritmicidad	70.2 %	27.2%
P	N.S.	N.S.

Bmal1

	CON	AYU
Acrofase	16.4	----
Ritmicidad	99.2 %	66%
P	0.00003	N.S.

Tabla 2. Tablas de los resultados del ajuste COSINOR de los niveles de expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en el núcleo ventral del hipotálamo anterior (NVHA) de los neonatos del grupo control (CON) y grupo mantenido en ayuno (AYU).

5.DISCUSIÓN

Este es el primer reporte de Ritmos Circadianos en el núcleo supraquiasmático de conejos (*Oryctolagus cuniculus*). Como es bien conocido los ritmos circadianos tienen como característica fundamental ser generados de manera endógena, en mamíferos el NSQ es el encargado de dirigir la ritmicidad endógena. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre el desarrollo temprano del sistema circadiano, debido a los exhaustivos cuidados maternos que en casi todos los mamíferos se presentan. Un modelo que puede ofrecer una excelente oportunidad para el desarrollo temprano del sistema circadiano, es el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) (Hudson, 1998), debido a que esta especie tanto en condiciones naturales como de laboratorio, puede observarse una visita diaria de la hembra cada 24 hrs. para alimentar a sus crías, la cual dura solo unos cuantos minutos (Hudson y Distel, 1989, Jilge 1993). Por lo tanto se ha observado que las crías anticipan la llegada de la hembra incrementando sus niveles actividad y temperatura de 1-2 hrs. antes de la llegada de la hembra (Hudson y Distel, 1982, Jilge 1993). Además es importante mencionar que el patrón diurno de actividad continúa aún cuando la visita de la hembra es omitida, sugiriendo de esta forma que esta conducta está gobernada por un ritmo endógeno (Hudson y Distel 1982, Jilge 1993). Este fenómeno de anticipación al amamantamiento es un patrón rítmico circadiano que parece estar controlado endógenamente.

Una primera investigación que busco dilucidar las bases neurales del fenómeno de anticipación al amamantamiento fue realizado por Allingham et al. 1998, empleando el gen de expresión temprana c-Fos se dieron a la tarea de identificar los patrones de actividad neural asociados al ritmo de actividad endógena. Las crías empleadas fueron de 3 y 7 días de edad, encontrando que la expresión de c-Fos ocurre en el núcleo paraventricular del tálamo (PVT) 2 hrs. posteriores al horario de alimentación tanto en el grupo de animales alimentados diariamente como en el grupo de animales mantenidos en ayuno de 1 día, sugiriendo de esta forma que el PVT refleja un patrón endógeno circadiano de actividad neural. El PVT es un núcleo que mantiene una inervación importante con el NSQ, además de ser un núcleo involucrado en la conducta de alertamiento.

Otro núcleo investigado en este trabajo es el núcleo paraventricular del hipotálamo PVN el cual muestra una expresión celular diferenciada de c-Fos, ya que en las crías alimentadas durante los 7 días consecutivos hay una expresión de c-Fos principalmente en las células parvocelulares de este núcleo; mientras que en las crías en ayuno c-Fos se expresa 2 hrs. posteriores al horario del supuesto amamantamiento principalmente en las células magnocelulares. Esta expresión diferenciada puede ser explicada de acuerdo con los autores por un estado interno de dominancia simpática durante la anticipación a efectos parasimpáticos como la urinación, digestión y la conducta de reposo posteriores al amamantamiento.

También se observó la expresión de c-Fos en el núcleo supraóptico (SO), esta expresión es explicada debido a la ingestión de leche de acuerdo con los autores.

Sin embargo los resultados arrojados por este estudio no son concluyentes debido al muestreo realizado en el que solo registran la expresión de c-Fos en solo 2 horas anteriores al amamantamiento y hasta seis horas después de que este ocurrió, horas que no parecen ser suficientes para observar la expresión de c-Fos en otras áreas cerebrales incluyendo al NSQ que es el principal marcapaso circadiano en mamíferos, y por lo tanto una estructura obvia para estudiar. Además es bien conocido que c-Fos es una proteína que sirve como marcador de activación celular, de la cuál aún no se conoce su función en general y tampoco se ha asociado a los mecanismos moleculares circadianos.

