



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DEL NUCLEO PARAVENTRICULAR DEL TALAMO
EN LA SINCRONIZACION A SEÑALES NO LUMINOSAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

PRESENTA:

JACQUELINA GONZALEZ RIOS



FACULTAD DE CIENCIAS.

UNAM

TUTOR

DR. ALBERTO SALAZAR JUAREZ

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno.

González
Ríos
Jacquelina.
56 18 13 95
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
093200006

2. Datos del tutor.

Dr.
Alberto
Salazar
Juárez

3. Datos de sinodal 1.

Dr.
Manuel
Miranda
Anaya.

4. Datos del sinodal 2.

Dra.
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Patricia
Rivas
Manzano

6. Datos del sinodal 4

M en C.
Julio
Prieto
Sagredo

7. Datos del trabajo escrito.

Papel del núcleo paraventricular talámico en la sincronización a señales no luminosas.
70 p
2008

A mis dos tesoros:

Ximena y Fernanda.

Ustedes iluminan mi vida con su sonrisa.

Agradecimientos.

Gracias al **Dr. Alberto Salazar Juárez.**

Por haberme brindado la oportunidad de desarrollar esta investigación.
Por haberme tendido la mano en un momento tan crítico de mi formación.

A los miembros del comité sinodal de esta tesis:

Dr. Manuel Miranda Anaya.

Dra. Elsa Escamilla Chimal.

Dra. Patricia Rivas Manzano.

M. en C. Julio Prieto Sagredo.

Por haber colaborado en el enriquecimiento de esta investigación,
con sus valiosos comentarios.

Gracias a la **M. en C. Leticia Parra Gamez.**

Por ser mi amiga, por guiarme y apoyarme a lo largo de este
tortuoso camino que un día empezamos juntas y que juntas lo terminamos.
Por ser mi maestra.

A la Dra. **Claudia Gómez Acevedo.**

Por enseñarme la ventana a un nuevo panorama.
Por cada una de sus palabras de aliento.
Por ser mi amiga.

Gracias al **Sr. Alejandro García Hidalgo.**

Por todo su valioso apoyo técnico durante la realización de este proyecto.
Y sobre todo por su buen humor, en los momentos mas difíciles.

Gracias a la **Familia Orozco: Gabriel, Nohemí, Amaury y Gabrielle.**

Por haberme abierto las puertas de su casa.
Por su apoyo para aprender ingles,
sin ustedes, este camino hubiese sido mucho mas difícil de andar.

Gracias a mis padres, **Aurea y Pedro**.
Por brindarme la maravillosa oportunidad de estudiar.
Por guiarme por el buen camino.
Gracias a ustedes alcance mi gran meta. Los amo.

Gracias a mi hermano. **Hueman Isaac**.
Por haber crecido conmigo y habernos reído de las mismas tonteras.
Por haberme alentado a regresar a la escuela,
cuando estaba decidida a no volver nunca más. Te amo.

Gracias al amor de mi vida, **Benjamín**.
Por todas y cada una de las palabras de aliento.
Por estar siempre conmigo apoyándome
en todas y cada una mis decisiones. Te amo.

Gracias a mis hijas, **Ximena y Fernanda**.
Por existir.

Gracias a las familias **González y Ríos**.
Por ser parte de mi vida.
Por que todos, de una u otra manera han contribuido
a que yo me encuentre titulándome.

Gracias a la familia **Vázquez**,
Por todo el apoyo que he recibo de su parte.

Esta investigación fue realizada en una colaboración entre el laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de las Adicciones del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente” y el laboratorio de Neuroanatomía Funcional del Departamento de Anatomía de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Índice.

Resumen	7
Introducción.....	9
Ritmos biológicos.....	9
Sincronización luminosa	15
Sustrato neuroanatómico para la sincronización luminosa.	16
Sincronización no luminosa.	17
Sustrato neuroanatómico de la sincronización no luminosa.	19
Núcleo paraventricular del tálamo (PVT).	21
Anatomía.....	21
Química del PVT.	27
Antecedentes	28
Planteamiento del problema.	31
Hipótesis.	33
Objetivos	34
Método	35
Resultados	40
Discusión.....	49
Conclusiones.....	60
Bibliografía.	61

Papel del núcleo paraventricular talámico en la sincronización a señales no luminosas.

El núcleo paraventricular del tálamo (PVT), es el elemento más dorsal de los núcleos mediales del tálamo ocupa una delgada línea que se extiende por debajo de la capa ependimal del tercer ventrículo, se encuentra sobre el tercer ventrículo y tiene una extensión anteroposterior igual a la del tálamo, proyecta a diferentes áreas cerebrales, las cuales se organizan topográficamente a lo largo del eje antero-posterior y dorso-ventral. Tiene una estrecha relación anatómica con el núcleo supraquiasmático (NSQ), además de recibir proyecciones del la hojuela intergenicular (HIG) y del núcleo del rafe, todos ellos importante componentes del sistema circadiano, por lo que se ha vinculado de forma importante con el sistema circadiano. Sin embargo existe evidencia experimental de lesión electrolítica, exposición a estímulos catalogados como sincronizadores no luminosos y evaluación de la actividad neuronal a través de la proteína c-Fos, que lo involucran con la sincronización no luminosa. Esta investigación pretende evidenciar la participación del PVT en la sincronización que imponen los patrones de restricción de alimento, considerados como un sincronizador no luminoso, utilizando como una herramienta la inmunoreactividad a la proteína c-Fos para evidenciar la actividad neuronal. Se utilizaron rata macho la cuales fueron sometidas a patrones de restricción de alimento, para después sacrificarlas, una hora previa al acceso al alimento (ZT 1), a momento de la llegada del alimento (ZT3) y cuatro horas posteriores al acceso al alimento (ZT7). (n=8 en cada uno de los puntos). Se procedió a realizar la técnica de inmunohistoquímica contra la proteína c-Fos, para poder evaluar de cantidad de neuronas que presentaron inmunoreactividad a la proteína c-Fos (IR-Fos), utilizando un analizador de imágenes digital. Dos horas previas a la llegada del alimento el PVT anterior tiene una IR-Fos escasa (ZT1 17.67 ± 2.63); justo a la llegada del alimento, la cantidad de neuronas se incrementa de manera significativa estadísticamente (ZT3 26.33 ± 2.49), y cuatro horas después de la llegada del alimento, la IR-Fos disminuye a las cantidades basales (ZT7 17.67 ± 2.00). Estos resultados ponen en evidencia la participación del PVT anterior en la sincronización que imponen los patrones de

restricción al alimento. Por lo que entonces podemos ubicarlo como miembro del circuito que se activa ante la sincronización no luminosa funcionando como un modulador. Un área interesante para explorar en este campo sería la identificación de los diferentes neuropéptidos involucrados durante la sincronización no luminosa, además de la participación del NSQ durante esta sincronización.

Ritmos biológicos.

Las variaciones cíclicas que ocurren en diferentes parámetros fisiológicos, conductuales y bioquímicos de los organismos a intervalos de tiempo más o menos regulares, son denominados ritmos biológicos (Bunning, 1973).

Los ritmos biológicos se presentan en un amplio intervalo de frecuencias de oscilación, desde un ciclo por milisegundo a un ciclo por año. Con base en esto Enright, (1981), clasificó de manera general a los ritmos biológicos de acuerdo a su frecuencia, en ritmos *ultradianos*, que ocurren más de una vez al día; e *infradianos* aquellos que tienen una frecuencia de más de un día. Por otra parte, el ambiente geofísico también se caracteriza por la existencia de ciclos que se derivan de movimientos de la tierra y la luna en relación al sol, estos ciclos ambientales o geofísicos son los días, las mareas, las fases lunares y las estaciones del año. Cuando la frecuencia de un ritmo biológico se aproxima a la frecuencia de un ciclo ambiental se le denomina con el prefijo griego “circa” (Rusak y Zucker, 1975; Pittendrigh, 1976), por lo tanto, a los ritmos biológicos cercanos a 24 horas se les llama ritmos *circadianos* (Halberg, 1969).

Los ritmos circadianos, son uno de los rasgos más característicos de la adaptación de un organismo a su ambiente; en los mamíferos, representan un importante proceso a través del cual, eventos del medio interno son organizados en una secuencia temporal, que permite la adaptación al medio externo (Rusak, 1979a; 1979b).

Una característica importante de los ritmos diarios observados en distintos organismos como las algas, moscas y humanos es que estos no sólo responden a cambios en el ambiente impuesto por las principales señales geofísicas, sino que presentan un sistema interno capaz de medir el tiempo (Pittendrigh, 1960), este sistema o reloj biológico permite al organismo predecir y prepararse a los cambios en el ambiente geofísico asociado con el día y la noche (Turek y Van Cauter, 1994).

De acuerdo con Pittendrigh (1976), para llevar a cabo este papel adaptativo los ritmos circadianos requieren que el sistema tenga dos características (Pittendrigh, 1976): 1) Capacidad de medir el tiempo biológico, es decir, que el

ritmo circadiano sea generado endógenamente y que este tenga un periodo cercano a 24 horas; 2) Que pueda medir el tiempo geográfico, es decir que bajo condiciones ambientales el periodo del *oscilador* (*oscilador* centro generador de un ritmo) se ajuste al periodo del ciclo ambiental, usualmente el ciclo luz-oscuridad (L:O) que sirve como el agente sincronizador ambiental (Takahashi y Zatz, 1982; Moore, 1983).

Para llevar a cabo la medición del tiempo biológico, el organismo requiere de la presencia de un reloj biológico. El término Reloj Biológico implica un mecanismo fisiológico capaz de imponer un orden temporal sobre un ritmo biológico; implica la capacidad del sistema para oscilar con un periodo regular, así como la capacidad de usar dichas oscilaciones como una referencia temporal interna que permite una adecuada interacción en el dominio temporal entre el organismo y su ambiente (Richter, 1967; Stephan y Zucker 1972; Moore y Eichler, 1972)

C.S. Pittendrigh y J. Aschoff se refieren a reloj biológico como estructuras orgánicas que funcionarían como marcapasos (entidad localizable y funcional capaz de generar oscilaciones autosostenidas y de acoplar los distintos ritmos) capaces de imponer periodo y fase a los procesos orgánicos. Otros autores como F. Halberg (1969), lo definen como el resultado de la interacción de múltiples procesos fisiológicos oscilatorios, en donde la participación de estructuras específicas se limita al ajuste de fase entre los diversos procesos (Figura 1) (Aguilar-Roblero y Drucker-Colin 1987; Aguilar-Roblero, 1993).

El fundamento del origen endógeno de la ritmicidad biológica se basa en el hecho de que en condiciones típicas de aislamiento de señales temporales, la ritmicidad biológica persiste con una ligera pero significativa variación en el periodo que la caracteriza. Esta variación de las 24 horas en el periodo de la oscilación indica que el ritmo observado no depende de fenómenos geofísicos cíclicos sino que el ritmo que emerge es endógeno (Aschoff, 1986).

Esta característica esencial de los organismos de ser capaces de mantener la expresión de los ritmos biológicos aún en ausencia de señales ambientales

periódicas es el fenómeno conocido como ritmo en Oscilación Espontánea (Free Running) (Halberg, 1969).

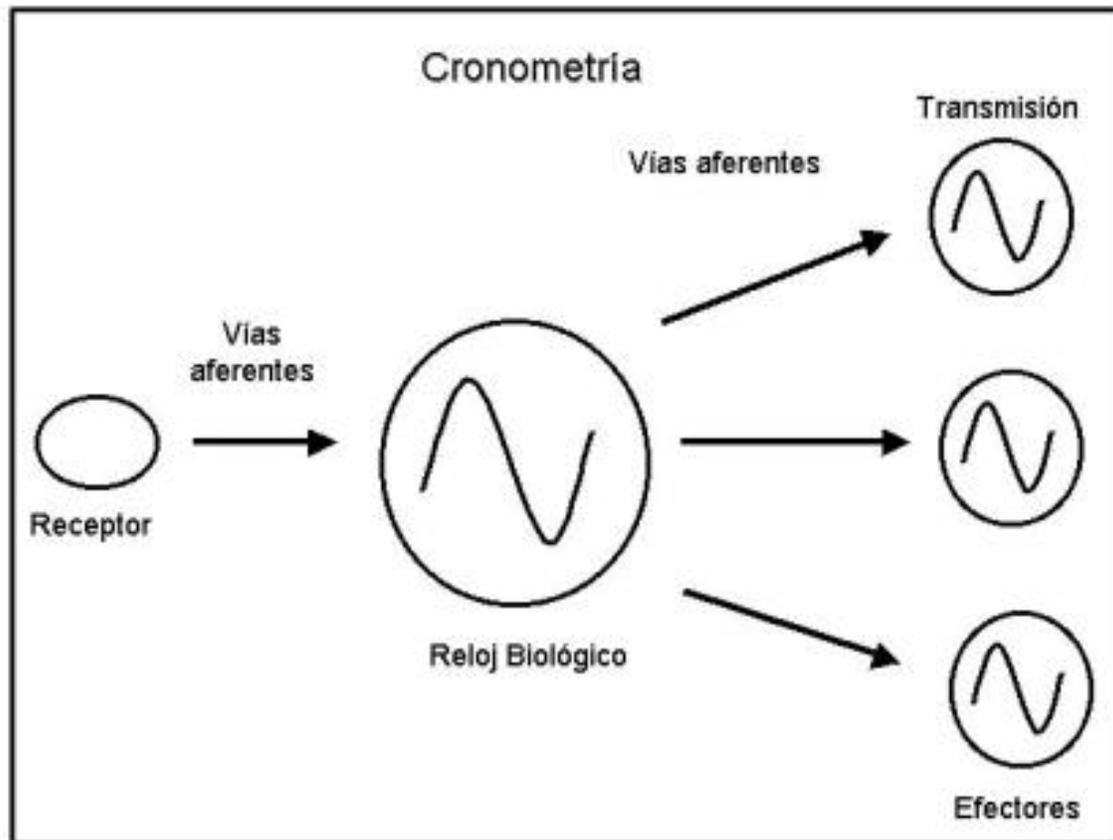


Figura 1. Esquema que muestra los componentes del sistema circadiano. Se señalan los procesos que actúan sobre los componentes de los mismos.

Componentes de un ritmo.

Tau (τ) representa el *periodo* endógeno del marcapaso (*periodo*: tiempo requerido para completar un ciclo) (Menaker, 1969); y presenta pequeñas variaciones entre los individuos de una especie (variación intraindividual) pero presenta diferencias significativas con respecto a individuos de otras especies (variación intraespecífica), de tal forma que para cada especie podemos determinar un período característico, lo cual indica que τ depende de la información genética (Figura 2).

τ , a su vez, está compuesto por dos fracciones; un período de actividad llamado alfa (α) y un período de reposo llamado rho (ρ), de modo que $\tau = \alpha + \rho$.

La *frecuencia* es el número de ciclos que tienen lugar por unidad de tiempo. La *fase* es el valor que toma el fenómeno en cada instante. La *amplitud* es la magnitud de la variación del fenómeno y se estima del valor máximo (*cresta*) al valor mínimo (*valle*) del ciclo (Figura 2).

En condiciones naturales el ambiente geofísico presenta diversas variaciones cíclicas, por lo que la ritmicidad biológica no manifiesta su período en oscilación espontánea sino que presenta una estrecha relación temporal con estos, la cual se manifiesta en forma más notable en el período de la ritmicidad biológica y en su relación de fase con los ciclos ambientales. A este fenómeno se le denomina *Sincronización*.

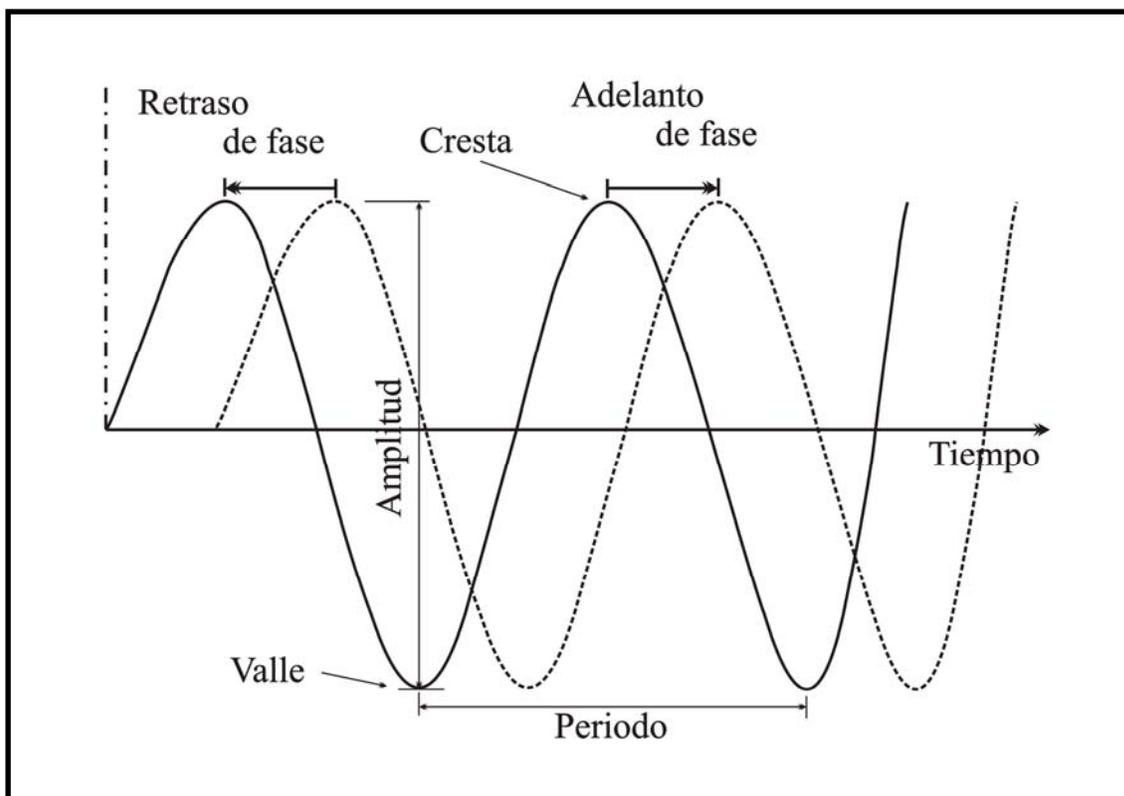


Figura 2. Componentes de un ritmo. Las líneas continua y discontinua representan dos ritmos. El adelanto de fase ocurre cuando, la fase se presenta de manera anticipada a lo esperado, por el contrario, el retraso de fase resulta de la aparición retardada de la fase.

La capacidad de los ritmos circadianos a ser sincronizados, se refiere a la condición en la cual el período (τ) y la fase (ϕ) del reloj biológico se ajustan al período (T) y la fase del estímulo ambiental externo.

Una de las más importantes funciones del sistema circadiano es asegurar que las conductas y el medio interno se ajusten apropiadamente con respecto a los eventos diarios en el ambiente, muchas especies adoptan un nicho temporal que se complementa a su nicho espacial, de este modo los mamíferos pueden ser nocturnos, diurnos o crepusculares, o bien, pueden confinar su actividad a tiempos limitados, estas relaciones entre los ritmos circadianos y las señales temporales ambientales maximizan la supervivencia de cada especie a su mundo, dado que la disposición de alimento y la actividad de los predadores son también cíclicas (DeCoursey y Buggy, 1989).

Estudios de aislamiento temporal riguroso sugirieron que sólo ciertas variables ambientales son capaces de actuar como señales temporales, en 1951, Aschoff acuñó el término *Zeitgeber* del alemán "Indicador de tiempo", el cual describe un ciclo ambiental periódico (Griffiths, 1986).

Para demostrar que la oscilación de una variable ambiental actúa como una señal temporal para el sistema circadiano debe presentar las siguientes características:

1. Que el período del ritmo en oscilación espontánea sea el mismo antes y después de ser expuesto a la señal temporal.
2. Que el período del ritmo circadiano se ajuste al período del ciclo ambiental.
3. Que se establezca y se mantenga una relación de fase estable entre el ritmo y el *zeitgeber*.
4. Que cuando la señal temporal sea removida, el ritmo inicie su oscilación espontánea en la fase determinada por el ciclo ambiental y no por el ritmo previo a la sincronización.
5. Que el ajuste de tau sólo sea posible dentro de ciertos límites de frecuencia del período del *zeitgeber* (T), y que estos límites conformen el intervalo de sincronización para el marcapaso circadiano (menos de 21 hrs. o mayor de 28 hrs.) y sólo cuando el período de la señal temporal se encuentre dentro del intervalo de sincronización la señal temporal podrá ser efectiva (Pittendrigh y Minis, 1972; Pittendrigh y Calderola, 1973).

