



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**CARACTERIZACION DE LA SINAPSIS PROVENIENTE DEL
TALAMO PARAVENTRICULAR A LAS NEURONAS DEL
NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO DEL HIPOTALAMO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

**JAVIER FRANCISCO ALAMILLA
GONZALEZ**

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAUL A. AGUILAR ROBLERO

CIUDAD UNIVERSITARIA

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero.

A lo largo del Doctorado conté con beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y de la Dirección General de Posgrado (DGEP).

El presente proyecto fue financiado por:
El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
con los donativos CONACyT-salud C01-101/A1,
CONACyT 42993 y
PAPIIT IN227107 asignados al
Dr. Raúl A. Aguilar Roblero.

Dedicatoria

A mis padres:

Delmy María González Hernández y Rodolfo Eliézer Alamilla Cabrera

...mis primeros maestros, gracias por su apoyo y aliento a lo largo de mi vida y de mi carrera; por inculcarme el trabajo diario y la perseverancia a pesar de las dificultades...

A mi compañera en la vida:

Azucena Pérez Burgos

...por habernos conocido y el maravilloso tiempo que hemos compartido...

A mi hermano:

Héctor Rodolfo Alamilla González

...aunque fue poco el tiempo que estuviste con nosotros, me dejaste un ejemplo que me ha servido cada día de mi vida...

A mi hermana:

Claudia Guadalupe Alamilla González

...porque siempre estas pendiente de mi y me has apoyado en todas las decisiones que he tomado en mi vida...

A toda mi familia, en especial a mis abuelos, tías, tíos, primos y sobrinos.

Agradecimientos

A nuestra máxima casa de estudios
La Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero, por su invaluable orientación y apoyo antes durante y después la realización de esta tesis. Por su impulso y amistad. Por ver en mí quizás mas allá de mis propias expectativas.

A lo miembros de mi comité tutorial:

Al Dr. José Segovia Vila y la Dra. Elvira Galarraga Palacio. Por toda la orientación, paciencia y consejo que me brindaron durante todo el desarrollo del doctorado.

A los miembros del jurado por los comentarios y sugerencias que me brindaron durante la revisión de mi tesis doctoral:

Dr. Raúl Antonio Aguilar Roblero, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Miguel Pérez de la Mora, Dr. Fernando Peña Ortega y Dr. Stefan Mihailescu.

Al Dr. José Bargas Díaz,

Por toda su orientación y ayuda.

A mis amigos y compañeros:

José Luis Chávez Juárez, Iván Villanueva Becerril, Claudia Alva Sánchez, Karla Valderrama, Andrés Nieto Posadas, Clara Mercado López, Mario Zamora, Javier Gallegos, Antonio Laville Conde, Fatuel Tecuapetla Aguilar, Luis Carrillo Reid, Yazmín Ramiro Cortés y Berenice Hernández Enríquez.

Al personal de cómputo, de la biblioteca y del taller del Instituto de Fisiología Celular por las facilidades que me brindaron a lo largo de mi estancia en dicho instituto.

A todos aquellos que me han echado una mano.

...Hay un momento para todo y un tiempo para cada cosa bajo el sol: un tiempo para nacer y un tiempo para morir, un tiempo para plantar y un tiempo para arrancar lo plantado; un tiempo para demoler y un tiempo para edificar...
(Eclesiástico 3, 1-3).

Índice

Abreviaciones	1
Resumen.	2
Summary.	4
1. Introducción.	6
1.1. Los ritmos biológicos.	6
1.2. El núcleo supraquiasmático.	7
1.2.1. Evidencia a favor de que el núcleo supraquiasmático regula los ritmos circadianos en mamíferos.	7
1.2.2. Características neuronales del núcleo supraquiasmático.	7
1.2.3. Tipos de patrones de disparo de las neuronas del núcleo supraquiasmático.	9
1.2.4. Canales transmembranales que regulan la frecuencia de disparo espontánea de las neuronas del núcleo supraquiasmático.	10
1.2.5. Transmisión sináptica espontánea en el núcleo supraquiasmático.	13
1.2.6. Los genes reloj y el oscilador molecular circadiano.	15
1.3. Aferencias al núcleo supraquiasmático.	17
1.3.1. El tálamo paraventricular anterior.	17
1.3.2. El tracto retino-hipotalámico.	18
1.3.3. La hojuela intergeniculada.	19
1.3.4. Núcleos del rafe dorsal.	19
1.4. Co-liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central.	20
2. Pregunta general.	22
3. Objetivo general.	22
4. Objetivos Específicos.	22
5. Métodos.	23
5.1. Animales y condiciones generales.	23
5.2. Registros electrofisiológicos.	23
5.3. RT-PCR en tiempo real.	28
5.4. Estudios de inmunohistoquímica.	29
6. Resultados.	31
6.1. La conexión entre el tálamo paraventricular anterior y el núcleo supraquiasmático es monosináptica.	31
6.2. Caracterización del componente glutamatérgico del tálamo paraventricular anterior a las neuronas del núcleo supraquiasmático.	32
6.3. Aislamiento del componente GABAérgico del tálamo paraventricular anterior a las neuronas del núcleo supraquiasmático.	34
6.4. Diferentes intensidades de estimulación en el tálamo paraventricular anterior producen potenciales postsinápticos con la misma latencia en las neuronas del núcleo supraquiasmático.	36
6.5. La estimulación mínima en el tálamo paraventricular anterior produce potenciales postsinápticos combinados en las neuronas del núcleo supraquiasmático.	37
6.6. El análisis de las corrientes miniaturas en el núcleo supraquiasmático apoya la hipótesis de co-liberación de GABA y	39

glutamato.	
6.7. Co-localización de los RNAm para los transportadores vesiculares de GABA y glutamato en las neuronas del tálamo paraventricular anterior.	42
6.8. Co-localización de las proteínas a los transportadores vesiculares de GABA y glutamato en terminales marcadas del tálamo paraventricular anterior.	44
6.9. Efecto de la estimulación del tálamo paraventricular anterior sobre la excitabilidad de las neuronas del núcleo supraquiasmático y su integración con las entradas provenientes del tracto retino hipotalámico.	47
6.9.1. Respuesta de las neuronas del núcleo supraquiasmático a la estimulación del tálamo paraventricular anterior y el tracto retinohipotalámico.	49
6.9.2. Efecto de la estimulación simultánea de tálamo paraventricular anterior y el tracto retinohipotalámico sobre la probabilidad de disparo de las neuronas del núcleo supraquiasmático.	50
6.9.3. Efecto de la estimulación de tálamo paraventricular anterior y tracto retinohipotalámico sobre la frecuencia de disparo en el núcleo supraquiasmático.	54
6.9.4. Los diferentes patrones de disparo de las neuronas del núcleo supraquiasmático exhiben diferentes potenciales de membrana espontáneos.	58
6.9.5. La estimulación del tálamo paraventricular anterior produce respuestas diferenciales en las neuronas del núcleo supraquiasmático dependiendo del patrón de disparo de la neurona postsináptica.	59
7. Discusión de los resultados.	62
Referencias.	69
Anexo I	81
Anexo II	90

Resumen

El tálamo paraventricular anterior (PVTa) es parte de los núcleos intralaminares del tálamo. Está implicado en mantenimiento de la vigilia y en la regulación de los ritmos circadianos. La lesión del PVTa elimina la zona de adelantos en la curva de respuestas de fase. Se ha descrito una aferencia directa entre el PVTa y el núcleo supraquiasmático (NSQ). El NSQ es la principal estructura involucrada en la regulación de los ritmos circadianos en mamíferos. Se ha propuesto que el neurotransmisor involucrado en esta conexión es el glutamato. Sin embargo, hasta antes del presente trabajo no había evidencia directa de los neurotransmisores involucrados en la mencionada vía. Por medio de registros electrofisiológicos de célula entera en la configuración de fijación de corriente se encontró que el PVTa libera GABA y glutamato a las neuronas del núcleo supraquiasmático. La consistencia de las latencias de los componentes GABAérgicos y glutamatérgicos durante la estimulación mínima y el análisis de corrientes postsinápticas miniatura con cinéticas de decaimiento combinadas, sugirió que el PVTa libera simultáneamente GABA y glutamato a las neuronas del NSQ. Asociado a los resultados anteriores se encontró colocalización de los RNA mensajeros para transportadores vesiculares de GABA y glutamato en las células aisladas pertenecientes al PVTa por medio de RT-PCR en tiempo real; así como colocalización de la proteína para los mismos transportadores en terminales marcadas en el NSQ provenientes del PVTa.

Por otra parte, se encontró que la aferencia proveniente del PVTa converge en un elevado porcentaje con las aferencias de la retina (la principal aferencia del núcleo supraquiasmático); mientras que la estimulación de ambas vías afectó la excitabilidad

(probabilidad y frecuencia de disparo) de las neuronas del NSQ en aquellas neuronas con una baja excitabilidad basal y un potencial de membrana hiperpolarizado.

Los resultados encontrados indican que la aferencia proveniente del PVTa juega un importante papel en la excitabilidad membranal de las neuronas del NSQ y muy probablemente desempeñen un rol central en el proceso de sincronización no fónica en estas neuronas.

Summary

The anterior paraventricular thalamus (aPVT) belongs to the intralaminar thalamus. The aPVT is implicated in the arousal maintaining and the circadian rhythm regulation. The PVT lesion abolishes the phase advance of the phase response curve. There is a description of a direct afference from the PVT to the suprachiasmatic nucleus (SCN). The SCN is the principal structure related with the regulation of the circadian rhythms in mammals. Several works reports that the neurotransmitter associated in this pathway is glutamate. However, before the present work there was not a straight evidence of the neurotransmitters implicated in this path. Taking advantage of whole cell patch clamp recordings in current clamp configuration, we found that aPVT released GABA and glutamate to SCN neurons. The consistency in latencies of GABA and glutamate components and analyses of the miniature postsynaptic currents with mixed decay time kinetics suggested that the aPVT released simultaneously GABA and glutamate to SCN neurons. Additional results indicated colocalization of mRNA for GABA and glutamate vesicular transporters in isolated aPVT neurons by real time RT-PCR. Moreover, colocalization of the same vesicular transporter was found in SCN neurons, in terminals arriving from aPVT.

On the other hand, we found that the aPVT afferents converged in high percentage with afferents coming from the retina (the principal afference of the SCN); furthermore, the stimulation of both nucleus (aPVT and retina) increased the excitability (probability and spike frequency) of SCN neurons in such cells with a low basal excitability and hyperpolarized membrane potential.

The present results indicated that the aPVT plays a pivotal role in the membrane excitability of SCN neurons and there are chances that PVTa carries out the non photic synchronization

1. Introducción

1.1. Los ritmos biológicos

Los ritmos biológicos son procesos fisiológicos que se presentan en forma cíclica. Todos los organismos desde los unicelulares hasta los multicelulares (incluyendo al ser humano) poseen ritmos biológicos. Existen distintos tipos de ritmos biológicos tomando en cuenta su periodo; ejemplo de ellos son los ritmos ultradianos, que ocurren más de una vez al día; los infradianos, que ocurren menos de una vez al día y los circadianos, que presentan un periodo similar al del día geológico (ocurren una vez al día). Ejemplos de ritmos circadianos son: el ciclo vigilia-sueño, la secreción hormonal, etcétera (Fig. 1).

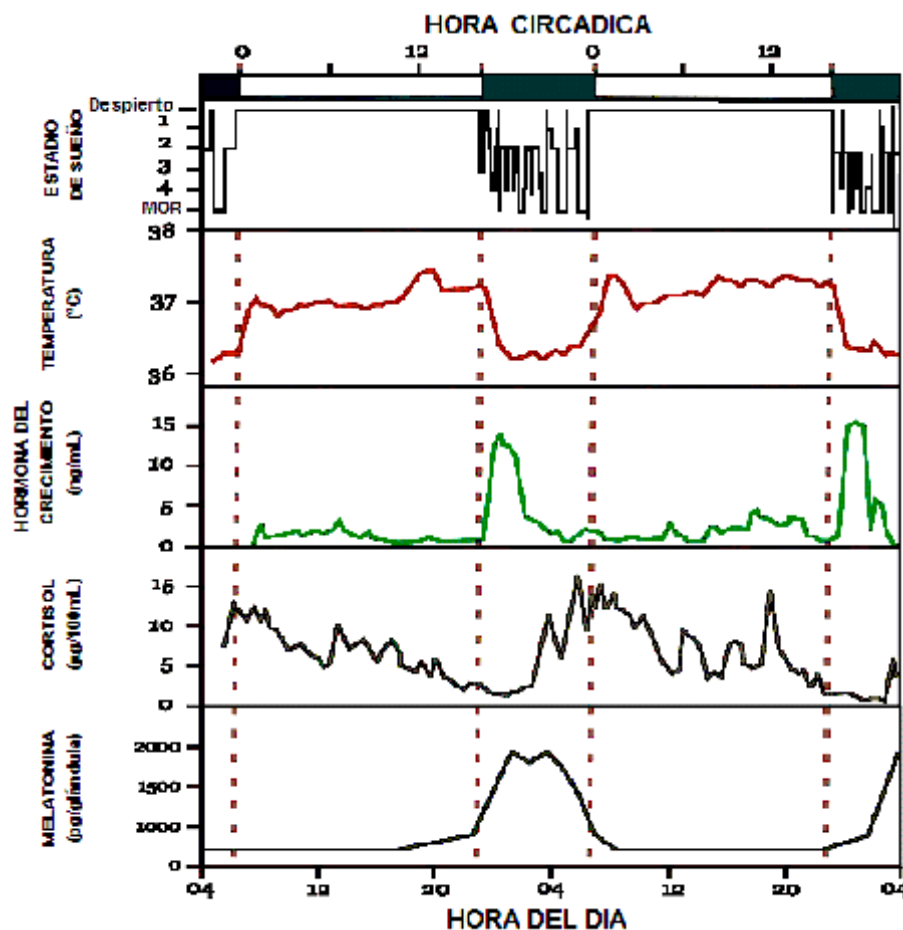


Figura 1.
Ejemplos de ritmos circadianos en humanos.

1.2. El núcleo supraquiasmático

1.2.1. Evidencia a favor de que el núcleo supraquiasmático regula los ritmos circadianos en mamíferos

El núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo es la estructura encargada de la regulación de los ritmos circadianos en mamíferos. La primera evidencia de que el NSQ regula los ritmos circadianos proviene de la descripción del tracto retino-hipotalámico (RHT), debido a que se encontró un grupo de fibras que viajan con el nervio óptico e inervan una zona bien definida del hipotálamo ventral. La lesión del NSQ elimina la expresión de los ritmos circadianos en las especies estudiadas (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972). En el animal completo se ha observado que el NSQ exhibe ritmos en el metabolismo de glucosa (Schwartz y Gainer, 1977) y actividad eléctrica (Intuye y Kawamura, 1972). Dichos ritmos en actividad eléctrica continúan cuando el NSQ es mantenido *in vitro* (Green y Gillete, 1982; Groos y Hendriks, 1982; Shibata et al., 1982) y en cultivos de células disociadas (Welsh et al., 1995).

Transplantes de tejido fetal de NSQ en animales adultos con lesión del NSQ restauran los ritmos circadianos del animal receptor (Aguilar-Roblero et al., 1986; Aguilar-Roblero et al., 1992; Aguilar-Roblero et al., 1994; Lehman et al., 1987); mientras que el ritmo restaurado tiene el periodo del animal donador (Ralph et al., 1990; Silver et al., 1996).

1.2.2. Características neuronales del núcleo supraquiasmático

El NSQ está formado por dos grupos neuronales localizados en el hipotálamo anterior dorsal al quiasma óptico y lateral al tercer ventrículo. Cada grupo contiene de 8,000 a 10,000 neuronas. Estas neuronas no forman una población homogénea de células. La evidencia anatómica apoya la división del NSQ en ventrolateral (core) y dorsomedial (shell) (Abrahamson y Moore, 2001). Las neuronas en la zona ventrolateral

son inervadas por fibras provenientes de la retina, en muchos casos expresan el neuropéptido intestinal vasoactivo (VIP) o el péptido liberador de la gastrina (GRP), mientras que el péptido arginina vasopresina (AVP) es expresado en la región dorsomedial (Moore y Leak, 2001). Las neuronas retino-receptoras comunican la información luminosa al resto del NSQ. Las células en la parte dorsal del NSQ exhiben una ritmicidad más robusta en la expresión de los genes reloj (los cuales se describirán posteriormente) comparado con la región ventral del NSQ (Yamaguchi et al., 2003; Hamada et al., 2004). Estudios electrofisiológicos han sugerido que las neuronas retino-receptoras no expresan ritmos en la frecuencia de disparo (Jiao et al., 1999). En el NSQ de hamsters, se ha identificado una población de células inmuno-positivas a calbindina que son reguladas por información fótica, pero que no expresan ritmos en la frecuencia de disparo (Antle et al., 2005; Jobst y Allen, 2002).

La mayor parte de las neuronas del NSQ poseen un ritmo en la frecuencia de disparo, el cual muestra su pico más alto en la mitad del día y su pico más bajo en la mitad de la noche, ya sea en registros realizados *in vivo* o *in vitro* (Figura 2).

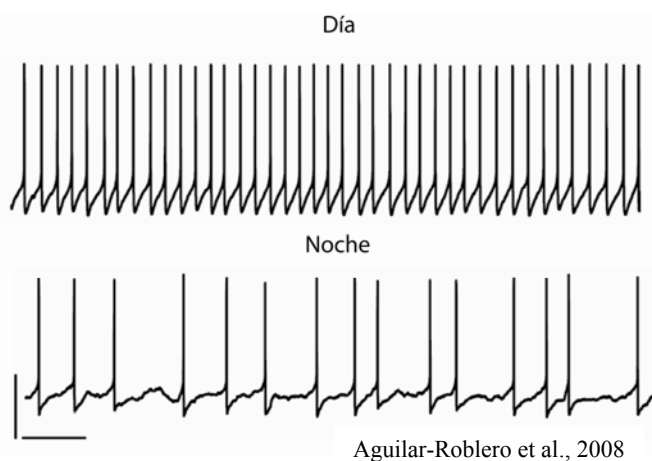


Figura 2. Neurona del NSQ registrada *in vitro*, en dos momentos del ciclo circadiano. Barras de calibración, horizontal 1 seg, vertical 30 mV.

La frecuencia de disparo de las neuronas del NSQ muestra un rango desde 0.5 a 12 Hz. Se han realizado registros durante largos periodos de tiempo en células

disociadas y se sigue observando este fenómeno, lo que indica que es una función inherente a las neuronas de este núcleo (Welsh et al., 1995).

1.2.3. Tipos de patrones de disparo de las neuronas del núcleo supraquiasmático

Tres tipos de patrones de disparo han sido encontrados en neuronas del NSQ por medio de registros *in vitro*: Las neuronas tipo I o rítmicas, muestran patrones regulares de disparo y elevadas frecuencias de disparo, la distribución del intervalo-interespiga muestra una distribución normal o Gaussiana, la cual es característica de la actividad marcapaso. Las neuronas tipo II o arrítmicas muestran un patrón irregular de disparo, desde baja a mediana frecuencia de disparo, la distribución del intervalo interespiga muestra una distribución sesgada. Las neuronas tipo III o de disparo en ráfagas, muestran de medianas a elevadas tasas de disparo interrumpidas por intervalos de silencio o falta de actividad. La distribución del intervalo interespiga ha sido ajustada a modelos de Poisson (Zhang et al., 1992; Roig et al., 1997; Saeb-Parsy y Dyball, 2003). Se ha reportado un cuarto patrón de disparo en las neuronas del NSQ (con registros extracelulares) que solo es reconocido por el posterior análisis del histograma en el intervalo interespiga, nombrado como patrón de disparo armónico (Zhang et al., 1992, Figura 3).

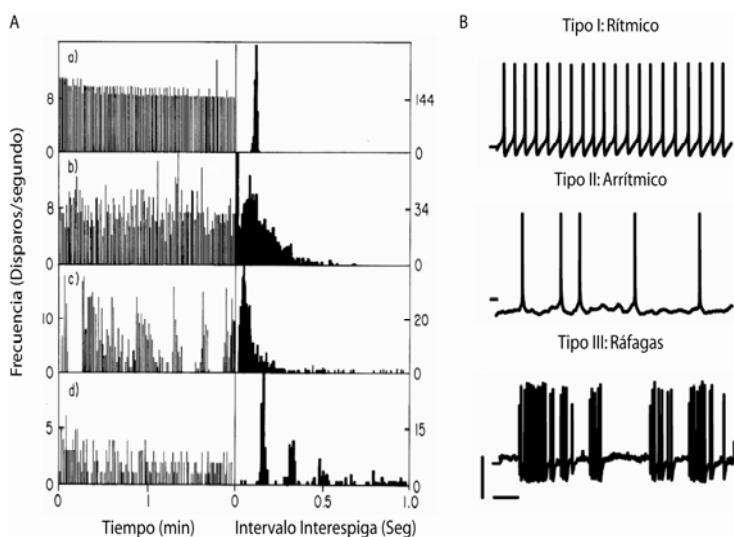


Figura 3. Patrones de disparo en las neuronas del NSQ. A, Frecuencia de disparo (izquierda) e histogramas de intervalo interespiga (derecha) de 4 registros extracelulares de neuronas del NSQ. a) Rítmicas, b) arrítmicas, c) en ráfagas, d) armónico. B, patrones de disparo de neuronas registradas en la configuración de parche perforado. Barras de calibración horizontal 500 ms, vertical 30 mV.

1.2.4. Canales transmembranales que regulan la frecuencia de disparo espontánea de las neuronas del núcleo supraquiasmático

En aquellas neuronas del NSQ que muestran un disparo rítmico o marcapaso es difícil sacar un potencial de membrana en reposo, ya que el potencial de membrana durante el intervalo interespiga continúa en movimiento, resultado de la activación de canales transmembranales; inmediato a la generación de un potencial de acción el potencial de membrana se halla en un potencial de membrana más negativo que el previo al potencial de acción, este potencial es nombrado postpotencial hiperpolarizante (PPH), después del cual el potencial de membrana alcanza el umbral de disparo y un nuevo potencial de acción es generado. Tanto el intervalo interespiga como el potencial de acción se deben a un grupo particular de canales regulados por voltaje, que controlan las corrientes de membrana específicas en forma selectiva y dependiente del tiempo. Así, el patrón de disparo de una neurona marcapaso del NSQ resulta del delicado balance entre corrientes salientes (K^+) y corrientes entrantes (Na^+ ; Ca^{2+} ; Fig. 4).

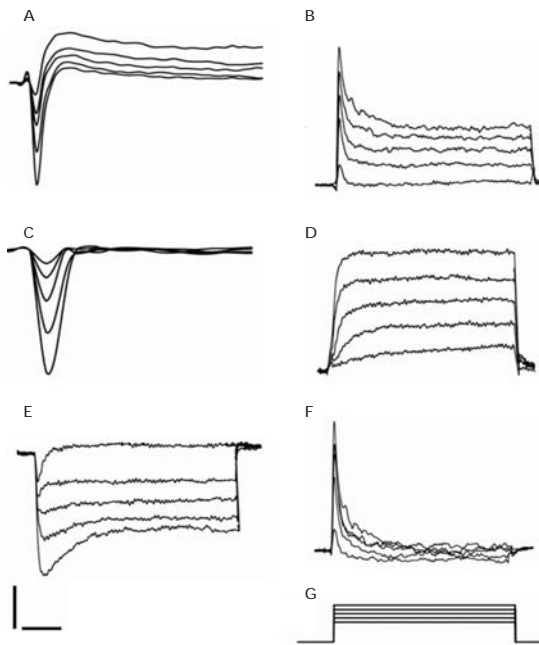


Figura 4. Corrientes iónicas de una neurona del NSQ; corrientes entrantes son ilustradas a la izquierda; corrientes salientes son ilustradas a la derecha; para cada panel los valores de las barras de calibración son indicados en paréntesis. A) corrientes globales (2.5 ms, 500 pA). B) Corrientes de potasio globales (50 ms, 200 pA). C) Corrientes de sodio sensibles a TTX (1.3 ms, 400 pA). D) Corrientes persistentes de potasio (50 ms, 200 pA). E) Corrientes globales de calcio (50 ms, 100 pA) F) Corriente de potasio transitoria I_A (50 ms, 200 pA). G) Protocolo de pasos de voltaje, el potencial de mantenimiento fue de -70 mV, los pulsos fueron cuadrados de -30 a +30 mV, en incrementos de 10 mV. Las corrientes específicas fueron bloqueadas por el uso de TTX (Na^+), cadmio, níquel, bario (Ca^{2+}) y TEA (K^+).

Las corrientes de K^+ identificadas en el NSQ regulan el intervalo interespiga y son el rectificador retardado rápido (fDR) (Itri et al., 2005); la corriente saliente transitoria (I_A) (Bouskila y Dudek, 1995); y tres corrientes de K^+ reguladas por Ca^{2+} ($K_{(Ca)}$) asociadas con el PPH: la corriente de gran conductancia (BK), sensible a iberotoxina (Pitts et al., 2006), la corriente de conductancia pequeña (SK), sensible a apamina (Teshima et al., 2003), una corriente $K_{(Ca)}$ insensible a iberotoxina y apamina (Cloues y Sather, 2003), además de una corriente de K^+ sensible a bario ($K_{(Ba)}$) (de Jeu et al., 2002). Por otra parte, las corrientes entrantes identificadas son: la corriente entrante catiónica inespecífica, la cual se activa a voltajes hiperpolarizados (I_h) (de Jeu y Pennartz, 1997); dos corrientes persistentes de Na^+ , una corriente subumbral sensible a TTX (Pennartz et al., 1997) y una corriente de fondo o de fuga insensible a TTX (Jackson et al., 2004); además de varias corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Huang, 1993), incluyendo los tipos L (Pennartz et al., 2002), N, P/Q y R (Cloues y Sather, 2003).