Una de las ventajas que ofrece nuestro estudio, es que, monitoreamos la expresión de los genes reloj, que son parte de los mecanismos moleculares que subyacen a los Ritmos Circadianos y que al ofrecer un patrón rítmico de expresión, sirven como un marcador de fase muy preciso. Estos genes reloj tienen una expresión muy similar a la observada en otros mamíferos (Reppert y Weaver, 2001). En nuestro estudio la expresión de los genes reloj en animales sincronizados por amamantamiento de P1 a P9 ocurre de la siguiente manera: *Per1* es el primero que empieza a expresarse después de ocurrido el evento de amamantamiento, aproximadamente 3.1 horas después seguido por *Per2* que comienza su expresión 6 horas después de que ocurre el horario de amamantamiento, al disminuir estos, empieza a incrementar *Bmal1* el cuál, se

expresa abundantemente en antifase a los genes *Per1* y *Per2*. Estos resultados están en concordancia con lo observado en estudios previos donde el patrón de expresión rítmica de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* se comporta de forma similar a lo observado en estudios previos (Caldelas et al. 2007: Caldelas et al. enviado).

Es evidente que el NSQ de los conejos en ayuno exhibe un patrón endógeno en su expresión, el cuál difiere de forma significativa al del NVHA, el cuál solo muestra ritmicidad en *Bmal1* bajo condiciones de sincronización, pero tan pronto como se quita la señal este pierde el patrón rítmico. Por lo tanto, es posible que el NSQ este involucrado en la estimación del paso del tiempo para anticipar el amamantamiento y dado que este núcleo exhibe ritmicidad endógena permita la anticipación de animales en ayuno.

Se han hecho estudios de otras estructuras hipotalámicas como es el núcleo dorsomedial y el núcleo ventromedial del hipotálamo de lesiones y monitoreo de su actividad encontrando que no exhiben ritmicidad endógena.

Sin embargo para corroborar que el NSQ es el encargado de la generación endógena de la anticipación, se necesitan hacer lesiones de este núcleo y observar si la anticipación se elimina o sigue presente. Además se tendrá que realizar un segundo experimento con la finalidad de alterar el asa de retroalimentación del reloj circadiano en regiones restringidas del sistema nervioso central de forma reversible, mediante la administración intracerebral de oligodeoxinucleotidos antisentido dirigidos específicamente contra genes reloj que de acuerdo a los experimentos anteriores se encuentren involucrados en el mantenimiento de la actividad anticipatoria al amamantamiento.

6.CONCLUSIONES

Este es el primer estudio en demostrar que el NSQ de conejos exhibe ritmicidad endógena, ya que los conejos neonatos mantenidos en oscuridad constante y mantenidos en ayuno durante 72 horas, muestran un patrón rítmico en la expresión de los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1* en el NSQ, es posible que este sea parte de los mecanismos endógenos que les permite a los conejos neonatos predecir y anticipar el momento del amamantamiento.

7.PERSPECTIVAS

Realizar lesiones del núcleo supraquiasmático con la finalidad de corroborar si este es el que de manera endógena regula la anticipación al amamantamiento.

Alterar el asa de retroalimentación del reloj circadiano mediante la administración intracerebral de oligodeoxinucleótidos antisentido dirigidos específicamente contra los genes reloj *Per1*, *Per2* y *Bmal1*, que están involucrados con la actividad anticipatorio al amamantamiento.

REFERENCIAS

Abrahamson E, Moore R (2001): The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *NeuroReport* 12:435-440.

Aguilar-Roblero R, Guadarrama C, Parmênides, Chávez J (2004): Aspectos Celulares y Moléculares del Núcleo Supraquiasmático. En: Hernández M. y Ortega A. (Eds). *Fisiología celular y molecular principios y conceptos*. Universidad Veracruzana, pp. 181-192.

Allingham K, Von Saldern C, Brennan P, 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.

Altman J, Bayer S (1978): Development of the diencephalon in the rat. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 182:945-971.

Altman J, Bayer S (1986): The development of the rat hypothalamus. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 100: 1-78.

Asberg M, Thoren P, Traksman L, Bertilson L, Ringerber V (1976): Serotonin depression: a biochemical subgroup within the affective disorders?. *Science* 191: 478-480.

Aschoff J. (1981): A Survey on Biological Rhythms. En: Aschoff J. (Ed.) *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Vol.4. New York: Plenum Press. Pp. 3-10.

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

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, 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.