Una relación de fase estable entre el sincronizador y un ritmo circadiano es dependiente del período del *zeitgeber* y del período endógeno del reloj biológico que transmiten el ritmo (Winfree, 1977). La relación de fase es definida en términos de diferencia en tiempo (h) o en término de diferencia en ángulo de fase (grados) entre la referencia de fase de las dos oscilaciones. Una referencia de fase puede ser el inicio de la luz en un ciclo luz-oscuridad o el inicio de la fracción de actividad (CT 12) en un ritmo en oscilación espontánea.

Debido a la capacidad de sincronización, los ritmos circadianos en oscilación espontánea pueden mostrar adelantos o retrasos en su ocurrencia, los cuales son inducidos por la estimulación con pulsos de diversa índole. Dichos avances y retrasos son llamados cambios de fase.

Un cambio de fase es el simple desplazamiento en la ocurrencia de una oscilación sin que ésta cambie sus características de período y amplitud. Cuando esto ocurre la fase del ritmo endógeno se ajusta progresivamente perdiéndose así la relación de fase constante entre ambos fenómenos, los ciclos durante los cuales ocurre el ajuste de fase al nuevo estímulo se les denomina *ciclos transitorios* (Pittendrigh y Dan, 1976).

La magnitud y dirección de los cambios de fase es dependiente del momento en que se presenta el estímulo con respecto a la oscilación en estudio, su representación gráfica se denomina Curva de Respuesta de Fase (PRC por sus siglas en inglés). En dicha curva, cuando a un animal nocturno se le presentan pulsos de luz al inicio del período de actividad (noche subjetiva temprana) se observa un retraso de fase, si el estímulo se aplica al final del período de actividad (noche subjetiva tardía) o al principio del día subjetivo se observa un avance de fase. Durante el resto de la fase de inactividad (día subjetivo) los pulsos de luz no tienen efectos y a esta región se le denomina zona muerta.

El descubrimiento de las características de respuesta de fase del sistema circadiano ha contribuido al conocimiento de como los ciclos luz-oscuridad (y otras señales ambientales periódicas) sincronizan un marcapaso circadiano, es decir los pulsos de luz son efectivos debido a que las transiciones luz-oscuridad y oscuridad-luz observadas comúnmente en el ciclo de iluminación ambiental son

reconocidas por el organismo como una de las señales ambientales más relevantes para sincronizar sus actividades a los ciclos ambientales. Además, el efecto neto de avances y retrasos de fase son suficientes para reiniciar el período endógeno cada 24 horas y de este modo asegurar la sincronización del reloj biológico a un ciclo día-noche de 24 horas (Pittendrigh, 1979).

Sincronización luminosa

Como ya se mencionó, el sistema circadiano provee de información temporal útil al organismo, mediante la cual el periodo y la fase de los diferentes ritmos biológicos pueden ajustarse a eventos ambientales relevantes.

Siendo la alborada y el ocaso del sol el indicador temporal más significativo y confiable de los cambios diarios en el ambiente, no es sorprendente que el ciclo luz-oscuridad sirva como la principal señal temporal responsable de la sincronización del reloj circadiano; a este proceso se le denomina *sincronización luminosa*. Esta respuesta endógena se concentra en un núcleo cerebral específico, encargado de mantener a todos los ritmos en armonía. En los mamíferos, esta estructura está confinada en el hipotálamo, específicamente en el núcleo supraquiasmático (NSQ, Figura 3), ubicado debajo del tercer ventrículo, sobre el quiasma óptico (Moore, 1983; Paxinos y Watson, 1998). Nota: en lo sucesivo, haremos referencia como reloj biológico, al NSQ.

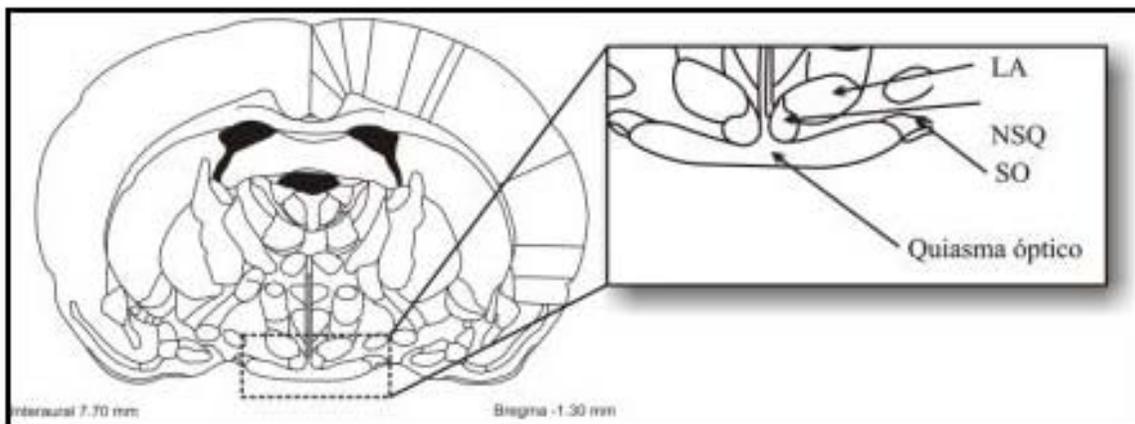


Figura 3. Ubicación del NSQ. Las partes oscuras esquematizan al tercer ventrículo. LA: núcleo lateroanterior del hipotálamo; NSQ, núcleo supraquiasmático; SO, supraóptico

Tomado de Paxinos y Watson, 1998.

Sustrato neuroanatómico para la sincronización luminosa.

La información de tipo luminosa es transmitida al NSQ a través de tres proyecciones distintas: 1) el tracto retinohipotalámico (TRH), 2) el tracto geniculohipotalámico (TGH) y 3) proyecciones directas del núcleo del rafe. (Figura 4)

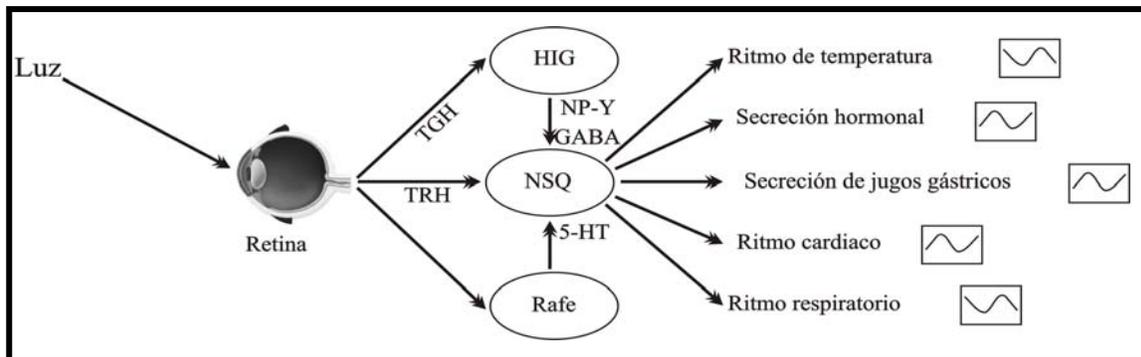


Figura 4. Sincronización luminosa. *TGH*. Tracto genículo hipotálamico. *TRH*. Tracto retino hipotálamico. *HIG*. Hojuela Intergenicular. *NSQ*. Núcleo supraquiasmático. *NP-Y*. Neuropeptido Y. *5-HT*. Serotonina.

1) El tracto retinohipotalámico (TRH) es una proyección monosináptica que se origina de células ganglionares retíneas, que termina en la región ventrolateral del núcleo supraquiasmático (Moore y Lenn, 1972; Johnson et al., 1988). Esta proyección es inmunoreactiva al glutamato (Yannielli y Harrington, 2004). El corte selectivo del TRH, elimina la capacidad de los organismos a sincronizarse al ciclo luz-obscuridad (L:O) (Rusak y Zucker, 1975 ; Johnson et al., 1988)

2) El tracto geniculohipotalámico (TGH) es una proyección indirecta que se origina de colaterales del TRH, el cual proyecta a neuronas retinorecipientes localizadas en la hojuela intergeniculada (HIG) (Moore y Card, 1994), esta proyección es inmunoreactiva al neuropéptido Y (NPY) (Card y Moore, 1982; Harrington et al., 1987; Moore et al., 1994; Pickard, 1982)

3) Otras proyecciones que llegan al NSQ, son las provenientes del núcleo rafe medial de neuronas inmunoreactivas a serotonina (Nojyo y Sano, 1978; Azmitia y Segal, 1978). Tanto las proyecciones provenientes del rafe, como las de la HIG, participan en el ajuste del inicio de la actividad de los ritmos circadianos en el inicio de la oscuridad (Aguilar-Roblero et al., 2004).

La predominancia de la sincronización luminosa como el sincronizador primario del reloj circadiano es una clara adaptación a la vida terrestre (Rea 1988); sin embargo, otras ventajas biológicas pueden ser conferidas a un individuo si el sistema circadiano es sensible a otras señales que provean de un estimado real del tiempo externo.

Sincronización no luminosa.

En organismos unicelulares, factores como la disponibilidad de nutrientes y la temperatura ambiental pueden influenciar la fase de los ritmos circadianos. Estos estímulos son denominados estímulos no luminosos y pueden ser categorizados como estímulos conductuales o farmacológicos. De entre los diferentes tipos de estímulos no luminosos que conforman estas categorías, destacan los tratamientos farmacológicos (Dawson y Armstrong, 1996), los estímulos sociales (Mrosovsky, 1988), el estrés (Semba et al., 2001; Miyazaki et al., 2001), la restricción de alimento (Challet, 1997; Ángeles-Castellanos, 2004) y la comunicación entre la madre y el producto en la vida fetal y neonatal; este último de particular importancia para optimizar la función circadiana y sensibilizar al neonato a los ambientes externos (Davids y Gorsky, 1985). Estas manipulaciones, en su mayoría involucran un aumento en la actividad locomotora, excitación o estados correlacionados que son capaces de reiniciar (resetting) la fase del reloj circadiano.

Experimentalmente se ha observado que si un estímulo de tipo no luminoso, es aplicado durante el día subjetivo es capaz de provocar un avance de fase, pero si es aplicado durante la noche subjetiva pueden provocar retrasos de fase (Yannielli y Harrington, 2004).

Mrosovsky, caracterizó a las relaciones sociales entre individuos del mismo sexo como un sincronizador de tipo no luminoso, capaz de inducir un adelanto de fase de la actividad locomotora, solo si el estímulo se presenta durante el día

subjetivo (Mrosovsky, 1988). Si los organismos son expuestos a estímulos novedosos, como una rueda para correr durante la fase de reposo, se inducen adelantos de fase (Janik y Mrosovsky, 1994; Mistberger, et al., 1996) en el ritmo de actividad locomotora. Una respuesta similar se puede generar por la administración intraperitoneal de solución salina en el inicio de la actividad locomotora (Mead et al., 1992). La privación de sueño, por su parte, también produce adelantos de fase de gran magnitud (Miyazaki et al., 2001). La actividad física también produce cambios en el periodo en roedores, y en humanos se reporta que la fase de inicio del ritmo de temperatura corporal y de melatonina en plasma cambian si se aplica un pulso de ejercicio a la mitad de la fase de reposo (Miyazaki et al., 2001).

Los patrones de restricción de alimento son considerados también como estímulos no luminosos ya que su aplicación a roedores induce un aumento en la actividad locomotora (Challet, et al., 1997; Ángeles-Castellanos et al., 2004).

Dado que los organismos requieren de suficiente energía para sobrevivir y reproducirse, fuertes presiones de selección deben haber desarrollado diferentes estrategias de alimentación dependiendo los hábitos temporales del organismo. En la naturaleza, las fuentes de alimento de los omnívoros y los carnívoros, están disponibles únicamente durante algunas horas durante el día o la noche y estas son susceptibles de cambio dependiendo de las estaciones del año. Para los herbívoros, por ejemplo, las fuentes de alimento son constantes durante una etapa del año, aun así, puede ser más ventajoso alimentarse únicamente en ciertos momentos del día, a pesar de la abundancia de alimento, con el fin de evitar a los predadores. Por lo tanto, el tiempo de disponibilidad del alimento y el tiempo de alimentación, son factores importantes para la supervivencia de los organismos. En el laboratorio se ha podido caracterizar la función del alimento como un sincronizador no luminoso, imponiendo a los animales horarios de alimentación restringidos a unas pocas horas del día. Este procedimiento genera un patrón de activación locomotora desde dos a tres horas antes de la hora de alimentación conocido como *actividad de anticipación al alimento (AA)* (Mistberger, 1994). Esta conducta se caracteriza por incremento de la actividad locomotora dirigida a la

búsqueda y adquisición del alimento. Investigaciones de los efectos de la restricción diaria de alimento sobre procesos fisiológicos revelan que la temperatura y los niveles de corticosterona sérica se elevan con anterioridad al acceso al alimento (Krieger, 1979; Escobar et al., 1998).

Sustrato neuroanatómico de la sincronización no luminosa.

Con respecto a los mecanismos fisiológicos involucrados en este proceso, se ha sugerido que participan cuatro de los sistemas de neurotransmisión involucrados en el sistema circadiano: 1) el sistema serotoninérgico proveniente del núcleo del rafe; 2) el sistema inmunoreactivo a neuropeptido Y (NPY) proveniente de la hojuela intergeniculada (HIG); 3) el sistema GABAérgico el cual se encuentra presente en la mayoría de las neuronas del NSQ y de la HIG (las proyecciones aferentes del núcleo del rafe y de la HIG hacen sinápsis con neuronas GABAérgicas en el NSQ) y 4) finalmente un sistema que implica señales dopaminérgicas y melatoninérgicas, los cuales se han implicado de manera muy importante en sujetos en la vida fetal y neonatal.

Hojuela Intergenicular (HIG)

Existen evidencias experimentales que sustentan la participación de la HIG, en la sincronización no luminosa. La lesión electrolítica de la HIG, elimina los adelantos y retrasos de fase del ritmo de la actividad locomotora cuando son expuestos a sincronizadores no luminosos (Johnson, et al., 1988; Meyer et al., 1993; Janik y Mrosovsky 1994; Wickland y Turek, 1994; Challet et al., 1996; Marchant y Mistberger, 1996; Nakamura, 1996). La estimulación eléctrica induce respuestas de fase muy similares a las observadas cuando se somete a los sujetos a patrones de sincronización no luminosa (Knoch et al., 2004). La administración de NPY en el área del NSQ, genera una curva de respuesta de fase muy parecida a la que se obtiene cuando se administra triazolam o patrones de actividad locomotora forzada (Albers y Ferris, 1984; Biello, 1995; Nakamura

1996). La administración de un antisuero contra NPY en el área del NSQ, bloquea los avances de fase inducidos por los estímulos no luminosos (Biello y Morosovsky 1995; 1996), lo cual sugiere que el NPY proveniente de la proyección de la HIG al NSQ es el neurotransmisor que media la respuesta del reloj biológico a estímulos no luminosos.

Además, se ha observado que la administración de sincronizadores no luminosos genera la expresión de la proteína c-Fos en neuronas inmunoreactivas a NPY localizadas en la HIG (Edelstein et al., 2003; Janik. y Mrosovsky, 1994; Joy y Turek, 1992). Todo lo anterior sugiere que la HIG es una parte importante de las estructuras reguladoras de las respuestas a estímulos no luminosos.

Muchas de las neuronas que originan el TGH, son inmunoreactivas a GABA (Mantyh y Kemp, 1983; Card y Moore, 1984; Takatsuji y Tohyama, 1989), por lo que sería de suponer que el GABA también podría estar involucrado en la regulación de los estímulos no luminosos. La administración de muscinol, un agonista GABAérgico, durante el día subjetivo en el NSQ *in vivo* e *in vitro* induce avances de fase, parecidos a los que se generan por sincronizadores no luminosos. Estos avances de fase no son acompañados de un incremento en la actividad locomotora, lo que sugiere que el TRH, a través de la liberación de GABA en el NSQ, tiene una importante participación en la sincronización del reloj biológico (Tominaga et al., 1992; Horika y Shibata, 2004).

Núcleo del Rafe.

Por otro lado, también se ha propuesto al núcleo del rafe como una estructura involucrada en la regulación de la sincronización a estímulos no luminosos.

La lesión de este núcleo en ratas provoca disminución significativa de la actividad locomotora, a pesar de que la organización temporal de esta conducta no se ve alterada (Liddell y Morberg, 1977).

Otras evidencias apoyan la idea de que el núcleo del rafe participa en la regulación de las respuestas a estímulos no luminosos, a pesar de que los niveles

de serotonina se encuentran altos durante la fase oscuridad (Glass et al., 2003; Mendoza et al., 2004). Estas evidencias están sustentadas en la administración de fármacos agonistas a la serotonina; por ejemplo, la administración quipazina, al NSQ, *in vitro*, genera una CRF muy similar a la CRF que se obtienen por la administración de sincronizadores no luminosos (Reebs y Morosovsky 1989). La administración intraperitoneal de quipazina e intracerebroventricular de 8-OH-DPAT, otro agonista serotoninérgico, durante el día subjetivo, induce avances de fase en el ritmo de actividad locomotora (Davids y Gorski, 1985; Mistlbergert et al., 1991; Cutrera, et al., 1994; Turek et al., 1995; Bobrzynska et al., 1996; Hut et al., 1999; Ehlen, et al., 2001; Gardini et al., 2005).

Finalmente la administración intracerebroventricular de diazepam o de 8-OH-DPAT al NSQ, durante la noche subjetiva, atenúa las respuestas de fase inducidas por la luz, así como la expresión de la proteína c-Fos (Cutrera et al., 1994; Horika y Shibata, 2004).

Por otra parte se ha reportado que el núcleo paraventricular talámico (PVT) proyecta directamente al NSQ de la rata (Moga et al., 1995) y del ratón (Abrahamson y Moore 2001) y que este también podría estar participando en la regulación de las respuestas de fase a estímulos no luminosos.

Núcleo paraventricular del tálamo (PVT).

Anatomía.

El PVT se localiza en los llamados núcleos mediales del tálamo, los cuales están compuestos por dos grupos de núcleos: el grupo dorsal, compuesto por los núcleos; paraventricular, paratenial interanteromedial y el intermediodorsal (Figs. 5-7). Y el grupo ventral, que está compuesto por el núcleo romboide y reuniens (Groenewegen y Berendse, 1994).

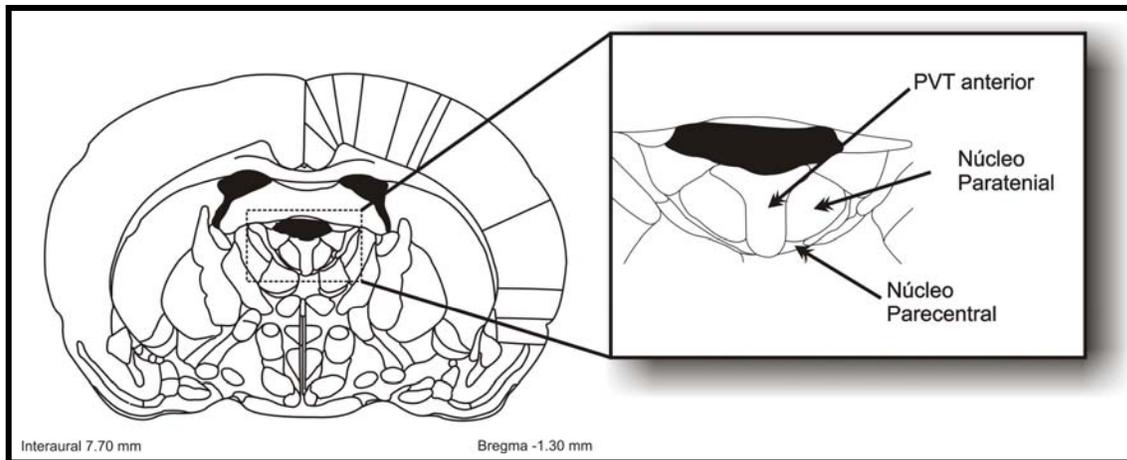


Figura 5 Ubicación del PVT anterior. Las partes oscuras esquematizan al tercer ventrículo.
Tomado de Paxinos y Watson, 1998.