Nuestro entendimiento actual de la dinámica de las corrientes iónicas durante el ciclo del potencial de acción en las neuronas del NSQ es aún incompleto. Desde un punto de vista simplificado, este inicia con el rápido aumento de la fase depolarizante del potencial de acción. Como ocurre con todas las células eléctricamente activas, cuando el potencial de membrana alcanza el umbral necesario para abrir un número crítico de canales de Na^+ dependientes de voltaje, se produce un proceso auto-regenerativo, el cual es solamente detenido por la inactivación de estos canales, cuando la corriente de Na^+ entra a la célula, la depolarización de la membrana abre los canales de Ca^{2+} tipo L y el Ca^{2+} entrante contribuye a una mayor depolarización en la membrana; simultáneamente, diferentes canales de K^+ se abren, incluyendo los canales de rectificadores lentos y rápidos. La apertura de los canales de Na^+ dependientes de

voltaje llevan el potencial de membrana hasta cerca de su potencial de equilibrio dado por la ecuación de Nerst (E_{Na}), sin embargo, este nunca es alcanzado por la repolarización que se produce debido a los canales de K^+ ; justo después de la máxima depolarización de la membrana se da la máxima conducción de los canales de K^+ que repolarizan la membrana y la llevan hasta cerca del potencial de equilibrio para el K^+ dado por la ecuación de Nerst para este ion (E_K), lo que produce la activación de los K_{Ca} que son dependientes de voltaje y de ligando (Ca^{2+}); simultáneamente, produciendo una mayor hiperpolarización de la membrana, produciendo el PPH. Tal hiperpolarización es importante, puesto que esta mayor negatividad activa corrientes que depolarizan la membrana, como la corriente de Ca^{2+} de bajo umbral (canales de Ca^{2+} tipo T) y la corriente entrante catiónica inespecífica (I_h). Así, el potencial de membrana lentamente se despolariza hasta el potencial en donde se activan la corriente subumbral de Na^+ , la sensible a TTX y la corriente de fondo insensible a TTX, las cuales son las principales responsables del alcance del umbral del potencial de acción. El papel de las corrientes que resultan de la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje no es aun claro en este proceso (Fig. 5).

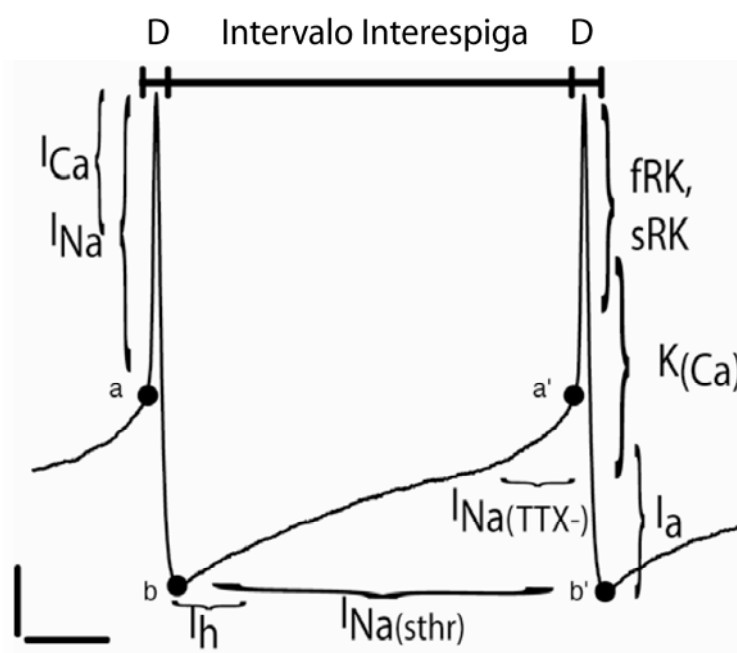


Figura 5. Potenciales de acción característicos de una neurona rítmica del NSQ. Los círculos en negro indican el umbral de disparo (a, a' [-45mV]) y el post potencial hiperpolarizante (b, b'). Los potenciales de acción (D) e intervalo interespiga son indicados. El dominio de cada conductancia iónica es indicado en paréntesis. Barras de calibración 20 ms y 10 mV.

1.2.5. Transmisión sináptica espontánea en el núcleo supraquiasmático

La generalidad de las neuronas del NSQ son inmunoreactivas a GABA o la enzima que lo sintetiza (decarboxilasa de glutamato-GAD). Existe una amplia distribución de los transportadores vesiculares de GABA (VGAT) que son los responsables de introducir este neurotransmisor a las vesículas sinápticas para su liberación como sustancia neuroactiva (Fig. 6).

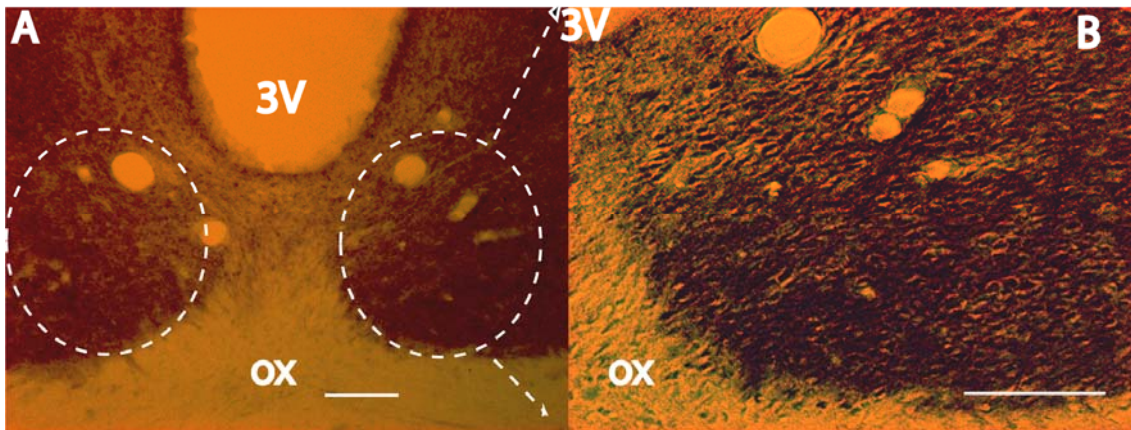


Figura 6. Expresión de transportadores vesiculares de GABA (VGAT) en el NSQ. A) Micrografía de inmunohistoquímica revelada con DAB contra VGAT (amplificación de 100 veces). Los círculos indican los NSQ. Escala 50 μ M. B) Amplificación de 200 veces un NSQ del panel A. Escala 50 μ M. abreviaturas: ox, quiasma óptico; 3V, tercer ventrículo.

La mayor parte de los axones que hacen contacto con las neuronas del NSQ son inmunoreactivos a GABA y GAD (Klein et al., 1991; van del Pol. et al., 1996). El 90 % de las corrientes postsinápticas inhibitorias (CPSI) espontáneas en el NSQ son de naturaleza gabaérgica, sensibles a bicuculina, resultado de la activación del receptor GABA_A (Strecker et al., 1997). La estimulación intra-núcleo provoca CPSIs con las mismas características de los CPSIs espontáneos (Kim et al., 1992). La frecuencia en la aparición de los CPSIs varía de célula a célula con un rango de 2 a 62 Hz; sin embargo, la frecuencia más común es 3 Hz y la amplitud de 7 pA en un potencial de membrana de -60 mV. El tiempo de subida es de 3.1 ± 0.27 ms, y el de bajada es de 7.1 ± 0.55 ms (Jiang et al., 1997).

Existe también una amplia distribución de glutamato en el NSQ (Fig. 7), por lo que hay corrientes postsinápticas excitatorias (CPSE) espontáneas de naturaleza glutamatérgica, producto de la activación de los receptores tipo AMPA-kainato.

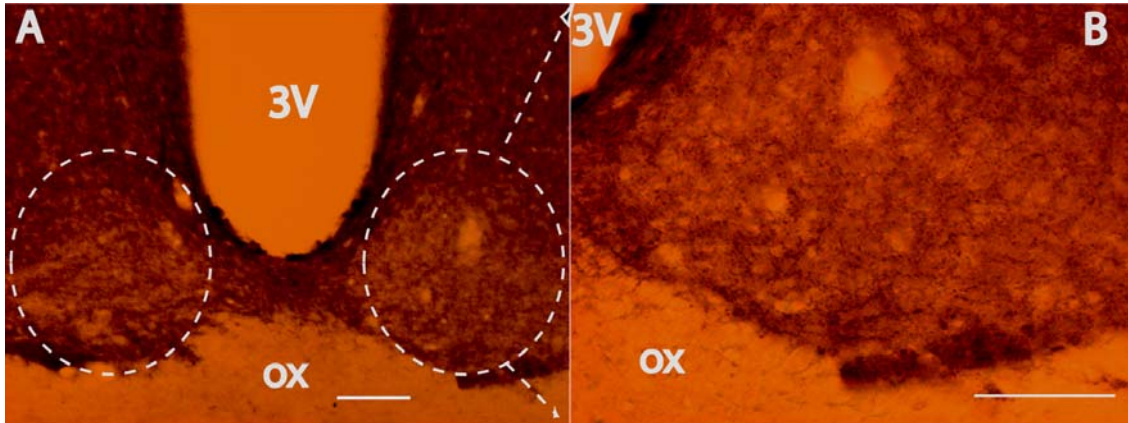


Figura 7. Expresión de transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT) en el NSQ. A) Micrografía de inmunohistoquímica revelada con DAB contra VGLUT (amplificación de 100 veces). Los círculos indican los NSQ. Escala 50 μ M. B) Amplificación de 200 veces un NSQ de panel A. Escala 50 μ M. abreviaturas: ox, quiasma óptico; 3V, tercer ventrículo.

La amplitud y frecuencia de los CPSE varían de célula a célula, siendo la amplitud típica de 10 pA (en un rango de 5 a 102 pA) en un potencial de membrana de -60 mV (Jiang et al., 1997), mientras que en -70 mV la amplitud característica es -17.5 ± 0.8 pA (en un rango de 7 a 37 pA; Michel et al., 2002). La frecuencia característica varía de 1 Hz hasta 0.26 Hz (Jiang et al., 1997, Michel et al., 2002). El tiempo de subida de los CPSE es de 1.3 ± 0.2 ms, mientras que el de bajada 2.2 ± 0.1 ms (Jiang et al., 1997; Michel et al., 2002). Siendo característicamente los CPSE más rápidos en el tiempo de subida y de bajada que las CPSI.

Existe un incremento del Ca^{2+} transmembranal por la activación de los receptores de AMPA-kainato, el cual es mayor en la noche que durante el día. Este efecto es importante, puesto que el Ca^{2+} se ha involucrado con importantes procesos y vías de señalización de las neuronas del NSQ (Jiang et al., 1997).

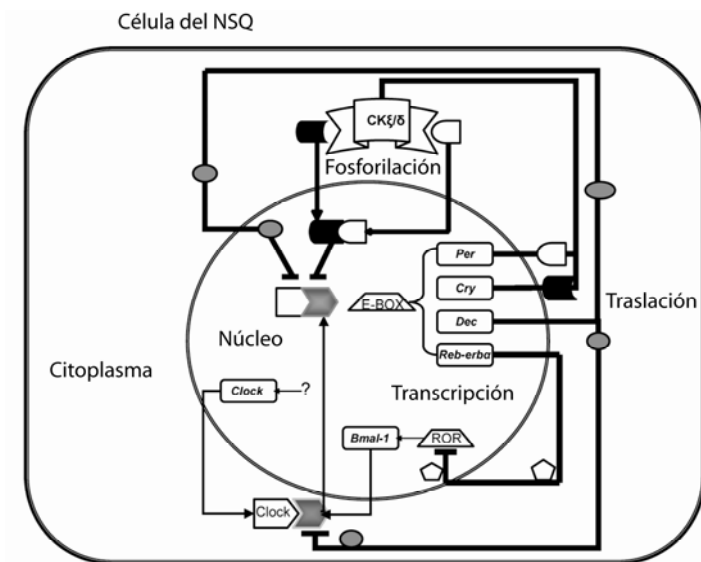
La aplicación de la tetrodotoxina (TTX) o bajo Ca^{2+} y alto Mg^{2+} , no disminuye la amplitud o la frecuencia de los CPSI o CPSE de forma considerable, indicando que se deben en su mayoría a la liberación espontánea de neurotransmisor (sinápticos miniatura). Se ha encontrado una regulación circadiana en la frecuencia de los CPSI, siendo el pico superior durante el inicio de la noche en la región dorsomedial (Itri et al., 2003); mientras que no hay regulación circadiana de los CPSE (Michel et al., 2002). La aplicación del neuropéptido VIP incrementa la frecuencia pero no la amplitud de los CPSI, de forma dependiente de la dosis, lo que indica que existe una regulación presináptica del receptor para VIP en la regulación circadiana de la liberación del neurotransmisor GABA.

Estos antecedentes indican que el GABA y glutamato tienen una amplia distribución en las neuronas del NSQ.

1.2.6. Los genes reloj y el oscilador molecular circadiano

Estudios previos han identificado los elementos moleculares responsables de la generación del oscilador circadiano en las neuronas del NSQ (Reppert y Weaver, 2003; Stanewsky, 2003). Este oscilador molecular incluye los genes *Period* (*Per*₁ y *Per*₂); los genes Cryptocromo *Cry*₁ y *Cry*₂; los factores de transcripción de los genes *Clock* y *Bmal*₁; y los factores represores *Rev-erb- α* , *Dec*₁ y *Dec*₂. Estos elementos interactúan mediante las asas de retroalimentación de transcripción-traducción. La evidencia actual indica que las proteínas de CLOCK y BMAL-1 forman un heterodímero el cual actúa como factor transcripcional que enlaza a E-box (Gekakis et al., 1998; DeBruyne et al., 2006) para inducir la transcripción de los genes *Per*₁, *Per*₂ (Bae et al., 2001), *Cry*₁, *Cry*₂ (Kume et al., 1999), *Dec*₁, *Dec*₂ (Hamaguchi et al., 2004; Kawamoto et al., 2004) y *Rev-erb- α* (Triqueneaux et al., 2004). La secuencia exacta de los eventos siguientes está aún bajo estudio; después de la traducción de las proteínas PER y CRY son fosforiladas por

las casein kinasa δ y ξ , formando heterodímeros que son trasladados al núcleo. En el núcleo, los dímeros PER/CRY enlazan al complejo CLOCK/BMAL-1 desplazando de la E-box y de esta forma inhibe su propia transcripción (Yu et al., 2002; Sato et al., 2006), así como la de los genes *Reb-erb-a* (Preitner et al., 2002) y *Dec* (Hamaguchi et al., 2004) (Fig. 8).



Aguilar-Robero et al., 2008

Figura 8. Asas de retroalimentación negativa de transcripción/traducción. Flechas apuntando representan promotores de transcripción.

El asa de retroalimentación negativa es necesaria para sostener la oscilación circadiana, como indican la disrupción de los ritmos circadianos en animales mutantes con carencia de cualquiera de los genes *Per₁*, *Cry₁* o *Clock* (Herzog et al., 1998; Vitaterna et al., 1999; Cermakian et al., 2001). Las vías de salida del oscilador molecular muy probablemente regulan la excitabilidad membranal. Actualmente, no se entiende claramente la forma en que el oscilador molecular regula la membrana y los procesos metabólicos en las neuronas del NSQ. Una posibilidad es que la transcripción de los genes codifica a los canales transmembranales y que estos a su vez modulan la frecuencia de disparo.

1.3. Aferencias al núcleo supraquiasmático

Existen múltiples núcleos que proyectan al NSQ, como el tálamo paraventricular anterior (PVTa), el RHT, la hojuela intergeniculada, los núcleos del rafé dorsal. Dado el objetivo del presente trabajo se describirán a mayor profundidad las aferencias del PVTa y el RHT, mientras que el resto de las aferencias serán descritas brevemente.

1.3.1. El tálamo paraventricular anterior

El PVTa es una estructura perteneciente al complejo talámico de la línea media con importantes eferencias tálamo-corticales y tálamo-estriatales (Groenewegen y Berensende, 1994). En base a las conexiones que presenta el PVT se le ha relacionado con conductas cognitivas, emocionales y viscerales (Cullinan et al., 1995; Duncan et al., 1996; Su y Bentivoglio, 1990). El uso del gen de expresión temprana c-Fos como marcador de actividad neuronal, ha mostrado que PVT incrementa su expresión cuando el animal se despierta. Este efecto se ha verificado en animales nocturnos y diurnos (Novak et al., 2000; Novak y Nunez, 1998). Además, el patrón diario de c-Fos en PVTa es de 180° fuera de fase con el área preóptica ventrolateral (VLPO), una región importante en el inicio y mantenimiento del sueño (Sherin et al., 1996).

Se ha propuesto que el PVTa envía eferentes excitatorios al NSQ (Moga et al., 1997); más aun, existe evidencia electrofisiológica de que el NSQ envía aferencias GABAérgicas y glutamatérgicas al PVT (Zhang et al., 2006). Las conexiones recíprocas de PVT con el NSQ, junto con las entradas a PVT desde otros componentes del sistema circadiano tales como la zona subparaventricular y la hojuela intergenicula (HIG) sugieren que PVT juega un papel importante en la regulación de los ritmos circadianos (Moga et al., 1995). La lesión del PVTa abole los avances de fase inducidos por luz durante la noche subjetiva tardía, mientras que la estimulación eléctrica o química del

PVT produce los mismos efectos que la estimulación fótica en la curva de respuestas de fase. Estos resultados indican la participación del PVTa como un modulador de la sincronización de los ritmos circadianos a la luz (Salazar-Juarez et al., 2002).

La última evidencia enunciada sirvió como motivo para desarrollar el presente proyecto, puesto que nuestro objetivo general fué caracterizar la sinapsis entre el PVTa y el NSQ del hipotálamo.

1.3.2. El tracto retino-hipotalámico.

El RHT es la principal vía por la cual se sincroniza el NSQ a la luz ambiental. El RHT es un haz de fibras que se inicia en una subpoblación de células ganglionares de la retina conocidas como W. Las cuales se proyectan a través del quiasma óptico hasta el núcleo supraquiasmático (Klein et al., 1991). El RHT libera glutamato a las neuronas del NSQ (principalmente a las neuronas de la parte ventral del NSQ), el cual activa receptores tipo AMPA-kainato y NMDA (Liou et al., 1986; Vindlacheruvu et al., 1992; Kim et al., 1993). Se ha reportado una mayor conductancia por la activación del receptor de NMDA durante la noche que durante el día, no así para los AMPA-kainato; esta variación en los receptores tipo NMDA podría explicar el efecto que ejerce la estimulación fótica sobre las neuronas del NSQ para producir los cambios de fase (Pennartz et al., 2001).

Por otro parte, se ha propuesto que la estimulación eléctrica del RHT provoca inhibición en la frecuencia de disparo en el 34 % de las neuronas del NSQ y que esta inhibición es provocada por la liberación de GABA (Jiao y Rusak, 2003).

El RHT co-libera glutamato y el neuropéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) que pertenece a la misma familia que el neuropéptido VIP (Hannibal et al., 1997; Hannibal et al., 2000). Los receptores PACAP ejercen su acción sobre tres tipos de receptores: el PAC1, VPAC1 y VPAC2. Estos dos últimos muestran

la misma afinidad para enlazar VIP que PACAP (Harmar et al., 1998); en el NSQ se ha mostrado la existencia de PAC1 y VPAC2, pero no de VPAC1 (Hannibal et al., 1997). El PACAP potencia el efecto del glutamato a través de la activación de los canales de Ca^{2+} transmembranales tipo L, por una vía de segundos mensajeros que involucra la activación de la PKC (Dziema et al., 2002). Hasta este momento, no se ha explorado cual es el efecto de la estimulación del RHT sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NSQ, puesto que como se ha mencionado anteriormente, la mayor parte de las neuronas de este núcleo presentan un disparo espontáneo, y la frecuencia de disparo se ha relacionado con momentos característicos del ciclo circadiano.

1.3.3. La hojuela intergeniculada

El núcleo geniculado lateral ventral del tálamo envía a las neuronas del NSQ presumiblemente aminoácidos excitatorios. Dichas fibras son inmunoreactivas al neuropéptido Y (NPY) (Klein et al., 1991). La HIG recibe aferencias de la retina y a su vez envía eferencias al NSQ. El 26.1 % de las neuronas del NSQ reciben aferencias provenientes de la HIG y la retina (Roing et al., 1997). La lesión de la HIG tiene variados efectos sobre los ritmos circadianos y la sincronización de los ritmos del animal a los periodos de luz. Se ha reportado que la lesión de la HIG provoca un alargamiento en el ritmo circadiano de animales sometidos a oscuridad constante (Pickard, 1994); a su vez, la inyección del NPY afecta la sincronización a la luz (Weber et al., 1997). El NPY actúa sobre el receptor NPY Y1/Y5 (Lall et al., 2003).

1.3.4. Núcleos del rafe dorsal

Una tercera entrada al NSQ se origina desde los núcleos mediano y dorsal del rafe. Estos reciben entradas excitatorias desde la retina; sin embargo, se desconoce si las eferentes que proyectan al NSQ provienen de neuronas conectadas por la retina. Las terminales del rafe contienen serotonina (5HT) y son responsables de las elevadas

concentraciones de 5HT en el NSQ (Klein et al., 1991). Las proyecciones provenientes de los núcleos del rafe coinciden con las proyecciones provenientes del TRH en el NSQ ventrolateral. La inervación de 5HT no es indispensable para el funcionamiento de los ritmos circadianos, se siguen presentando ritmos aun cuando se haya lesionado los núcleos del rafe que inervan al NSQ; sin embargo, hay un efecto sobre la sincronización a la luz (Miller, 1990).

1.4. Co-liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central.

Dados los resultados encontrados, es necesario mencionar algunos de los resultados más relevantes de la co-liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso, el cual se describe a continuación.

Existe evidencia de co-liberación de un neurotransmisor clásico con neuropéptidos desde la década de los años '70 (Osborne, 1979; Lundberg y Hökfelt, 1983). Durante las últimas dos décadas, se ha acumulado evidencia de co-liberación de neurotransmisores rápidos a partir de la misma neurona en el sistema nervioso central de vertebrados (Seal y Edwards, 2006). La primera evidencia electrofisiológica de co-liberación de GABA y glicina fue en interneuronas de la médula espinal (Jonas et al., 1998). De igual forma, se ha demostrado que el glutamato se co-libera con acetilcolina durante etapas primarias del desarrollo en motoneuronas e interneuronas de la médula espinal (Li et al., 2004; Nishimaru et al., 2005); glutamato también es co-liberado con serotonina *in vitro* (Johnson, 1994); mientras en neuronas del asta dorsal de la médula espinal cultivadas se ha visto que el GABA se co-libera con el ATP, el cual actúa como un neurotransmisor rápido (Jo et al., 1999). Tanto el GABA como la glicina se co-liberan en el cerebro medio auditivo durante el desarrollo (Kotal et al., 1998; Nabekura et al., 2004). Se ha encontrado co-liberación de GABA y dopamina en neuronas periglomerulares en el bulbo olfativo (Maher y Wetbrook, 2008). Finalmente, GABA y

glutamato, los principales neurotransmisores inhibitorios y excitatorios, de acción rápida en el sistema nervioso central, son co-liberados de las fibras musgosas en el hipocampo de ratas utilizando un modelo experimental de epilepsia (Gutierrez, 2000; 2002), durante etapas juveniles en condiciones fisiológicas (Walker et al 2001); y durante el desarrollo del sistema auditivo en el cerebro de medio de ratas (Gillespie et al., 2005). A pesar de la evidencia enunciada anteriormente todavía es vigente la pregunta si el proceso de co-liberación de neurotransmisores rápidos se presenta en la edad madura en otros núcleos en el sistema nervioso central.

2. Pregunta general:

¿Qué características electrofisiológicas presentan las sinapsis entre las neuronas del núcleo supraquiasmático y las aferencias provenientes del tálamo paraventricular anterior?

3. Objetivo general:

Determinar con una aproximación electrofisiológica las características neuroquímicas entre las sinapsis provenientes del tálamo paraventricular anterior y las neuronas del núcleo supraquiasmático del hipotálamo, así como determinar su efecto sobre la excitabilidad de las neuronas del núcleo supraquiasmático.

4. Objetivos Específicos:

Conocer si el potencial postsináptico que resulta de la estimulación en el tálamo anterior es de naturaleza mono o poli sináptica.

Explorar la naturaleza de los neurotransmisores liberados en esta sinapsis.

Estudiar el efecto de la estimulación del tálamo paraventricular anterior sobre la excitabilidad membranal en las neuronas del núcleo supraquiasmático y su interacción con el tracto retino-hipotalámico.

5. Métodos

5.1. Animales y condiciones generales

Se usaron ratas Wistar macho de peso entre 100 y 120 g, las cuales fueron alojadas por mínimo dos semanas antes que iniciaran los experimentos bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 hrs. La luz (400 lux) se prendía a las 6:00 AM y se apagaba a las 6:00 PM; en un cuarto con ruido de fondo ambiental que funciona como aislador de sonido. La temperatura fue de $22^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C. Para la realización de registros electrofisiológicos durante el período correspondiente a la noche, se mantuvieron los animales en ciclo invertido 12:12 (400 lux). La luz se encendía a la las 10:00 PM y se apagaba a la 10:00 AM por al menos 3 semanas antes de que iniciaran los experimentos. Los animales tenían libre acceso a agua y alimento.