Caldelas I, D. Tejadilla, B. González, R. Montúfar y R. Hudson (2007): Diurnal Pattern of clock gene expresión in the Hypothalamus of the newborn rabbit. *Neuroscience* 144: 395-401.

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 D, Reppert S (2001): The circadian clocks of mice and men. *Neuron* 29: 555-558.

Curras M, Kelso S, Boulant J (1991): Intracellular analysis of inherent and synaptic activity in hypothalamic thermosensitive neurones in the rat. *J Physiol* 440:257-271.

Davis F (1981): Ontogeny of circadian rhythms. En: Aschoff J (Ed). *Handbook of Behavioral Neurobiology* New York: Plenum Press. 4: 257-274.

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.

Delvenne V, Kerkhofs M, Apélobom-Fondu J, Lucas F, Mendlewicz J (1992): Sleep polygraphic variables in anorexia nervosa and depression: a comparative study in adolescents. *J. Affect Disord.* 25: 167-172.

Denenberg V, Huff R, Ross S, Sawin P, Zarrow M (1963): Maternal Behavior in the rabbit: The quantification of nest building. *Anim Behav* 2: 494-499.

Denenberg V, De Santis D, Waite S, Thoman E (1997): The effects of handling in infancy on behavioral status in the rabbit. *Physiol Beba* 18:553-557.

Drucker C, Aguilar-Roblero, García H, Fernández C, Bermudez R (1984): Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythms recovery of lesioned rats. *Brain Res.*, 311: 353-357.

Esseveldt L, Lehman M, Boer G (2000): The suprachiasmatic nucleus and circadian time-keeping system revised. *J Brain Res.* 33: 34-77.

Frazer A, Brown R, Kocsis J, Caroff S, Amsterdam J, Winokur A, Sweeney J, Stokes P (1986): Patterns of melatonin rhythms in depression. *J. Neural Transm.* 21:269-290.

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.

Gottlieb G (1971): Ontogenesis of sensory function in birds and mammals. In: Biopsychology of Development (Tobach E, Aronson L and Shaw E, eds.) pp.67-128. Academic Press, New York.

Green D, 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 y Hendriks J (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurons recorded in vitro. *Neurosci. Lett.* 34: 283-288.

Gruart A, Delgado J, Escobar C, Aguilar R, (2002): "Los Relojes que Gobiernan la Vida" Ed. Fondo de Cultura Económica: Pp 45,-70.

Halberg F (1959): Physiologic 24 hour periodicity: general and procedural considerations with reference to the adreanal cycle. *Vitamin-Hormone-Fermentforsch* 10: 225-96.

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

Hastings M, Duffield G, Smith E, Maywood E, Ebling F (1998): Entrainment of the circadian system of mammals by nonphotic cues. *Chronobiol Int* 15: 425-445.

Honma K, Honma S, Shirakawa T, Hiroshige T (1987): Phase setting of circadian locomotor rhythm of infant rats. *Am. J. Physiol.* 252: R 256-R 61.

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.

Horton T (2001): Conceptual Issues in the Ecology and Evolution of Circadian Rhythms. En *Circadian Clocks, Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol. 12 (Ed) Takahashi J, Turek F, y Moore R, Klumer Academic Plenum Publishers, New York. 12: 45-53.

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. *Behav.* 85: 260-275.

Hudson R, Distel H (1984): Nipple-search pheromone in rabbits: Dependence on season and reproductive state. *J.Comp. Physiol. A* 155: 13-17.

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 (1990): Sensivity of female rabbits to changes in photoperiod as mesured by pheromone emission. *J. Comp Physiol A* 167: 225-230.

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

Hudson R, Cruz Y, Lucio R, Ninomiya J, Martínez-Gómez-M (1999): Temporal and behavioral patterning of parturition in rabbits and rats. *Physiol Behav* 66: 599-604.

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

Isojima Y, Okamura N, Nagai K (2003): Molecular Mechanism Mammalian Circadian Clock. *J. Biochem.* 134: 777-784.

Jilge B (1993): The ontogeny of circadian rhythms in the rabbit. *J. Biol Rhythms.* 8:247-260.

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 y 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.

Kalén E (1989): Hipocampal NA and 5-HT release over 24hs as measured by the dialysis technique in freely moving rats: correlation to behavioral activity state, effect of handling and tail pinch. *Eur. J. Neuroscience*, 1:181-188.

Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Iwata T, Fujimoto K, Furukawa M, Miyazaqui K, Homma K, Kato Y (2004): A novel Autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 117-124.