El PVT ocupa una delgada línea que se extiende por debajo de la capa endodimal del tercer ventrículo (Uroz et al., 2004), es el elemento más dorsal de los núcleos mediales del tálamo, se encuentra sobre el tercer ventrículo y tiene una extensión anteroposterior igual a la del tálamo (Peng y Bentivoglio, 2004). En la región anterior, el PVT está rodeado lateralmente por el núcleo paratencial y por el paracentral (Paxinos y Watson, 1998); ventralmente está rodeado por el núcleo central medial (Paxinos y Watson, 1998; Uroz et al., 2004). Más posteriormente en las regiones lateral y ventral está rodeado por el núcleo mediodorsal y por los núcleos central medial y parafascicular, respectivamente (Uroz et al., 2004).

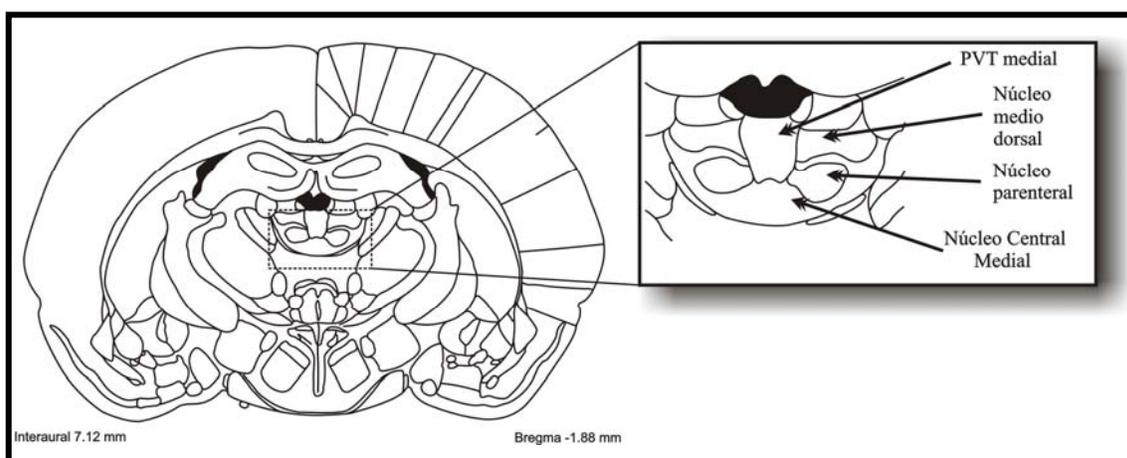


Figura 6. Ubicación del PVT medial. Las partes oscuras esquematizan al tercer ventrículo.
Tomado de Paxinos y Watson, 1998

En humanos se ha reportado al PVT, carente de mielina y las neuronas que lo componen son de tamaño pequeño a mediano midiendo 23-29 μm de diámetro (Uroz et al., 2004).

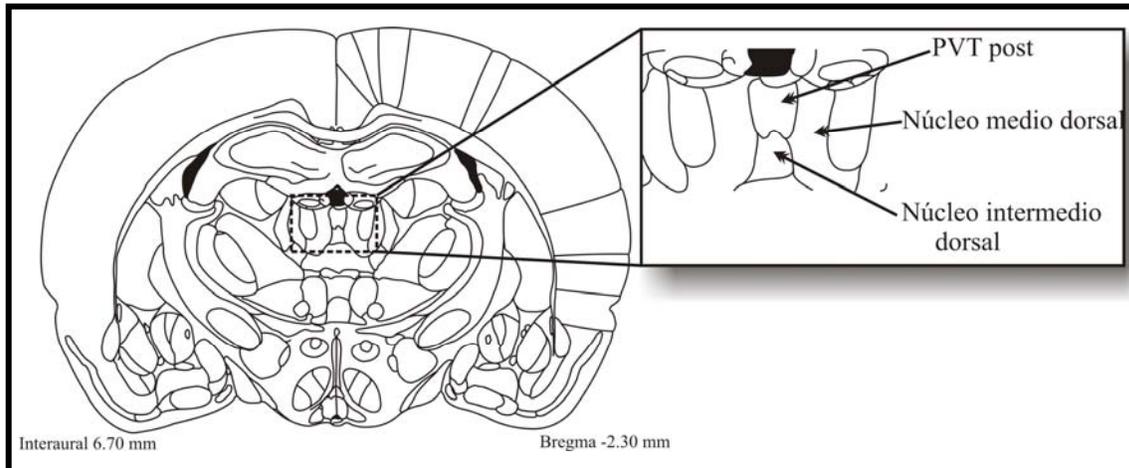


Figura 7. Ubicación del PVT posterior. Las partes oscuras esquematizan al tercer ventrículo.

Tomado de Paxinos y Watson, 1998

Utilizando técnicas de inmunohistoquímica con marcadores retrogrados y anterogrados, se determinó que el PVT proyecta a diferentes áreas cerebrales (Cuadro 1), estas proyecciones están organizadas topográficamente a lo largo del eje antero-posterior y dorso-ventral.

De hecho, el PVT es considerado como uno de los principales efectores del sistema circadiano (Salazar-Juárez, 2002), ya que tiene una estrecha relación anatómica con el NSQ (Chen y Su, 1990; Moga et al., 1995; Kawano et al., 2001), siendo este el principal blanco de proyecciones extra-hipotalámicas del NSQ (Chen y Su, 1990); además de que recibe proyecciones, en su región posterior, de otros núcleos involucrados en la regulación de los ritmos circadianos como es la HIG (Moore y Card, 1994), y el núcleo del rafe (Chen y Su, 1990, Otake et al., 2002), específicamente.

CUADRO. 1

	Aferencia (*)	Eferencias (**)	Referencias.
Diencefalo			
Formación hipocampal.	✓	✓	*Su y Bentivoglio, 1990; Turner y Herkenham, 1991. **Chen y Su, 1990
Corteza infralimbica.		✓	**Otake et al., 2002.
Corteza medial frontal.		✓	**Chen y Su, 1990
Corteza agranular insular.		✓	**Otake et al., 2002
Sustancia innomita.		✓	**Otake et al., 2002
Núcleo reticular talámico.	✓		*Moga et al., 1995
Amígdala.	✓	✓	*Turner y Herkenham, 1991, Freedman y Cassell, 1994; Van der werf et al., 2002. **Chen y Su, 1990, Moga et al., 1995, Otake et al., 2002
Corteza infralimbica.	✓		*Otake y Nakamura, 1998; Van der werf et al., 2002
Núcleos supramamilares	✓		*Van der werf et al., 2002
Núcleo dorsomedial del hipotálamo,	✓	✓	*Van der werf et al., 2002; **Otake, 2005
Núcleo supraquiasmático	✓	✓	*Moga et al., 1995 **Chen y Su, 1990, Moga et al., 1995, Novak et al., 2000; Kawano et al., 2001; Leak y Moore, 2001; Peng y Bentivoglio, 2004
Hipotálamo caudal		✓	**Moga et al., 1995
Zona subparaventricular del hipotálamo		✓	**Novak et al., 2000
Hojuela intergenicular	✓	✓	*, **Moga et al., 1995
Núcleo reticular talámico		✓	**Chen y Su, 1990
Subiculum	✓	✓	*Van der werf et al., 2002; **Moga et al., 1995, Otake et al., 2002
Núcleo del tracto solitario		✓	**Otake et al., 2002
Cerebro anterior			
Núcleo accumbens	✓	✓	*Su y Bentivoglio, 1990; Freedman y Cassell, 1994; Moga et al., 1995; Otake y Nakamura, 1998; Bubser y Deutch, 1998; Van der werf et al., 2002; Pinto et al., 2003 **Chen y Su, 1990, Bubser y Deutch, 1998
Septum	✓	✓	*Moga et al., 1995 **Chen y Su, 1990, Moga et al., 1995, Otake et al., 2002
Núcleo cama de la estria terminalis	✓		*Turner y Herkenham, 1991; Moga et al., 1995; Van der werf et al., 2002
Tubérculo olfatorio	✓		*Moga et al., 1995
Corteza prefrontal	✓		*Bubser y Deutch, 1998, Pinto et al., 2003
Caudado putamen	✓		*Erro et al., 2002
Corteza piramidal		✓	**Chen y Su, 1990

Mesencéfalo	✓		
Corteza entorrinal	✓		*Van der werf et al., 2002
Clastrum		✓	**Chen y Su, 1990
Tallo cerebral			
Núcleo parabraquial	✓	✓	*Van der werf et al., 2002 **Krout y Loewy, 2000b, Otake et al., 2002
Sustancia gris periacueductal	✓	✓	*Krout y Loewy, 2000a. Krout y Loewy, 2000b. **Otake et al., 2002
Núcleo del rafe		✓	**Chen y Su, 1990, Otake et al., 2002
Núcleo tegmental		✓	**Chen y Su, 1990
Locus coeruleus		✓	**Chen y Su, 1990
Super colliculus		✓	**Krout et al., 2001

Cuadro 1. Resumen de aferencias y eferencias del PVT

Las proyecciones que recibe el NSQ desde el PVT se originan en su mayor parte de la parte anterior; aunque también el PVT en su región posterior participa con un pequeño número de fibras, localizadas predominantemente a lo largo de la superficie ventricular del NSQ, esta región del PVT es el sitio a donde llegan principalmente las proyecciones provenientes del NSQ (Moga y Moore 1995). Siendo considerada la proyección del PVT al NSQ, como una de las pocas proyecciones no visuales que inervan al NSQ.

Recientemente, Calvacante y cols., (2005), describieron la existencia de una proyección de la retina al PVT en los monos titi (*Callithrix jacchus*); este hallazgo es muy interesante ya que en los estudios neuroanatómicos de las proyecciones aferentes y eferentes del PVT en roedores no se había descrito una proyección de la retina al PVT anterior.

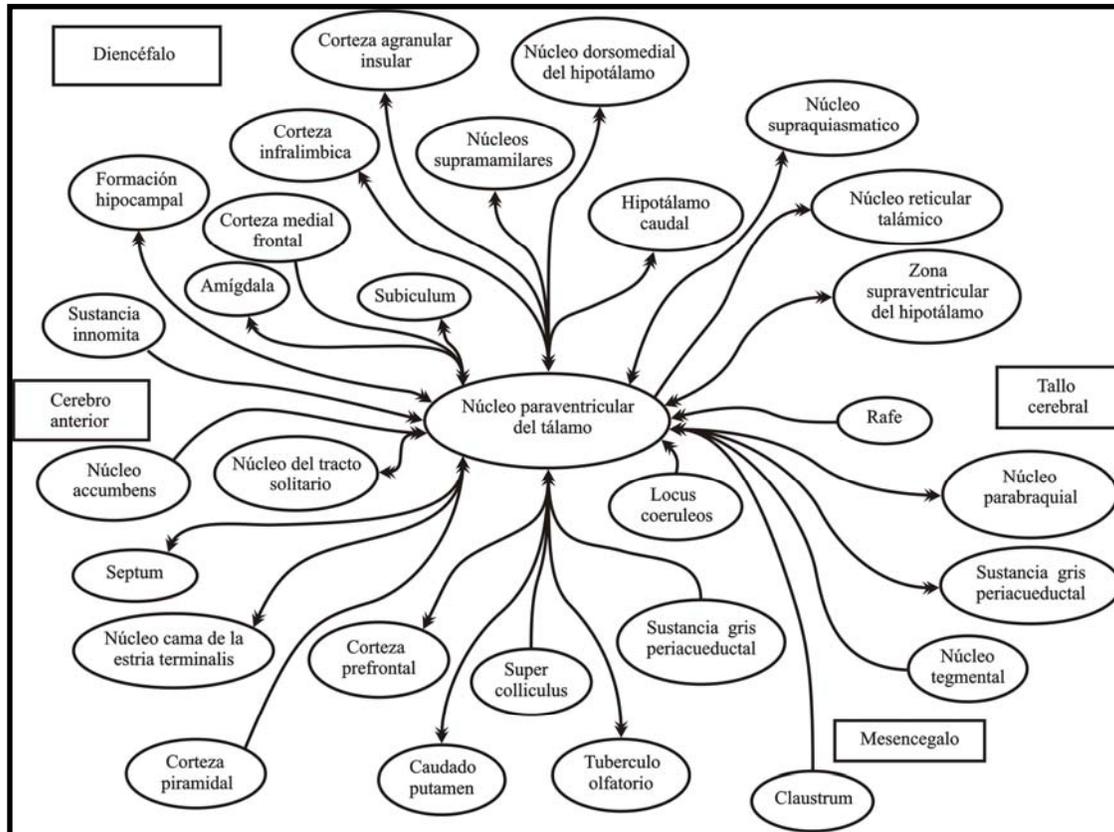


Figura 8. Esquema de aferencias y eferencias del PVT.

El glutamato es el principal neurotransmisor de las neuronas del PVT anterior, que proyectan al NSQ (Moga y Moore, 1995), sin embargo la participación de otras sustancias neuroactivas en esta proyección no ha sido determinada aún (Cuadro 2) y es muy probable que otros neurotransmisores también sean liberados en el NSQ. Además, el PVT presenta una alta densidad de sitios de unión a la melatonina (Ebling et al., 1992), que no presentan variaciones diurnas a lo largo del fotoperiodo (Recio et al., 1996). Esta proyección ha sido reportada tanto en especies diurnas como en nocturnas (Novak et al., 2000).

Química del PVT.

Se han realizado múltiples estudios inmunohistoquímicos para determinar la naturaleza peptídica del PVT, lográndose establecer diferentes grupos de neuronas con diferentes fenotipos (Ver cuadro 2).

Cuadro 2.

Péptido	Procedencia	Referencia
Colecistoquinina (CCK).	Núcleo Edinger-Westphal; Tegmento mesopontino Núcleo rafe medular	Bentivoglio et al., 1991; Otake, 2005
Dopamina.	Diencefalo área ventral tegmental de la región retrorubral	Bentivoglio et al., 1991 Van der Werf et al., 2002
Serotonina.	Núcleo del rafe	Bentivoglio, 1991; Freedman y Cassell, 1994
Acetilcolinesterasa (AChE).	Locus coeruleus	Bentivoglio, 1991
Somatostatina. Sustancia P.	Hipotálamo	Bentivoglio et al., 1991; Battaglia et al., 1991; Freedman y Cassell, 1994; Otake, 2005
Colecistoquinina (CCK). Neuropeptido Y (NPY). Aferencias aminérgicas.	Núcleo tuberomamilar	Van der Werf et al., 2002
Fibras de neurotensina.	Hipotálamo	Bentivoglio et al., 1991 Freedman y Cassell, 1994
Histamina.	Hipotálamo	Bentivoglio et al., 1991.
Orexinas.	Hipotalamo lateral Región perifornical.	Kirouac et al., 2005; Yoshida et al., 2006
Vasopresina. Peptido liberador de gastrina (GRP).	NSQ	Novak et al., 2000
Noradrenergicos	Locus coeruleus Núcleo del tracto solitario Núcleos parabraquiales	Van der Werf et al., 2002 Bentivoglio et al., 1991
	Núcleo blanco	
Colecistoquinina (CCK).	dorsal del hipotálamo sustancia gris periacueductal rafe dorsal	Otake, 2005

Cuadro 2. Resumen de los neuropéptidos hasta ahora reportados en el PVT.

Antecedentes.

El PVT de roedores diurnos, como el *Arvicanthis niloticus*, presenta un ritmo diurno en la expresión de la proteína c-Fos (Novak et al., 2000); en la mayor parte del núcleo, la expresión de esta proteína es muy alta en el periodo de actividad de este animal, presentando la mayor inmunoreactividad en ZT1, cuando el sujeto inicia su vigilia; en cambio en el periodo de reposo (fase de luz) no se observa inmunoreactividad alguna en el PVT. En el caso de los roedores nocturnos, la expresión de la proteína Fos en el PVT, se incrementa durante la noche cuando las ratas son activas y muestran menos episodios de sueño (Peng et al., 1995; Novak y Nuñez 1998). Debido a este patrón de expresión de inmunoreactividad a la proteína c-Fos se sugiere la posibilidad de que el PVT esté relacionado con el mantenimiento del inicio de la vigilia, pues la máxima expresión de la proteína c-Fos se presenta al inicio del periodo de actividad y no a la mitad del mismo, en esta parte del ciclo otras estructuras podrían ser las responsables del mantenimiento de la vigilia en el resto del periodo de actividad (Novak et al., 2000).

Recientemente se reportó una mayor inducción en la expresión de la proteína c-Fos en el PVT posterior, después de que al animal se le sometió a 6 horas de privación de sueño, lo cual confirma la participación del PVT en la vigilia (Semba et al., 2001).

La lesión electrolítica del PVT no impide la regresión testicular inducida por fotoperiodos cortos en hamster (Ebling et al., 1992); la microinyección de melatonina dentro del PVT no inhibe la maduración gonadal, en las mismas dosis que fueron efectivas cuando se administró en el NSQ (Badura y Goldman, 1992). Esto sugiere que el PVT no es necesario para las respuestas gonadales inducidas por fotoperiodos cortos y tampoco es necesario para la expresión de las adaptaciones invernales en el hamster (Purvis y Duncan, 1997).

Por otra parte, hamsters con lesiones extensas del PVT, expresan ritmos circadianos de actividad locomotora en oscuridad continua (O:O) y muestran la misma velocidad de resincronización a un nuevo ciclo luz-oscuridad que sujetos intactos (Ebling et al., 1992). En ratas enucleadas, la lesión del PVT modifica la

ritmicidad circadiana, incrementando el periodo en oscilación espontánea y concentrando la actividad locomotora dentro de la noche subjetiva tardía (Moga y Moore, 2000); esto sugiere que el PVT aunque no es esencial para la expresión circadiana en hamster y rata, podría ser parte integral del sistema circadiano que puede estar interviniendo en la regulación o modulación de los diferentes procesos del mismo.

Como una primera aproximación a describir la participación del PVT en el sistema circadiano, recientemente se reportó que la lesión del PVT anterior altera las respuestas de fase del reloj biológico en respuesta a pulsos de luz aplicados en la noche subjetiva tardía (CT 23). Esta alteración en la respuesta de fase, fue dependiente de la región del PVT que se lesionaba, siendo los mayores efectos cuando se lesionaba el PVT anterior (Salazar-Juárez et al., 2002). Cuando se lesionaba la región medial-posterior del PVT y se aplicaba un pulso de luz (400 lux, 60 min.) en la noche subjetiva tardía se observaban avances de fase similares a los del grupo control. En cambio cuando se lesionaba la región anterior del PVT y se aplicaban pulsos de luz con la misma duración e intensidad se obtenían retrasos de fase de una magnitud similar a cuando se estimulaba en la noche subjetiva temprana (CT 12), en vez de los esperados adelantos de fase. Esto sugiere que el PVT participa importantemente en la regulación de las respuestas de fase del NSQ a la luz, de manera diferente a como las modula la HIG o el NRM.

Por otro lado, la lesión del PVT anterior aumenta la velocidad de sincronización a un ciclo L:O 12:12, aumenta la velocidad de resincronización a un retraso de 6 horas en el inicio del fotoperíodo, induce un aumento en la velocidad de sincronización del ritmo de ingesta de agua a un fotoperíodo esqueleto y altera el ángulo de fase en condiciones de sincronización a un ciclo L:O, presentando constantes retrasos y adelantos en la relación entre el inicio de la actividad y el inicio de la oscuridad (datos no publicados, Salazar-Juárez, 2002).

La estimulación eléctrica y química del PVT, mediante inyecciones intracerebrales de glutamato produce cambios de fase similares a los observados seguidos de pulsos de luz o debidos a la estimulación eléctrica del NSQ (Salazar-Juárez et al., 2002).

Se ha logrado establecer que en el NSQ, existe una población de neuronas que responde ante los estímulos provenientes desde el PVT y otra que responde ante los estímulos de tipo luminoso.

Estos datos en conjunto sugieren fuertemente que el PVT es un componente integral de la circuiteria neural que media el efecto de la luz sobre el sistema circadiano en la rata; participando principalmente en la modulación de las respuestas del reloj biológico a la luz y en el proceso de resincronización. Sin embargo la participación del PVT en las respuestas del reloj biológico a estímulos no luminosos no ha sido determinada.