5.2. Registros electrofisiológicos

Las ratas fueron profundamente anestesiadas entre 3 y 5 hrs. después del encendido de las luces y el cerebro fue removido rápidamente y colocado en fluido cerebro espinal artificial (aCSF) con bajo Ca^{2+} , a una temperatura de 4° C, el cual contenía (en mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 4 MgCl_2 , 0.5 CaCl_2 , 26 NaHCO_3 , and 10 glucosa, pH 7.38, 330 mOsm/l, el medio fue oxigenado con una combinación de 95% O_2 /5% CO_2 . Cuando se realizaron registros en ciclo invertido, se obtuvieron rebanadas durante el período correspondiente a la luz (1 hora antes del apagado de la luz), para evitar cambios de fase inducidos por luz. Rebanadas sagitales de 250-300 μm de espesor fueron obtenidas con la ayuda de un vibratomo. Las rebanadas que contenían el PVTa y el NSQ fueron transferidas en aCSF con bajo Ca^{2+} a temperatura ambiente y continuamente oxigenadas hasta que se procedió al registro. Las rebanadas fueron

colocadas en la cámara de registro y fueron continuamente perfundidas (2.5-5 ml) con aCSF oxigenado a temperatura ambiente. La solución de la cámara de registro fue idéntica a la solución de la extracción excepto a que el CaCl_2 fue incrementado a 2.4 mM, y el MgCl_2 reducido a 1.3 mM. Las rebanadas del NSQ fueron visualizadas y los electrodos de registro colocados con la ayuda de microscopía de contraste de fases en un microscopio Nikon Eclipse 600 con una cámara de video MTI y un monitor. Los registros fueron hechos a temperatura ambiente (20-25° C) usando la técnica de célula entera durante diferentes momentos del ciclo circadiano. Entre las 5 y las 10 horas después del encendido de la luz se consideró la mitad del día; y entre las 5 y las 10 horas después del apagado de la luz se consideró la mitad de la noche. Los electrodos de registro fueron llenados con solución interna que contenía (en mM): 72 KH_2PO_4 , 36 KCl, 2 MgCl_2 , 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 Na_2ATP , 0.2 Na_2GTP , pH 7.2, 275 mOsmol/l, como es reportado por Tecuapetla et al., (2008). Las pipetas de registro tenían una resistencia de 4 a 7 M Ω . Se consideró un sello adecuado cuando hubo una resistencia mayor que 2 G Ω , entre la pipeta de registro y la membrana de la célula. La membrana fue rota gentilmente por una breve succión. Los registros fueron hechos en la configuración de fijación de corriente con un amplificador modelo Axopatch 200B de Axon instruments. Los datos fueron adquiridos en línea usando una tarjeta de adquisición digital y un programa realizado en el contexto del programa Lab View. Se estimuló eléctricamente al PVT anterior con un electrodo bipolar concéntrico (diámetro interno 12.5 μm de FHC Company), el electrodo bipolar se conectó a una unidad de aislamiento (Grass PSIU6), el cual estaba comandada por un estimulador (Grass model 2000) sincronizado a la computadora. Los pulsos eléctricos fueron aplicados con una frecuencia de 0.5 Hz, con una duración de 0.5 ms y la intensidad fue ajustada para producir respuestas en el 70 al 80% de los pulsos aplicados. Cuando una célula del NSQ

estaba lista para registrar, la intensidad de la estimulación en PVT fue aplicada al 80% en relación al máximo y si la neurona respondía claramente, la intensidad fue reducida para producir del 70 al 80% de las respuestas en 10 a 20 pulsos consecutivos, de otra forma la neurona fue descartada. Solamente aquellas neuronas que fueron capaces de seguir una frecuencia de 20 Hz en la estimulación del PVTa fueron seleccionadas para análisis posteriores. Las neuronas del NSQ fueron registradas al menos por dos minutos para obtener una línea basal de la tasa de disparo espontánea y después se realizaron dos minutos adicionales de registro bajo la estimulación del PVT anterior. Se analizó el efecto de la estimulación de PVTa sobre las neuronas del NSQ dependiendo del patrón de disparo. Con el objetivo de disecar los diferentes componentes de las respuestas sinápticas se utilizó 5 mM de QX-314 en la pipeta para eliminar los potenciales de acción espontáneos en la neurona registrada sin afectar la transmisión sináptica. Otras drogas utilizadas para los experimentos fueron: bicuculina methiodide (10 μ M), antagonista receptores GABA_A; ácido DL-2-amino-5-fosfonopentanoico (APV, 50 μ M), antagonista receptores de glutamato NMDA; 6,7-dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (DNQX, 10 μ M), antagonista de receptores de glutamato tipo AMPA-kainato, y finalmente estricnina (10 μ M), antagonista de receptores glicinérgicos.

Para experimentos de mínima a máxima intensidad de estimulación, el electrodo de registro no contuvo QX-314, con el objetivo de que los potenciales de acción ocurran. Para la estimulación máxima, una relación estímulo respuesta fue obtenida, cuando una clara respuesta fue obtenida en el 50 % de los intentos se consideró como una unidad (X). Para la máxima estimulación, la intensidad de estimulación fue incrementada 5 veces la unidad de estimulación (5X). La máxima intensidad produjo el 100% de las respuestas sinápticas y generó potenciales de acción al menos en el 50% de los eventos. Para los experimentos de estimulación mínima, se determinó la relación

estímulo-respuesta con el objetivo de hallar un nivel al cual la tasa de fallas disminuyera sin incrementar la amplitud media de las respuestas. La estimulación mínima fue aquella en el que el nivel de fallas fue del 40 al 60 % (Gillespie et al., 2005). En esta intensidad de estimulación, de 50 a 100 estímulos fueron aplicados a una frecuencia de 0.5 Hz, antes y después de la administración de la primera droga (estricnina más APV/DNQX o bicuculina) y después de 50-100 pulsos fueron administrados en presencia de una segunda droga (bicuculina o APV/DNQX) para abatir por completo la respuesta restante.

Se analizaron las corrientes postsinápticas espontáneas (CPSe) en 15 neuronas del NSQ que respondieron a la estimulación del PVTa. Para cada célula se registraron al menos 500 eventos de las CPSe en cada una de las siguientes condiciones del baño: (1) solución de aCSF solamente, (2) solución de aCSF añadida de 1 μ M TTX y 200 μ M de CdCl₂ con el objetivo de bloquear los potenciales de acción y la liberación de neurotransmisor dependiente de Ca²⁺ y aislar la liberación de neurotransmisor relacionada con la liberación espontánea de vesículas sinápticas (miniaturas). (3) La solución 2 conteniendo además 10 μ M de bicuculina con el objeto de bloquear los receptores GABA_A y aislar el componente glutamatérgico de las CPSe. (4) Solución 2 suplementado con 10 μ M DNQX y 50 μ M APV para bloquear los receptores de glutamato AMPA-kainato y NMDA con el objetivo de aislar el componente GABAérgico de las CPSe.

El análisis de los potenciales sinápticos fue hecho en el programa Mini Análisis 6.0.3 (synaptosoft). Los parámetros estudiados fueron: la amplitud al pico del potencial sináptico y la latencia desde el artefacto del estímulo al inicio de la respuesta.

Se analizó la estimulación individual y simultánea del PVTa y el RHT sobre dos parámetros fundamentalmente de la excitabilidad de las neuronas del NSQ: la probabilidad de disparo y en la frecuencia de potenciales de acción de las neuronas del NSQ. Con el objeto de obtener un indicador de la probabilidad de disparo (**P**), se aplicaron 100 estímulos (**E**), de forma independiente o simultánea sobre el PVT y el RHT con una intensidad de corriente suficiente para inducir un PPS en el 60 % de los pulsos aplicados. El número de total de respuestas (**R**) (potenciales de acción inducidos por la estimulación de los núcleos) fue dividido en el número total de estímulos aplicados. Dicho de otro modo, se tomó como probabilidad de disparo al número de respuestas entre el número de estímulos ($P=R/E$). La estimulación simultánea es igual a la estimulación del RHT con un retraso de 5 ms a la estimulación del PVTa, puesto que el análisis de la latencia entre estos 2 núcleos indica que la latencia del PVTa es más larga que la del RHT, como se mostrará después.

El análisis de la estimulación del PVTa y el RHT sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NSQ se realizó de la siguiente manera: (1) Se registró una basal de dos minutos en ausencia de estimulación. (2) Se estimuló el PVTa de forma individual y se realizó un registro por 2 min. (3) Se estimuló el RHT individualmente y se registró por 2 minutos la tasa de disparo espontánea (TDE). (4) Se estimuló el PVTa y el RHT de forma simultánea (como se indica en la parte superior) y se registró la TDE por 2 min. (5) Se registró por 2 min la TDE sin estimulación de algún núcleo.

Se usó en la mayor parte de los casos la prueba de Wilcoxon para muestras pareadas. Cuando se analizaron más de dos muestras se utilizó la prueba Friedman para muestras relacionadas y la Kruskal Wallis para muestras no relacionadas. La prueba de Dunn fue utilizada como prueba post-hoc. El nivel de α fue de 0.05.

5.3. RT-PCR en tiempo real

El PVT (Paxinos y Watson, 1997) anterior fue disecado de una rebanada coronal de 300 μm de espesor bajo microscopía estereoscópica (Nikon SMZ645). Las rebanadas fueron preparadas como se describió anteriormente. Los bloques de tejido que contenían el PVT anterior fueron tratadas con enzimas digestivas: papaina y tripsina (10 mg/ml, cada enzima) y disociadas mecánicamente por una gentil manipulación a través de una pipeta Pasteur. Las neuronas fueron colocadas en un medio de cultivo hasta el momento de ser procesadas. Las neuronas fueron succionadas con una pipeta de registro bajo el control visual de un microscopio invertido Nikon TE2000; y colocadas en un tubo para PCR estéril. A cada célula se le añadió 10 μl de agua fría y fueron tratadas con dietilpirocarbonato con el objetivo de romper y eliminar el DNA residual. El total RNA fue expuesto a la digestión con DNAasa por incubación a 25° C durante 15 min, la reacción fue detenida por la incubación a 65°C por 15 min adicionales. La transcripción reversa de la primera síntesis del cDNA fue llevada a cabo usando el kit GeneAmp RNA PCR Kit. Los iniciadores (primers) seleccionados fueron: VGLUT2 (sentido TTCCTCATCGCTGCACTGG; antisentido TTCGCTTGTTTCCTCAGGGT); VGAT (sentido CGAGCTTTAAACACCTCCGGT; antisentido AGAACGACAGAAACGCAGACG); GFAP (sentido CGCCACCTACAGGAAATTGC; antisentido TGGTGTCCAGGCTGGTTTCT); y GADPH (sentido TCACCACCATGGAGAAGGC; antisentido CAGGAGGGAT TGCTGATGATC); Sinaptotagmina (sentido TCCAGAAAGTGCAAGTGGTGG; antisentido CCCAGTGCTGTTGTAACCAA). El PCR en tiempo real fue realizado y analizado mediante el kit ABI PRISM 7000. La HotStarTaq polimerasa fue activada a 95° C por 10 min, seguido por 50 ciclos a 95°C por 30 s, 60° C por 60 s. Todas los

experimentos fueron amplificados en duplicado y la media fue obtenida para cálculos posteriores.

5.4. Estudios de inmunohistoquímica

Ratas Wistar de 100 a 250 g fueron perfundidas transcárdialmente con 250 ml de solución salina, seguido de 250 ml de paraformaldeído al 4% en buffer de fosfato y salina (PBS; pH 7.2, 0.1 M). El cerebro fue removido y crio-prottegido mediante concentraciones sucesivas de sacarosa en PBS (10%, 20% y 30%). Rebanadas coronales de 40 μm de grosor fueron obtenidas con la ayuda de un criostato. Las rebanadas fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal contra VGLUT2 de ratón y un anticuerpo policlonal contra VGAT de conejo, 1:250 por 72 hrs a -4°C . Los anticuerpos fueron diluidos en PBS con triton X-100 al 0.01% y suero de cabra (PBSGT) como se describe en Aguilar-Roblero et al., (1994). Las rebanadas fueron lavadas 3 veces por 10 min con PBS e incubadas por 2 hrs a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios para anti-ratón conjugado con Alexa fluor 594 a una concentración 1:1000 y anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa 488 a la misma concentración en PBSGT.

Para las inyecciones de Fluoro-Gold se utilizaron ratas Wistar de 100 g que fueron mantenidas en ciclos 12:12 hasta el momento de la cirugía. Las inyecciones de PVTa fueron hechas como previamente se describieron (Salazar-Juarez et al., 2002). El Fluoro-Gold se disolvió en salina (0.9%) a una concentración de 4%. El volumen total inyectado fue 0.1 μm en 5 min. Los animales fueron mantenidos 48 hrs después de los procedimientos quirúrgicos para asegurar un adecuado etiquetamiento anterógrado.

Aunque nuestros anticuerpos están bien estandarizados, se realizaron los siguientes controles para asegurar que el pegado de los mismos fue específico bajo nuestras condiciones experimentales. Para ello, se incubaron las rebanadas con ambos

anticuerpos secundarios (anti-ratón [594] y anti-conejo [488]) en ausencia de los anticuerpos primarios para comprobar que no hubiera pegado inespecífico. No se encontró marca superior al ruido de fondo. Se incubó el anticuerpo secundario (anti-ratón [594]) con el anticuerpo primario contrario hecho en conejo (VGAT). En otro grupo, se incubó el anticuerpo secundario contra conejo (Alexa 488), con el anticuerpo primario hecho en ratón (VGLUT2), con el fin de comprobar que no había cruzamiento en el pegado. Al igual que el control anterior, no se encontró marca superior al ruido de fondo.

6. Resultados

6.1. La conexión entre el tálamo paraventricular anterior y el núcleo supraquiasmático es monosináptica

El primer objetivo fue saber si la respuesta postsináptica que resulta de la estimulación del PVTa es mono o poli sináptica. Si el potencial postsináptico que resulta de la estimulación eléctrica del tálamo paraventricular anterior es de naturaleza monosináptica, no existirán diferencias en las latencias en las respuestas entre bajas (5) y altas (20 Hz) frecuencias de estimulación en el tálamo paraventricular (Berry y Pentreath, 1976). Para ello se analizaron las latencias en las respuestas de 17 neuronas del NSQ estimuladas en el PVTa a una frecuencia de 5 y 20 Hz (con un potencial de mantenimiento de membrana de -70 mV) y no se encontraron diferencias significativas en ellas. La latencia que mostró el potencial postsináptico (PPS) en la neurona del NSQ cuando recibió estimulación a 5 Hz fue 9.99 ± 3.26 ms; mientras que cuando fue estimulada a 20 Hz fue 9.84 ± 3.18 ms ($P=0.75$; prueba de Wilcoxon) (Fig. 9). De acuerdo con Zhang et al., (2006) la habilidad de una sinapsis para seguir altas frecuencias de estimulación es indicativo de monosinápsis. Bajo este supuesto, se examinó la habilidad de las neuronas del NSQ para seguir una estimulación de 20 Hz en el PVT anterior. De 196 neuronas analizadas 102 (52 %) fueron capaces de seguir 20 Hz con una latencia de 9.5 ± 2.1 ms. Estos resultados indican que la sinapsis entre el PVT anterior y el NSQ es monosináptica.

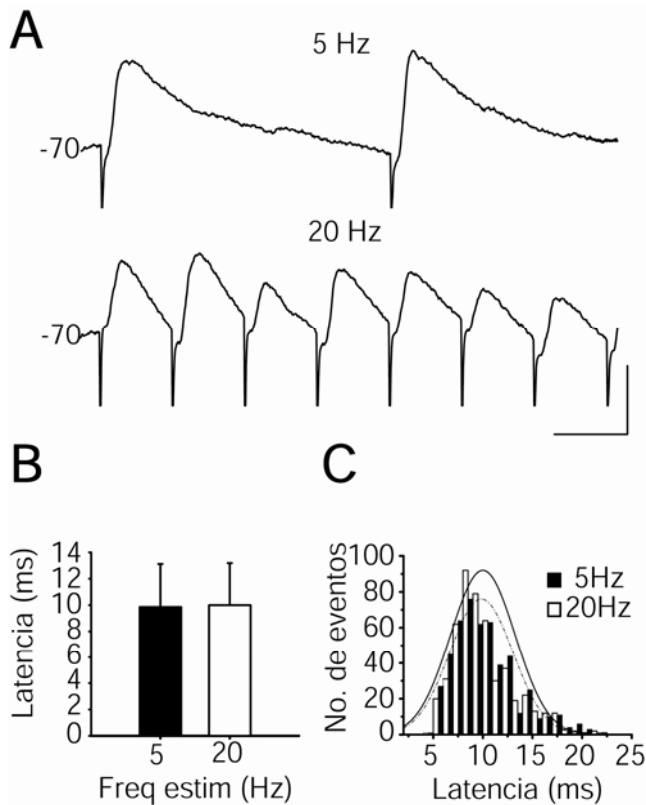


Figura 9. Respuestas en las neuronas del NSQ a la estimulación de PVTa. A) Potenciales postsinápticos que resultan de la estimulación de PVTa a bajas (5Hz) y altas (20 Hz) frecuencias de estimulación. B) Histograma de frecuencia mostrando la distribución de latencias a las diferentes frecuencias de estimulación. C) Distribuciones poblacionales de más de 500 eventos a 5 y 20 Hz de estimulación.

6.2. Caracterización del componente glutamatergico del tálamo paraventricular anterior a las neuronas del núcleo supraquiasmático

El siguiente objetivo fue conocer el tipo de neurotransmisor liberado en la sinápsis entre el PVTa y el NSQ; si la estimulación del PVTa produce un potencial postsináptico excitatorio (PPSE) que resulta de la liberación de glutamato, entonces la aplicación de bloqueadores selectivos para los receptores glutamatergicos ionotrópicos (en presencia de bicuculina, antagonista de los receptores GABA_A) provocará la abolición completa de la respuesta. Para ello, se procedió a aislar el componente glutamatergico en 40 neuronas del NSQ (34 durante la fase de luz y 6 durante la fase de oscuridad) registradas en presencia de QX-314 en la solución interna de la micropipeta, con el objetivo de eliminar los potenciales de acción espontáneos; además, se añadió bicuculina a la solución extracelular para restar el componente GABAérgico mediado por la activación de los receptores GABA_A. No se encontraron diferencias entre las

neuronas registradas durante la fase de luz y la de oscuridad. La administración de bicuculina incrementó la amplitud de los PPSE (Fig. 10A, B).

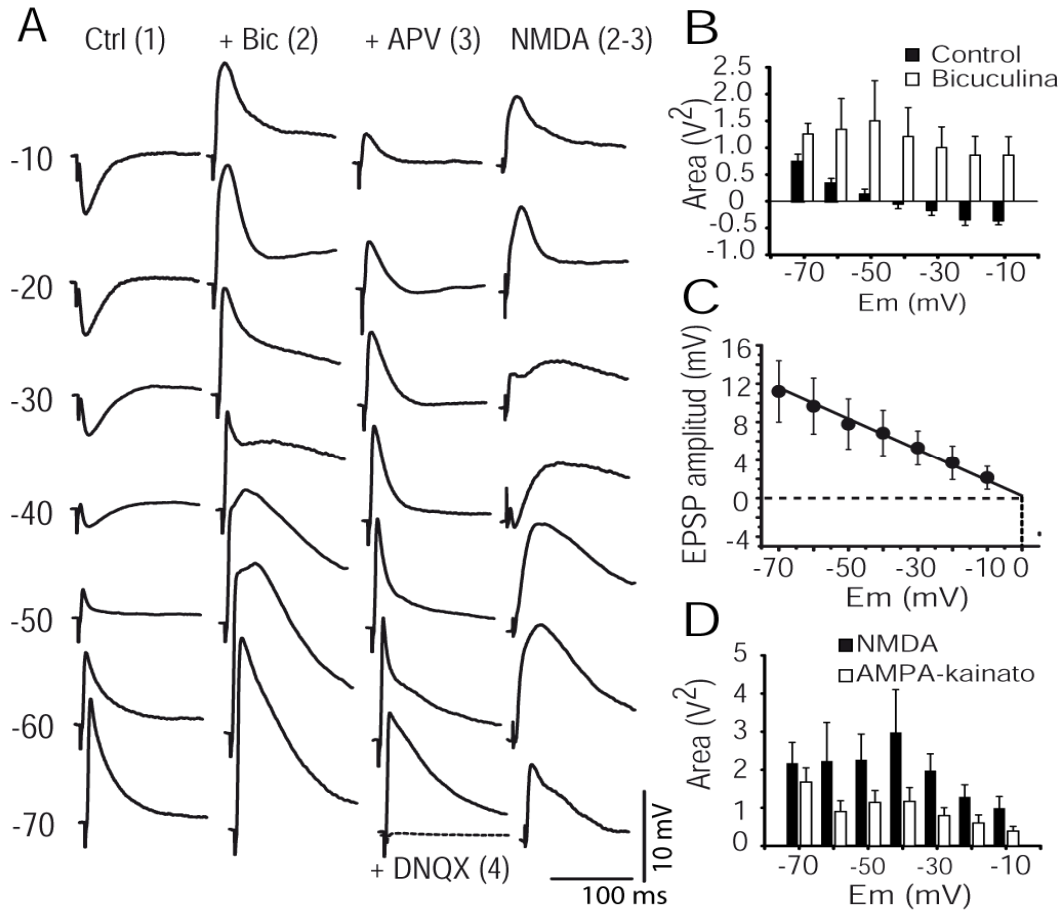


Figura 10. Caracterización del componente glutamatergico durante la estimulación de PVTa. A) PPS registrados en el NSQ por la estimulación del PVTa a diferentes potenciales de mantenimiento. Las condiciones experimentales durante el experimento son indicadas en la parte superior de cada columna. El componente atribuible a la activación de los receptores NMDA fue calculado por la resta algebraica de la columna 2 menos la columna 3. B) Poder del PPS (estimado por el área bajo la curva) antes y después de la aplicación de bicuculina. La aplicación de bicuculina incrementó la amplitud de los PPSE y eliminó los PPSI a diferentes potenciales de membrana. C) Potencial de inversión calculado para los PPS glutamatergicos (después de la aplicación de bicuculina) que resultaron durante la estimulación del PVTa. D) Contribución relativa de los componentes atribuibles a la activación de los receptores de AMPA-Kainato y NMDA en los potenciales glutamatergicos. Dichos componentes fueron estimados por el valor del área bajo la curva.

No se encontraron cambios en las latencias previas y posteriores a la aplicación de bicuculina (7.9 ± 0.58 ms antes, 7.9 ± 0.52 después, Wilcoxon $P=0.94$). En todas las neuronas disminuyó la amplitud del PPSE después de la aplicación de APV y este fue completamente abolido después de la aplicación de DNQX (Fig. 10A). El PPSE

glutamatérgico tuvo la capacidad para seguir una frecuencia de 20 Hz de estimulación. El potencial de inversión del componente glutamatérgico aislado fue cercano a 0 mV (Fig. 10C), el cual es acorde con el valor reportado para el potencial de inversión de los receptores glutamatérgicos (Hille, 2001). La contribución relativa de los receptores AMPA-kainato y NMDA a diferentes voltajes se muestra en la figura 10D. Los datos sugieren que el glutamato es uno de los neurotransmisores liberados en la sinapsis entre el PVTa y el NSQ.

6.3. Aislamiento del componente GABAérgico del tálamo paraventricular anterior a las neuronas del núcleo supraquiasmático

Puesto que el postpotencial (PPS) que resultó de la estimulación del PVTa mostró una gran participación de los receptores GABA_A (Fig. 11), la siguiente pregunta se enfocó en saber si el neurotransmisor GABA es liberado en las sinapsis del NSQ por axones provenientes de PVTa o por grupos neuronales intermedios entre el primero y el NSQ.

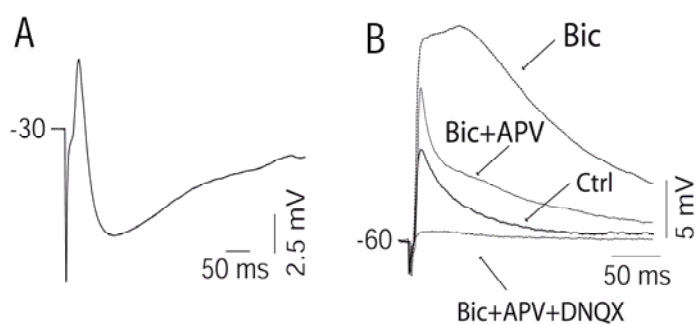


Figura 11. Los potenciales postsinápticos en el NSQ producidos por la estimulación del PVTa tienen un componente GABAérgico y uno glutamatérgico. A) Respuesta monosináptica bifásica registrada en condiciones control a un potencial de membrana de -30 mV; se pueden apreciar claros componentes inhibitorios y excitatorios. B) La aplicación de bicuculina incrementó la amplitud del PPSE a un potencial de membrana de -60 mV, lo cual indica una entrada inhibitoria mediada por GABA en esta neurona. La amplitud del PPSE fue disminuida por el bloqueo de los receptores NMDA (APV) y completamente abolida por el bloqueo de los AMPA-Kainato (DNQX).

¿Liberan las eferencias del PVTa al NSQ GABA o este es liberado por alguna interneurona? Si la estimulación del PVTa produce solamente liberación de glutamato y no de GABA, la aplicación de un cóctel de bloqueadores selectivos para receptores

ionotrópicos de glutamato pero no de GABA_A inducirá la completa abolición de la respuesta. Con el objetivo de aislar el componente GABAérgico 21 neuronas del NSQ (13 durante la fase de luz y 8 durante la fase de oscuridad) fueron registradas en presencia de QX-314. APV y DNQX fueron añadidos a la solución extracelular después del registro basal. No se encontraron diferencias entre las respuestas registradas durante el día y la noche. El bloqueo de los receptores glutamatérgicos aisló un claro componente de naturaleza GABAérgica, el cual fue completamente abolido por la aplicación de bicuculina (Fig. 12A, B). Los PPS aislados mostraron la misma latencia tanto antes como después de la administración de los bloqueadores glutamatérgicos (9.08 ± 1.2 ms antes, 9.16 ± 1.05 después, prueba de Wilcoxon, $P=0.81$). El potencial de inversión del componente GABAérgico fue -46.6 ± 5.4 mV (Fig 12C, D). El componente GABAérgico aislado mostró la habilidad para seguir una frecuencia de 20 Hz de estimulación. La persistencia del postpotencial postsináptico inhibitorio (PPSI) después del bloqueo de los receptores glutamatérgicos sugiere que el GABA es liberado directamente por la estimulación ejercida sobre el PVTa y no es liberado por un grupo de interneuronas entre este y el NSQ.