Kobayashi S (1986): Warm-and cold sensitive neurons inactive at normal core temperature in rat hypothalamic slices. *Brain Res* 362: 132-139.

Lewy A, Wehr T, Goodwin K, Newsome D, Markey S (1988): Light suppresses melatonin secretion in humans. *Science* 210: 1267-1269.

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

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

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

Moga M, Weis R y Moore R (1995): Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 359: 221-238.

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

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

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

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

Moore R, Leak R (2001): Suprachiasmatic nucleus. En: *Circadian Clocks.* Takahashi J, Turek F, Moore R (Eds.) New York: Kluwer Academic Plenum Publishers 12: 141-171.

Moore R, Shibata S, Bernstein M (1989): Developmental anatomy of the circadian system. En: Reppert SM (Ed.) *Developmental of Circadian Rhythmicity and Photoperiodism in Mammals.* Res in Peri Med Bost: Perinatology Press. 9: 1-24.

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

Novak C; Harris A; Smale L y and Nunez A (2000): Suprachiasmatic nucleus projection to the paraventricular thalamic nucleus in nocturnal rats (*Rattus norvegicus*) and diurnal Nile grass rats (*Anvicanthis niloticus*). *Brain Res.* 874: 147-157.

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.

Okamura H, Yamaguchi S, Yagita K. (2002): Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res* 309: 47-56.

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

Palmer J, Brown F, Edmunds L (1976): *An Introduction to Biological Rhythms* New York : Academic Press.

Patton N (1994): Colony husbandry. In *The Biology of the Laboratory Rabbit*, 2ed.(Maining P, Ringler D, Newcomer, eds),pp 27-45, Academic Press, San Diego.

Pittendrigh C y Dan S (1976): Funcional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents (I-IV). *J. Comp. Physiol.* 106:223-355.

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

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

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

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

Reppert S, Weaver D (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.* 353-370.

Ripisardi S, Chow K, y Mahers L (1975): Ontogenesis of receptive field characteristics in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rabbit. *Brain Res.* 22: 295-305.

Rosenzweig M (1996): Aspects of the search for neural mechanisms of memory. *Annu. Rev. Psychol.* 47: 1-32.

Rovirosa M, Levine S, Gordon M, Caba M (2005): Circadian rhythm of corticosterone secretion in neonatal rabbit. *Dev Brain Res* 158:92-96.

Sawaki Y., Nihonmatsu I, Kamura H (1984): Transplantation of the neonatal suprachiasmatic nuclei into rats with complete bilateral suprachiasmatic lesions. *Neurosci Res*, 1: 67-72.

Schibler U, Juergen R, Steven A (2003): Peripheral Circadian Oscillators in Mammals: Time and Food. *J Biol Rhyth* 18: 250-260.

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.

Schwartz W, Gainer H (1997): Suprachiasmatic nucleus: Use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197: 1089-1091.

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

Stephan F (2002): The "other" circadian system: Food as a zeitgeber. *J. Biol. Rhythms* 17: 284-292.

Takahashi K, Hayafuji C., Murakami N (1982): Foster mother rat entrains circadian adrenocortical rhythm in blinded pups. *Am. J. Physiol.* 243: E443-E449.

Takahashi K, Ohi K, Shimoda K, Yamada N, Hayashi S (1989): Postnatal maternal entrainment of circadian rhythms. In Reppert SM(ed) *Development of circadian rhythmicity and photoperiods in mammals.* Perinatology Press, Ithaca, NY. 67-82.

Tenreiro S, Dowse H, D'Souza S, Minors D, Chiswick M, Sims D, Waterhouse J (1991): The development of ultradian and circadian rhythms in premature babies maintained in constant conditions. *Early Human Development.* 27:33-52,.

Thoman E Acebo C, Lamm S (1993): Stability and instability of sleep in older persons recorded in the home. *Sleep.* 16:578-585.

Tosini G, Menaker M (1998): The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res.* 789: 221-228.

Van Cauter E, Turek F (1986): Depression. A disorder of time keeping? *Perspectives in Biology in Medicine* 29(4): 510-519.

Van den Pol A (1980): The hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: Intrinsic Anatomy. *J of Comp. Neurol.* 191: 661-702.

Van Gelder R, Herzog E, Schwartz W, Taghert P (2003): Circadian Rhythms: In the Loop at Last. *Science* 300:1534-1535.