Dentro de las señales de tipo no luminosa en la que el PVT podría estar directamente involucrado se encuentran los patrones de restricción de acceso al alimento. Por un lado, por que el PVT recibe proyecciones de áreas del sistema nervioso central involucradas en la regulación de la ingestión del alimento; y por otro, por que este paradigma experimental es capaz de inducir la expresión de la proteína Fos, (IR-Fos) en diferentes áreas del cerebro, principalmente en el hipotálamo, directamente involucradas en la regulación de la ingesta del alimento.

La restricción de 22 horas de alimento induce la expresión de la proteína c-Fos en el núcleo dorsomedial (DMH), el hipotálamo lateral (LH), el área perifornical (PeF), el núcleo tuberomamilar (TM), y el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) (Ángeles-Castellanos et al., 2004). Con base en este trabajo se pudo determinar que algunos de los núcleos que componen al hipotálamo son sensibles a la sincronización por el alimento. Mientras que algunos otros no tiene esa capacidad como lo son: el núcleo ventromedial (VMH) y el núcleo supraquiasmático (NSQ, Challet et al., 1997, Ángeles-Castellanos et al., 2004).

Planteamiento del problema.

Se han desarrollado múltiples investigaciones encaminadas a determinar las áreas cerebrales encargadas de regular la sincronización del reloj biológico a estímulos no luminosos. La participación de estas áreas cerebrales en la sincronización no luminosa está sustentada en estudios clásicos de lesión electrolítica y de estimulación química y eléctrica. Con base en estas evidencias se ha caracterizado la participación de la HIG (Johnson, et al., 1988; Meyer et al., 1993; Janik y Mrosovsky 1994; Wickland y Turek, 1994; Challet et al., 1996) y del núcleo del rafe (Kam y. Moberg, 1977) como estructuras integrantes del sistema circadiano, que podrían estar regulando las respuestas del reloj biológico a estímulos no luminosos.

Estudios recientes proponen la participación del PVT anterior como una estructura neural que regula las respuestas del reloj biológico a la luz. Ya que la lesión electrolítica de esta estructura altera las respuestas de fase a pulsos de luz aplicados en la noche subjetiva tardía (CT 23, Salazar-Juarez et al., 2002), esto sugiere que el PVT a pesar de que no recibe proyecciones directas de la retina, podría procesar información luminosa importante para el reloj biológico, funcionando como una especie de interfase entre las señales ambientales periódicas externas y el reloj biológico. Con base en sus relaciones anatómicas con otras estructuras neurales (Moga et al., 1995) se ha sugerido que el PVT anterior también podría integrar información no luminosa. Esta podría ser de origen visceral, ya que este núcleo recibe proyecciones de núcleos del tallo cerebral y del hipotálamo involucrados directamente en la regulación de la ingestión de alimento (Chen y Su, 1990; Krout y Loewy, 2000b; Van der werf et al., 2002; Otake et al., 2002).

Un modelo muy utilizado para estudiar la respuesta del sistema circadiano al alimento como un estímulo sincronizador no luminoso son los patrones de restricción al alimento (Stephans, 1997). Este procedimiento genera *actividad de anticipación al alimento (AA)*. Además también se ha reportado que este paradigma genera un patrón de sincronización de la actividad locomotora, el cual se ajusta al periodo y fase del sincronizador (Mistlberger, 1994).

Siendo los patrones de alimentación una señal considerada dentro del grupo de señales no luminosas y dado que el PVT, por un lado, muestra una relación anatómica cercana con componentes estructurales del sistema circadiano como el reloj biológico, la HIG y el núcleo de rafe (estructuras neurales involucradas en la sincronización a estímulos no luminosos) y por otro lado recibe proyecciones de núcleos relevantes en la regulación de la ingestión de alimento, ubicados en el hipotálamo, entonces sería muy importante determinar si un estímulo no luminoso como los patrones de alimentación podrían generar la activación de las neuronas del PVT anterior.

Considerando que la participación del PVT anterior en el sistema circadiano es similar a una interfase, procesando y filtrando información para después enviarla al reloj biológico y posteriormente ordenar topográficamente a los efectores del reloj biológico, la realización de este trabajo nos permitiría determinar si el PVT anterior además de procesar información de tipo luminosa también procesa información de tipo no luminosa con el fin de ser enviada al reloj biológico.

Hipótesis.

El PVT recibe proyecciones de algunos núcleos involucrados con estímulos de tipo no luminosos, como el rafe (Chen y Su, 1990, Otake et al., 2002) y la HIG (Moga et al., 1995,); además recibe proyecciones de algunos núcleos relacionados con la ingesta del alimento. Debido a que los patrones de restricción de alimento están considerados como un sincronizador no luminoso, entonces la imposición de patrones de restricción del alimento induciría la activación de las neuronas del PVT anterior visto como un aumento en la expresión de la proteína c-Fos.

Objetivo General.

- ✓ Determinar el papel del núcleo paraventricular talámico anterior (PVT) sobre el proceso de sincronización que imponen los patrones de restricción de alimento.

Objetivos Específicos.

- ✓ Caracterizar si existe un incremento en la inmunoreactividad a la proteína c-Fos en el PVT anterior bajo un paradigma de sincronización no luminosa impuesta por los patrones de restricción de alimento.
- ✓ Caracterizar el patrón temporal de inmunoreactividad de la proteína c-Fos del NSQ de sujetos expuestos a un sincronizador de tipo no luminoso (alimento).
- ✓ Utilizar al PVN como un control positivo, debido a que existe una caracterización de la activación neural ante paradigmas de sincronización similares a las utilizadas en esta investigación.

Método.

Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, obtenidas del bioterio general de la Facultad de Medicina de la UNAM; con un peso al inicio del experimento de 180-250 gramos. Se mantuvieron bajo un ciclo luz-oscuridad 12:12 (al inicio de la fase de luz, por convención, se le denomina ZT=0, que en nuestro experimento fue definida como las 7:00 hrs), en grupos de 4 animales, con acceso libre al agua y alimento (Chow Purina 5001).

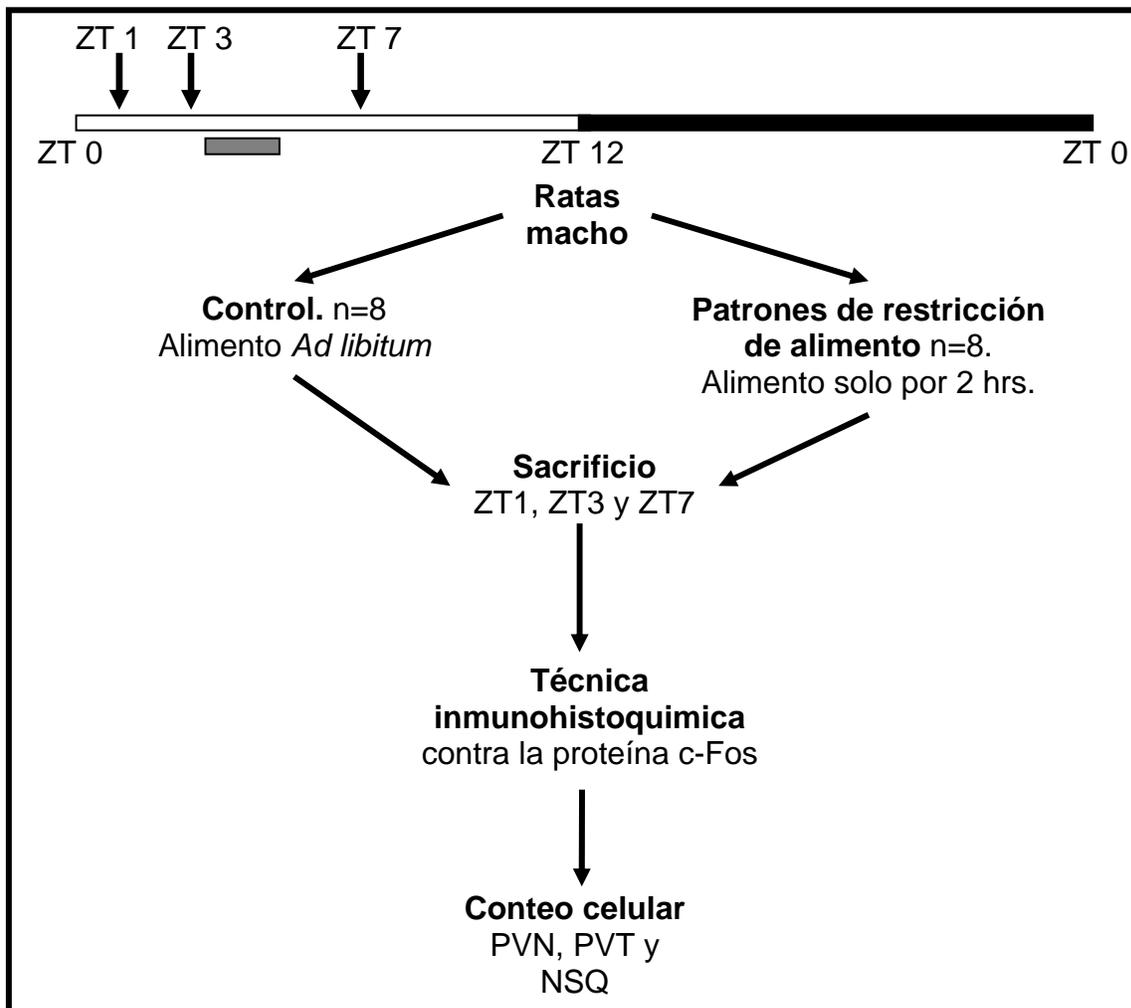


Figura 9. Diagrama de flujo del método. Las fechas indican los puntos temporales de sacrificio. La barra gris muestra el tiempo de acceso al alimento (2 hrs.)

Diseño experimental.

Transcurrida una semana de adaptación a las condiciones ambientales del bioterio, los animales se dividieron en dos grupos experimentales, de 8 animales cada uno. El grupo control, tuvo acceso al alimento de forma continua durante todo el experimento. En cambio, el grupo con restricción de alimento, tuvo acceso al alimento solo por dos horas al día, de ZT3 a ZT5 (10 a 12 hrs.). La duración del tratamiento para ambos grupos fue de tres semanas, similar a la usada en otros estudios (Ángeles-Castellanos et al., 2002). Una vez transcurridas las tres semanas de tratamiento, los sujetos fueron sacrificados en diferentes puntos temporales: ZT1, ZT3 y ZT7. Se extrajeron los cerebros y se procesaron para las diferentes técnicas histológicas.

Histología.

Con el fin de evaluar si el PVT anterior tiende a incrementar su actividad neuronal ante la estimulación con un sincronizador no luminoso, se procedió a evaluar el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos dentro de la región anterior del PVT y en distintos núcleos cerebrales, previo, durante y posterior a la estimulación con el sincronizador no luminoso (alimento).

Las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital sódico, 2 ml. ip (65 mg/ml), para posteriormente perfundirlos transcárdiacamente con 250 ml. de solución salina (0.9%) seguido por 250 ml. de fijador de Zamboni (paraformaldehído al 4%, ácido pícrico saturado al 0.2% disueltos en buffer de fosfato (PB) 0.1M pH 7.2).

Los cerebros fueron extraídos y se colocaron en el mismo fijador por 24 horas, posteriormente, se sumergieron en sacarosa al 30% por lo menos 48 horas para su crioprotección.

Se realizaron cortes coronales que contuviesen el PVT en su totalidad, de 40µm cada uno, a -18°C, en serie de cuatro. Los cortes fueron colocados en buffer de fosfatos salino 0.1M (PBS) y mantenidos a 4°C, hasta su procesamiento histológico.

Inmunohistoquímica contra la proteína c-Fos

Los cortes procesados con la técnica de inmunohistoquímica contra la proteína c-Fos, se colocaron en H₂O₂ al 3% por 40 min., seguido de tres lavados de PBS de 10 min. cada uno. Al finalizar los lavados, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti c-Fos (conejo anti-Fos, Laboratorios Santa Cruz) en una dilución 1:2000 en PBS, con suero de cabra al 1% y Triton X-100 al 10% (PBSGT), por 48 hrs a 4°C. Al finalizar la incubación, los cortes se lavaron tres veces en PBS (10 min. cada lavado); después los cortes fueron incubados en el anticuerpo secundario biotinilado (cabra anti-conejo; Laboratorios Vector) en una dilución de 1:200, en PBSGT por dos horas, a temperatura ambiente, seguido de tres lavados de PBS de 10 min. cada uno. Al terminar la incubación con el anticuerpo secundario se procedió a incubar los cortes en el complejo Avidina-Biotina (0.9% de cada una de las soluciones, Laboratorios Vector) diluido en PBSGT, a temperatura ambiente por dos horas; los cortes, posteriormente, se lavaron con PBS en tres ocasiones cada una de ellas con una duración de 10 min.

Finalmente, con el fin de hacer visible la expresión de la proteína Fos, los cortes se incubaron en una solución que contenía 10 mg de diaminobencidina (DAB) disuelta en 25 ml de PBS, 250µl de NiSO₄ al 3% y 5µl de H₂O₂ al 30%, durante 10 minutos, al finalizar se procedió a realizar tres lavados en PBS de 10 minutos cada uno.

Los cortes se colocaron en portaobjetos gelatinizados siguiendo un orden antero-posterior, se deshidrataron en alcoholes graduales, se aclararon en xileno y se cubrieron con Permount y un cubreobjetos.

Tinción de Nissl.

La serie de cortes adyacentes al utilizado para la técnica de inmunohistoquímica contra la proteína c-Fos, se utilizó para realizar la tinción por el método de Nissl. Los cortes se colocaron en portaobjetos gelatinizados en una disposición antero posterior, se dejaron secar por 3 días, para permitir su adhesión permanente al portaobjetos. Transcurrido este tiempo, los cortes se hidrataron en

agua destilada, y se siguió un tren de tinción: alcohol 70%, violeta de cresilo al 2% disuelta en alcohol 70% (2 min.), alcohol 70%, alcohol 96%, alcohol 100%, xileno, (10 min. en cada uno de los cambios) y se cubrieron con Permount y un cubreobjetos.

Conteo celular.

Se procedió a contabilizar el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos en el PVT anterior (Interaural 7.40 mm); el NSQ (Interaural 7.70 mm) y el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (Interaural 7.20 mm). Las imágenes de los cortes teñidos con la técnica de Nissl, fueron utilizadas para delimitar las áreas correspondientes a cada uno de los núcleos (Figura 10)

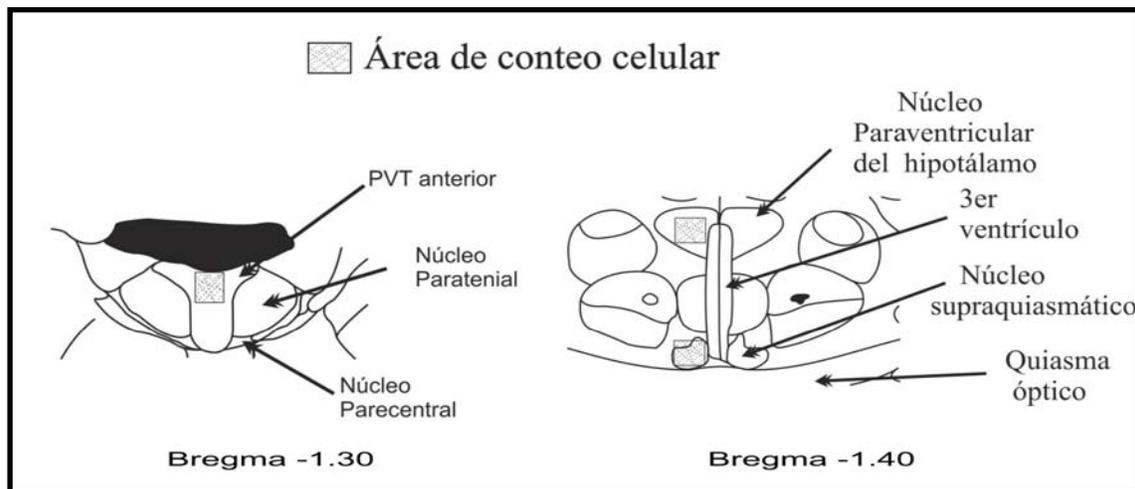


Figura 10. Áreas de conteo celular.

Las áreas cerebrales de interés fueron determinadas mediante un microscopio óptico (Leica, MPS 30) a un aumento de 240x. Posteriormente se procedió a digitalizar las imágenes mediante un analizador de imágenes (Leica Qwin versión 2.6.0.), el cual estaba acoplado al microscopio. Cada imagen digitalizada representaba una sola de las regiones de interés mencionadas anteriormente. Al centro de cada una de las imágenes digitalizadas se colocó un rectángulo de $110\mu\text{m} \times 85\mu\text{m}$, al centro de la imagen y sólo las marcas dentro del rectángulo fueron consideradas para el conteo. Para evitar los falsos positivos en el conteo celular, se determinó el nivel de gris basal de cada imagen. Para esto

fueron promediados el valor de gris de 10 puntos seleccionados al azar dentro del rectángulo de análisis. Posteriormente se seleccionó cada una de las marcas que tuviesen un valor de gris mayor que el valor promedio basal.

Análisis estadístico.

Los datos fueron representados como promedios \pm error estándar. Con el fin de determinar diferencias entre los diferentes grupos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías seguido por una prueba *post hoc* LSD o Tukey.

Resultados.

En la figura 11 se muestran cortes coronales representativos de la región anterior del PVT de los sujetos control (A-D) y de los sujetos expuestos al sincronizador no luminoso (E-H) sacrificados en tres diferentes puntos temporales ZT1, ZT3 y ZT7.

Los sujetos del grupo control, en la región anterior del PVT, muestran, una expresión de la proteína c-Fos muy escasa. El número promedio de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos, es similar en los diferentes puntos temporales analizados (**ZT 1** 19.42 ± 1.80 ; **ZT 7** 17.17 ± 3.66). Lo cual sugiere que las condiciones experimentales (iluminación, sonido, temperatura, etc) y el manejo de los animales no indujeron la expresión de la proteína c-Fos en esta región.

En cambio, los sujetos del grupo expuesto al sincronizador no luminoso, muestran un aumento en la expresión de la proteína c-Fos justo a la llegada del sincronizador no luminoso (**ZT 3** 26.33 ± 2.49) en comparación al número de neuronas que expresan a la proteína c-Fos dos horas antes (**ZT 1** 17.67 ± 2.63) y cuatro horas después (**ZT 7** 17.67 ± 2.00) de la llegada del sincronizador.

La ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales y el tiempo (Control-F=(1.22)=0.71 $p>0.04$). (Figura 12). La prueba *post hoc* no mostró diferencias significativas entre el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos entre ZT 1 y ZT 3 en los sujetos del grupo control (*Tukey Test* NS $p<0.40$). En cambio, la ANOVA de una vía (Estimulado-F=(1.22)=5.74 $p>0.025$), en los sujetos expuestos al sincronizador, la prueba de Tukey reveló diferencias significativas en el número de neuronas inmunopositivas a c-Fos en ZT 1 con respecto al número de neuronas IR-Fos expresadas en ZT 3 (*Tukey Test* $p<0.025$), esto sugiere que la aplicación del sincronizador generó un aumento significativo en el número de neuronas IR-Fos en la región anterior del PVT, lo cual lo involucra en la regulación de las respuestas a estímulos no luminosos.