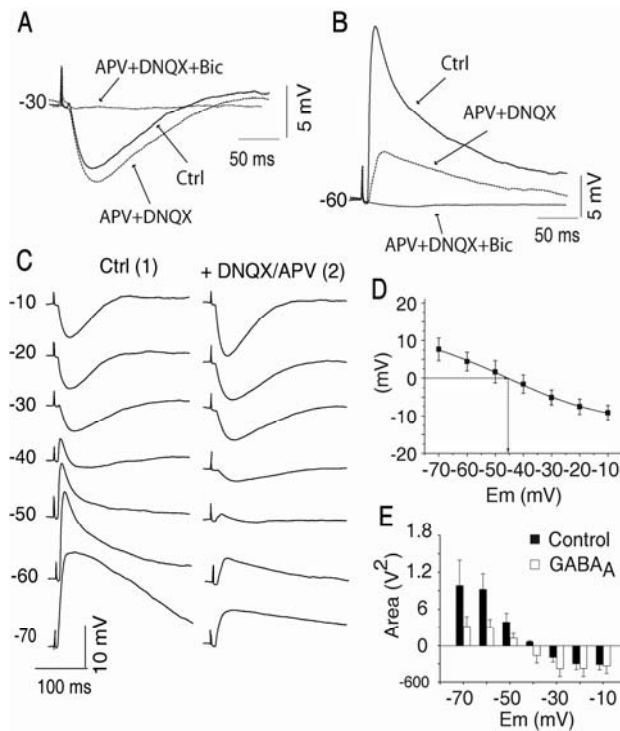


Figura 12. Caracterización del componente GABAérgico de la respuesta monosináptica en el NSQ por la estimulación del PVTa. A) El bloqueo de los receptores NMDA y AMPA-Kainato de glutamato (APV/DNQX), incrementó la amplitud de los PPSI a un potencial de membrana de -30 mV, B) pero disminuyó los PPSE cuando fue registrado a -60 mV. En ambos casos, el PPS mostró la misma latencia que en condiciones control y fue completamente abolido por la subsiguiente aplicación de bicuculina. C) Efecto del bloqueo de los receptores glutamatérgicos de NMDA y AMPA-Kainato a diferentes potenciales de membrana, las condiciones del registro son indicadas en la parte superior de la columna. D) El potencial de inversión del componente GABAérgico aislado es cercado a -45 mV. E) contribución relativa del componente GABAérgico al PPS en diferentes potenciales de membrana (calculado por el área bajo la curva).

6.4. Diferentes intensidades de estimulación en el tálamo paraventricular anterior producen potenciales postsinápticos con la misma latencia en las neuronas del núcleo supraquiasmático

Con el objetivo de descartar la activación de diferentes fibras descendentes al NSQ que pudieran activarse por la estimulación del PVTa se realizó el análisis de la latencia a diferentes intensidades de estimulación (Uchigashima et al., 2007). ¿La estimulación sobre el PVTa activa fibras descendentes al NSQ que podrían estar liberando GABA? Si la estimulación sobre el PVTa esta activando fibras descendentes al NSQ, entonces habrá diferencias en las latencias de los PPS con la estimulación máxima y la estimulación mínima. Se analizaron las latencias en 10 neuronas a diferentes intensidades de estimulación (desde mínima hasta máxima) en el PVTa; no se encontraron diferencias entre los mínimos y los máximos valores de estimulación (12.83 ± 0.44 ms; 12.33 ± 0.16 ms, respectivamente, prueba de Wilcoxon, $P= 0.5$; Fig.

13A). Similar a estos resultados, el componente GABAérgico aislado por la aplicación de APV/DNQX no mostró cambios en la latencia entre mínima y máxima estimulación (12.5 ± 1.0 ; 12.75 ± 0.75 respectivamente, prueba de Wilcoxon, $P=1$; Fig. 13A, B).

Estos resultados indican que el componente GABAérgico es activado desde el PVTa y no desde otras fibras que descienden al NSQ.

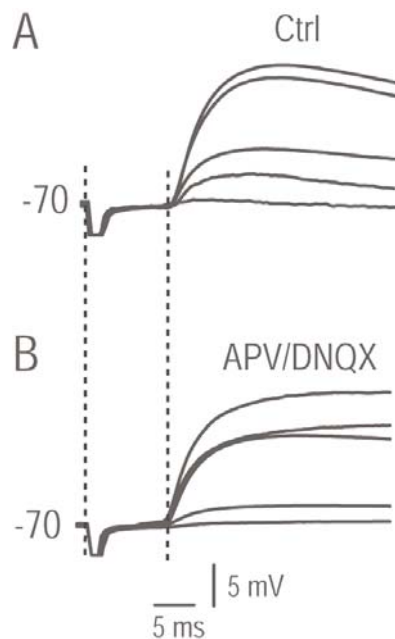


Figura13. La latencia del PPS GABAérgico producto de la estimulación del PVTa permanece igual durante diferentes intensidades de estimulación. A) PPS registrados en el NSQ durante diferentes intensidades de estimulación en el PVTa (desde la mínima hasta la máxima) en situación control. B) Disección del PPS GABAérgico resultado de la aplicación de APV/DNQX.

6.5. La estimulación mínima en el tálamo paraventricular anterior produce potenciales postsinápticos combinados en las neuronas del núcleo supraquiasmático

El siguiente objetivo se orientó a saber si el GABA y el glutamato eran liberados simultáneamente por la misma neurona del PVTa que proyecta sus axones a las neuronas del NSQ. ¿La liberación de GABA y glutamato es el resultado de la activación de diferentes grupos neuronales en el PVTa que se activan simultáneamente por la corriente inyectada en este núcleo bajo las condiciones usadas en el experimento? Si los componentes de PPS son el resultado de diferentes grupos neuronales que se activan por

la corriente inyectada en el PVTa, entonces una estimulación mínima en este núcleo eliminaría el componente GABAérgico o glutamatérgico de la respuesta postsináptica. El protocolo de estimulación mínima utilizado es acorde al reportado por Gillespie et al., (2005). En este grupo de experimentos se administró estriquina (bloqueador de receptores glicinérgicos) con el objetivo de descartar la posible liberación de glicina desde las terminales provenientes del PVTa. Se disecó el componente glutamatérgico por la aplicación de bicuculina y estriquina, los cuales disminuyeron la amplitud del PPSE en 7 de 8 neuronas (control 4.3 ± 0.78 ; después del cóctel 3.3 ± 0.74 mV; prueba de Wilcoxon, $P=0.01$). No se encontraron diferencias en las latencias (10.1 ± 0.7 ms antes; 10.1 ± 0.6 ms después de la aplicación de bicuculina/estriquina. Prueba de Wilcoxon, $P=1$). El PPS residual fue completamente abolido por la administración de DNQX/APV (Fig. 14A, B). En la neurona restante, la presencia de bicuculina y estriquina disminuyó la amplitud del PPS pero alargó la latencia. En 8 neuronas adicionales se aisló el componente GABAérgico con APV/DNQX y estriquina (Fig. 14C, D, E), los cuales redujeron la amplitud del PPS en 7 neuronas de 3.7 ± 0.75 a 2.2 ± 0.29 mV, prueba de Wilcoxon $P=0.01$; sin afectar las latencias (control 13.9 ± 0.6 , después del cóctel 14.2 ± 0.7 , prueba de Wilcoxon $P= 0.25$). El PPS residual fue completamente eliminado después de la aplicación de bicuculina (Fig. 14E). Estos resultados *sugieren* que GABA y glutamato son liberados simultáneamente por la misma neurona del PVTa en el NSQ.

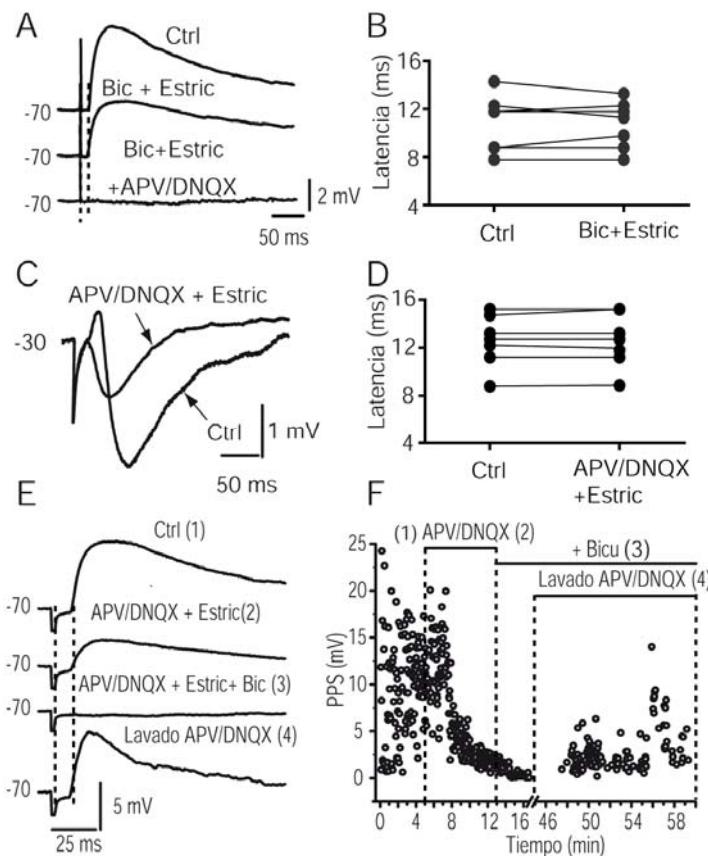


Figura 14. La estimulación mínima del PVTa revela simultánea liberación de GABA y glutamato de terminales sinápticas en el NSQ. A) La administración de bicuculina y estricnina reduce la amplitud de los PPSE. La aplicación adicional de antagonistas de los receptores glutamatérgicos abolió la respuesta restante. B) Latencias de los PPS que resultaron de la estimulación del PVTa antes y después de la aplicación de bicuculina y estricnina. C) Respuesta bifásica en una neurona del NSQ inducida por la estimulación mínima de PVTa en un potencial de mantenimiento de -30 mV, los antagonistas de receptores glutamatérgicos y glicinérgicos abolieron el PPSE e incrementaron el PPSI. D) Latencias de los PPS durante el control y después de la disección del componente GABAérgico (posterior a la administración de APV/DNQV y estricnina). E) La aplicación de APV/DNQX disminuyó la amplitud de los PPSE (2), mientras que fue completamente abolida por la aplicación de bicuculina y estricnina (3). El lavado de los antagonistas glutamatérgicos (4) reveló un componente glutamatérgico. H) Curso temporal del experimento mostrado en panel G.

6.6. El análisis de las corrientes miniaturas en el núcleo supraquiasmático apoya la hipótesis de co-liberación de GABA y glutamato

Debido a que la estimulación mínima es un protocolo que intenta estimular unas cuantas fibras pero no asegura que la neurona postsináptica esta recibiendo inervación de una sola neurona presináptica nos enfocamos a confirmar mediante el estudio de las corrientes miniatura si el GABA y el glutamato podrían ser co-liberados sobre las neuronas del NSQ. Se analizaron 15 neuronas que recibían aferencias monosinápticas del PVTa. Se analizaron al menos 500 corrientes postsinápticas espontáneas (CPSe) en cada condición. TTX ($1\mu\text{M}$) y CdCl_2 ($200\mu\text{M}$) fueron administradas al baño después de 5 min de registro basal, con el objetivo de reducir la probabilidad de neurotransmisión y bloquear la liberación de neurotransmisor dependiente de Ca^{2+} y Na^+ (inducción de corrientes miniatura, acorde con Jonas et al., 1997). En comparación con los registros basales, la administración de TTX y CdCl_2 no afectó significativamente la amplitud de

los CPSe (21.75 ± 3.2 y 20.51 ± 4.6 pA, respectivamente; prueba de Wilcoxon, n.s.). En contraste, TTX/CdCl₂ disminuyeron la frecuencia de las CPSe de 10.95 ± 3.6 a 5.49 ± 2.6 Hz (basal, TTX/CdCl₂, respectivamente; prueba Wilcoxon, P=0.0156). Estos resultados (reducción de la frecuencia pero no de la amplitud) sugieren que TTX y CdCl₂ tuvieron efectos presinápticos, pero no postsinápticos (Jiang et al., 1997; Itri y Colwell, 2003), como se esperaba. Con el objetivo de aislar las CPSe miniatura, en 9 de las neuronas, se añadió bicuculina en presencia de TTX/CdCl₂. La bicuculina disminuyó la amplitud de las CPSe, en comparación con TTX/CdCl₂ (22.6 ± 4.8 a 10.9 ± 1.1 , TTX/CdCl₂ y bicuculina, respectivamente; prueba de Friedman, P=0.0055, post hoc de Dunn P<0.01, Fig. 15A(2)). Posterior a esto, la perfusión contenía TTX y CdCl₂ pero no bicuculina, con el objeto de desbloquear los receptores GABA_A. DNQX/APV fueron incluidos en la perfusión después de pasados 10 min, para aislar las CPSe miniatura de naturaleza GABAérgica. La aplicación de DNQX/APV disminuyó la amplitud de las corrientes en comparación de TTX/CdCl₂ solamente, (22.6 ± 4.8 a 12.75 ± 0.9 pA, TTX/CdCl₂ y DNQX/APV, respectivamente; prueba de Friedman P=0.0055, post hoc de Dunn P<0.05, Fig. 15A(3)). Con el objetivo de tener un diseño contrabalanceado, las 6 neuronas restantes recibieron la aplicación de APV/DNQX inmediatamente después de TTX/CdCl₂, para descartar un efecto persistente de la bicuculina debido a un lavado incompleto (Fig. 15B). En estas neuronas, la amplitud fue reducida en comparación con TTX/CdCl₂, de 24.2 ± 4.1 a 10.8 ± 1.3 pA (prueba de Wilcoxon, P=0.03). Los análisis del 10 al 90 % del tiempo de subida de las CPSe en todas las neuronas registradas con este protocolo indicaron que las CPSe de naturaleza GABAérgica fueron más lentas en comparación con las glutamatérgicas (1.7 ± 0.21 y 1.0 ± 0.15 ms, respectivamente; prueba de Friedman P=0.04, post hoc de Dunn P<0.05, Fig. 15C). En contraste, no se encontraron diferencias de los grupos en comparación con TTX/CdCl₂ solamente ($1.3 \pm$

0.08 ms, post hoc de Dunn $P=0.04$). El análisis de los tiempos de caída (hasta el 37%), mostró que los CPSe de origen glutamatérgico fueron más rápidos que los GABAérgicos (2.9 ± 0.3 y 10.55 ± 0.7 ms, respectivamente; prueba de Friedman, $P=0.0003$, post hoc de Dunn, $P<0.05$, Fig. 15D). De forma similar, el tiempo de caída de las CPSe glutamatérgicas fueron más rápidas que aquellas encontradas en TTX/CdCl₂ solamente (8.1 ± 1.1 ms; post hoc de Dunn $P<0.05$); pero no se encontraron diferencias entre TTX/CdCl₂ y el tiempo de caída de las CPSe GABAérgicas (post hoc de Dunn). Los datos presentes son acordes con reportes previos que indican que los eventos glutamatergicos son más rápidos en tiempo de subida y de bajada que los GABAérgicos (Jiang et al., 1997). Por último, se analizó en cada neurona la distribución de los componentes GABAérgicos, glutamatérgicos y combinados en presencia de TTX/CdCl₂, utilizando su constante de caída para identificar al neurotransmisor involucrado. Las CPSe miniatura de origen GABAérgico fue 122.4 ± 19.8 ms (56.6%), las de origen glutamatérgico fueron 39.8 ± 17.4 ms (18.2%); mientras que aquellos eventos que fueron una combinación de ambas constantes de decaimiento (GABAérgicos y glutamatérgicos) fueron 60 ± 16.18 ms (25.2%). Estos resultados apoyan la hipótesis de que GABA y glutamato son co-liberados de las mismas terminales sinápticas (PVTa) en las neuronas del NSQ.

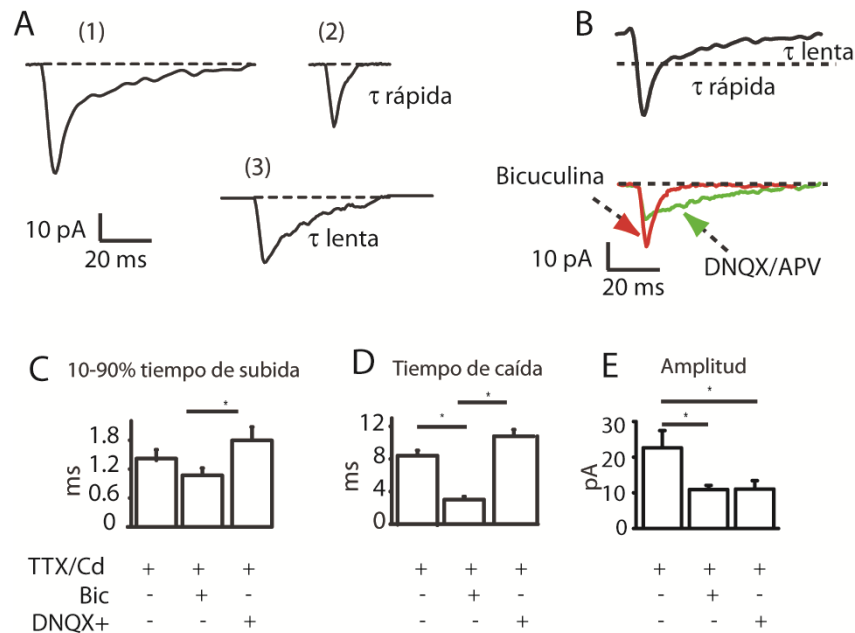


Figura 15. Corrientes postsinápticas miniatura muestran cinéticas de decaimiento combinadas de GABA y glutamato. A) Curso temporal de CPSe en presencia de (1) TTX y CdCl₂, (2) TTX/CdCl₂ y bicuculina (3) TTX/CdCl₂ + DNQX/APV. B) (Arriba) trazos combinados típicos encontrados en TTX/CdCl₂, los cuales tienen dos constantes de decaimiento (τ rápida y lenta; (abajo) dos trazos representativos superpuestos correspondientes a GABA (DNQX/APV) y glutamato (bicuculina). C, D) Los eventos glutamatérgicos son más rápidos que los GABAérgicos (DNQX/APV) en el 10-90 % en el tiempo de subida y en la constante de decaimiento, respectivamente. E) Amplitud de las CPSe aisladas de naturaleza glutamatérgica y GABAérgica.

6.7. Co-localización de los RNAm para los transportadores vesiculares de GABA y glutamato en las neuronas del tálamo paraventricular anterior

Puesto que el glutamato y el GABA están relacionados con el metabolismo neuronal, los transportadores vesiculares son los indicadores más confiables de que una neurona libere un determinado neurotransmisor (Seal and Edwards, 2006; Fei et al., 2008). Bajo esta premisa, nos enfocamos a indagar si una neurona del PVTa podría poseer ambos transportadores vesiculares para GABA y glutamato. Si una neurona del PVTa colibera GABA y glutamato entonces poseerá los RNA mensajeros para los transportadores vesiculares de dichos neurotransmisores. Con este objeto, se utilizó RT-PCR en tiempo real en célula única, para saber si las neuronas de PVTa tenían los

transportadores vesiculares para GABA (VGAT) y glutamato (VGLUT2). Se utilizó sinaptotagmina para discriminar entre neuronas y células gliales y GADPh que es un gen constitucional como control del procedimiento. De 18 células disociadas del PVT anterior (Fig. 16A, B), todas expresaron el GADPh pero solamente 13 expresaron sinaptotagmina y fueron consideradas como neuronas. De estas 13 neuronas, 3 (23.0 %) expresaron VGAT solamente, mientras 2 (15.4 %) expresaron el VGLUT2; 4 expresaron VGLUT2 y VGAT (30.8 %, Fig. 16E, F). Las 4 neuronas restantes (30.8%) expresaron VGLUT2 y solamente trazas de VGAT con una CT>40 ciclos. Las 5 células que no expresaron sinaptotagmina fueron consideradas como un tipo de célula glial. Estos resultados indican que dentro del PVTa hay un grupo sustancial de neuronas que contienen ambos tipos de transportadores para GABA y glutamato y por tanto podrían co-liberar ambos neurotransmisores.

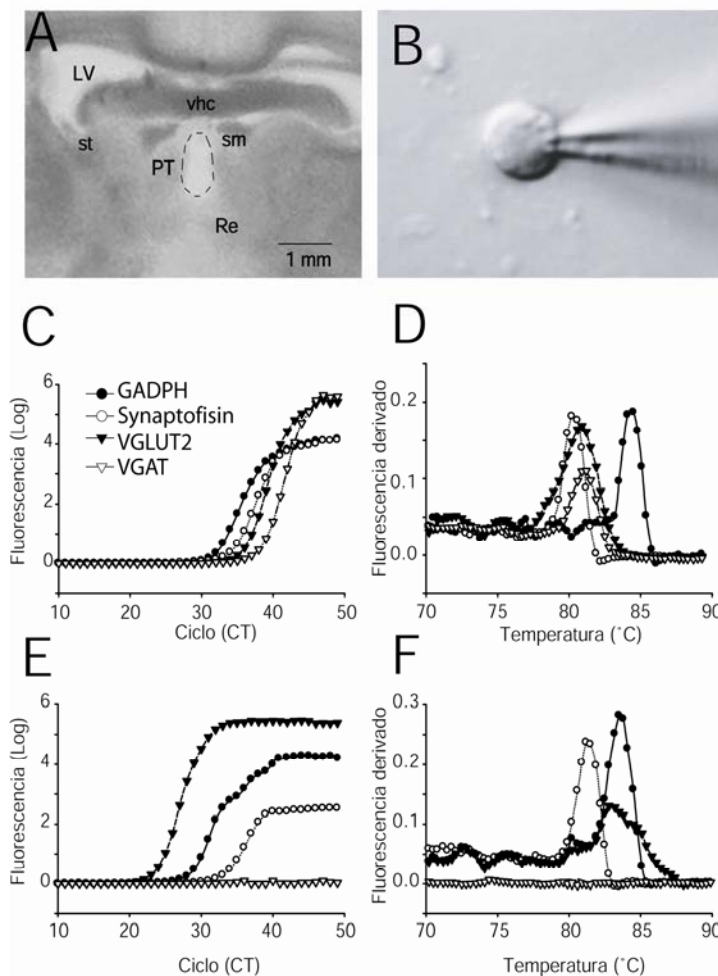


Figura 16. Experimento de RT-PCR en tiempo real de célula única del PVTA. A) microdissección de PVTA (parte faltante) de una rebanada coronal de cerebro de rata. Abreviaturas: LV, ventrículo lateral; st, stria terminalis; PT, nucleus paratenialis; Re, nucleus reuniens; sm, stria medulares; vhc, ventral hippocampal commissure. B) Extracción de una célula de PVTA con una pipeta de vidrio para ser usada en un experimento de RT-PCR. C) Tiempo de amplificación (CT) para detección de fluorescencia de diferentes RNAm, de una célula del PVTA, que expresa GADPh, sinaptotagmina, transportador vesicular de GABA (VGAT), y VGLUT2, el patrón de co-localización atribuido a esta célula es encontrado en el 30.8% de las células analizadas. D) Curvas de disociación para la misma célula que en el panel C. E) Gráfica de una neurona de PVTA que no expresa VGAT pero si GADPh, sinaptotagmina y VGLU2. Este patrón de expresión de RNAm es encontrado en el 15.4% de las veces. F) Curvas de disociación para la misma neurona que en panel E.

6.8. Co-localización de las proteínas a los transportadores vesiculares de GABA y glutamato en terminales marcadas del tálamo paraventricular anterior

Puesto que existe la posibilidad de que los RNA mensajeros no sean traducidos (Lewin, 2002) nos enfocamos a determinar si las proteínas de los transportadores vesiculares de GABA (VGAT) y glutamato (VGLUT2) colocalizan en las mismas terminales del NSQ. Si las terminales de la misma neurona co-libera GABA y glutamato sobre las neuronas del núcleo supraquiasmático, entonces deberá existir co-localización de las proteínas transportadoras vesiculares para dichos neurotransmisores. Cuatro NSQ de diferentes animales fueron analizados por medio de inmuno-

fluorecencia. Las secciones fueron incubadas con anticuerpos contra VGAT y VGLUT2. El número terminales inmunoreactivas (en $100 \mu\text{m}^2$ de NSQ) para VGAT fueron 58.04 ± 2.99 , para VGLUT2 51.10 ± 3.21 ; el número de terminales en donde co-localizaron ambos tipos de proteínas fueron 8.85 ± 1.06 (Fig. 17A, B). El análisis de correlación de Pearson entre los canales rojo y verde correspondiente a las inmunoreactividad de las proteínas VGLUT2 y VGAT respectivamente, fue de 0.34 ± 0.02 ($n=4$).