Vega-González A. (1993): Análisis Estadístico de la cronobiología *Psiquis*, Vol. 2, 139-149.

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

Wishaw I, Flannigan K, Barnsley R (1979): Development of tonic immobility in the rabbit: Relation to body temperature. *Develop. Psychobiol.* 12:595-605.

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.

Yamazaki A, Y. Ohtsuki, T. Yoshihara, S. Honma, K. Honma (2005): Maternal deprivation in neonatal rats of different conditions affects growth rate, circadian clock, and responsiveness differentially. *Physiol. Behav.* 86:136-144.

Zarrow M, Denenderg V, Anderson C (1965): Rabbit: frequency of suckling in the pup. *Science* 31: 1835-1836.

ANEXOS

GLOSARIO

Acrofase: momento del ciclo en que la variable alcanza su valor máximo.

Amplitud: parámetro que caracteriza a cualquier fenómeno rítmico y que hace referencia a la magnitud de la variación del fenómeno en estudio y se estima obteniendo la diferencia entre el valor máximo o cresta al valor mínimo o valle del ciclo.

Ángulo de fase: Se refiere a la fase de referencia de dos eventos oscilatorios distintos.

Anticipación al alimento: conducta de alertamiento que se caracteriza por un incremento en la actividad locomotora, además de conductas de búsqueda.

Fase: parámetro que caracteriza a cualquier fenómeno rítmico y que se refiere al momento (hora, día o mes) en que ocurre un hecho característico dentro del ciclo de estudio.

Hipotálamo: porción del cerebro localizada bajo el tálamo y que cumple un papel importante en la regulación neuroendocrina de procesos vegetativos y metabólicos.

Mesor: característica para describir a cualquier ritmo, que indica el promedio de los valores observados.

Núcleo supraquiasmático: pequeño conjunto neuronal localizado en el hipotálamo, sobre el quiasma óptico.

Oscilación espontánea: se refiere al periodo del oscilador involucrado en la generación del patrón rítmico.

Oscilador: centro generador de un ritmo determinado.

Periodo: parámetro que caracteriza a cualquier fenómeno rítmico y que se refiere al intervalo entre dos puntos de referencia idénticos.

Reloj biológico: estructura biológica que genera un ritmo determinado.

Ritmos Biológicos: repetición regular de una característica biológica a lo largo del tiempo.

Ritmos Circadianos: son aquellos fenómenos cuya ocurrencia es cercana a las 24 horas, y que muestran un periodo cercano al ciclo luz-oscuridad.

Ritmos infradianos: son ritmos que tienen como característica tener una frecuencia menor que los circadianos, es decir que necesitan más de un día para que se repitan.

Ritmos ultradianos: Son aquellos ritmos que tienen una frecuencia mayor que los circadianos, es decir se repiten más de una vez en un día.

Sincronizador: elemento que regula y sintoniza el comienzo de un ritmo biológico. Los sincronizadores pueden ser internos o externos.

Sincronización: este fenómeno ocurre cuando los osciladores ajustan su periodo y fase a la ocurrencia de señales cíclicas ambientales.

Tálamo: centro nervioso que aparece como lecho en el que se apoya la corteza cerebral y que contiene neuronas relacionadas con la percepción de distintas modalidades sensoriales.

ABREVIATURAS

A: Amplitud
AVP: Avidina Vasopresina
AYU: Ayuno
CG: Células Ganglionares
CON: Control
DM: Dorsomedial
DOR: Densidad Óptica Relativa
E: Embrionario
GABA: Ácido Gamma Amino-butírico
HIS: Hibridación *in-situ*
IGL: Hojuela Intergeniculada
M: Mesor
NAT: N-acetil transferasa
NC: Núcleos Coeruleus
NR: Núcleos del Rafe
NSQ: Núcleo Supraquiasmático
NVHA: Núcleo Ventral del Hipotálamo Anterior
P: Postnatal
PHL: Péptido Histidina Leucina
PVT: Núcleo Paraventricular Tálamo
QO: Quiasma Óptico
RB: Ritmos Biológicos
RC: Ritmos Circadianos
SPVz: Zona Subparaventricular
TGH: Tracto Genicula Hipotalámico
TRH: Tracto Retino hipotalámico
VIP: Péptido Vasoactivo Intestinal
VL: Ventrolateral
3V: Tercer Ventrículo