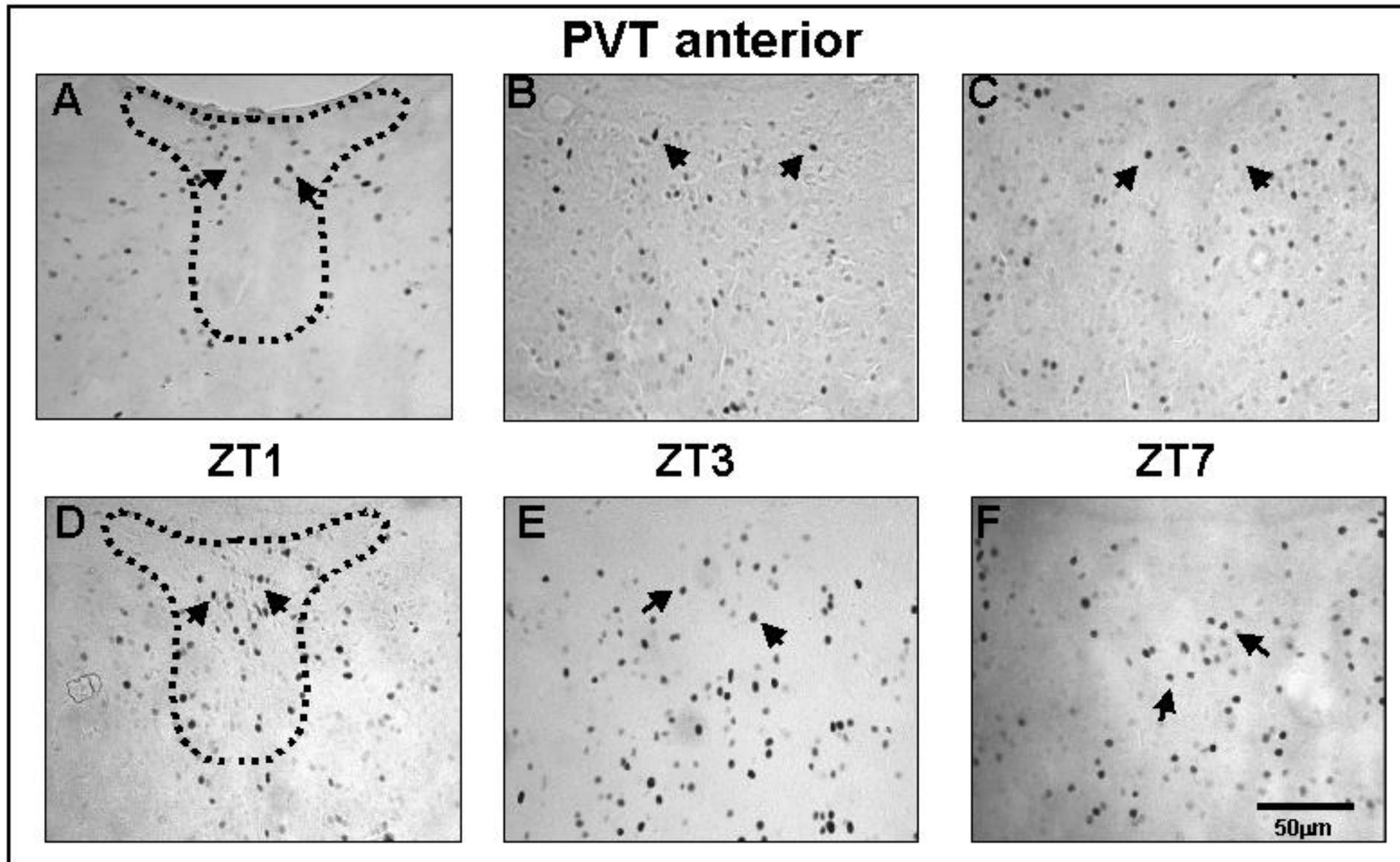


Figura 11. Cortes histológicos representativos del PVT anterior con un grosor de 40µm. En el panel superior (A-C) se muestran los cortes pertenecientes al grupo control, el número de neuronas que presentan IR-Fos, (flechas) es muy similar en ZT1, ZT3 y ZT7. En el inferior (D-F), se muestran los cortes pertenecientes al grupo expuesto al sincronizador, el número de neuronas con IR-Fos, se muestra elevado a la llegada del sincronizador (ZT3), mientras que en ZT1 y ZT7 la cantidad de neuronas con IR-Fos se encuentra disminuida.

Con el fin de descartar que el aumento en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos fuera debido a la participación de otros factores durante la experimentación y no al alimento, se decidió evaluar un tercer punto temporal, cuatro horas posteriores a la llegada del alimento (ZT7), (Figura 12).

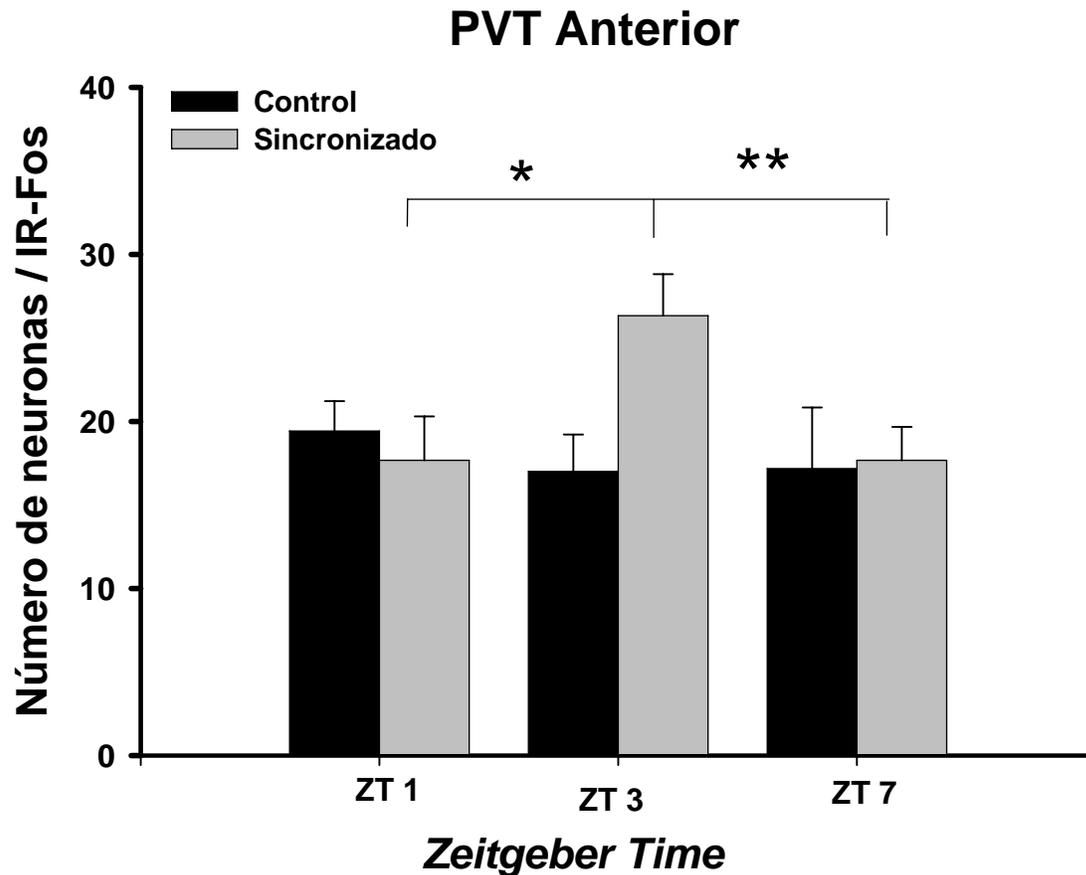


Figura 13. Representación gráfica de la cuantificación de neuronas con IR-Fos en el PVT anterior. Las barras oscuras representan el grupo control, muestran un número de neuronas con IR-Fos muy similar en los tres ZT analizados, por lo que la prueba estadística no mostró diferencias significativa. Las barras claras representan al grupo expuesto al sincronizador no luminoso, este muestra un evidente incremento en el número de neuronas con IR-Fos justo a la llegada del sincronizador, mientras que en ZT1 y ZT7, la cantidad de neuronas se encuentra claramente disminuida en comparación con ZT3. Esta diferencia es estadísticamente significativa (*Tukey Test* $p > 0.03$). Los datos se encuentran representados como promedios \pm error estándar

Como sucedió en los dos puntos anteriores, ZT 1 y ZT 3, durante ZT 7 los sujetos del grupo control, mostraron un número de neuronas con IR-Fos muy escaso. La prueba *post hoc* no encontró diferencias significativas (*Tukey Test* NS)

$p < 0.80$) en el número de neuronas IR-Fos mostradas durante ZT1, ZT 3 y ZT 7 (**ZT 1** 19.42 ± 1.80 ; **ZT 3** 17.00 ± 2.22 ; **ZT 7** 17.17 ± 3.66).

Mientras que los sujetos del grupo expuesto al sincronizador no luminoso, no mostraron un aumento en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos durante ZT 7. La ANOVA de una vía encontró diferencias significativas entre los grupos y tiempos ($F(2,33) = 4.40$ $p > 0.002$, *Tukey Test* $p > 0.03$). La prueba *post hoc* no encontró diferencias significativas entre el número de neuronas IR-Fos en ZT 1 y ZT 7 (**ZT 1** 17.67 ± 2.63 ; **ZT 7** 17.67 ± 2.00) (*Tukey Test* NS $p < 1.0$), sin embargo reveló diferencias en el número de neuronas inmunopositivas a la proteína c-Fos entre ZT 3 y ZT 7 (**ZT 3** 26.33 ± 2.49 ; **ZT 7** 17.17 ± 3.66) (*Tukey Test* $p < 0.03$), lo cual sugiere que el aumento en el número de neuronas con IR-Fos, previo a la llegada del sincronizador (en ZT 3) es totalmente atribuido al sincronizador no luminoso y no a otras variables no controladas, que pudiesen haber sometido a situaciones de estrés a los animales.

Con el fin de determinar si el sincronizador no luminoso (alimento) era capaz de alterar el ritmo diurno de expresión de la proteína c-Fos en las células del NSQ, se procedió a analizar cortes coronales que contenían al NSQ en los tres diferentes puntos temporales. En la figura 13 se pueden observar microfotografías de dichos cortes. Los cuales muestran células IR-Fos de sujetos control y expuestos al sincronizador no luminoso en ZT1, ZT3 y ZT7.

Los sujetos del grupo control muestran un aumento gradual en la expresión de la proteína c-Fos llegando a su máxima expresión alrededor de ZT 2 (datos no mostrados), el número de células IR-Fos disminuye lentamente hasta el punto de observar pocas neuronas IR-Fos en ZT 7. (**ZT1** 34.67 ± 9.42 ; **ZT3** 10.50 ± 4.18 **ZT7** 11.00 ± 1.00).

La ANOVA de una vía demostró diferencias significativas entre los grupos control ($F(2,15) = 3.52$ $p > 0.055$, *LSD Test* $p > 0.01$) (Figura 14). La prueba *LSD post hoc* reveló diferencias significativas entre el número de células IR-Fos mostradas en ZT 1 con respecto al número de células inmunopositivas a la proteína Fos en ZT 3 (*LSD Test* $p < 0.03$) y ZT 7 (**ZT1** 34.67 ± 9.42 ; vs **ZT3** 10.50 ± 4.18 **ZT7** 11.00

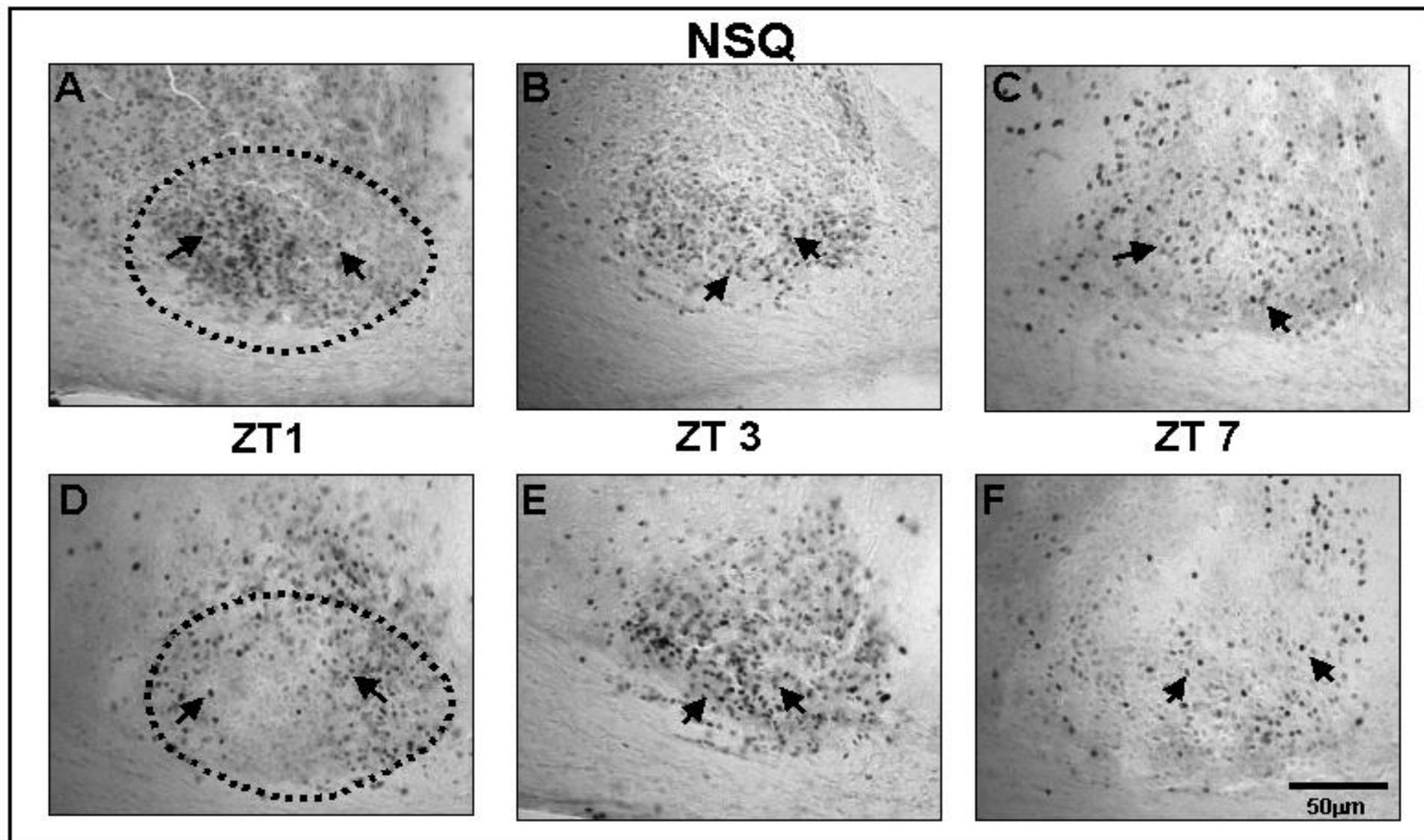


Figura 13. Cortes histológicos representativos del NSQ. En los cortes provenientes de grupo control (A, B, C), se puede observar una cantidad de neuronas variable con IR-Fos, en los tres ZT, mostrando una mayor cantidad en ZT1, para después disminuir. El grupo expuesto al sincronizador no luminoso (D, E, F) presenta un evidente incremento en el número de neuronas IR-Fos en ZT 3, justo al momento de la llegada del sincronizador, para disminuir en ZT7. Las flechas señalan neuronas con IR-Fos.

± 1.00). (LSD Test $p < 0.03$), sin embargo no se encontraron diferencias significativas (NS LSD Test $p < 0.96$) entre el número de células IR-Fos mostradas en ZT3 con respecto a las neuronas IR-Fos en ZT 7 (**ZT 3** 10.50 ± 4.18 , vs **ZT 7** 11.00 ± 1.00). El hecho de encontrar diferencias significativas entre el número de células IR-Fos mostradas en ZT 1 con respecto a los otros dos puntos temporales puede deberse al efecto de la luz sobre la expresión de la proteína c-Fos (ritmo diurno) y no a situaciones de stress.

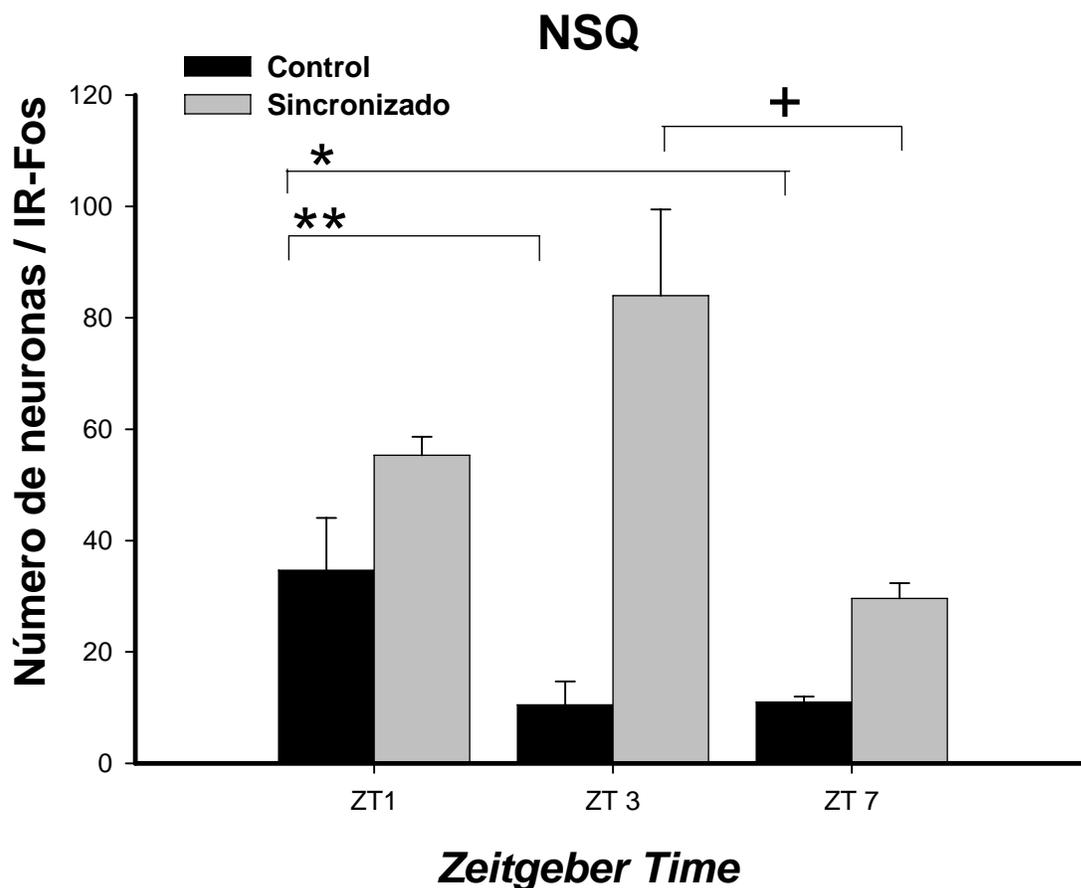


Figura 14. Representación gráfica de la cuantificación de neuronas con IR-Fos en el NSQ. Las barras oscuras muestran al grupo control, donde se muestra un ritmo diurno de IR-Fos, elevado al inicio del día, para disminuir a lo largo del día. En las barras claras se muestra el grupo expuesto al sincronizador, este muestra un elevado número de neuronas con IR-Fos, previas a la llegada del sincronizador no luminoso, para después disminuir de manera importante. La diferencia entre los ZT previo y posterior a la llegada del sincronizador es estadísticamente significativa. * (LSD Test $p > 0.03$); ** (LSD Test $p > 0.03$). + (Tukey Test $p < 0.021$) Los datos se encuentran representados como promedios \pm el error estándar.