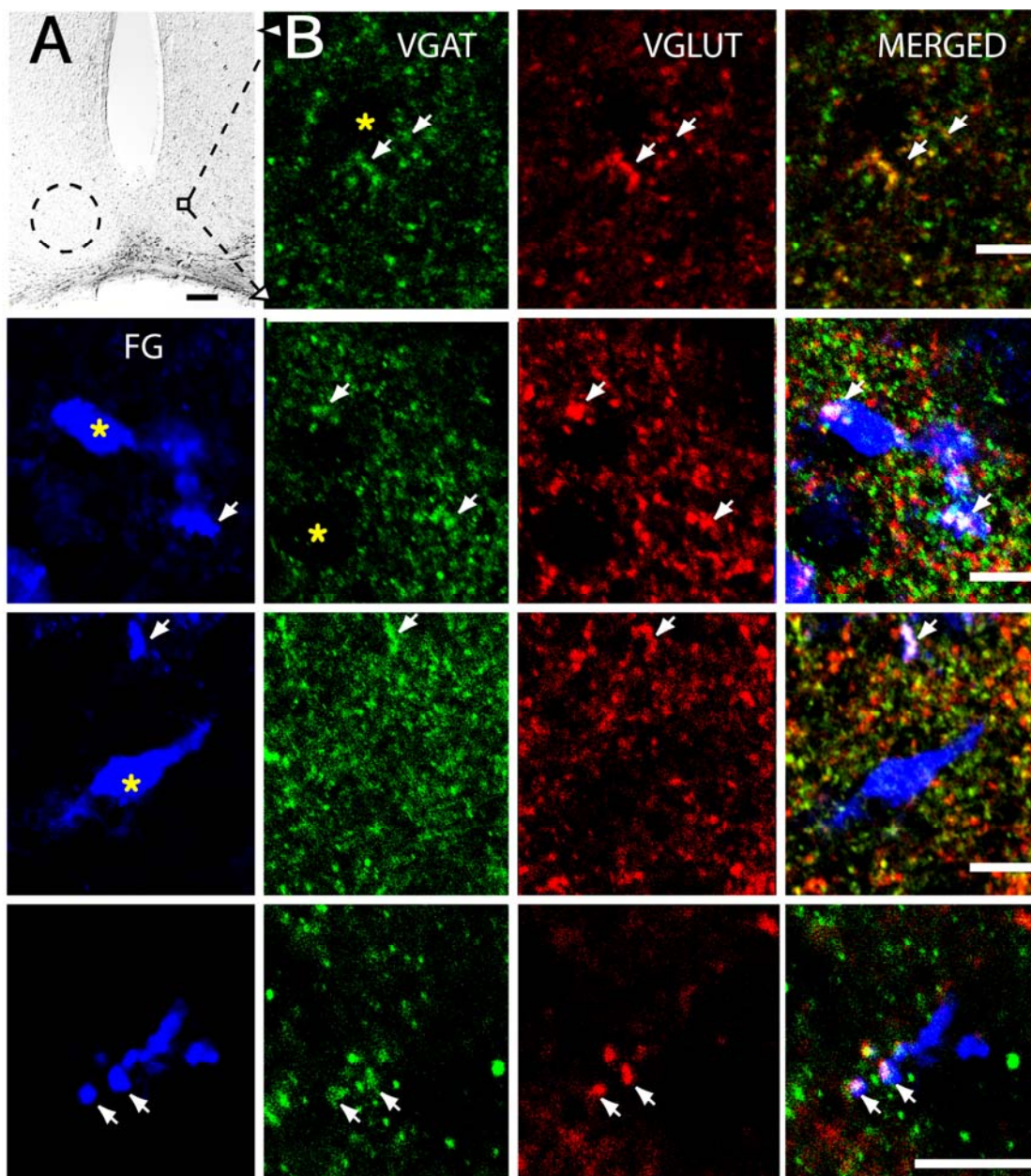


Figura 17. Co-localización de la inmunoreactividad para los VGAT y VGLUT2 en terminales sinápticas provenientes del PVTa, localizadas en el NSQ. A) Imagen de contraste de fases diferencial del hipotálamo anterior el cual muestra la localización del NSQ (circulo punteado), el cuadrado indica el área engrandecida en el panel B. Escala 100 μ M. B) Doble marca para VGAT (verde) y VGLUT2 (rojo), las imágenes mezcladas se muestran en el panel derecho. Las flechas indican las terminales con co-localización de ambas proteínas en amarillo. C –E) Micrografías de tres secciones de diferentes animales mostrando terminales inmunoreactivas de VGAT, VGLUT y Fluoro-Gold, esta última marca fue inyectada por medio de técnicas estereotáxicas en PVTa. Las flechas indican la triple marca en blanco. Los asteriscos indican la presencia de un cuerpo celular. Escala 5 μ M (paneles B-E).

Para asegurarnos que la co-localización de las proteínas de los transportadores vesiculares de GABA y glutamato provenía de las neuronas del PVTa y no de otro núcleo se realizó un marcaje anterógrado desde las neuronas de dicho núcleo. Si la co-localización de VGAT y VGLUT se encuentra en terminales de neuronas pertenecientes al PVTa, entonces al marcar dicho núcleo se deberá encontrar la co-localización de ambas proteínas junto con el marcaje anterógrado. Con este fin, se inyectó fluoro-gold en el PVTa por medio de técnicas estereotáxicas (Fig. 17) y se trataron las rebanadas con anticuerpos para VGAT y VGLUT2 como se mencionó anteriormente. La cuantificación de terminales inmunoreactivas en 100 μ m² para VGAT fueron 66.98 ± 2.76 ; VGLUT 59.65 ± 3.72 ; fluoro-gold 3.3 ± 1.36 ; terminales etiquetadas de PVT anterior que mostraron co-localización de VGAT y VGLUT2 fueron 1.4 ± 0.35 . (Fig. 17C-E). Hubieron algunas terminales que tuvieron co-localización de VGAT y VGLUT2 y no mostraron marcaje de Fluoro-Gold (0.53 ± 0.11). Estos resultados indican que la co-localización de las proteínas de los transportadores vesiculares para GABA y glutamato proviene de neuronas que tienen sus cuerpos neuronales en el PVTa.

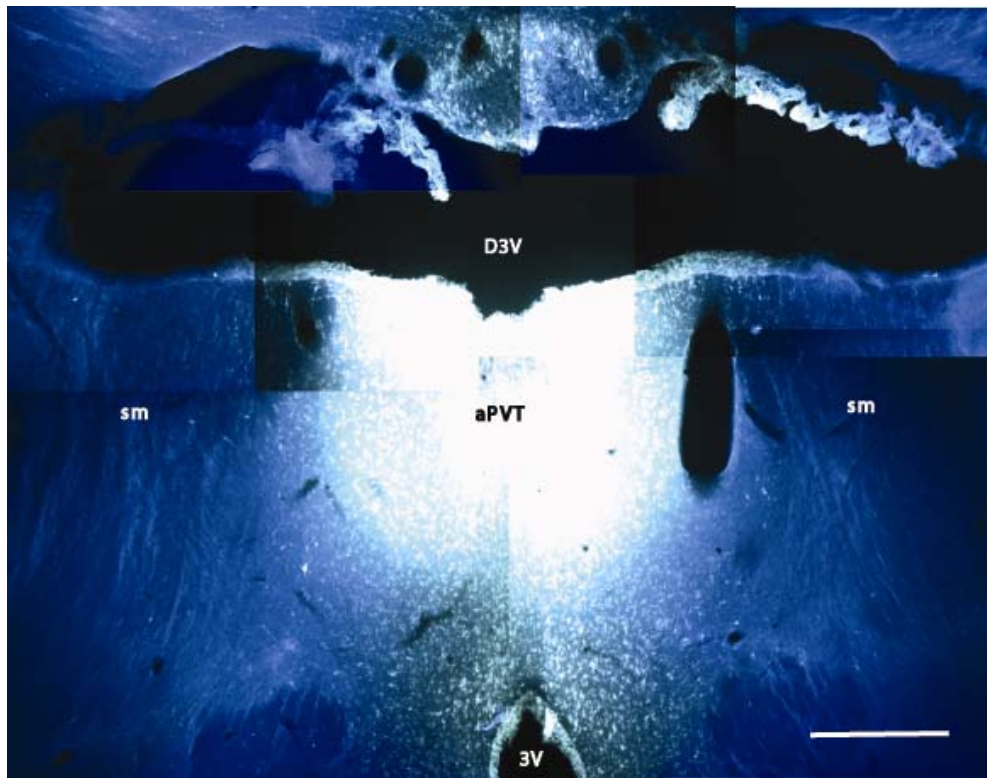


Figura 18. Inyección de fluoro-gold en el PVTa. Reconstrucción de la inyección de fluoro-gold por técnicas estereotáxicas. Abreviaturas: sm, stria medullaris, PVTa, tálamo paraventricular anterior, D3V tercer ventrículo dorsal, 3V tercer ventrículo. Escala, 500 μ m.

6.9. Efecto de la estimulación del tálamo paraventricular anterior sobre la excitabilidad de las neuronas del núcleo supraquiasmático y su integración con las entradas provenientes del tracto retino hipotalámico

El grupo de experimentos descritos hasta este momento fueron enfocados a los 2 primeros objetivos: 1) comprobar si la sinapsis entre el PVTa y el NSQ es monosináptica 2) explorar la naturaleza de los neurotransmisores involucrados en esta sinapsis. A continuación nos abocaremos al tercer objetivo que es analizar la interacción excitante entre las entradas provenientes del PVTa en términos de la modulación de la excitabilidad neuronal en el NSQ y como interactúan estas con su principal aferencia sincronizadora, el RHT. Con este objetivo, se realizaron una serie de experimentos en la configuración de célula entera tendientes a explorar dos aspectos principales: la probabilidad de disparo de las neuronas del NSQ y el efecto de la estimulación del

PVTa y el RHT de forma independiente y simultánea sobre la frecuencia de disparo espontánea de las neuronas del NSQ. Si el PVTa modifica la excitabilidad de las neuronas del NSQ, entonces la estimulación del primero tendrá un efecto sobre la probabilidad y la frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo supraquiasmático. Para comprobar esta hipótesis, se exploraron 138 neuronas del NSQ; 47 en célula unida y 91 en la configuración de célula entera. Se clasificó la tasa de disparo espontáneo (TDE) de las neuronas registradas en base al tipo de distribución de la frecuencia en el intervalo interespiga (Kononenko y Dudek, 2004). De las 138 neuronas registradas, 49 (36%) mostraron un disparo rítmico, 67 fueron (49%) arrítmicas; 17 (12%) tuvieron una tasa de disparo muy bajo (<0.05 Hz) y 5 (3%) dispararon en ráfagas (Fig. 19).

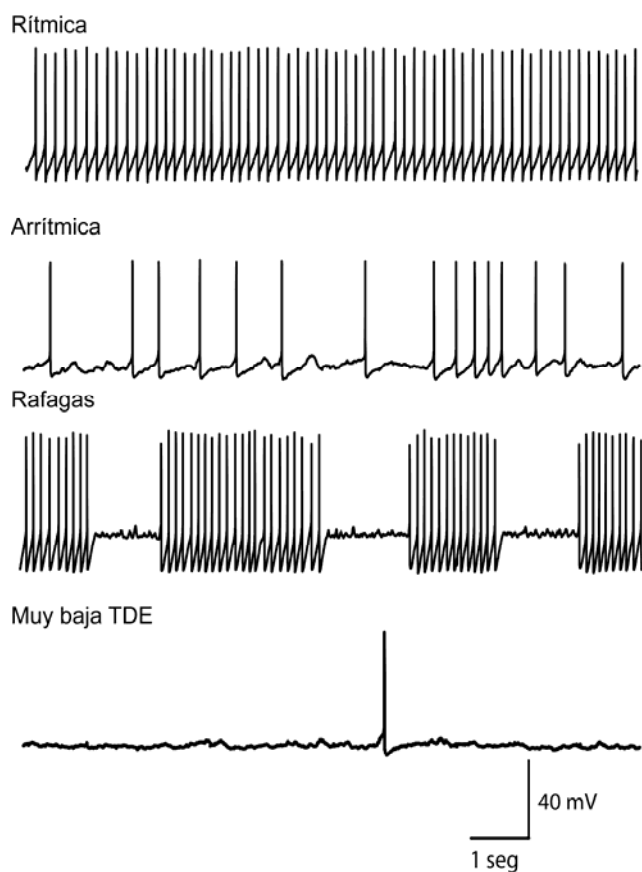


Figura 19. Tipos de patrón de disparo encontrados en las neuronas del NSQ. Dichos patrones corresponden a cuatro tipos diferentes: rítmico, arrítmico, en ráfagas, y con muy baja tasa de disparo espontánea (TDE).

Los patrones de disparo encontrados son acordes a los reportados en el NSQ por Kononenko et al., (2008). Los registros en célula unida y célula entera mostraron una

distribución similar en la TDE (Tabla 1), indicando que las condiciones metodológicas de célula entera conservan el patrón de disparo de las neuronas del NSQ. Las 5 neuronas con disparo en ráfagas se incluyeron en el grupo de las arrítmicas para posteriores análisis.

Tabla 1. Distribución de tipos de patrón de disparo encontrados en las neuronas del NSQ, en relación a la metodología utilizada en su registro.

Tipo de disparo	Célula unida		Tipo de disparo	Célula entera	
	Número de células	%		Número de células	%
Rítmicas	13	28	Rítmicas	36	38
Arrítmicas	31	66	Arrítmicas	36	42
Muy baja TDE	3	6	Muy baja TDE	14	15
			Ráfagas	5	5
Total	47	100		100	100

6.9.1. Respuesta de las neuronas del núcleo supraquiasmático a la estimulación del tálamo paraventricular anterior y el tracto retinohipotalámico

De un total de 138 neuronas, 85 (61%) responden a ambas aferentes, 20 (14%) solamente a RHT, 15 (11%) a PVTa y 13 (10%) no responden a ninguna de las aferencias (Fig. 20). No hubo alguna preferencia entre el patrón de disparo de las neuronas del NSQ y el hecho de que respondieran a algunas de las aferencias.

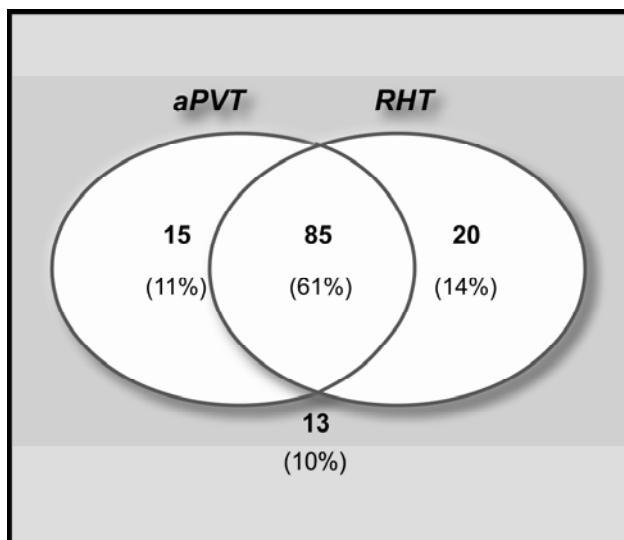


Figura 20. Distribución de respuesta de las neuronas del NSQ a la estimulación del PVTa y el RHT. La intersección de los 2 grupos indica el número y porcentaje de neuronas que respondieron a la estimulación de ambos núcleos. Los números fuera de la intersección corresponden a las neuronas que responden solamente al núcleo indicado arriba en negrillas. El número fuera de las elipses indica la cantidad de células del NSQ que no responden a algún núcleo explorado.

La latencia a la presentación del PPS tras la estimulación del RHT fue de 5.67 ± 0.29 ms mientras que tras la estimulación en PVTa fue de 10.8 ± 0.38 ms (Prueba T no pareada, $t=10.39$, $P<0.001$, $n= 84$, Fig. 21).

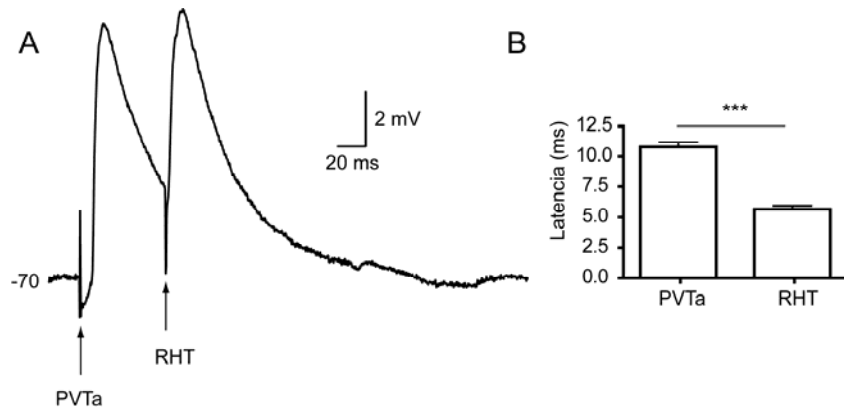


Figura 21. La estimulación de PVTa y RHT produce diferentes latencias sinápticas. A) La misma neurona del NSQ recibe PPS con diferentes latencias de la estimulación de PVTa y RHT. B) La estimulación de PVTa induce latencias sinápticas más largas que la estimulación del RHT, $n=84$ células.

6.9.2. Efecto de la estimulación simultánea del tálamo paraventricular anterior y el tracto retinohipotalámico sobre la probabilidad de disparo de las neuronas del núcleo supraquiasmático

Para estos experimentos se estimuló independiente y simultáneamente el PVTa y el RHT con el objetivo de verificar su efecto sobre la probabilidad de disparo de las neuronas del NSQ mantenidas bajo un potencial de membrana hiperpolarizado (-70 mV), por la aplicación de un pulso de corriente negativa. La probabilidad de disparo tras la estimulación independiente del RHT, fue de 0.15 ± 0.052 ; del PVTa de 0.03 ± 0.01 ; pero cuando ambos núcleos fueron estimulados simultáneamente (SIM) dicha probabilidad incrementó significativamente a 0.56 ± 0.06 (Kruskal-Wallis $P=0.0001$, post hoc de Dunn RHT vs. SIM $P<0.05$; PVTa vs. SIM $P<0.001$, $n=13$, Fig. 22).

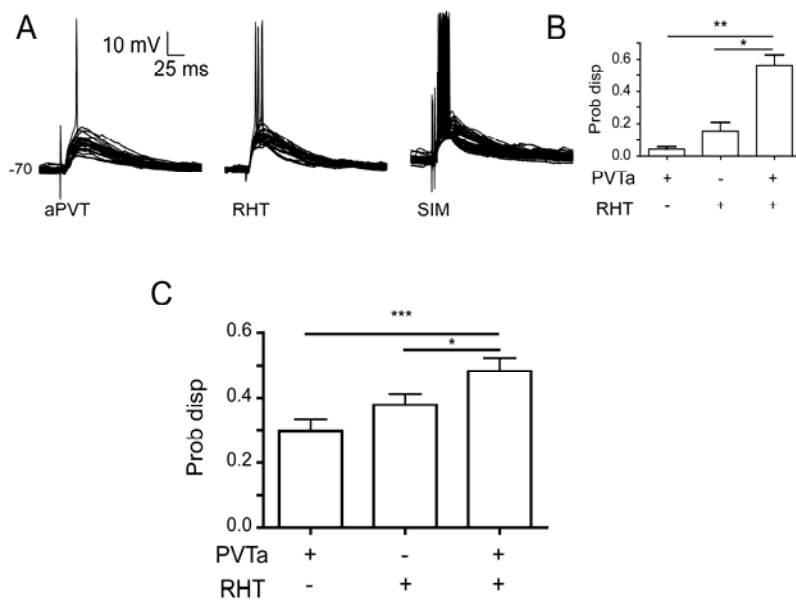


Figura 22. Probabilidad de disparo en las neuronas del NSQ por la estimulación del PVTa y el RHT. A) Potenciales de acción provocados por la estimulación individual de PVTa, RHT y la estimulación simultánea de ambos núcleos (SIM) en una neurona responsive a ambos núcleos. Potencial de membrana de -70 mV. B) La estimulación simultánea incrementó la probabilidad de disparo en neuronas con un potencial de membrana de -70 mV. C) La probabilidad de disparo fue incrementada en neuronas con un potencial de membrana espontáneo.

A continuación, se exploró la probabilidad de disparo bajo condiciones de un potencial de membrana espontáneo (sin la aplicación de un pulso de corriente negativa). El primer análisis se realizó en todas las neuronas sin hacer distinción de su patrón de disparo. Se encontró un incremento significativo cuando ambas aferentes fueron estimuladas en comparación con su estimulación individual (SIM vs. RHT, 0.48 ± 0.03 ; 0.29 ± 0.03 , respectivamente, ANOVA muestras repetidas, $F= 2.963$, $P<0.0001$, post hoc de Tukey $P<0.001$; SIM vs. PVTa 0.48 ± 0.03 ; 0.37 ± 0.03 , respectivamente, post hoc de Tukey $P<0.05$, $n=91$, Fig. 23C). Se realizó el mismo análisis agrupando a las neuronas por su patrón de disparo. En neuronas con un disparo rítmico, se encontraron diferencias significativas entre la estimulación simultánea y la del PVTa (0.47 ± 0.07 ; 0.30 ± 0.05 respectivamente, Friedman $P=0.02$, post hoc de Dunn $P<0.05$ $n=24$). Pero no entre la estimulación simultánea y la del RHT (0.47 ± 0.07 ; 0.31 ± 0.06 respectivamente, n.s. Fig. 23).

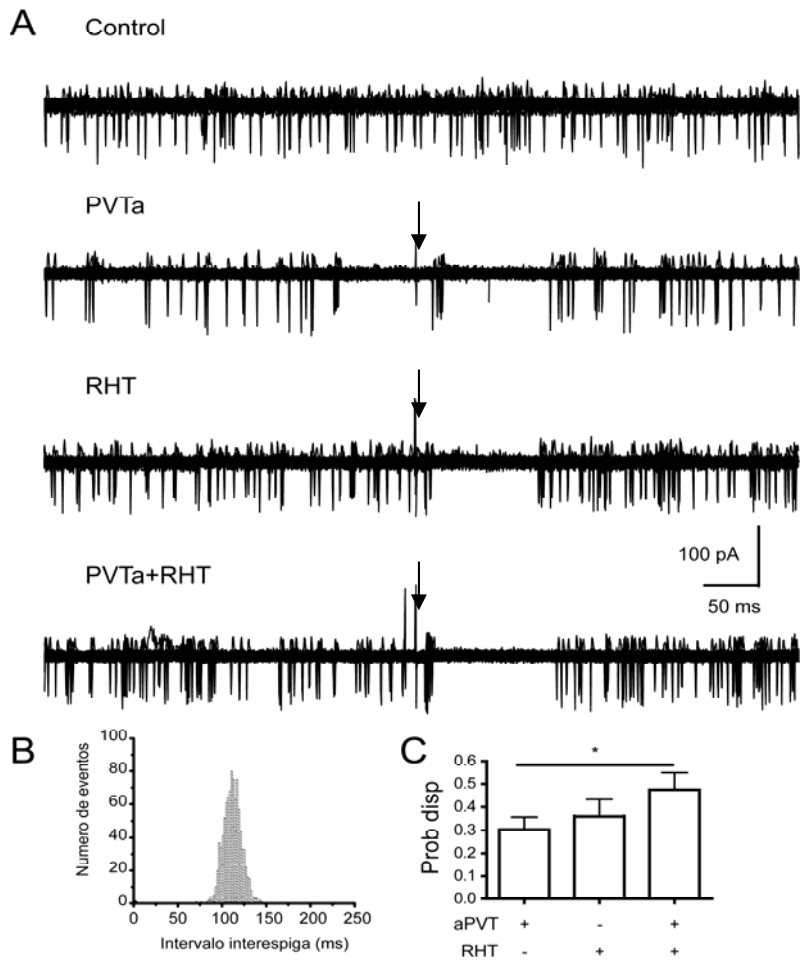


Figura 23. Probabilidad de disparo inducida por estimulación de PVTa y RHT en neuronas rítmicas. A) Treinta y cinco barridos sobrepuestos de dos segundos de duración de una célula rítmica del NSQ registrada en configuración de célula unida. El tipo de estimulación es indicada en la parte superior. Las flechas indican el momento de la estimulación. Nótese como después de la estimulación se da un periodo de silencio. B) Histograma del intervalo interespiga de la neurona presentada en A. La distribución en el histograma (Gaussiana) es característica de una neurona rítmica. C) La estimulación simultánea incrementó la probabilidad de disparo en relación a la estimulación independiente del PVTa.

La probabilidad de disparo se incrementó por la estimulación simultánea en contraste con la individual, en las neuronas arrítmicas (SIM vs. PVT 0.45 ± 0.053 ; 0.29 ± 0.03 respectivamente, ANOVA muestras repetidas, $F=2.996$, $P<0.0001$, post hoc de Tukey $P<0.01$, $n=50$) (SIM vs. RHT 0.45 ± 0.053 ; 0.27 ± 0.046 respectivamente, post hoc de Tukey $P<0.01$ Fig. 24).

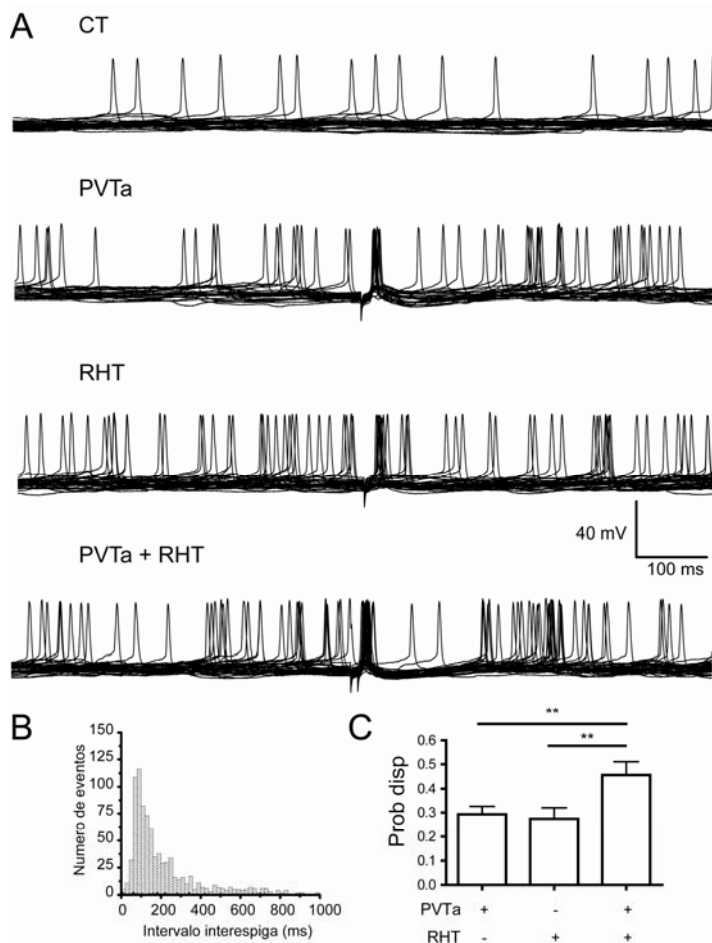


Figura 24. Probabilidad de disparo inducida por estimulación de PVTa y RHT en neuronas arrítmicas. A) Treinta y cinco barridos sobrepuestos de dos segundos de duración de una célula arrítmica del NSQ registrada en configuración de célula entera. La estimulación correspondiente es indicada en la parte superior. B) Histograma del intervalo interespiga de la neurona presentada en A. La distribución en el histograma (sesgada) es característica de una neurona arrítmica. C) La estimulación simultánea incrementó la probabilidad de disparo en relación a la estimulación individual de PVTa y RHT.