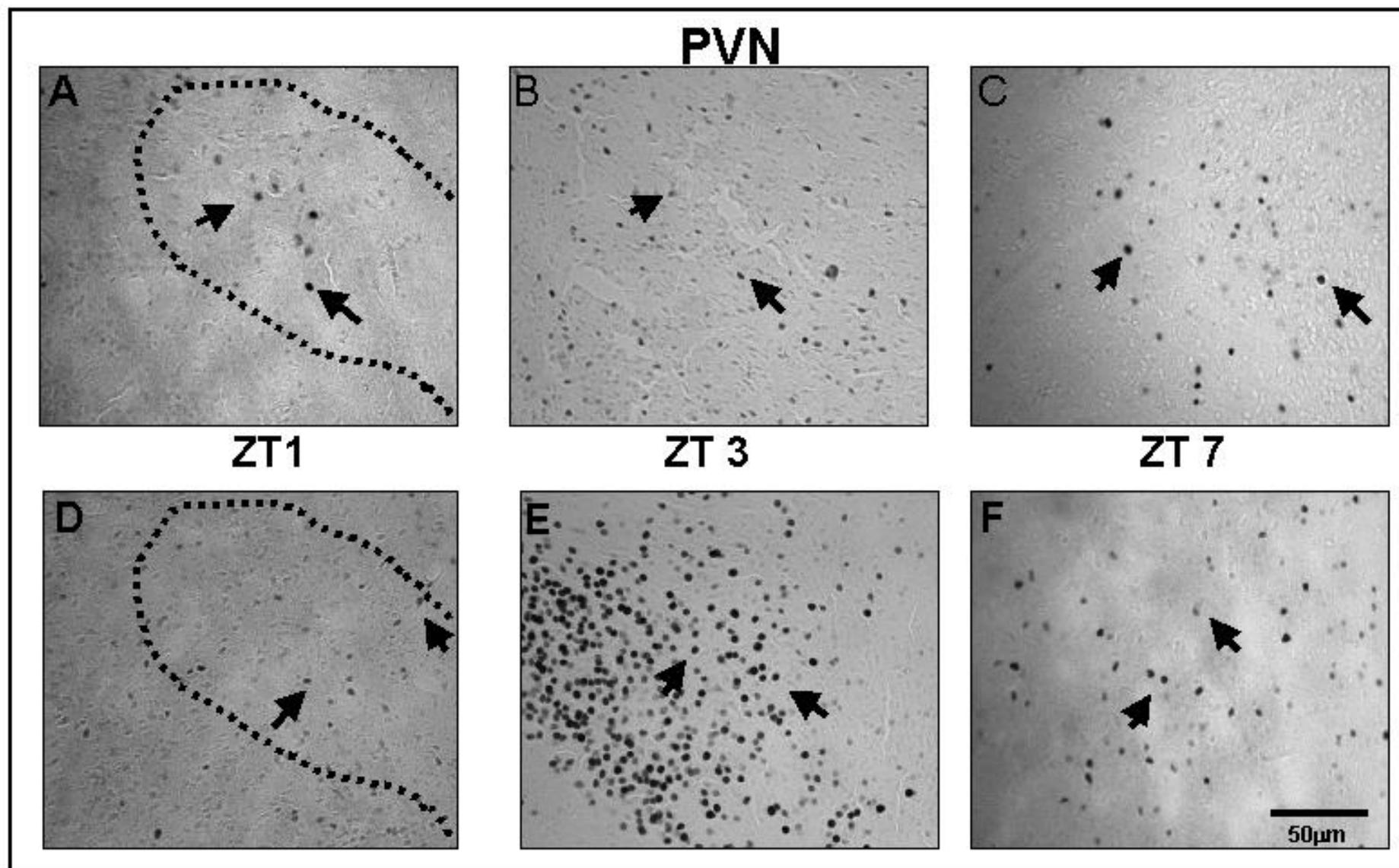


Figura 15. Cortes histológicos representativos del PVN. Se muestran cortes provenientes del grupo control (A, B, C), en los tres ZT, la cantidad de neuronas es similar. D, E y F muestran cortes pertenecientes al grupo expuesto al sincronizador no luminoso, en ZT1 y ZT7, la cantidad de neuronas es escasa, mientras que justo a la llegada del sincronizador no luminoso, se incrementa de manera considerable.

Con respecto a los sujetos del grupo expuesto al sincronizador no luminoso, se observa un aumento gradual, en el número de células IR-Fos, en ZT 1, (**ZT 1** 55.33 ± 3.33) el número de células IR=Fos es similar al mostrado por el grupo control. Sin embargo justo a la llegada del estímulo no luminoso el número de células IR-Fos (**ZT 3** 84.00 ± 15.43 ;) aumenta, posteriormente el número de neuronas IR Fos disminuye (**ZT 7** 29.6 ± 2.75).

La ANOVA de una vía demostró diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F=(2,15) 4.62 p>0.02$, *Tukey Test* $p>0.01$). La prueba *post hoc* reveló diferencias significativas entre el número de células IR-Fos mostradas en ZT 3 con respecto al número de neuronas inmunopositivas a c-Fos mostradas en ZT 7 (*Tukey Test* $p< 0.021$). Sin embargo, no encontró diferencias significativas en el número de neuronas IR a c-Fos en ZT 1 con respecto al número de neuronas mostradas en ZT7 (*Tukey Test* NS $-p<0.34$). Lo cual sugiere que el aumento en el número de células IR Fos observado por el grupo expuesto al sincronizador no luminoso se deben al efecto generado por la llegada del sincronizador.

De manera paralela, se contó la inmunoreactividad de la proteína c-Fos en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), ya que se cuenta con la referencia de la curva que esta describe, en animales sometidos a un paradigma de sincronización similar al que se utilizó en este experimento (Angeles-Castellanos et al., 2004). En la figura 15, se muestran cortes histológicos representativos del PVN, en el grupo control, la expresión de la proteína c-Fos se muestra escasa en todos los ZT. (**ZT1** 18.00 ± 8.37 ; **ZT3** 17.00 ± 1.42 ; **ZT7** 19.67 ± 0.85). En los cortes pertenecientes al grupo expuesto al sincronizador no luminoso, se muestra un claro incremento en la cantidad de neuronas IR-Fos a la llegada del sincronizador no luminoso, (**ZT1** 25.67 ± 10.27 ; **ZT3** 38.60 ± 9.48 ; **ZT7** 22.20 ± 2.92), mostrando la máxima cantidad de neuronas IR-Fos, en ZT 5, justo al finalizar el acceso al alimento (datos no mostrados).

La ANOVA de una vía demostró que hay diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F(5,30)$ N.S: $p>0.001$). Lo mismo sucedió con la prueba *post hoc*, demostró diferencias significativas en ZT3 entre los grupos (*Tukey Test*

$p > 0.01$) (ZT3 17.00 ± 1.42 vs. ZT3 38.60 ± 9.48). Lo que sugiere que la inmunoreactividad observada es provocada, de manera exclusiva, por el la llegada de alimento.

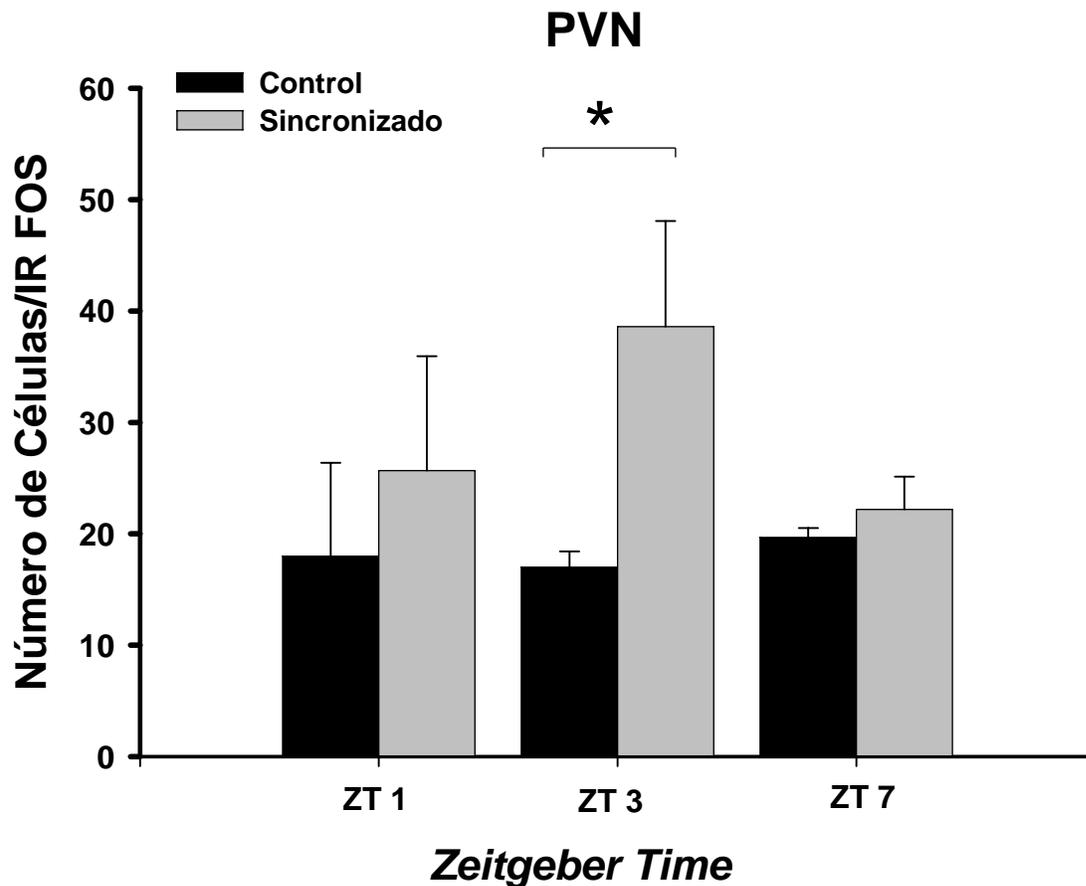


Figura 16 Representación gráfica de la cuantificación de neuronas con IR-Fos en el PVN. El grupo control se muestra en las barras oscuras, mostrando una cantidad de neuronas IR-Fos, muy parecida en los tres ZT, analizados. Las barras claras muestran al grupo expuesto al sincronizador no luminoso, este muestra un número de neuronas elevado previo a la llegada del sincronizador, para después disminuir de manera considerable. (*Tukey test* $p > 0.01$) Los datos se encuentran representados como promedios \pm el error estándar.

Discusión.

Los resultados mencionados demostraron que una señal periódica de alimentación es capaz de inducir la sincronización de la actividad neuronal en núcleos involucrados en la regulación de los ritmos biológicos. El hecho de que justo a la llegada del alimento el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos, localizadas en el PVT anterior y en el NSQ, se incrementen, sugiere que el patrón de alimentación está sincronizando la actividad de las células localizadas en estos núcleos. Una respuesta similar se ha logrado establecer en otros núcleos como la HIG (Challet et al., 1997) y el rafe dorsal y medial (Takase y Nogueira, 2008), de sujetos sometidos a un paradigma de sincronización no luminosa similar a la utilizada en esta investigación. La evidencia de que las neuronas del PVT incrementen su actividad ante el sincronizador no luminoso, sugiere su participación dentro del sistema circadiano.

Los patrones periódicos de alimentación se han utilizado ampliamente en el campo de los ritmos biológicos (Stephans, 1984; Challet, et al., 1997; Angeles-Castellanos et al., 2004, Nakahara et al., 2004); se ha reportado que la actividad locomotora de sujetos sometidos a este paradigma bajo condiciones de iluminación constante, se sincroniza a la llegada del alimento (la actividad se ajusta en periodo y fase al sincronizador), en algunos casos atenuando la actividad controlada por el reloj biológico (Mistlberger y Moore.,1990; Lax et al., 1999). De hecho se ha reportado que el alimento no solo sincroniza la actividad locomotora, principalmente durante el día subjetivo, aunque también sincroniza otras variables rítmicas, como la temperatura y los niveles de corticosterona sérica, estos se elevan con anterioridad al tener acceso al alimento (Krieger 1979; Escobar et al., 1998). Estas evidencias fundamentan entonces la propuesta del uso del alimento (patrones periódicos de alimentación) como un sincronizador de tipo no luminoso.

Este paradigma experimental, se ha utilizado para evaluar la participación de otros núcleos en la regulación de la conducta de ingesta de alimento. Este estudio demostró que la administración periódica de alimento induce un aumento en el número de neuronas, del PVN, inmunoreactivas a la proteína c-Fos, posterior

a la llegada del sincronizador (alimento), dado que el PVN no es parte del sistema circadiano, esta evidencia, sugiere que el alimento solo tiene la capacidad de sincronizar la actividad neuronal en áreas cerebrales relevantes en la regulación del sistema circadiano. Esta característica del PVN ya ha sido descrita por algunos otros autores (Ángeles-Castellanos et al., 2004).

Entonces la pregunta es ¿por que las neuronas del PVT anterior se sincronizan al alimento cuando este es administrado de una manera periódica?

El PVT es miembro de los núcleos del tálamo, que en algún momento fueron considerados como núcleos inespecíficos, ya que se creía que no tenían una organización topográfica específica, pero ahora se ha logrado poner en evidencia que los núcleo inespecíficos del tálamo presentan una organización específica con respecto a sus proyecciones (Bentivoglio et al., 1991.; Moga et al., 1995) la parte anterior del PVT es la zona a través del cual este núcleo proyecta a sus sitios eferentes, y la región posterior es la que recibe las proyecciones de diversos sitios del sistema nervioso central (Su y Bentivoglio, 1990; Chen y Su, 1990; Moga et al., 1995; Krout y Loewy, 2000a; Krout y Loewy, 2000b). Además de presentar áreas específicas con diferentes fenotipos celulares (Bentivoglio et al., 1991; Battaglia et al., 1991; Van der Werf et al., 2002; Kirouac et al., 2005, McGranahan y Pgginis, 2001). Del mismo modo se ha sugerido que debido a su localización anatómica el PVT se encuentra en un sitio ideal, a través del cual es capaz de acceder a información de diversa índole como información sensorial, visceral, motora, etc (Su y Bentivoglio, 1990; Chen y Su, 1990; Moga et al., 1995; Krout y Loewy, 2000a; Krout y Loewy, 2000b).

Algunos estudios (Chen y Su, 1990; Moore et al., 1997; Kawano et al., 2001) han reportado una proyección bidireccional anatómica importante entre el NSQ y el PVT, de hecho el PVT es el sitio neural extra-hipotalámico con mayor cantidad de proyecciones provenientes del NSQ, (Chen y Su, 1990) mientras que el PVT por su parte, le envía múltiples proyecciones en su porción anterior (Moga et al., 1997; Kawano et al., 2001)

Dadas estas evidencia anatómicas, diversos grupos de investigadores (Salazar-Juarez et al., 2002; Nakahara et al., 2004) en los últimos años, han

reportado una serie de evidencias que sugieren que el PVT es una parte integral del sistema circadiano. La lesión electrolítica del PVT anterior, altera la respuesta de fase a la luz del NSQ, eliminando los adelantos de fase (Salazar-Juarez, 2002), lo cual sugiere que el PVT, regula las respuestas del reloj biológico a la luz, lo que pone de manifiesto su importante participación en el sistema circadiano. Pero debido a que el PVT recibe proyecciones muy diversas, es muy probable que también sea capaz de regular e integrar información de tipo no luminoso y posteriormente enviarla hacia el reloj biológico. De hecho, si esto fuese cierto, la administración de un sincronizador de tipo no luminoso debería de inducir la activación de las neuronas localizadas en el PVT anterior y del reloj biológico, casi de manera simultánea. Lo cual sucede, según nuestros resultados.

Diversas evidencias experimentales sugieren la participación del PVT en la regulación de la sincronización de tipo no luminosa. Se ha reportado que la administración de diversos sincronizadores no luminosos como la administración de aromas agradables (Amir et al., 1999); privación de sueño (Semba et al., 2001); acceso a estímulos novedosos (Mistberger, et al., 1996; Janik y Mrosovsky, 1994) indujeron un aumento en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos, en el PVT. Nuestros resultados apoyan estas evidencias, ya que en el PVT muestra un incremento en el número de neuronas que expresan la proteína c-Fos, justo a la llegada del sincronizador no luminoso (alimento).

Una evidencia muy importante, es la reportada por Nakahara y cols. (2004), en la que la lesión electrolítica del PVT elimina la actividad locomotora, previa a la llegada del sincronizador no luminoso. Aunque este resultado se contrapone con los resultados que ha reportado otro grupo de investigadores, que sugieren que la lesión del PVT no elimina la sincronización de la actividad locomotora inducida por la administración de un patrón periódico de alimentación (Landry et al., 2007). Estos resultados antagónicos podría deberse a las diferentes manipulaciones experimentales a las que fueron sometidos los animales en observación. En este último estudio realizan lesiones del PVT en su totalidad, y como ya se mencionó, solo la lesión selectiva del PVT anterior es la que genera los efectos más notorios en la respuesta de fase del NSQ a las señales luminosas, lo que sería fácil de

suponer ya que es esta la región que proyecta al reloj biológico (Kawano et al., 2001; Chen y Su, 1990 Moga et al., 1997).

Relacionado con la anatomía del PVT, ya mencionamos que recibe múltiples proyecciones, de núcleos relacionados con el sistema circadiano, como la HIG (Moore y Card, 1994), el núcleo del rafe (Chen y Su, 1990, Otake et al., 2002) y el NSQ (Moga et al., 1997), lo que nos sugiere que también forma parte del sistema circadiano.

Debido a que la HIG, recibe proyecciones directas de la retina (Moore y Card, 1994), su participación en la sincronización luminosa es evidente, aunque existen evidencias que la ubican como miembro del sistema circadiano, encargado de regular y enviar al reloj biológico información importante acerca de estímulos no luminosos y luminosos. (Abe y Rusak, 1992; Challet et al., 1996; Challet et al., 1997; Johnson et al., 1989; Lewandosky y Usarek, 2002). La administración de un sincronizador de tipo no luminoso induce un aumento en el número de neuronas que expresan la proteína c-Fos en la HIG, justo a la llegada del sincronizador (Muscart y Morin, 2006); la lesión electrolítica de la HIG, elimina la respuesta de los individuos a sincronizadores de tipo no luminosos (Johnson, et al., 1988; Johnson, et al., 1989; Meyer et al., 1993; Janik y Mrosovsky 1994; Wickland y Turek, 1994; Challet et al., 1996; Marchant y Mistberger, 1996; Nakamura, 1996; Lewandosky y Usarek, 2002). La estimulación eléctrica y química de la HIG, induce respuestas de fase semejantes a los que se generan cuando se administra un sincronizador de tipo no luminoso (Knoch et al., 2004). Una evidencia importante de señalar, es la que arroja la investigación de Challet y cols. en 1997, donde se propone que la administración periódica de alimento produce un incremento en la cantidad de neuronas que expresan la proteína c-Fos, en la HIG.

Otra referencia importante que recibe el PVT, es la que proviene del núcleo del rafe dorsal y medial (Chen y Su, 1990, Otake et al., 2002). Algunas evidencias proponen a este como participante en la sincronización a estímulos no luminosos, entre las que podemos mencionar algunas: sujetos a los cuales se le administro la 5,7-dihydroxytryptamina-3 (DHT), toxina específica para neuronas serotoninérgicas, inhibe las respuestas de fase inducidas por la administración de

sincronizadores no luminosos como el alertamiento y la actividad locomotora forzada (Meyer-Bernstein et al., 1997). La lesión electrolítica del núcleo del rafe en ratas provoca que la actividad locomotora disminuya de manera significativa, a pesar de que no se modifica que la actividad locomotora se presente solo durante la fase de oscuridad (Liddel y Morberg, 1997). Por último, una evidencia importante de mencionar es la que se obtiene a partir de las investigaciones realizadas por Takase y Nogueira en el 2008; donde utilizando un paradigma de sincronización similar al utilizado en esta investigación, logran demostrar un incremento en la cantidad de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos, a la llegada del alimento en el núcleo del rafe.

Tomado en cuenta las evidencias que sugieren la participación del PVT; de la HIG y del núcleo del rafe en la sincronización que impone el alimento, podemos suponer la existencia de un circuito entre ellos, ya que en los tres se observa un incremento en el número de neuronas que muestran inmunoreactividad a la proteína c-Fos justo a la llegada del alimento. La señal que genera el alimento podría llegar a los tres núcleos de manera simultánea y después ser enviada al NSQ. O bien podría llegar de manera secuencial a los diferentes núcleos, una posibilidad podría ser la siguiente: la información relativa al aparato digestivo podría llegar al rafe, tomando en cuenta que es miembro de los núcleos del tallo cerebral, de ahí podría ser distribuida a la HIG y al PVT, para después ser enviada al NSQ, donde sería regresada al PVT y en consecuencia distribuida al resto del cerebro. Cualquiera que fuese el mecanismo por el que las señales relativas al alimento, lleguen a este circuito, tendrían que diseñarse nuevos experimentos, encaminados a esclarecer esta incógnita.