Del mismo modo, la estimulación en neuronas con muy baja TDE, la estimulación simultánea tuvo el mismo efecto (SIM vs. PVT 0.61 ± 0.079 ; 0.39 ± 0.086 respectivamente, Friedman test, $P=0.0423$, post hoc de Dunn $P<0.05$, $n=17$) (SIM vs. RHT 0.61 ± 0.079 ; 0.35 ± 0.092 respectivamente, post hoc de Dunn $P<0.05$, Fig. 25). En forma similar a lo encontrado por Jiao y Rusak (2003) en varias neuronas se observó un efecto inhibitorio posterior al disparo tras la estimulación de las aferencias. Los resultados presentes indican que la estimulación simultánea incrementa la probabilidad de disparo en aquellas neuronas arrítmicas y con muy baja TDE en comparación con las neuronas que muestran un disparo rítmico.

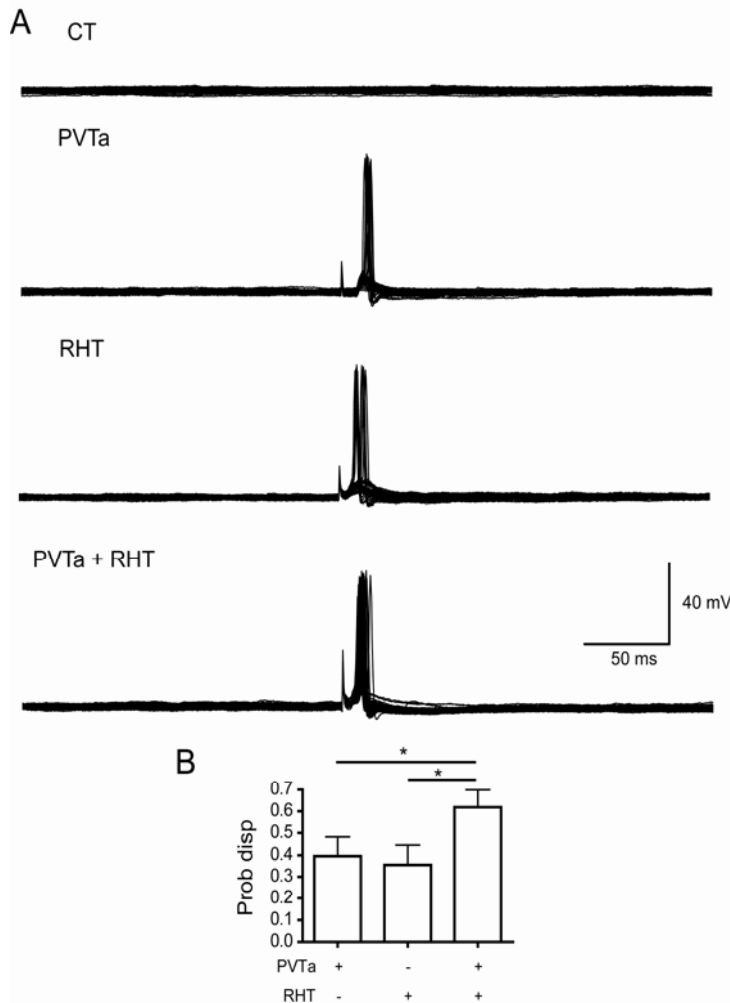


Figura 25. Probabilidad de disparo inducida por estimulación de PVTa y RHT en neuronas con muy baja TDE. A) Treinta y cinco barridos sobrepuestos de dos segundos de duración de una célula arrítmica del NSQ registrada en configuración de célula entera. La estimulación correspondiente es indicada en la parte de arriba. B) La estimulación simultánea incrementó la probabilidad de disparo en relación a la estimulación individual de PVTa y RHT.

6.9.3. Efecto de la estimulación del tálamo paraventricular anterior y el tracto retinohipotalámico sobre la frecuencia de disparo en el núcleo supraquiasmático

Como se ha mencionado, se cree que la frecuencia de disparo es controlada por los genes reloj (que se considera el mecanismo endógeno del reloj circadiano). Sin embargo, puede existir una modificación en el sentido opuesto, ya que la excitabilidad de la membrana afecta la expresión de los genes reloj (Nahm et al., 2005). Por otro lado, no existen reportes que relacionen la frecuencia de disparo de las neuronas del NSQ con la estimulación de sus aferentes. Debido a lo anterior, nos enfocamos en analizar el efecto de la estimulación individual y simultánea del PVTa y del RHT sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NSQ. En primera instancia, se realizó dicho

examen sobre 119 neuronas, sin importar su patrón de disparo. La estimulación del RHT incrementó significativamente la TDE en comparación con el control (3.32 ± 0.29 ; 2.9 ± 0.28 Hz respectivamente, ANOVA muestras repetidas, $F= 5.81$, $P<0.0001$, post hoc de Tukey $P<0.05$). De igual forma, la estimulación simultánea aumentó la tasa de disparo espontánea relación con el control (3.4 ± 0.28 ; 2.9 ± 0.28 Hz, post hoc de Tukey $P<0.05$). El segundo registro basal de la TDE sin estimulación alguna regreso a niveles similares en relación con el control (2.9 ± 0.26 Hz, Fig. 26).

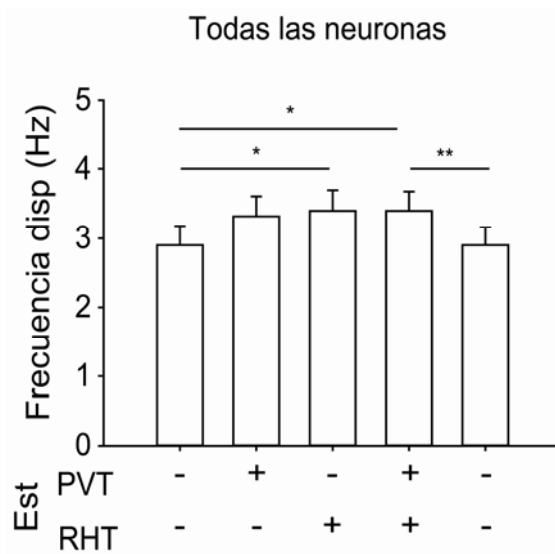


Figura 26. La estimulación de PVTa y RHT afectó la frecuencia de disparo cuando todas las neuronas registradas fueron agrupadas.

Posteriormente, se realizó el mismo análisis dependiendo del patrón de disparo mostrado por las células. No se encontraron efectos en la neuronas con patrón de disparo rítmico, bajo ninguna condición de estimulación (ANOVA muestras repetidas, $F= 0.4900$, $P=0.7430$, $n=47$, Fig. 27).

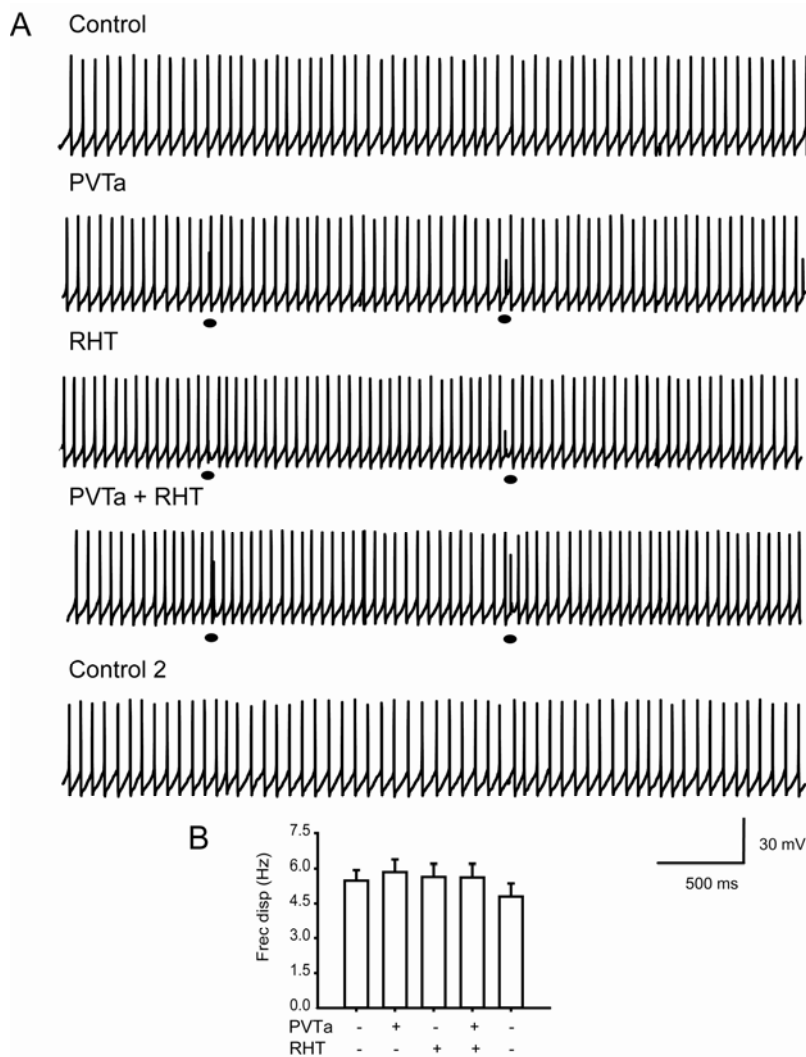


Figura 27. La estimulación del PVTa y RHT no afecta la frecuencia de disparo espontánea en las neuronas rítmicas. A) Cinco segundos de registro de una neurona con disparo rítmico. La estimulación correspondiente a cada registro es indicada en la parte superior. Los círculos en negro indican los momentos de la estimulación. B) La estimulación de los núcleos mencionados (individual o simultánea) no afectan la frecuencia de disparo espontánea en las neuronas con patrón de disparo rítmico.

En contraste, en 55 neuronas con un tipo de disparo arrítmico, la estimulación de RHT incrementó su frecuencia de disparo en relación con el control (2.5 ± 0.27 ; 1.9 ± 0.21 Hz; respectivamente. ANOVA muestras repetidas, $F=5.46$, $P=0.003$; post hoc de Tukey, $P<0.01$). En forma similar, la estimulación simultánea del PVTa y del RHT mostró un incremento significativo en contraste con el control (2.6 ± 0.27 ; 1.9 ± 0.21 Hz; respectivamente, $F=5.46$, $P=0.003$; post hoc de Tukey, $P<0.001$). La segunda basal registrada mostró un incremento significativo con respecto al control (2.6 ± 0.27 ; 1.9 ± 0.21 Hz, respectivamente; $F=5.46$, $P=0.003$; post hoc de Tukey, $P<0.001$). Lo cual indica un efecto residual sobre la TDE después del cese de las condiciones de estimulación (Fig. 28).

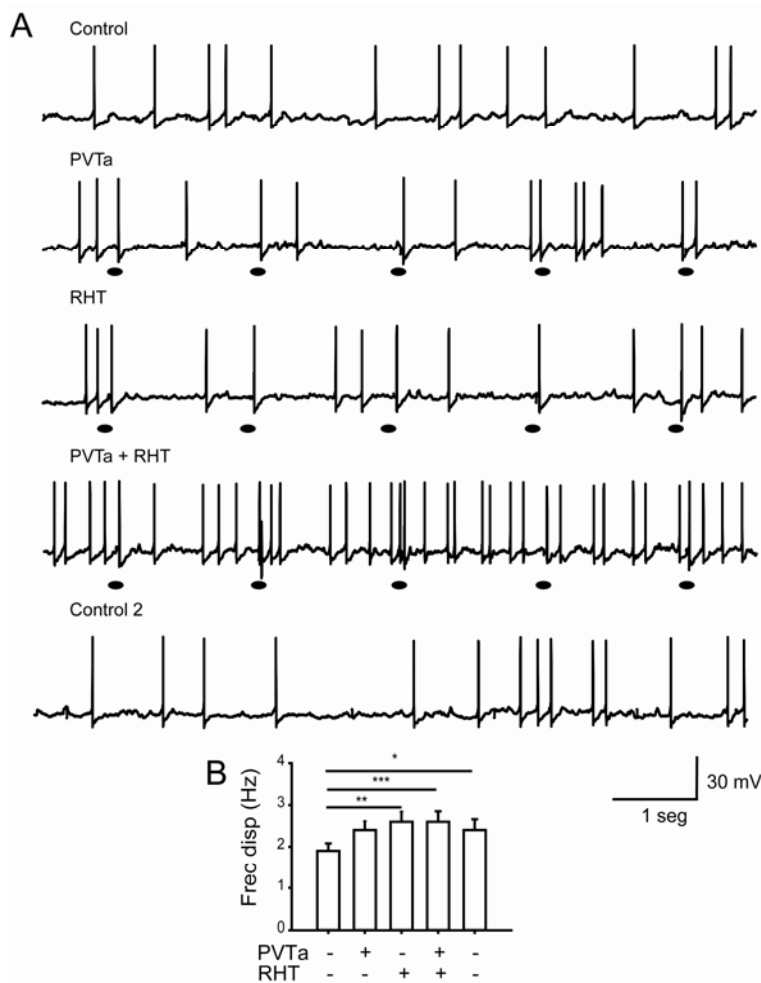


Figura 28. La estimulación simultánea de PVTa y RHT incrementa la frecuencia de disparo espontánea en las neuronas arrítmicas. A) Diez segundos de registro de una neurona con disparo arrítmico. La estimulación correspondiente a cada registro es indicada en la parte superior. Los círculos en negro indican los momentos de estimulación. B) La estimulación simultánea de PVTa y RHT incrementa la frecuencia de disparo espontánea en las neuronas arrítmicas.

Por otro lado, las neuronas que presentaron muy baja TDE fueron muy sensibles a las diferentes condiciones de estimulación. La estimulación de independiente del PVT anterior y del RHT incrementó la TDE en relación con el control (*PVT*, 0.617 ± 0.21 , 0.17 ± 0.14 Hz respectivamente; prueba de Friedman, $P < 0.0001$, post hoc de Dunn $P < 0.05$ $n=17$; *RHT*, 0.89 ± 0.21 Hz, prueba de Friedman, $P < 0.0001$, post hoc de Dunn $P < 0.01$). En el mismo sentido, la estimulación simultánea del PVTa y del RHT incrementó la frecuencia de disparo espontánea en comparación con el control (0.92 ± 0.20 , 0.17 ± 0.14 Hz, prueba de Friedman, $P < 0.0001$, post hoc de Dunn $P < 0.001$, Fig. 29).

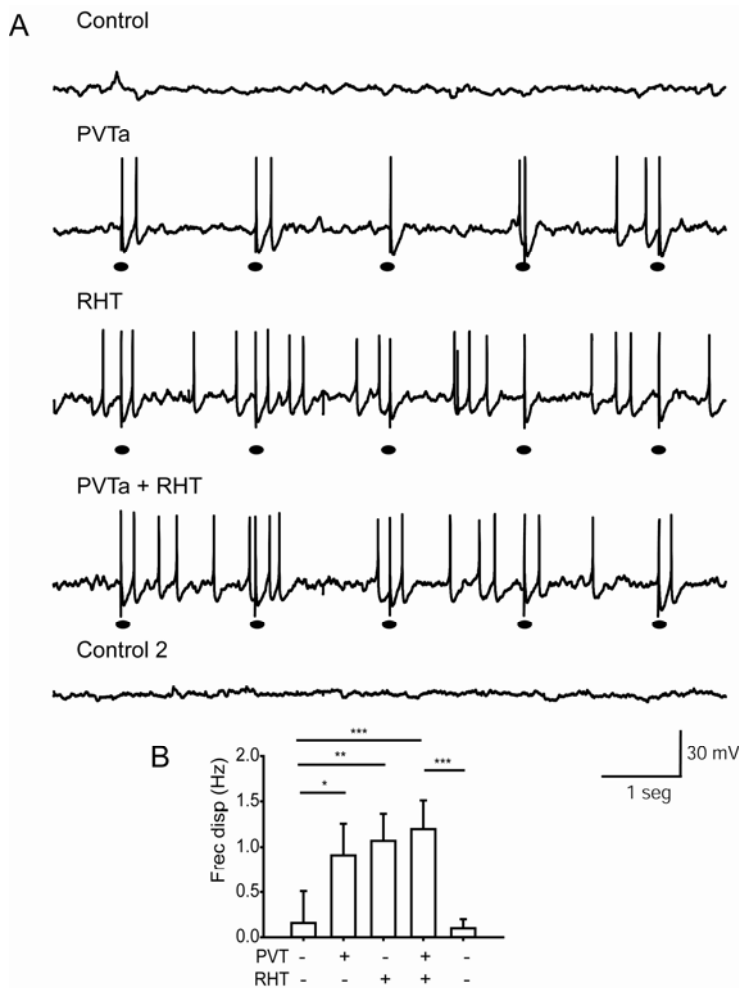


Figura 29. La estimulación individual y simultánea de PVTa y RHT incrementa la frecuencia de disparo espontánea en las neuronas con muy baja TDE. A) Diez segundos de registro de una neurona con disparo con muy baja TDE. La estimulación correspondiente a cada registro es indicada en la parte superior. Los círculos en negro indican los momentos de estimulación. B) La estimulación individual y simultánea de PVTa y RHT incrementa la frecuencia de disparo espontánea en las neuronas arrítmicas.

Estos resultados indican un efecto significativo de la estimulación del PVTa en la frecuencia de disparo en neuronas con muy baja TDE. En neuronas con un disparo arrítmico, el efecto significativo se puede atribuir principalmente a la estimulación por RHT y una menor contribución por parte de PVTa.

6.9.4. Los diferentes patrones de disparo de las neuronas del núcleo supraquiasmático exhiben diferentes potenciales de membrana espontáneos

Con el objetivo de explicar las diferencias encontradas entre neuronas rítmicas o con una muy baja TDE se analizó el potencial de membrana espontáneo que presentaba cada grupo neuronal. El potencial de membrana en las neuronas rítmicas fue de -43.88 ± 0.75 mV; en las neuronas con un disparo arrítmico -46.67 ± 0.93 mV; mientras que en

neuronas con muy baja TDE -48.5 ± 1.8 mV, que es donde se registró el potencial de más hiperpolarizado (ANOVA de una vía, $F= 4.681$, $P= 0.0117$; post hoc de Tukey, rítmicas vs. arrítmicas $P<0.05$; rítmicas vs. muy baja TDE, $P<0.05$, $n=100$, Fig. 30). No se encontraron diferencias significativas entre el potencial de membrana de las neuronas arrítmicas y con muy baja TDE.

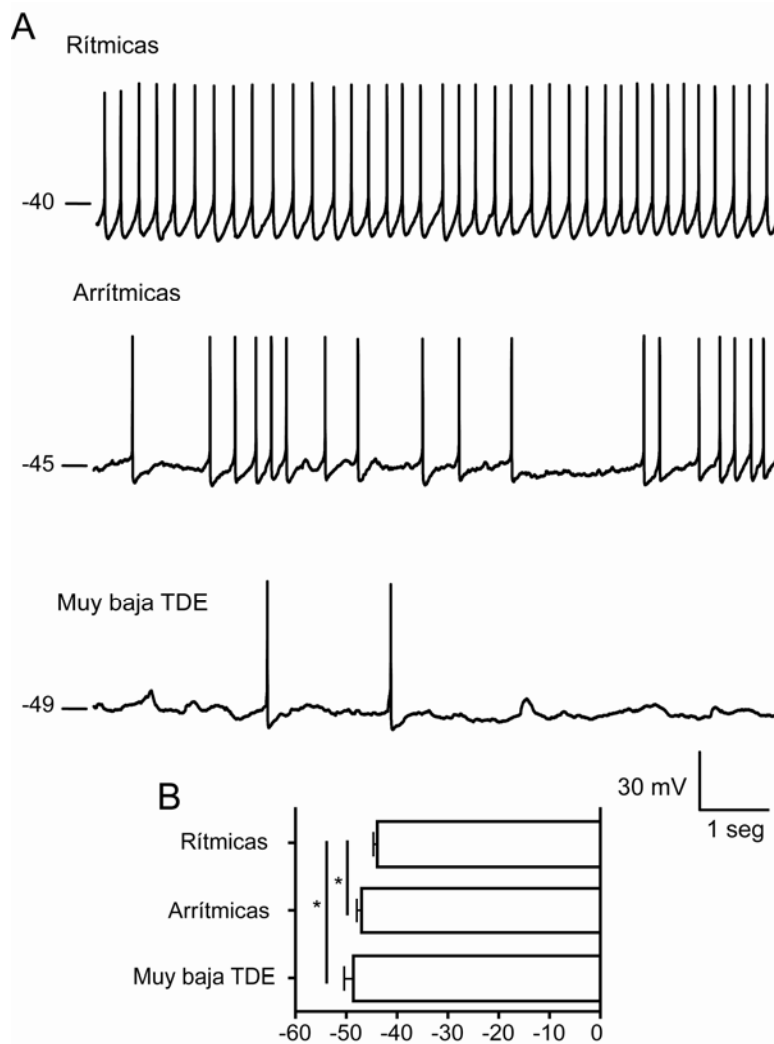


Figura 30. Potencial de membrana espontáneo correspondiente a distintos patrones de disparo en las neuronas del NSQ. A) Trazos de principales patrones de disparo encontrados en las neuronas del NSQ y su potencial de membrana característico. B) Histograma enseñando las diferencias en los diferentes grupos. Las neuronas con muy baja TDE muestran un potencial de membrana más negativo que las neuronas con patrón de disparo rítmico. Al igual que las neuronas con disparo arrítmico mostraron tener un potencial de membrana más negativo que las neuronas rítmicas.

6.9.5. La estimulación del tálamo paraventricular anterior produce respuestas diferenciales en las neuronas del núcleo supraquiasmático dependiendo del patrón de disparo de la neurona postsináptica

Puesto que en la primera parte del proyecto se encontró que el PVTa libera al mismo tiempo GABA y glutamato en el NSQ nos interesamos en ver como las neuronas de este núcleo computan la interacción entre neurotransmisores inhibitorios y excitatorios dependiendo de su frecuencia de disparo espontánea y por ende de su potencial de membrana espontáneo. Con este objetivo, se comparo la probabilidad de PPSE y PPSI en las neuronas del NSQ por la estimulación del PVTa haciendo dos grupos: neuronas rítmicas en el grupo 1, y neuronas arrítmicas y con muy baja TDE en el grupo 2, puesto que no se encontraron diferencias en el potencial de membrana de estos dos últimos grupos. En las neuronas del grupo 1 la probabilidad de PPSI fue mayor que la de PPSE (0.50 ± 0.07 , 0.27 ± 0.04 , respectivamente, Prueba T pareada, $t=2.389$, $P=0.02$, $n=36$). Mientras que en las neuronas del grupo 2 la probabilidad de PPSI fue menor que la de PPSE (0.20 ± 0.04 , 0.68 ± 0.04 , respectivamente, $t=7.545$, $P<0.0001$, $n=45$ Fig. 31).

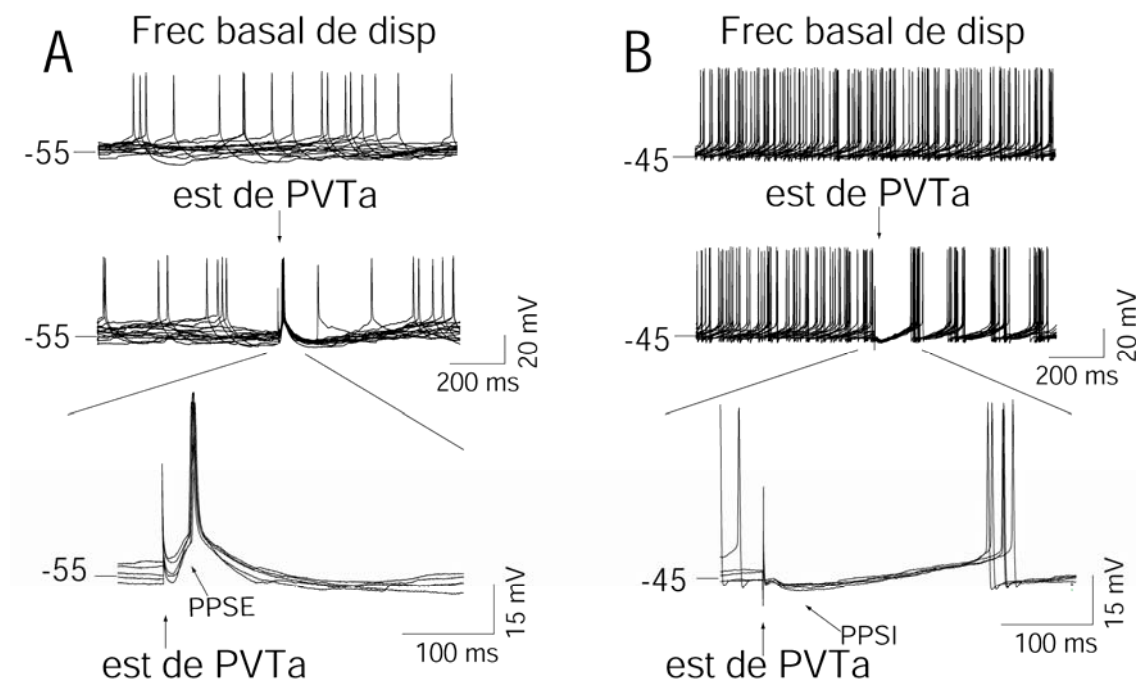


Figura 31. Respuestas diferenciales a la estimulación del PVTa de las neuronas del NSQ, dependiendo de su tasa de disparo espontánea. A) La estimulación del PVTa induce potenciales postsinápticos excitatorios y potenciales de acción en aquellas neuronas del NSQ con una baja frecuencia de disparo espontánea (0.6 ± 0.3 Hz) y disparo arrítmico. B) En contraste, la estimulación del PVTa induce potenciales postsinápticos inhibitorios en aquellas neuronas del NSQ con una elevada frecuencia de disparo (mas de 4 Hz) y patrón de disparo rítmico. Diez trazos superpuestos son indicados en cada panel.

Mientras que tras la estimulación del RHT fue mucho mayor la probabilidad de PPSE en comparación con la de PPSI (0.47 ± 0.37 , 0.09 ± 0.03 , Prueba T pareada, $t=5$, $P<0.0001$, $n=45$); no se encontraron diferencias entre las neuronas rítmicas y las arrítmicas (datos no mostrados).

7. Discusión de los resultados

Se usaron dos criterios para considerar la existencia de una monosinapsis: 1, la habilidad para seguir frecuencias elevadas de estimulación (Zhang et al., 2006), y 2 su consistencia en las latencias a bajas (5 Hz) y altas (20 Hz) frecuencias de estimulación (Berry y Prennant, 1976). La sinapsis entre el PVTa y el NSQ cumplió satisfactoriamente con estos supuestos, por lo que se puede considerar que es una monosinapsis. La estimulación del PVTa provocó un potencial postsináptico combinado en el NSQ, integrado por un PPSE y un PPSI cuando la neurona postsináptica se encontraba en un potencial de membrana espontáneo cercano a -45 mV (cercano al potencial de inversión del componente GABAérgico) y en presencia de QX-314. La separación farmacológica de cada componente indicó que el PPSE ejerce su acción sobre receptores glutamatérgicos ionotrópicos clásicos (AMPA-kainato y NMDA), mientras que el PPSI a través de los receptores GABA_A. La liberación de glutamato en la sinapsis entre el PVTa y el NSQ es acorde con los reportes de Moga y Moore (1996), que sugieren basados en la inyección de glutamato radioactivo en el NSQ que el neurotransmisor involucrado en esta sinapsis es el glutamato. De igual modo, Salazar-Juarez et al., (2002), proponen que el neurotransmisor involucrado en esta sinapsis es el glutamato, puesto que la estimulación eléctrica o química del PVTa provoca los mismos efectos en la curva de respuesta de fase que la estimulación fótica; ya que el neurotransmisor que se libera por la estimulación fótica a las neuronas del NSQ es el glutamato.

La disección farmacológica del componente inhibitorio de la respuesta del NSQ a la estimulación del PVTa aisló un claro componente sensible a bicuculina, el cual mostró un potencial de inversión alrededor de -46.6 ± 5.4 mV. Estos resultados son

importantes pues no existían reportes previos indicando que algún neurotransmisor inhibitorio se libere entre la sinapsis del PVTa y el NSQ. Sin embargo, el GABA es el más abundante neurotransmisor en el NSQ (Moore y Speh, 1993) y como se mencionó en la introducción la mayor actividad espontánea en este núcleo es de naturaleza GABAérgica (Strecker et al., 1997). La persistencia del PPSI después de la aplicación de bloqueadores glutamatérgicos, el hecho de que este componente muestre la habilidad para seguir elevadas frecuencias de estimulación, y la consistencia en las latencias antes y después de la aplicación de antagonistas de receptores glutamatérgicos (tanto en estimulación normal como mínima indican que el GABA puede liberarse simultáneamente con el glutamato desde terminales provenientes del PVTa (Jonas et al., 1998; Jo et al., 1999; Li et al., 2004). La consistencia en las latencias entre intensidades mínimas y máximas de estimulación, en el control y bajo la disección del componente GABAérgico; además de la disección farmacológica de los componentes GABAérgicos y glutamatérgicos en el protocolo de estimulación mínima, y la estabilidad en las latencias bajo diferentes condiciones de estimulación, son indicativos de que la liberación de ambos neurotransmisores proviene del mismo núcleo y no de grupos neuronales intermedios (Gillespie et al., 2005, Uchigashima et al., 2007).

La colocalización de los RNA mensajeros de los transportadores vesiculares para GABA y glutamato en la misma neurona disociada del NSQ, así como la colocalización de las proteínas para los transportadores vesiculares en la misma terminal marcada desde el PVTa da apoyo adicional a la hipótesis de una co-liberación de GABA y glutamato en el NSQ de terminales de neuronas provenientes del PVTa. La colocalización de GABA y glutamato ha sido demostrada tanto en fibras musgosas del hipocampo de rata y de primate (Sandler y Smith, 1991; Schwarzer y Sperk 1995;

Sloviter et al., 1996), como en la oliva superior lateral de ratas en desarrollo (Gillespie et al., 2005).

En el mismo sentido, la aplicación de un protocolo para inducir epilepsia experimental en ratas se ha demostrado que induce co-liberación de GABA y glutamato desde fibras musgosas que arriban a neuronas piramidales de la región del hipocampo CA3 (Gutierrez, 2000, 2002). No es clara la relevancia funcional de la co-liberación de neurotransmisores y particularmente tratándose de neurotransmisores antagónicos tales como GABA y glutamato. Sin embargo, se ha implicado dicha co-liberación como un factor neurotrófico durante el desarrollo temprano, y como un mecanismo para contrabalancear los efectos de la excitabilidad incrementada después del protocolo inductor de la epilepsia experimental en ratas (Gutierrez, 2005). Por otro lado, dado que existe evidencia que sitúa al GABA como un neurotransmisor excitatorio durante etapas tempranas del desarrollo (Leinekugel et al., 1997; Gao et al., 1998), se ha propuesto a la co-liberación del GABA y del glutamato como un mecanismo sinérgico para asegurar la activación de los receptores NMDA como parte de un mecanismo de consolidación sináptica durante las etapas tempranas del desarrollo (Gillespie et al., 2005).

Como se ha mencionado en la introducción, el NSQ presenta diferentes estados funcionales acordes a su papel como un reloj circadiano (Klein et al., 1991). Entre estos estados funcionales se puede mencionar la dependencia temporal que tiene el reloj para producir avances y retrasos del reloj circadiano, a partir de la misma señal fótica. Los retrasos y los avances del reloj, se relacionan con diferentes vías de señalización que se harían sentir durante la noche temprana y tardía, respectivamente (Gillette and Mitchell 2002). Por otra parte, se ha relacionado un cambio en el efecto de inhibitorio a excitatorio del GABA a lo largo del ciclo circadiano (Wagner et al., 1997; 2001; Albus

et al., 2005; Choi et al., 2008). Nosotros creemos que esta función reportada en el NSQ puede ser la clave para cambiar los efectos de inhibitorios a excitatorios del GABA e inducir una mayor excitabilidad en las neuronas del NSQ mediada por las entradas provenientes del PVTa durante ciertos momentos del ciclo circadiano pero no así durante otros momentos.

Por otra parte, la estimulación simultánea del PVTa y el RHT aportan dos resultados relevantes: 1, la convergencia funcional entre fibras provenientes de la retina y el PVTa que ocurren en una gran proporción de neuronas del NSQ (61%); y 2, que el PVTa es capaz de modular la actividad eléctrica de las neuronas del NSQ especialmente en aquellas neuronas con una excitabilidad neuronal disminuida. Tal aspecto modulador de la entradas del PVTa sobre el NSQ concede mayor soporte al papel del PVTa como un elemento importante en el entrenamiento de los ritmos circadianos a la luz (Salazar-Juarez et al., 2002).

Con base en la respuesta de la estimulación al RHT, PVTa o ambos, las neuronas del NSQ pueden ser agrupadas en 4 subpoblaciones: independiente, responsivas al PVTa, al RHT, a ambos o no responsivas. Estos resultados apoyan la idea de microcircuitos en el NSQ relacionados con el manejo de la información de las aferentes (Roig et al., 1997).

La latencia obtenida por la estimulación de RHT fue de 5.6 ± 0.29 ms. Estudios previos han encontrado latencias similares: Kim y Dudek (1991) en donde se reporta 6.2 ms usando registros intracelulares, mientras que Jiang et al., (1997) reportan latencias de 2.5 to 7.8 ms por la estimulación directa del nervio óptico; en registros de célula entera. Según Moore et al., (1995) dado que las fibras provenientes de la retina son fibras no mielinizadas, otros (Jiang et al., 1997) consideran que esto es debido a la

velocidad de conducción que es mas lenta en fibras no mielinizadas. Por otra parte, la latencia registrada en el NSQ debido a la estimulación de PVTa (10.8 ± 0.38 ms) fue significativamente mayor que la encontrada durante la estimulación del RHT. La latencia por la estimulación en el NSQ al PVTa, es de 12.6 ± 0.29 ms (Zhang et al., 2006), no es muy diferente la latencia registrada en el PVTa por la estimulación del NSQ (12.6 ± 0.29 ms; Zhang et al., 2006) a la latencia reportada en el presente trabajo (registrada en el NSQ durante la estimulación del PVTa).

Varios trabajos dan información acerca del ritmo circadiano en la frecuencia de disparo de las neuronas del NSQ (Gross y Hendriks, 1982; Green y Gillete, 1982, Theshima et al., 2003). Como se ha mencionado anteriormente, la frecuencia de disparo de las NSQ se ha relacionado con los mecanismos de salida del reloj (Meredith et al., 2006). Por otra parte, existe evidencia de que modificando la excitabilidad membranal se puede afectar lo que se cree es el mecanismo propio del reloj circadiano (los genes reloj) (Nahm et al., 2005). Nuestra hipótesis es que al modificar la frecuencia de disparo de las neuronas del NSQ por la estimulación sus aferentes es probable que se modifiquen los genes que se consideran los mecanismos del reloj. Por esta razón, en el presente trabajo nos enfocamos en estudiar el efecto de la estimulación de dos de las principales aferentes al NSQ y su efecto sobre dos aspectos de excitabilidad membranal: la probabilidad de disparo y la tasa de potenciales de acción.

El incremento en la probabilidad de disparo por la estimulación simultánea es dependiente del potencial de membrana de la neurona; puesto que el mayor incremento se registró con un potencial de membrana hiperpolarizado artificialmente (por inyección de una corriente negativa), seguido por las neuronas con muy baja TDE y arrítmicas; mientras que en las neuronas rítmicas fue donde se encontraron los menores efectos. El

análisis del potencial de membrana en estos tres grupos sugiere un efecto inversamente proporcional entre el potencial de membrana y la probabilidad de disparo ejercida por la estimulación individual o simultánea de PVTa y RHT (mientras más negativo es el potencial de membrana mayor es el efecto de la estimulación sobre la probabilidad de disparo). Nuestros resultados están en línea con los encontrados por Tremeret et al., (2008) quienes proponen que mientras más negativo es el pulso de corriente inyectado a la membrana de las neuronas del NSQ, mayor es la probabilidad de disparo ejercida por el rebote. Nosotros creemos que la misma neurona del NSQ puede pasar por diversos estados a lo largo del ciclo circadiano y mostrar diferentes patrones de disparo. Existen diversos reportes que apoyan esta hipótesis, Kim y Dudek (1993) mostraron que al hiperpolarizar una neurona con un patrón de disparo rítmico esta puede mostrar un patrón arrítmico y que por el contrario, al despolarizar el potencial de membrana espontáneo de una neurona con patrón de disparo arrítmico esta se convierte en rítmica. Mas aún, en nuestro grupo de trabajo encontramos evidencia que al manipular el calcio intracelular a través de los canales sensibles a rianodina (RyR) se puede modificar la frecuencia de disparo de estas célula, pasando de una baja a una alta frecuencia de disparo y viceversa (Aguilar-Roblero et al., 2007). La mayor influencia que ejercen las aferentes sobre las neuronas del NSQ es cuando estas se encuentran con un potencial de membrana hiperpolarizado y con una baja frecuencia de disparo, que según los registros a lo largo del ciclo circadiano ocurre durante el periodo de oscuridad (Gross y Hendriks, 1982; Green y Gillete, 1982, Theshima et al., 2003).

Las diferencias en el potencial de membrana pueden explicar el mayor efecto que tiene la estimulación de las aferentes sobre el potencial de membrana mas negativo, ya que los PPS son mayores en amplitud en un potencial de membrana hiperpolarizado en comparación con uno despolarizado como lo demostró Kim y Dudek (1991) y la

integración espacial y temporal es mayor en el caso hiperpolarizado. Como ya hemos mencionado Tremere et al., (2008) mostraron una relación directa entre la negatividad del potencial de membrana y la probabilidad de disparo; una hipótesis de ese trabajo es que la negatividad del potencial de membrana juega un papel celular importante. De acuerdo con esto, en este trabajo demostramos como el potencial de membrana hiperpolarizado ofrece una ventaja para la excitabilidad neuronal en la comunicación sináptica de las neuronas del NSQ.

Los resultados anteriores indican que las aferencias provenientes del núcleo PVTa liberan simultáneamente GABA y glutamato en el NSQ. Además, que esta aferencia converge en un alto porcentaje en neuronas que reciben aferencias provenientes del RHT; y que las aferencias proveniente del PVTa ejercen un papel activo en la regulación de la excitabilidad en las neuronas del NSQ, especialmente en aquellas con una baja excitabilidad espontánea. El presente trabajo es la primera evidencia que caracteriza la vía descrita entre el PVTa y las neuronas del NSQ.

Glutamate and GABA Neurotransmission from the Paraventricular Thalamus to the Suprachiasmatic Nuclei in the Rat

Javier Alamilla and Raúl Aguilar-Roblero¹

*División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México, México*

Abstract The anterior paraventricular thalamus (aPVT) projects to the SCN, and a lesion of the aPVT leads to phase delays of circadian rhythms, instead of advances, produced by light pulses at CT23. As a first step to understanding the underlying mechanism, the authors characterized the monosynaptic responses of SCN neurons to aPVT in whole-cell recordings from brain slices in rats. Stimulation of aPVT evoked excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in SCN neurons. Pharmacological isolation of such components indicated that the excitatory postsynaptic potential (EPSP) involves AMPA and NMDA glutamate receptors while the inhibitory postsynaptic potential (IPSP) involves GABA_A receptors. Since the SCN comprises mostly GABA neurons, the persistence of IPSP after the blockade of glutamate receptors ruled out the possibility that GABA was released from SCN interneurons responsive to glutamate released from the paraventricular thalamus. Altogether, the present evidence demonstrates that glutamate and GABA are released in synapses between aPVT and the SCN.

Key words circadian rhythms, fast neurotransmitters corelease, postsynaptic potentials, glutamate, GABA

The paraventricular thalamus (PVT) is one of the midline and intralaminar nuclei that plays a role in maintenance of wakefulness (Bentivoglio et al., 1991; Novak et al., 2000), viscerolimbic integration (Groenewegen and Berendse, 1994; Otake et al., 1995), and modulation of circadian rhythms (Bhatnagar and Dallman, 1999; Moga and Moore, 2000; Salazar-Juárez et al., 2002).

The SCN form the main circadian pacemaker in mammals. SCN neurons are characterized by circadian rhythms in spontaneous firing frequency, glucose metabolism, neuropeptide synthesis, and secretion, all of which are driven by a molecular

clock involving translation-transcription loops in specific clock genes (Reppert and Weaver, 2002). The SCN neurons are entrained by light through the retinohypothalamic tract (RHT), which involves glutamate and PACAP as neurotransmitters (Hannibal, 2002). SCN neurons respond differentially to the same brief light pulses applied at different times of the day in a similar way to the behavioral phase response curve (Gillette and Mitchell, 2002; Dann and Pittendrigh, 1976).

The PVT and the SCN are reciprocally connected. SCN projects into the posterior division of the PVT (pPVT; Watts et al., 1987), while the anterior PVT

1. To whom all correspondence should be addressed: Raúl Aguilar-Roblero, Neurociencias, IFC/UNAM, Apdo. Postal 70-253, México D.F. 04510, México; e-mail: raguilar@ifc.unam.mx.

(aPVT) projects into the SCN (Moga et al., 1995). Electrophysiological studies indicate glutamatergic and GABAergic release from SCN terminals in the pPVT (Zhang et al., 2006). On the other hand, aPVT projections to the SCN seem to be glutamatergic (Moga and Moore, 1996).

The role of PVT on the regulation of circadian rhythms has been studied by ablation of different parts of this nucleus. Lesion of the pPVT lengthens the endogenous period of locomotion activity rhythm (Moga and Moore, 2000) and increases food intake during the day (Bhatnagar and Dallman, 1999). In rats recorded in constant dim red light, the lesion of aPVT leads to phase delays, instead of the expected advances of circadian rhythmicity induced by light pulses at CT23, but it has no effect on the phase delays induced by light pulses at CT12. Furthermore, electrical or glutamate stimulation of aPVT neurons induces a light-type phase response curve on the drinking circadian rhythm (Salazar-Juárez et al., 2002).

As a first step to understanding the mechanisms involved in PVT modulation of circadian rhythmicity, we characterize the synapse from the aPVT to the SCN in rats: we found simultaneous monosynaptic excitatory postsynaptic potential (EPSP) and inhibitory postsynaptic potential (IPSP). Pharmacological isolation of such components indicated that the EPSP involves AMPA and NMDA glutamate receptors, while the IPSP involves GABA_A receptors. Persistence of the IPSP after blockade of glutamate receptors suggests that GABA is released from aPVT terminals and is not due to activation of the SCN's GABA interneurons in response to PVT stimulation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and General Conditions

Male Wistar rats weighing between 100 and 120 g were housed under 12:12-h LD cycle (lights on at 0600 h, 400 lux) in a sound-attenuated room with regulated temperature (22 ± 1 °C) for at least a week before starting the experiment. For electrophysiological recordings during the night, the animals were maintained in a reversed 12:12-h LD cycle (lights on at 2200 h, 400 lux) for at least 3 weeks before the experiments. Animals had continuous access to food and water. All the procedures were conducted according to the guidelines for use of experimental animals from the Universidad Nacional Autónoma de México

in accordance to national laws on the matter (NOM-062-200-1999).

Slice Preparation

Rats were deeply anaesthetized 3 h after lights on (ZT3), and the brains were quickly removed and placed in ice-cold low-calcium artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM) 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 4 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 26 NaCO₃, and 10 glucose, pH 7.38, 330 mOsm/L, oxygenated with a gas mixture of 95% O₂/5% CO₂. To avoid phase shifts induced by light, the brain slices used during the night period were prepared 1 h before lights off (ZT11). Sagittal sections of 250 to 300 μm were obtained using a vibratome (Vibratome, St. Louis, MO, USA), and those slices containing both the SCN and the aPVT were transferred to fresh low-calcium aCSF at room temperature under continuous oxygenation and kept in this condition until use. One slice was then placed in the recording chamber and continuously perfused (2.5-5 mL-min) with oxygenated aCSF at room temperature. The recording chamber solution was identical to the extraction solution except that CaCl₂ was increased to 2.4 mM, MgCl₂ was reduced to 1.3 mM, and the pH was adjusted to 7.38 at room temperature. For experiments with high extracellular calcium, the osmolarity was adjusted by decreasing the NaCl, and the NaCO₃ was replaced with HEPES buffer at the same concentration. For the experiment, we first placed the tip of the stimulation electrode by infrared microscopy at 100× in the aPVT at approximate stereotaxic coordinates (L: 0.2, V: -6.0, AP: -1.4) from the bregma (Paxinos and Watson, 1986). Then, SCN neurons located in the same slice were viewed, and the recording electrodes were positioned by infrared Nomarski microscopy at 600×. We used a Nikon Eclipse 600 (Nikon, Melville, NY, USA) with a Dage MTI video camera and monitor.

Patch-Clamp Recordings and Stimulation

Recordings were made at room temperature (20-25 °C) using whole-cell configuration at different moments of the circadian cycle, either between 5 and 10 h after lights on (ZT5-10, midday) or between 5 and 10 h after lights off (ZT17-22, midnight). The recording electrodes were filled with a solution containing (in mM) 72 KH₂PO₄, 36 KCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 1.1 EGTA, 0.2 Na₂ATP, and 0.2 Na₂GTP, pH 7.2, 275 mOsmol/L, as previously reported (Tecuapetla

et al., 2007). Pipettes had resistances between 4 and 7 M Ω . Once a good seal was obtained (above 2 G Ω) between the recording electrode and the neuron, the membrane was disrupted by a gentle suction. Recordings were made in the current clamp mode with an Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Online data were collected with a digital acquisition board (DAQ, National Instruments, Austin, TX, USA) using a custom-made program in the LabView environment. Stimulation was delivered on aPVT with a concentric electrode (inner diameter 12.5 μ m; FHC, Bowdoinham, ME, USA), and the bipolar electrode was connected to a constant current stimulus isolation unit (Grass PSIU6, West Warwick, RI, USA) driven by a stimulator (Grass model 2000) synchronized to the computer. The electrical pulses were applied with a frequency of 0.5 Hz; each pulse had duration of 0.5 msec, and the intensity was adjusted to produce responses in 70% to 80% of the pulses applied.

Postsynaptic Potentials

To dissect the different components of the synaptic responses, QX314 (5 mM) was added into the recording pipette to block the sodium currents and therefore abolish the generation of action potentials. Other drugs added to the recording chamber solution were bicuculline methiodide (10 μ M) to block GABA_A receptors, DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid (APV, 50 μ M) to block NMDA glutamate receptors, 6,7-dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (DNQX, 10 μ M) to block AMPA-kainate glutamate receptors, and strychnine (10 μ M) to block glycine receptors. All the drugs were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Electrophysiological Data Analysis

Analysis of the synaptic potentials was done by the Mini Analysis 6.0.3 (Synaptosoft, Decatur, GA, USA). The parameters studied were the amplitude at the peak value of the synaptic potential and the latency from the stimulus artifact to the onset of the response. Statistical analysis of these parameters was done in GraphPad Prisma 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The statistical tests were the nonparametric Wilcoxon test for matched pairs. The α level was set at 0.05. Data are presented as mean and standard error of the mean (SEM).

RESULTS

Monosynaptic Connections between aPVT and SCN Neurons

From a total of 196 neurons from the SCN that responded to aPVT stimulation, we found 102 (52%) that were able to follow 20 Hz with a latency of 9.5 ± 2.1 msec (Fig. 1A). The ability to follow high-frequency stimulation with a steady synaptic delay has been used to verify monosynaptic connectivity (Zhang et al., 2006). In 20 neurons tested, the latencies to low-frequency (5 Hz) and high-frequency (20 Hz) stimulation were similar (9.84 ± 3.19 msec and 9.99 ± 3.3 msec, respectively; Fig. 1A). The remaining 94 neurons (48%) were not able to follow 20-Hz stimulation, and the latency values were much larger (24.4 ± 4.7 msec). To confirm the monosynaptic nature of afferent from the aPVT to the SCN, we recorded an additional 52 neurons under high extracellular calcium concentrations and established their ability to show 100% responses to 2-Hz stimulation. Twenty-five of 52 neurons (48%) were able to follow 20 Hz in control conditions and show 100% of responses to a 2-Hz stimulus at different high calcium concentrations as follows: 7 cells were tested in 10 mM, 6 in 20 mM, 6 in 30 mM, and 6 in 40 mM calcium. No significant differences were found on the latencies before and after the high calcium administration (Fig. 1B, Table 1). Remarkably, the ability of the postsynaptic neuron to follow different stimulation frequencies was inversely related to the extracellular high calcium concentration; in 10 mM, the neurons could follow up to 10 Hz, in 20 mM up to 5 Hz, and in 30 and 40 mM up to 2 Hz. We attributed this phenomenon to synaptic vesicular depletion induced by high calcium. To verify this latter hypothesis, we analyzed the frequency of spontaneous postsynaptic potentials (SPSPs) before and after high calcium. The extracellular high calcium administration increased the SPSP frequency (control, 4.18 ± 0.66 Hz; high calcium, 6.32 ± 0.93 Hz, $W = -166$, $p = 0.009$, Wilcoxon test). There were no differences in the frequency of SPSP between the different groups of extracellular high calcium. The SPSP amplitude was not affected by the high calcium administration (5.47 ± 1.2 ; 5.47 ± 1.03 mV, *ns*, Wilcoxon test). These facts confirm the monosynaptic connectivity between the aPVT to the SCN according to extracellular high calcium criteria (Berry and Cottrell, 1975; Berry and Pentreath, 1976).

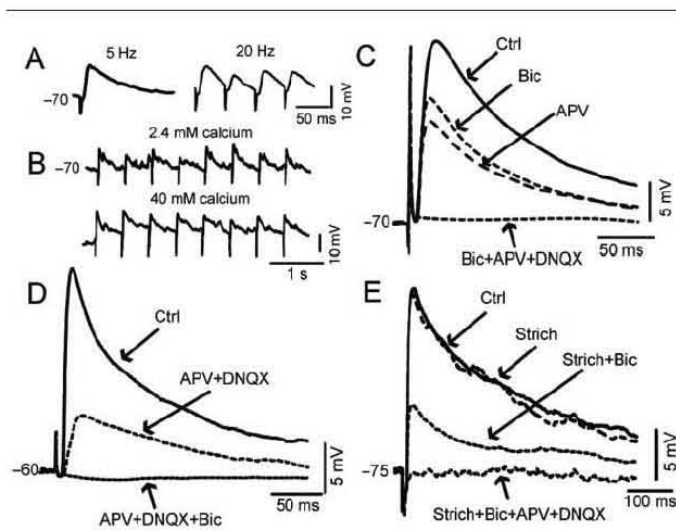


Figure 1. Monosynaptic potentials from SCN neurons in response to anterior paraventricular thalamus (aPVT) stimulation involve glutamate and GABA receptors but not glycinergic receptors. (A) Responses to 5- and 20-Hz aPVT stimulation at -70 mV. No significant differences were found in the latencies from 20 SCN neurons stimulated at 5 Hz (9.84 ± 3.18 msec) and 20 Hz (9.99 ± 3.3 msec). (B) The postsynaptic responses were maintained in a normal and high extracellular calcium presence. No significant differences were found in the latencies in 2.4-mM (9.6 ± 0.3 msec) and 40-mM extracellular calcium (10.08 ± 0.2 msec) administration. (C) Bicuculline administration isolated a glutamatergic excitatory postsynaptic potential (EPSP) and decreased its amplitude when recorded at -70 mV, which indicates GABA-mediated input into this neuron. The remaining EPSP was decreased by blockade of NMDA receptors with APV and was completely abolished after blockade of AMPA/kainate with 6,7-dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (DNQX). (D) Blockade of NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors by administration of DL-2-amino-5-phosphopentanoic acid (APV) and DNQX isolated a GABAergic postsynaptic potential which decreased its amplitude when recorded at -60 mV. (E) Administration of strychnine had no effect on the EPSPs, which indicates that glycine is not a neurotransmitter in this synapse. Further administration of bicuculline and DNQX/APV subsequently decreased the amplitude of the EPSPs recorded at -75 mV.