¿Cómo es posible que el alimento pueda sincronizar al organismo? ¿De qué manera las señales desencadenadas por el alimento llegan al sistema nervioso central?. Estas señales son de diversa índole. En primera instancia la ingesta del alimento es traducida por el estómago, generando diversos estímulos que son transmitidos por diversas vías, para poder llegar al sistema nervioso central. (Coll et al., 2007, Woods et al., 2006, Owais et al., 2006) Una de ellas podría ser

puramente hormonal, en donde la falta y la presencia de alimento induce cambios en los niveles de glucosa (Heijboer, 2006); con lo que se provocan cambios drásticos en el organismo. Otra vía sería mediante la transmisión de la señal a través de proyecciones nerviosas, las cuales en su mayoría terminan en núcleos del tallo cerebral, que a su vez proyectan a múltiples áreas, entre las que podemos destacar el hipotálamo, donde se encuentran núcleos relacionados con la regulación de la ingestión del alimento (Williams, et al., 2001). Otro núcleo importante podría ser el PVT, dado que recibe proyecciones de núcleos involucrados en la regulación del alimento (Moga et al., 1995 Chen y Su, 1990, Otake et al., 2002, Moore y Card, 1994). Además de tener proyecciones al NSQ (Moga et al., 1995; Kawano et al., 2001). Esta ubicación lo propone como un núcleo con la capacidad de integrar la información relacionada con la sincronización no luminosa y poder enviarla al reloj biológico o bien transmitir la información temporal a los efectores. Para poder esclarecer esta propuesta se requieren realizar estudios encaminados a determinar por un lado la importancia del PVT en el sistema circadiano y por otro su relación con otros estímulos no luminosos (algunas de estas ideas serán discutidas posteriormente) (Ver Figura 17).

En el NSQ, reside el reloj biológico, encargado de mantener a todos los ritmos en armonía, su principal sincronizador es la luz (Klein et al., 1991.). Se ha reportado que las células del NSQ muestran una expresión rítmica de la proteína c-Fos, como respuesta a estímulos luminosos. En donde, la mayor expresión de la proteína c-Fos se observa entre dos y tres horas después del inicio de la fase de luz, para después decaer gradualmente a lo largo del día (Challet et al., 1997). Además, se ha reportado que el NSQ, durante esta fase, también, es sensible a señales no luminosas (Edelstein y Amir, 1995; Amir et al., 1999). Los resultados de nuestra investigación muestran que el NSQ, presenta un incremento en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos, justo a la llegada del sincronizador no luminoso. Este incremento podría ser el reflejo de la acción conjunta de los dos sincronizadores, la luz y el alimento, ya que los sujetos en nuestra investigación se encontraban expuestos a los dos tipos de señales.

Por todas las evidencias aquí mencionadas, podríamos proponer al PVT, como un núcleo importante en la generación y/o modulación de las respuestas del reloj biológico ante los sincronizadores de tipo no luminoso. Como ya fue mencionado, el PVT, regula las respuesta a la luz del NSQ (Salazar-Juárez, 2002), en este caso, también podría regular las respuestas al sincronizador no luminoso, ya sea procesando este tipo de información y enviándola al NSQ, o por otro lado, podría regular la transmisión de la información que es enviada desde el NSQ a sus efectores.

Ahora surge una nueva pregunta ¿a través de que mecanismo el PVT puede responder a la llegada del alimento? ¿Cómo es que este núcleo puede censar las señales que se desencadenan ante el acceso al alimento? es posible que los niveles de glucosa puedan jugar un papel trascendental en este sentido, durante las horas de ayuno (22 horas) estos se encuentran disminuidos; posterior al acceso del alimento los niveles de glucosa se normalizan. Se ha reportado la existencia de dos tipos de neuronas con la capacidad de poder censar los niveles de glucosa plasmática. Un primer tipo es aquel que incrementa su incidencia de disparo ante niveles de glucosa elevados, este tipo de neurona se denomina, glucoresponsiva. El segundo tipo de neurona es aquel que incrementa su incidencia de disparo cuando los niveles de glucosa son bajos, a este tipo se le llama neurona glucosensitiva (Levine, 2002). De esta manera podríamos sugerir que las neuronas que expresan la proteína c-Fos en el NSQ, y en el PVT anterior, justo a la llegada del alimento, podrían ser neuronas glucosensitivas, ya que los niveles de glucosa se encuentran muy disminuidos en estos momentos. Mientras que por otro lado, las neuronas inmunoreactivas a la proteína c-Fos, localizadas en el PVN, las cuales se incrementan en número, al finalizar el acceso al alimento, podrían corresponder a neuronas glucoresponsivas, ya que en ese momento el sistema ya obtuvo grandes cantidades de glucosa. (Ver Figura 17)

El PVT y las orexinas

Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado una gran abundancia de neuronas inmunoreactivas a la orexina A (MacGranahan y Pgginis,

2001) en toda la extensión del PVT (Kirouac et al., 2005; Yoshida et al., 2006). A este péptido se le han conferido múltiples funciones, como por ejemplo señales de saciedad (Bernadis y Bellinger, 1993), estados de alertamiento (España et al., 2003), y situaciones de estrés (Fujiki et al., 2001) provocan un incremento en la cantidad de neuronas que expresan orexina.

Nixon y Smale (2005) han propuesto la posibilidad de que las neuronas que muestran inmunoreactividad a la proteína c-Fos, activadas por el acceso a estímulos novedosos, tienen un fenotipo orexigénico. Este hallazgo nos podría sugerir la idea de que todos los sincronizadores de tipo no luminosos activan neuronas con un fenotipo orexigénico, además de las situaciones relacionadas con el estrés y estados de alertamiento, las cuales están implícitas en las reacciones que provocan los sincronizadores no luminosos. Un dato importante de recalcar es que el PVT se encuentra activo durante las horas de alertamiento de individuo y en situaciones relacionadas con el estrés (Semba et al., 2001, Challet et al., 1997).

MacGranahan y Pgginis, en el 2001, realizaron una investigación con el propósito de evidenciar las áreas cerebrales que poseían neuronas inmunoreactivas al fenotipo orexigénico, esta revela que todas las áreas que se han propuesto, a lo largo de esta discusión como involucradas en la sincronización no luminosa, como el PVT, la HIG, el núcleo rafe dorsal y medial, presentan neuronas con inmunoreactividad a las orexinas y algo de llamar la atención es la presencia de varicosidades orexigénicas en la periferia del NSQ. Lo que nos permite suponer que es a través de las proyecciones orexigénicas por la que los núcleos implícitos en los circuitos descritos pudiesen estar en comunicación y lo mismo sucede con el NSQ, podría ser que por medio de este péptido es que reciba la información concerniente a la sincronización que impone el alimento. Para poder comprobar esta hipótesis sería necesario profundizar en esta área realizando marcajes específicos y técnicas de inmunomarcaje contra las orexinas y así establecer las conexiones orexigénicas entre los diferentes núcleos. (Ver Figura 17)

El PVT y la sincronización mediante horarios de acceso restringido al alimento.

En los últimos años, algunos grupos de investigadores (Challet et al., 1997; Angeles-Castellanos, et al., 2004), han propuesto la existencia de una estructura (o serie de estructuras) con la capacidad de ser sincronizada mediante los patrones de alimentación (FEO, por sus siglas en inglés, oscilador asociado al alimento), además de que se ha supuesto que este tiene la capacidad de sincronizar al organismo. La existencia de tal estructura no se ha demostrado y la situación aun se encuentra en controversia. Bajo este contexto, el PVT podría ser propuesto como un núcleo que mantiene comunicación anatómica con tal estructura, a la cual denominaremos estructura X, esta idea surge de la capacidad que tiene el PVT de sincronizarse ante los patrones de acceso al alimento. La información relativa al alimento, podría llegar a la estructura X, después al PVT y a partir de ahí ser distribuida a las diferentes áreas anatómicas con las que mantiene comunicación.

Aunque también por otro lado, podríamos proponer que la estructura X, pudiese actuar en conjunto con el NSQ, a través del PVT, es decir un eje, estructura X- PVT-NSQ. En este sentido, la información relacionada con la sincronización impuesta por los patrones de alimentación, tendrían que llegar a la estructura X, después al PVT y después al NSQ, (de esta manera podría ser como el NSQ, reciba la información de tipo no luminosa) y sólo, entonces poder sincronizar al organismo con la información relativa a la sincronización luminosa y no luminosa, como ya mencionamos el NSQ tiene la capacidad de responder ante los dos tipos de estímulos, tal y como se demuestra en esta investigación. Para poder comprobar esta propuesta se tendría que diseñar una investigación donde se realicen lesiones del PVT y observar las alteraciones que esta provoca, por un lado ya se cuenta con evidencias que dicen que la conducta de anticipación se elimina (Nakahara et al., 2004), pero no se cuenta con evidencias que describan el comportamiento del NSQ ante esta situación. (Ver Figura 17)

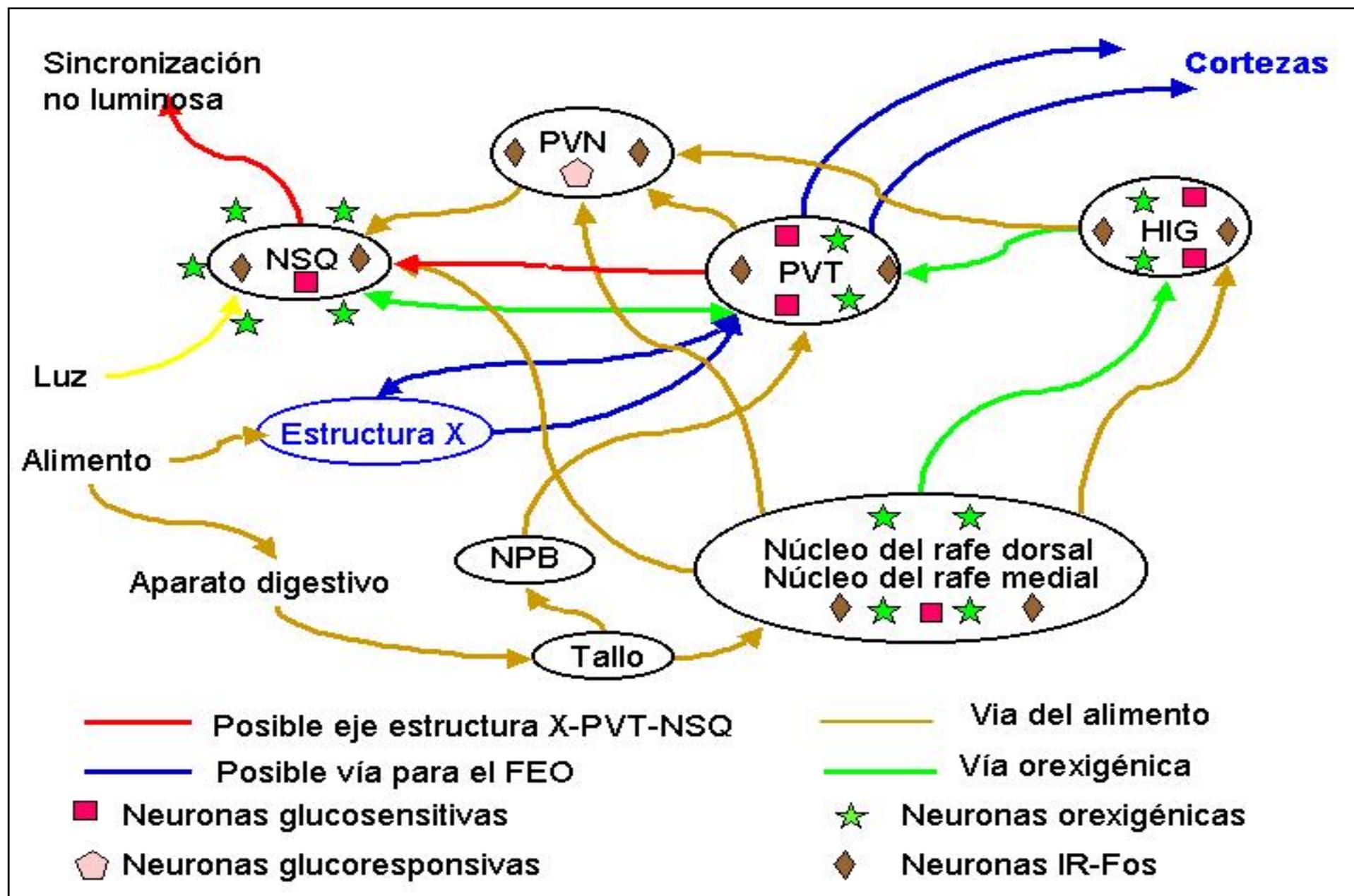


Figura 17. Esquema que propone el papel del PVT en la sincronización impuesta por patrones de restricción de alimento. En relación a sus eferencias y eferencias, además de la posible intervención de algunos neuropéptidos.

Conclusiones.

- ✓ El PVT anterior es sensible a los sincronizadores no luminosos, ya que este incrementa su inmunoreactividad a la proteína c-Fos, previo a la presentación del sincronizador .
- ✓ El PVT anterior forma parte de los circuitos activos ante la sincronización no luminosa funcionando como un modulador ante la sincronización impuesta por los patrones de restricción al alimento.
- ✓ El NSQ es sensible al sincronizador no luminoso que se utilizó (alimento), ya que este incrementa su inmunoreactividad a la proteína c-Fos a la llegada del alimento.
- ✓ El PVN es sensible al sincronizador no luminoso empleado, debido a que incrementa su actividad neuronal (inmunoreactividad a la proteína c-Fos) ante la llegada del alimento,.

Bibliografía.

- ✓ Abe, H.; Rusak, B. 1992. Stimulation of the hamster ventral lateral geniculate nucleus induces Fos-like immunoreactivity in suprachiasmatic nucleus cell. *Neuroscience Letters*. (138) 185-189
- ✓ Abrahamson E. E.; Moore R. Y. 2001. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research*. (916)172-91
- ✓ Aguilar-Roblero R.; Drucker-Colin R. 1987. The role of the suprachiasmatic nuclei in the regulation of circadian rhythms in mammals. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*. (35):35-51.
- ✓ Aguilar-Roblero, R.; Morin, L. P.; Moore, R. Y. 1994. Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters. *Experimental Neurology*. (130) 250-260.
- ✓ Aguilar-Roblero, R.; Guadarrama, P.; Mercado, C.; Chávez, J. L. 2004. El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. En *Temas selectos de neurociencias III* Ed. Javier Velázquez Moctezuma UAM,
- ✓ Albers, H. E.; Ferris, C. F.1984. Neuropeptide Y: role in the light dark cycle entrainment of hamster circadian rhythms. *Neuroscience Letter*. (50) 163-168.
- ✓ Amir, S.; Cain, S.; Sullivan, J.; Robinson, B.; Stewart, J. 1999. Olfactory stimulation enhances light-induced phase shift in free-running activity rhythms and fos expression in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. (92) 1165-1170.
- ✓ Angeles-Castellanos, M.; Aguilar-Roblero, R.; Escobar, C. 2004. c-Fos expression in the hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. (286) 158-165.
- ✓ Aschoff, J. 1986. A survey on biological rhythms. In *Biological Behavior*. Ed. Aschoff, J.
- ✓ Azmitia, E. C.; Segal, M. 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. (179) 641-667.

-
- ✓ Badura, L. L.; Goldman, B. D. 1992. Central sites mediating reproductive responses to melatonin in juvenile male Siberian hamsters. *Brain Research*. (598) 98-106
 - ✓ Battaglia, G.; Spreafico, R.; Rustioni, A. 1991. Substance P innervation of the rat and the cat thalamus. I. Distribution and relation to ascending spinal pathways. *The Journal of Comparative Neurology*. (315) 457-472.
 - ✓ Bentivoglio, M.; Balercia, G.; Kruger, L. 1991. The specificity of the nonspecific thalamus: The midline nuclei. *Progress in Brain Research* (87) 53–80.
 - ✓ Bernardis, L. L.; Bellinger L. L. 1993. The lateral hypothalamic area revisited: Neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neuroscience & Biobehavior Reviews*. (17) 141–193
 - ✓ Biello, S. M. 1995. Enhanced photic phase shifting after treatment with antiserum to neuropeptide Y. *Brain Research*. (673) 25-29
 - ✓ Biello, S. M.; Mrosovsky N. 1995. Blocking the phase-shifting effect of neuropeptide Y with light. *Proceedings: Biological Science*. (259) 179-187.
 - ✓ Biello, S. M.; Mrosovsky, N. 1996. Phase response curves to neuropeptide Y in wildtype and tau mutant hamsters. *Journal of Biological Rhythms*. (11) 27-34.
 - ✓ Bobrzynska, K. J.; Vrang, N.; Mrosovsky, N. 1996. Persistence of nonphotic phase shifts in hamsters after serotonin depletion in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*. (741) 205-214.
 - ✓ Bubser M.; Deutch, A. Y. 1998. Thalamic paraventricular nucleus neurons collateralize to innervate the prefrontalcortex and nucleus accumbens. *Brain Research*. (787) 304-310.
 - ✓ Bunning, E. 1973. *The physiological clock*. English University Press. London.
 - ✓ Calvacante, S. J.; Costa, S. M. O.; Santee, U. M.; Britto, L. R. G. 2005. Retinal projections to the midline and intralaminar thalamic nuclei in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Brain Research*. (1043) 42-47.
 - ✓ Card, J. P.; Moore, R. Y. 1982. Ventral geniculate nucleus efferents to the rat supachiasmatic nucleus exhibit avian pancreatic polypeptide-like immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology*. (206) 390-396.

-
- ✓ Card, J. P.; Moore, R. Y. 1984. The suprachiasmatic nucleus of the golden hamster: Immunohistochemical analysis of cell and fiber distribution. *Neuroscience* (13) 415-431.
 - ✓ Coll, A. P.; Farooqui, S.; O'Rahilly S. 2007. The hormonal control of food intake. *Cell*. (129) 251-262
 - ✓ Cutrera, R. A.; Ouarour, A.; Pevet, P. 1994. Effect of the 5HT1-a receptor agonist 8-OH-DPAT and other non photic stimuli on the circadian rhythm of wheel running activity in hamsters under different constant conditions. *Neuroscience Letters*. (172) 27-30
 - ✓ Challet, E.; Jacob, N.; Vuillez, P.; Pevet, P.; Malan, A. 1997. Fos like immunoreactivity in the circadian timing system calorie-restricted rats fed at dawn: daily rhythms and light pulse-induced changes. *Brain Research*. (770) 228–236
 - ✓ Challet, E.; Pevet, P.; Malan, A. 1996. Intergeniculate leaflet lesion and daily rhythms in food-restricted rats fed during daytime. *Neuroscience Letters*. (216) 214-218.
 - ✓ Chen, S.; Su, H. S. 1990. Afferent connections of the thalamic paraventricular and parataenial nuclei in the rat – a retrograde tracing study with iontophoretic application of Fluoro-Gold. *Brain Research*. (522) 1-6
 - ✓ Davids, F.C.; Gorski, R. A. 1985. Development of hamsters circadian rhythms: Prenatal entrainment of the pacemaker. *Journal of Biological Rhythms*. (1) 77-89.
 - ✓ Davids, F. C. Gorski, R. A. 1988. Development of hamster circadian rhythms; role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *Journal of Comparative Neurology*. (162) 601-610.
 - ✓ Dawson, D.; Armstrong, S. M. 1996. Chronobiotics-drugs that shift rhythms. *Pharmacol Ther*. 69 (1): 15-36.
 - ✓ DeCoursey, P. J.; Buggy, J. 1989. Circadian rhythmicity after neural transplant hamster third ventricle: Specificity of suprachiasmatic nuclei. *Brain Research*. (500) 263-275.
 - ✓ Ebling, F. J.; Maywood, E. S.; Humby, T. 1992. Circadian photoperiodic measurement in male hamsters following lesions of the melatonin-

- binding sites in the paraventricular thalamus. *Journal of Biological rhythms*. (7) 241-254
- ✓ Edelstein, K.; Amir, S. 1995. Non-photic manipulations induce expression of Fos protein in the suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet in the rat. *Brain Research*. (690) 254-258
 - ✓ Edelstein, K.; de la Iglesia, H. O.; Schwartz, W. J.; Mrosovsky, N. 2003. Behavioral arousal blocks light-induced phase advanced in locomotor rhythmicity but no light-induced Per 1 and fos expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. (118) 253-261.
 - ✓ Ehlen, J. C.; Grossman, G. H.; Glass, J. D. 2001. *In vivo* resetting of the hamster circadian clock by 5-HT₇ receptors in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience*. (21) 5351-5357.
 - ✓ Enright, J. T. 1981. Methodology. En *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol 4. *Biological Rhythms*. J. Aschoff (ed). New York. Plenum Press. s/d. 11-20.
 - ✓ Erro, M. E.; Lanciego, J. L.; Gimenez-Amaya, J. M. 2002. Reexamination of the thalamo striatal projections in the rat with retrograde tracers. *Neuroscience Research*. (42) 45-55.
 - ✓ Escobar, C.; Díaz-Muñoz, M.; Encinas, F.; Aguilar-Roblero, R. 1998. Persistence of metabolic rhythmicity during fasting and its entrainment by restricted feeding schedules in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. (274) 1309-1316.
 - ✓ España, R. A.; Valentino, R. J.; Berridge, C. W. 2003. Fos immunoreactivity in hypocretin-synthesizing and hypocretin-1 receptor-expressing neurons: effects of diurnal and nocturnal spontaneous waking, stress and hypocretin-1 administration. *Neuroscience*. (121) 201– 217.
 - ✓ Freedman, L. J.; Cassell, M. D. 1994. Relationship of thalamic basal forebrain projection neurons to the peptidergic innervation of the midline thalamus. *The Journal of Comparative Neurology*. (318) 321-312.
 - ✓ Fujiki, N.; Yoshida, Y.; Ripley, B.; Honda, K.; Mignot, E.; Nishino, S. 2001. Changes in CSF hypocretin-1 (orexin A) levels in rats across 24 hours and in response to food deprivation. *Neuro Report*. (12) 993– 997.
 - ✓ Gardini, M.; Blance, R. N.; Biello, S. M. 2005. NMDA alters the response

- of the mammalian circadian clock in hamsters: effects on re-entrainment and triazolam induced phase shifts. *Brain Research*. (1046)105-115.
- ✓ Glass, J. D., Gregory H. Grossman, L F.; DiNardo L. 2003 Midbrain raphe modulation of nonphotic circadian clock resetting and 5-HT release in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *The Journal of Neuroscience*. (23) 7451–7460
 - ✓ Griffiths, R. A 1986. Natural environmental cues and circadian rhythms of behaviour-a perspective. *Chronobiology International*. (3) 247-253
 - ✓ Groenewegen, H.J.; Berendse, H.W. 1994. The specificity of the “nonspecific “midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends in Neurosciences*. (17) 52-57.
 - ✓ Halberg, F. 1969 Cronobiology. *Annual Review of Physiology*. (31) 675-726.
 - ✓ Harrington, M. E.; Dwight, M. N.; Rusak, B. 1987. Double-labeling of neuropeptide Y immunoreactive neurons with project from the geniculate to the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*. (410) 275-282.
 - ✓ Heijboer A. C.; Pijl, H. M.; Van den Hoek, A. M.; Havekes L. M.; Romijn J. A; Corssmit, E. P. M. 2006. Gut–Brain Axis: Regulation of glucose metabolism. *Journal of Neuroendocrinology* (18) 883–894
 - ✓ Horika, K. Shibata, S. 2004. Phase-resetting response to (+)8-OH-DPAT, a serotonin 1A/7 receptor agonist, in the mouse in vivo. *Neuroscience Letter*. (368) 130-134.
 - ✓ Hut, R. A.; Mrosovsky, N.; Daan, S. 1999. Nonphotic entrainment in a diurnal mammal, the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*). *Journal of Biological Rhythms*. (14) 409-419.
 - ✓ Janik, D.; Mrosovsky, N. 1994. Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. *Brain Research*. (651) 174-182.
 - ✓ Johnson, R. F.; Smale, L.; Moore, R. Y.; Morin, L. P. 1988. Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift responses to a benzodiazepine. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* (85) 5301-5304.
 - ✓ Johnson, R. F.; Mooreis, R. Y.; Morin, L. P. 1989. Lateral geniculate lesions alter circadian activity rhythms in the hamster. *Brain Research*

-
- Bulletin.* (22) 411-422
- ✓ Joy, J. E.; Turek, F. W. 1992. Combined effects on the circadian clock of agents with different phase response curves; phase-shifting effects of triazolam and light. *Journal of Biological Rhythms* (7) 51-63.
 - ✓ Kam, L. M.; Moberg G. P. 1977. Effect of raphe lesions on the circadian pattern of wheel running in the rat. *Physiology & Behavior.* (18) 213--2171
 - ✓ Kawano, J.; Krout K. E.; Loewy, A. D. 2001. Suprachiasmatic nucleus projections to the paraventricular thalamic nucleus of the rat. *Thalamus & Related Systems* (1) 197-202.
 - ✓ Kirouac, G. J.; Parsons, M. P.; Li, S. 2005. Orexin (hipocratin) innervation of the paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Research.* (1059)179-188
 - ✓ Klein, D.C.; Moore, R.Y.; Reppert S. M. 1991. Suprachiasmatic nucleus. In: *The Mind's Clock.* New York: Oxford Univ. Press,
 - ✓ Knoch, M. E.; Gobes, S. M.; Pavloska, S. C.; Mistberger, R. E.; Glass J.D. 2004. Short-term exposure to constant light promotes strong circadian phase-resetting responses to nonphotic stimuli in Syrian hamsters. *European Journal of Neuroscience* (19) 2779-2790.
 - ✓ Krieger, D. T. 1979. Regulation of circadian periodicity of plasma corticosteroid concentrations and of body temperature by time of food presentation. In: *Biological Rhythms and Their Central Mechanism,* edited by Suda M, Hayaishi O, and Nakagawa H. New York: Elsevier/North-Holland Biomedical, 247–259.
 - ✓ Krout, K. E.; Loewy, A. D. 2000a. Parabrachial nucleus projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *The journal of comparative neurology.* (428) 475-494.
 - ✓ Krout, K. E.; Loewy, A. D. 2000b. Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* (424) 111-141.
 - ✓ Krout, K. E.; Loewy, A. D; Westby G. W. M.; Redgrave, P. 2001. Superior colliculus to the midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* (431) 198-216.
 - ✓ Landry, G. J.; Yamakawa, G. R. S.; Mistlberger, R. E. 2007. Robust food

- anticipatory circadian rhythms in rats with complete ablation of the thalamic paraventricular nucleus. *Brain Research* (1141) 108-118
- ✓ Lax, P.; Zamora, S.; Madrid, J. A. 1999. Food-entrained feeding and locomotor circadian rhythms in rats under different lighting conditions. *Chronobiology International*. (16) 281-91.
 - ✓ Leak, R. K.; Moore R. Y. 2001. Topographic organization of the suprachiasmatic nucleus projection neurons. *The Journal of Comparative Neurology*. (433) 312-334.
 - ✓ Levine, B. E. 2002. Metabolic sensors: Viewing glucosensing neurons from a broader perspective. *Physiology & Behaviour*. (76) 397– 401
 - ✓ Liddel, M. K.; Moberg, G. P. 1997. Effect of raphe lesions on the circadian. Pattern of wheel running in the rat. *Physiology & Behavior*. (18) 213-217.
 - ✓ Mantyh, P. W.; Kemp, A. 1983. The distribution of putative neurotransmitters in the lateral geniculate nucleus of the rat. *Brain Research* (288) 344-348
 - ✓ Marchant, E. G.; Mistberger, R. E. 1996. Entrainment and phase shifting of circadian rhythms in mice forced treadmill running. *Physiology & Behaviour*. (60) 657-653.
 - ✓ McGranaghan, P, A.; Piggins, H. D. 2001. Orexin A-like immunoreactivity in the hypothalamus and thalamus of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) and Siberian hamster (*Phodopus sungorus*), with special reference to circadian structures. *Brain Research*. (904) 234–244
 - ✓ Mead, F. J. P.; Ebling, E. S.; Maywood, E. S.; Humby, T.; Hebert, J.; Hastings, A. 1992. A nonphotic stimulus causes instantaneous phase advances of light-entrainable circadian oscillator of the Syrian Hamster but does not induce the expression of c-fos in the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Neuroscience*. (12) 2516-2522
 - ✓ Menaker, M. 1969. Biological clocks. *BioScience* (19) 681-689.
 - ✓ Mendoza J. Y.; Dardente, H.; Escobar C.; Pevet, P.; Challet, E. 2004. Dark pulse resetting of the suprachiasmatic clock in Syrian hamsters: behavioral phase-shifts and clock gene expressions. *Neuroscience*. (127) 529-537.

-
- ✓ Meyer, E. L., Harrington, M. E.; Rahmani, T. 1993. A phase-response curve to the benzodiazepine chlordiazepoxide and the effect of geniculo hypothalamic tract ablation. *Physiology & Behaviour*. (53) 237-243.
 - ✓ Meyer-Bernstein, E. L.; Blanchard, J. H; Morin L. P. 1997. The serotonergic projection from the median raphe nucleus to the suprachiasmatic nucleus modulates activity phase onset, but not other circadian rhythm parameters. *Brain Research*. (755)112–120
 - ✓ Mistlberger, R. E.; Moore, E. M. 1990. Characteristics of food-entrained circadian rhythms in rats during long-term exposure to constant light. *Chronobiology International*. (7):383-91.
 - ✓ Mistlberger R. E.; Houpt T. A.; Moore-Ede M. C. 1991. The benzodiazepine triazolam phase-shifts circadian activity rhythms in a diurnal primate, the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Neuroscience Letters*. (124) 27-30
 - ✓ Mistlberger, R. E. 1994. Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms. *Neuroscience & Biobehavior Reviews*. (18) 171–195.
 - ✓ Mistberger, R. E.; Marchant, E. G., Sinclair, S. V. 1996. Nonphotic phase shifting and the motivation to run: cold exposure reexamined. *Journal of Biological Rhythms*. (11) 208-215
 - ✓ Miyazaki, T.; Hashimoto, S., Masubuchi, S., Honma, S.; Honma, K. I. 2001. Phase-advance shift of human circadian pacemaker are accelerated by daytime physical exercise. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. (281) 197-205.
 - ✓ Moga M. M.; Moore F. Y. 1995. Putative excitatory amino acid projections to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Research*. (743) 171-177
 - ✓ Moga M. M.; Weis, R. P.; Moore, F.Y. 1995. Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. (359) 221-38.
 - ✓ Moore, R. Y. 1983. Organization and function of central nervous system circadian oscillator: The suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Federation Proc*. (42) 2783-2789.

-
- ✓ Moga M. M.; Moore F.Y. 2000. Paraventricular thalamus lesion alters circadian period and activity distribution in the blinded rat. *Biological Rhythms Research*. (420) 398-418.
 - ✓ Moore, R. Y.; Eichler, V. B. 1972. Loss of a circadian adrenalcorticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*. (42) 201–206
 - ✓ Moore, R. Y.; Lenn, N. J. 1972. A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. (146) 1–14
 - ✓ Moore, R. Y.; Card, J. P. 1994. Intergeniculate leaflet: An anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *The Journal of Comparative Neurology*. (334) 403-430.
 - ✓ Moore, R. Y. 1995. Organization of the mammalian circadian system. *Ciba Found Symp*. (183) 88-99
 - ✓ Mrosovsky, N. 1988. Phase response curves for social entrainment. *Journal of Comparative Physiology*. (162) 35-46.
 - ✓ Muscart, L; Morin, L, P. 2006. Intergeniculate leaflet: contributions to photic and non-photoc responsiveness of the hamster circadian system neuroscience. (140) 305–320
 - ✓ Nakahara, K.; Fukui, K.; Murakami, N. 2004. Involvement of thalamic paraventricular nucleus in the anticipatory reaction under food restriction in the rat. *Journal of Veterinary. Medical Science*. (66) 1297-1300,
 - ✓ Nakamura, K. 1996. Non photic entrainment of human circadian clock-effects of Forced sleep-wake schedule on the circadian rhythm in plasma melatonin. *Hokkaido Igaku Zasshi*. (71) 403-422.
 - ✓ Nixon, J. P.; Smale L. 2005. Orexin fibers form appositions with Fos expressing neuropeptide-Y cells in the grass rat intergeniculate leaflet. *Brain Research* (1053) 33 – 37
 - ✓ Nojyo, Y; Sano, Y. 1978. Ultrastructure of the serotonergic nerve terminals in the suprachiasmatic and interpeduncular nuclei of rat brains. *Brain Research*. (149) 482-8.
 - ✓ Novak, C. M.; Nuñez A. 1998. Daily rhythms in fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *American Physiological Society*. 275 (1620-1625)
 - ✓ Novak, C.M.; Harris, J.A.; Smale, L.; Nuñez A. 2000. Suprachiasmatic

- nucleus projections to the paraventricular thalamic nucleus in nocturnal rats (*Rattus norvegicus*) and diurnal Nile grass rats (*Arvicanthis nitoticus*). *Brain Research*. (874) 147-157.
- ✓ Otake, K.; Nakamura Y. 1998. Single midline thalamic neurons projecting to both the ventral striatum and the prefrontal cortex in the rat. *Neuroscience*. (86) 635-649.
 - ✓ Otake, K.; Kin, K.; Nakamura Y. 2002. Fos expression in the efferents to the rat midline thalamus following immobilization stress. *Neuroscience Research*. (47) 269-282.
 - ✓ Otake, K. 2005. Cholecystokinin and substance P immunoreactive projections to the paraventricular nucleus in the rat. *Neuroscience Research*. (51) 383-394
 - ✓ Owais, C.; Small, C.; Bloom S. 2006. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philosophical Transactions of the Royal Society*
 - ✓ Paxinos, G.; Watson, C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth edition. Academic Press. USA.
 - ✓ Peng Z. C. H.; Grassi-Zucconi, G.; Bentivoglio, M: 1995. Fos-related protein expression in the midline paraventricular nucleus of the rat thalamus: basal oscillation and relationship with limbic afferents. *Experimental Brain Research*. (104) 21-29
 - ✓ Peng, Z.; Bentivoglio, M. 2004. The thalamic paraventricular nucleus relays information from the suprachiasmatic nucleus to the amygdala: A combined anterograde and retrograde tracing study in the rat at the light and electron microscopic levels. *Journal of Neurocytology*. (33) 101–116.
 - ✓ Pickard, G. E. 1982. The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *Journal of Comparative Neurology*. (211) 65-83
 - ✓ Pinto, A.; Jankowski, M.; Sesack, S. R. 2003. Projections from the paraventricular nucleus of the thalamus to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens shell: Ultrastructural characteristics and spatial relationships with dopamine afferents. *Journal of Comparative Neurology*. (459) 142-155.
 - ✓ Pittendrigh, C. S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*

-
- ✓ Pittendrigh, C. S.; Minis, D. H. 1972. Circadian system longevity as a function of circadian resonance in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science*. (69) 1537-1539.
 - ✓ Pittendrigh, C. S.; Candarola, P. C. 1973. A differential effect of heavy water on temperature-dependent and temperature-compensated aspect of the circadian system of *Drosophila pseudoobscura*. *Proceedings of the National Academy of Science*. (70) 2037-2041.
 - ✓ Pittendrigh, C. S.; Dan, S. 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents (I-IV). *Journal of Comparative Neurology*. (106) 223-255
 - ✓ Pittendrigh, C. S. 1976. Circadian Systems: Entrainment. *In Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol.4 Edit. Aschoff, J. Plenum Press. New York and London. 95-123,.
 - ✓ Pittendrigh, C. S. 1979. Some functional aspects of circadian pacemakers. *Biological Rhythms and their Central Mechanism*. 3- 12.
 - ✓ Purvis, C.C.; Duncan, M. J. 1997. Discrete thalamic lesions attenuate winter adaptations and increase body weight. *American Journal of Physiology*. (273) 226-235.
 - ✓ Rea, M. A. 1998. Photic entrainment of circadian rhythms in rodents. *Chronobiology International*. (15) 395-423
 - ✓ Recio, J.; Pevet, P.; Vivien-Rorls, B.; Miguez, J.; Masson-Pevet, M. 1996. Dayli and photoperiodic melatonine binding changes in the suprachiasmatic nuclei, paraventricular thalamic nuclei and pars tuberalis of the female Siberian hamsters. *Journal of Biological Rhythms*. (11) 325-332.
 - ✓ Reeb, S. G.; Mrosovsky, N., 1989. Large phase-shifts of circadian rhythms caused by induced running in a re-entrainment paradigm: the role of pulse duration and light. *Journal of Comparative Physiology*. (165) 819–825.
 - ✓ Richter, C. P. 1967. Sleep and activity: their relation to the 24-hourclock. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis*. (45) 8–29
 - ✓ Rusak, B.; Zucker, I. 1975. Biological rhythms and animal behavior. *Annual Review of Psychology*. (12) 137-171.

-
- ✓ Rusak, B. 1979a. Neural mechanism for entrainment and generation of mammalian circadian rhythms. *Federation Proc.* (38) 2589-2595.
 - ✓ Rusak, B. 1979b. Neural regulation of circadian rhythms. *Physiological review.* (59) 449-526.
 - ✓ Salazar-Juárez, A.; Escobar, C.; Aguilar-Roblero, R. 2002. Anterior paraventricular thalamus modulates light-induced phase shift in circadian rhythmicity in rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology.* (283) 897-904.
 - ✓ Semba, K.; Pastorius, J.; Wilkinson, M.; Rusak, B. 2001. Sleep deprivation-induced c-fos and jun-B expression in the rat brain: effects of duration and timing. *Behavioral Brain Research.* (120) 75-86.
 - ✓ Stephan, F. K.; Zucker, I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Science.* (69)1583-1586.
 - ✓ Stephan, F. K. 1984. Phase shifts of circadian rhythms in activity entrained to food access. *Physiology & Behavior.* (32) 663-671
 - ✓ Stephans, F: K. 1997. Caloric effect zeitgeber properties of the feeding entrained circadian oscillator. *Physiology & Behavior.* (62) 995-1002
 - ✓ Su, H. S.; Bentivoglio, M. 1990. Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala and hippocampus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology.* (297) 582-593.
 - ✓ Takahashi, J. S.; Zatz, M. 1982. Regulation of circadian rhythmicity. *Science.* (217) 1104-1111
 - ✓ Takase, L. F; Nogueira, M. I. 2008. Patterns of fos activation in rat raphe nuclei during feeding behaviour. *Brain Research* (1200) 10-18
 - ✓ Takatsuji, K.; Tohyama, M. 1989. The organization of the rat lateral geniculate body by immunohistochemical analysis of neuroactive substances. *Brain Research.* (480) 196-209
 - ✓ Tominaga, K.; Shibata, S.; Ueki, S.; Watanabe, S. 1992. Effects of 5-HT1A receptor agonist on the circadian rhythms of wheel-running activity in hamsters. *European Journal of Pharmacology.* (214) 79-84
 - ✓ Turek, F. W.; Van Cauter, E. 1994. Rhythms in reproduction. The physiology of reproduction. Edt. Knobil, E. and Neill, J. D. Raven Press. New York, 487-540

-
- ✓ Turek, F. W.; Pinto, L. H.; Vintaterna, M. H.; Penev, P. D.; Zee, P. C.; Takahashi, J. S. 1995. Pharmacological and genetic approaches for the study of the circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol.* (16) 191-223.
 - ✓ Turner, B. H.; Herkenham, M. 1991. Thalamoamygdaloid projections in the rat: A test of the amygdala's role in the sensory processing. *The Journal of Comparative Neurology.* (313) 295-325.
 - ✓ Uroz; V.; Prensa, L.; Gimenez-Amaya, J. M. 2004. Chemical anatomy of the human paraventricular thalamic nucleus. *Synapse.* (51) 173-185
 - ✓ Van der Werf, Y. D.; Witter, M. P.; Groenewegen, H. J. 2002. The intralaminar and midline nuclei of the thalamus. Anatomical and functional evidence for participation in processes of arousal and awareness. *Brain Research Reviews.* (39) 107–140.
 - ✓ Wickland, C.; Turek, F. W. 1994. Lesions of the thalamic intergeniculate leaflet block activity-induced phase shifts in the circadian activity rhythm of the golden hamster. *Brain Research.* (660) 293-300.
 - ✓ Williams, G.; Bing, C.; Cai, X. J.; Harrold, J. A.; King, P. J.; Liu, X. H.; 2001. The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes *Physiology & Behavior.* 74 683-701
 - ✓ Winfree, A. T. 1977. Phase control of neural pacemakers *Science.* (197) 761-763
 - ✓ Woods S. C.; Lut, T. A.; Geary, N.; Langhans, W. 2006. Pancreatic signals controlling food intake; insulin, glucagon and amylin. *Philosophical Transactions of the Royal Society*
 - ✓ Yannielli, P.; Harrington, M. E. 2004. Let there be “more” light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photoc pathways. *Progress in Neurobiology.* (74) 59-76.
 - ✓ Yoshida, K.; McCormack, S.; España, R. A.; Crocker, A.; Scammell, T. E. 2006. Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology.* (494) 845–861