Table 1. Synaptic Delay in SCN Neurons to Anterior Paraventricular Thalamus Stimulation Remains Constant at Different Ca^{2+} Concentrations in the Bathing Medium, Indicating a Monosynaptic Connection

Extracellular (Ca^{2+}), mM	Synaptic Delay, msec	
	Control	Experimental
2.4	9.8 ± 3.2	10.0 ± 3.3
10	8.8 ± 1.5	8.8 ± 1.2
20	13.1 ± 1.8	13.4 ± 1.5
30	12.0 ± 1.5	12.2 ± 1.3
40	9.0 ± 2.0	9.1 ± 1.9

Glutamatergic SCN Postsynaptic Potentials to aPVT Stimulation

The next results refer only to those neurons with monosynaptic responses to aPVT (those that followed

20-Hz stimulation in physiological aCSF). The action potentials were blocked by adding QX314 to the internal solution of the recording micropipette and proceeding to isolate the glutamatergic EPSPs in 40 SCN neurons (34 at midday and 6 at midnight). After basal recordings at different membrane holding potentials (from -70 to -10 mV), bicuculline was added to the extracellular solution to block the GABA_A receptors and prevent the GABAergic inputs into the neuron under study. Since no difference in any of the studied parameters was found between midday or midnight recordings, all neurons were pooled for analysis. The administration of bicuculline changed the EPSPs' amplitude according to the holding potential of the recorded neuron (Figs. 1C, 2A) in all neurons except one, which we infer had no GABAergic synaptic input. No changes before or after bicuculline were found in the EPSPs' latency (7.9 ± 0.58 msec before, 7.9 ± 0.52 msec after, *ns*, Wilcoxon test). In all neurons, EPSPs decreased after administration of NMDA receptor antagonist APV and were completely abolished after administration of AMPA receptor antagonist DNQX (Fig. 1C). The reversal potential of the isolated glutamate EPSPs was close to 0 mV (Fig. 2C), which is in accordance with the value reported for these receptor channels (Hille, 2001). The relative contribution to the EPSPs from AMPA and the component sensitive to APV (attributable to NMDA receptors) at different holding potentials is shown in Figure 2E; the component sensitive to APV was estimated by subtracting the value of the PSPs recorded in the presence of bicuculline and APV from the value recorded in the presence of bicuculline alone (Flores-Barrera et al., 2009).

GABAergic SCN Postsynaptic Potentials to aPVT Stimulation

The change in EPSPs amplitude after isolation of the glutamate component indicates inhibitory influences

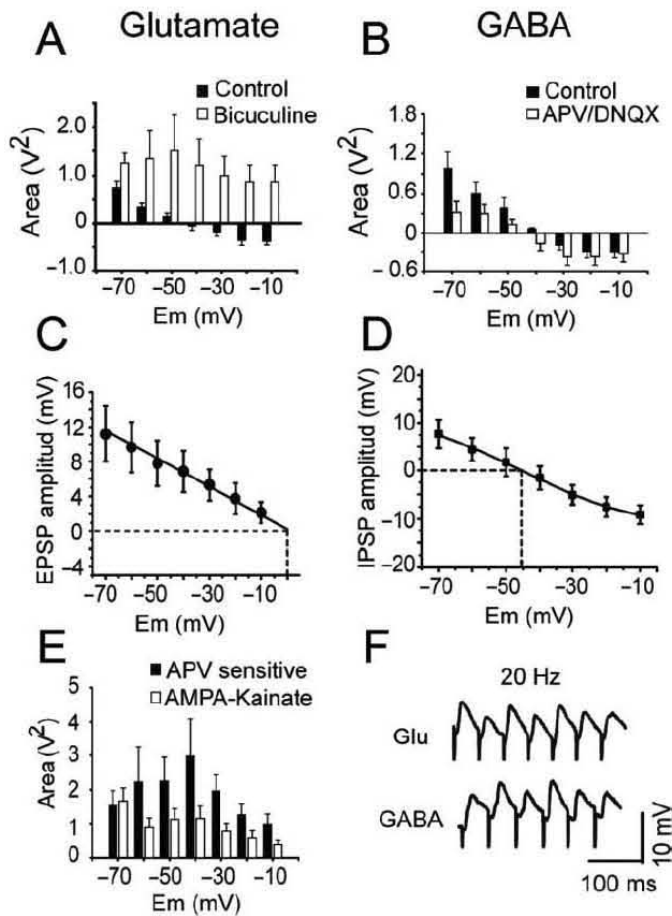


Figure 2. Characterization of the glutamatergic and GABAergic components from the SCN monosynaptic response to anterior paraventricular thalamus (aPVT) stimulation. (A) Postsynaptic potentials' (PSPs) amplitude (area under the curve) before and after bicuculline application. Bicuculline application increased the excitatory postsynaptic potential (EPSP) and abolished inhibitory postsynaptic potential (IPSP) at the different holding potentials. (B) Relative contribution of the GABAergic component to the power of the PSPs (measured by the area under the curve) at different holding potentials. Equilibrium potential to the glutamatergic isolated component (C), which was close to 0 mV, and the GABAergic isolated component (D), which was close to -45 mV. (E) Relative contribution of AMPA/kainate and NMDA components at several holding potentials; the values were estimated from the PSPs' area under the curve. (F) The isolated glutamatergic and GABAergic components showed the ability to follow high aPVT frequency stimulation, which implicates the monosynaptic afferent.

involving GABA_A receptors, which may be induced by the release of GABA from SCN interneurons activated by glutamate released from aPVT terminals or from GABA released directly from aPVT terminals in the SCN. In the first case, the blockade of glutamate

would prevent both EPSPs and IPSPs. To isolate the GABAergic PSPs, 21 SCN neurons (13 at midday and 8 at midnight) were recorded in the presence of QX314; after basal recordings, APV and DNQX were added to the extracellular solution (Fig. 1D). Again neurons recorded during day or night behaved similarly, and thus the data were pooled. Blockade of glutamate transmission by APV and DNQX isolated a clear GABAergic component that was completely abolished by the application of bicuculline (Fig. 1D). These isolated PSPs showed the same latency as before administration of the glutamate antagonists (9.08 ± 1.2 msec before, 9.16 ± 1.05 msec after, *ns*, Wilcoxon test). The isolated GABA PSPs (Fig. 2B) at different holding potentials changed with respect to those recorded in basal conditions as a consequence of its reversal potential (-46.6 ± 5.4 mV), which determines the direction and magnitude of the current across the GABA_A receptor channel (Fig. 2D). The monosynaptic nature (Fig. 2F) and persistence of the IPSPs after blockade of glutamate receptors indicate that GABA is released from aPVT terminals in the SCN and did not result from activation of GABAergic SCN interneurons.

The Glycine Neurotransmitter Was Not Involved between aPVT and the SCN Pathway

To test whether glycine may be released from aPVT terminals to SCN neurons, we compared PSPs before and after strychnine administration in 11 SCN neurons held at a membrane potential of -75 mV. No differences were found in any of the

analyzed parameters (Fig. 1E) as follows (control, strychnine): amplitude (20.23 ± 2.95 , 20.88 ± 3.68 mV, Wilcoxon test, *ns*), synaptic latency (10.82 ± 1.01 , 10.82 ± 0.94 msec, Wilcoxon test, *ns*), and area under the curve (2.2 ± 0.06 , 2.5 ± 0.09 V², Wilcoxon test, *ns*).

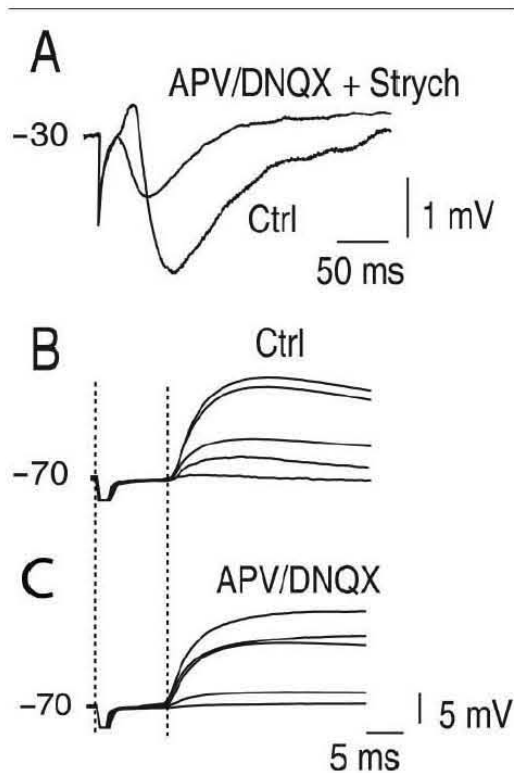


Figure 3. (A) Biphasic responses in the SCN neuron induced by minimal stimulation were observed at a holding potential of -30 mV, and administration of glutamatergic antagonists and strychnine abolished the excitatory postsynaptic potential (EPSP), revealing that both the EPSP and the inhibitory postsynaptic potential (IPSP) had a similar synaptic delay and increased the amplitude of the IPSP. The latency of the postsynaptic potentials remained the same at different stimulation intensities (from minimal to maximal) of the anterior paraventricular thalamus (aPVT) in (B) control recordings or (C) after APV/DNQX application. These results suggest simultaneous GABA and glutamate release from aPVT synaptic terminals in the SCN.

In these neurons, further bicuculline administration decreased the PSP in 8 neurons (73%) and increased the response in the 3 remaining neurons (27%). The residual component was completely abolished by DNQX and APV administration. These results provided evidence that glycine does not contribute to SCN synaptic responses to aPVT.

Is It Possible That a Terminal Could Release 2 Fast Amino Acid Transmitters?

Eight neurons treated with strychnine were also studied at -30 mV above the reversal potential of

GABA. In these neurons, aPVT stimulation produced an EPSP immediately followed by an IPSP; blockade of glutamate receptors by APV and DNQX dissected the IPSP sensitive to bicuculline. In this condition, we could appreciate that both EPSPs and IPSPs started simultaneously (Fig. 3A)—that is, they had the same synaptic delay, which is highly suggestive of release of both fast transmitters from the same terminal.

Previous data indicate that the stimulation protocol may activate presynaptic terminals from the aPVT containing both glutamate and GABA. To determine whether different stimulation intensities, from minimal to maximal values, may activate different fiber populations, we analyzed in 5 neurons the latencies of monosynaptic responses to 5 different stimulation intensities according to Uchigashima et al. (2007). No differences in the latency of PSPs were observed at any of the intensities used (Fig. 3B), as revealed by statistical comparison between minimal and maximal intensities (12.83 ± 0.44 msec and 12.33 ± 0.16 msec, respectively; Wilcoxon test, $p = 0.5$). Likewise, isolation of the GABAergic receptors by administration of APV and DNQX did not alter the latency to minimal or maximal stimulation intensities (12.5 ± 1.0 and 12.75 ± 0.75 , respectively; Wilcoxon test, *ns*; Fig. 3C).

DISCUSSION

We used 2 complementary criteria that have been shown to reliably characterize monosynaptic responses to study the connections between aPVT and SCN: (1) the ability of postsynaptic responses to follow high-frequency (20-Hz) stimulation, as well as the constancy of synaptic latencies to a low (5 Hz) and high (20 Hz) frequency of stimulation, and (2) 100% of responses with a constant synaptic delay in extracellular high calcium conditions (Berry and Cottrell, 1975; Berry and Pentreath, 1976; Zhang et al., 2006). Since the 2 criteria provide consistent results, we conclude that we recorded monosynaptic responses from SCN neurons.

When the action potentials from SCN neurons were blocked, the monosynaptic responses were either excitatory or inhibitory postsynaptic potentials. Pharmacological isolation of such components indicated that EPSPs involve AMPA and NMDA glutamate receptors. That glutamate could be a neurotransmitter in the synapses between aPVT and SCN neurons was previously suggested

by the uptake of radioactive glutamate injected in the SCN by aPVT terminals (Moga and Moore, 1996), as well as the report that electrical or chemical aPVT stimulation mimics the effects of photic retinal stimulation, which is mediated by glutamate, on the phase response curve of behavioral rhythmicity (Salazar-Juárez et al., 2002).

Since we were not aware of any previous indication of inhibitory neurotransmitters released from the paraventricular thalamus into the SCN, and GABA is the most abundant neurotransmitter in the SCN (Aguilar-Roblero et al., 1993; Moore and Speh, 1993; Itri et al., 2004), it is possible that GABA release may have originated from SCN interneurons activated by glutamate released from aPVT terminals. Nevertheless, the persistence of the PSPs after blockade of glutamate receptors and the fact that this response followed high frequencies of stimulation in the aPVT (Fig. 2F) indicate that GABA is released from aPVT terminals. Glutamatergic receptor antagonists isolated a clear IPSP when tested above -40 mV, but below -50 mV, they isolated an EPSP that had an amplitude that decreased with respect to the control; in either case, the remaining PSPs were completely abolished by the subsequent addition of bicuculline. The differences in the direction of the PSPs are a consequence of the chloride equilibrium potential because the reversion potential of the GABAergic component was -46.6 ± 5.4 mV. Finally, the lack of effect of strychnine on the PSPs clearly indicates that glycine is not a neurotransmitter between aPVT and SCN neurons.

For the past 2 decades, evidence has accumulated about the corelease of 2 fast neurotransmitters from the same neuron in the nervous system of vertebrates. Electrophysiological evidence of the corelease of 2 inhibitory neurotransmitters, GABA and glycine, was first obtained in interneurons from the spinal cord (Jonas et al., 1998). GABA and glutamate, the main inhibitory and excitatory fast neurotransmitters in the central nervous system, also are coreleased from mossy fibers in the hippocampus from kindled epileptic rats and hippocampal slices (Gutierrez, 2000) and in the developing auditory system in rats (Gillespie et al., 2005). The fixed PSPs' latency before and after administration of antagonist for GABA_A, glycine, or AMPA- and NMDA-glutamatergic receptors suggests that GABA may be simultaneously released with glutamate from aPVT terminals in the SCN (Gutierrez, 2000) and does not result from excitation of a GABAergic interneuron from the SCN or other of its afferents. In addition, monosynaptic responses from minimal to maximal stimulation have shown the same

latency as those evoked by maximal stimulation, and pharmacological dissection of glutamatergic and GABAergic components has shown the same latency for all components in response to minimal aPVT stimulation, which is consistent with the hypothesis of the corelease of GABA and glutamate from the same aPVT terminal in the SCN (Jonas et al., 1998; Gillespie et al., 2005). Further morphological studies demonstrating colocalization of GABA and glutamate in the same neuron, as well as simultaneous recording from 2 connected neurons in the aPVT and the SCN, are needed to demonstrate that corelease of 2 fast neurotransmitters occurs at this synapse.

We did not find day-night differences in SCN postsynaptic responses to aPVT. This result is not conclusive, and further studies are needed since it could be attributed to the small sample used during the night or to the use of whole-cell recordings together with the long time of the experiments. A previous work indicates the possibility of a washout of the intracellular second messenger in the SCN neurons after only 5-min recordings in whole-cell configuration (Schaap et al., 1999).

The SCN presents different functional states that fulfill its role as a circadian clock. Such functional states underlie the fact that the same light pulse can either delay or advance the circadian clock, or even have no effect, known as the phase response curve to light. This phenomenon is related to the activation of independent signaling pathways during early or late night (Gillette and Mitchell, 2002). Another example of different functional states is the switch of GABA effects from depolarization to hyperpolarization of SCN neurons throughout the circadian cycle (Wagner et al., 1997, 2001; Albus et al., 2005; Choi et al., 2008). The switch of functional states during development often involves a switch of GABA from a depolarizing to a hyperpolarizing neurotransmitter (Leinekugel et al., 1997; Gao et al., 1998). GABA release has been proposed as a synergic mechanism to glutamate transmission to ensure NMDA activation as part of the mechanism of synaptic consolidation during early development (Gillespie et al., 2005). It is thus possible that simultaneous release of GABA and glutamate from aPVT terminals may enhance or antagonize the effect of light pulses mediated by glutamate released from the retinohypothalamic tract onto SCN clock neurons (Hannibal, 2002), depending on whether GABA acts as an inhibitory or excitatory neurotransmitter. In the latter case, it may increase calcium influx into the neuron as previously described (Nabekura et al., 2004; Choi et al., 2008)

and thus enable a switch in the intracellular signaling pathway of SCN neurons from delays to advances at the appropriate phase of the circadian cycle. Further studies are necessary to test this hypothesis.

In conclusion, this is the first electrophysiological characterization of the synapse between aPVT and SCN neurons in the rat. The results demonstrate glutamate and GABA as the 2 fast neurotransmitters released by these terminals. Glutamate induces EPSPs by both AMPA/kainate and NMDA receptors with an inversion potential near 0 mV, while GABA induces PSPs involving GABA_A receptors with an inversion potential close to -45 mV. Further studies are still needed to understand the role of this SCN input in the regulation of the circadian clock.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially funded by grants IN227107 from the DGAPA/UNAM and from CONACyT 128528 and FONCICYT 91984 to RAR and a scholarship from CONACyT to JA. Drs. E. Galarraga, J. Segovia, M. Díaz-Muñoz, C. Colwell, and R. Romo provided valuable criticism and suggestions to the manuscript. We also thank Jose Luis Chavez for skilful technical assistance and Ana Escalante from the Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular. This work is a partial fulfillment of JA to obtain the Ph.D. program in Ciencias Biomédicas at the UNAM.

REFERENCES

- Aguilar-Roblero R, Verdusco-Carbajal L, Rodríguez C, Méndez-Franco J, Morán J, and de la Mora MP (1993) Circadian rhythmicity in the GABAergic system in the suprachiasmatic nuclei of the rat. *Neurosci Lett* 157:199-202.
- Albus H, Vansteensel MJ, Michel S, Block GD, and Meijer JH (2005) A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr Biol* 15:886-893.
- Bentivoglio M, Balerchia G, and Kruger L (1991) The specificity of the nonspecific thalamus: The midline nuclei. *Prog Brain Res* 87:53-80.
- Berry MS and Cottrell GA (1975) Excitatory, inhibitory and biphasic synaptic potentials mediated by an identified dopamine-containing neuron. *J Physiol* 244:589-612.
- Berry MS and Pentreath VW (1976) Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission. *Brain Res* 105:1-20.
- Bhatnagar S and Dallman MF (1999) The paraventricular nucleus of the thalamus alters rhythms in core temperature and energy balance in a state-dependent manner. *Brain Res* 851:66-75.
- Choi HJ, Lee CJ, Analyne S, Yoon SK, Jung SH, Kim JS, Kim DY, Son EJ, Han HC, Hong SK, et al. (2008) Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 28:5450-5459.
- Daan S and Pittendrigh CS (1976) A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: II. The variability of phase response curves. *J Comp Physiol* 106:253-266.
- Flores-Barrera E, Laville A, Plata V, Tapia D, Bargas J, and Galarraga E (2009) Inhibitory contribution to supra-threshold corticostriatal responses: An experimental and modeling study. *Cell Mol Neurobiol* 5:719-731.
- Gao XB, Chen G, and van den Pol AN (1998) GABA-dependent firing of glutamate-evoked action potentials at AMPA/kainate receptors in developing hypothalamic neurons. *J Neurophysiol* 79:716-726.
- Gillespie DC, Gunsoon K, and Kandler K (2005) Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci* 8:332-338.
- Gillette MU and Mitchell JW (2002) Signaling in the suprachiasmatic nucleus: Selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res* 309:99-107.
- Groenewegen HJ and Berendse HW (1994) The specificity of the "nonspecific" midline and intralaminar thalamic nuclei. *TINS* 17:52-57.
- Gutierrez R (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system. *J Neurophysiol* 84:3088-3090.
- Hannibal J (2002) Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 309:73-88.
- Hille B (2001) Ligand-gated channels of fast chemical synapses. In *Ion Channels of Excitable Membranes*, Hille B, ed, pp 169-199, Sinauer, Sunderland.
- Itri J, Michel S, Waschek JA, and Colwell CS (2004) Circadian rhythm in inhibitory synaptic transmission in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 92:311-319.
- Jonas P, Bischofberger J, and Sandkühler J (1998) Co-release of two fast neurotransmitters at a central synapses. *Science* 281:419-424.
- Leinekugel X, Medina I, Khalilov I, Ben-Ari Y, and Khazipov R (1997) Ca²⁺ oscillations mediated by the synergistic excitatory actions of GABA(A) and NMDA receptors in the neonatal hippocampus. *Neuron* 18:243-255.
- Moga MM and Moore RY (1996) Putative excitatory amino acid projections to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Brain Res* 743:171-177.
- Moga MM and Moore RY (2000) Paraventricular thalamus lesions alter circadian period and activity distribution in the blinded rat. *Biol Rhythm Res* 31:212-219.
- Moga MM, Weis RP, and Moore RY (1995) Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 359:221-238.
- Moore RY and Speh JC (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett* 150:112-116.
- Nabekura J, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Shibata S, Matsubara A, Jinno S, Mizoguchi Y, Sasaki A, and Ishibashi H (2004) Developmental switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals. *Nat Neurosci* 7:17-23.

- Novak CM, Smale L, and Nunez AA (2000) Rhythms in Fos expression in brain areas related to the sleep-wake cycle in the diurnal *Arvicantis niloticus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:1267-1274.
- Otake K, Ruggiero DA, and Nakamura Y (1995) Adrenergic innervation of forebrain neurons that project to the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *Brain Res* 697:17-26.
- Paxinos G and Watson C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Reppert SM and Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-941.
- Salazar-Juárez A, Escobar C, and Aguilar-Roblero R (2002) Anterior paraventricular thalamus modulates light-induced phase shifts in circadian rhythmicity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:897-904.
- Schaap J, Bos NP, de Jeu MT, Geurtsen AM, Meijer JH, and Pennartz CM (1999) Neurons of the rat suprachiasmatic nucleus show a circadian rhythm in membrane properties that is lost during prolonged whole-cell recording. *Brain Res* 815:154-166.
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J, and Galarraga E (2007) Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:10258-10263.
- Uchigashima M, Fukaya M, Watanabe M, and Kamiya H (2007) Evidence against GABA release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus. *J Neurosci* 27:8088-8100.
- Wagner S, Castel M, Gainer H, and Yarom Y (1997) GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature* 387:598-603.
- Wagner S, Sagiv N, and Yarom Y (2001) GABA-induced current and circadian regulation of chloride in neurones of the rat suprachiasmatic nucleus. *J Physiol* 537:853-869.
- Watts AG, Swanson LW, and Sanchez-Watts G (1987) Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of phaseolus vulgaris leucoagglutinin in the rat. *J Comp Neurol* 258:204-229.
- Zhang L, Kolaj M, and Renaud LP (2006) Suprachiasmatic nucleus communicates with anterior thalamic paraventricular nucleus neurons via rapid glutamatergic and gabaergic neurotransmission: State-dependent response patterns observed in vitro. *Neuroscience* 141:2059-2066.

Anexo II

Transworld Research Network
37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Comparative Aspects of Circadian Rhythms, 2008: 000-000 ISBN: 978-81-7895-329-8
Editors: María Luisa Fanjul-Moles and Raúl Aguilar Roblero

10

Neuronal activity in the suprachiasmatic nuclei: Cellular and molecular mechanisms

Raúl Aguilar-Roblero¹, Javier Alamilla¹, Clara Mercado¹
Vania Carmona-Alcocer¹ and Christopher S. Colwell²
Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de
Neurobiología, UNAM, Querétaro, QRO., México

1. Abstract

Humans and other organisms exhibit daily rhythms in their behavior and physiology. In mammals, the part of the nervous system responsible for most circadian behavior can be localized to a bilaterally paired structure in the hypothalamus known as the suprachiasmatic nucleus (SCN). Many neurons in the SCN are intrinsic oscillators that continue to generate near 24-hour rhythms in electrical activity, secretion, and gene expression when isolated from the rest of the

Correspondence/Reprint request: Dr. Raúl Aguilar-Roblero, Apdo., Postal 70-253, México D.F. 04510 México
E-mail: raguilar@ifc.unam.mx

Referencias

- Abrahamson EE, Moore RY (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res* 916:172-91.
- Aguilar-Roblero R, García-Hernández F, Aguilar R, Arankowsky-Sandoval G, Drucker-Colín R (1986) Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neurosci Lett* 69:47-52.
- Aguilar-Roblero R, Morin LP, Moore RY (1994) Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters. *Exp Neurol* 130:250-60.
- Aguilar-Roblero R, Morin LP, Moore RY (1994) Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus in hamsters. *Exp Neurol* 130:250-260.
- Aguilar-Roblero R, Shibata S, Speh JC, Drucker-Colín R, Moore RY (1992) Morphological and functional development of the suprachiasmatic nucleus in transplanted fetal hypothalamus. *Brain Res* 580:288-96.
- Antle MC, LeSauter J, Silver R (2005) Neurogenesis and ontogeny of specific cell phenotypes within the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Dev Brain Res* 157:8-18.
- Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR (2001) Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30:525-36.
- Berry MS, Pentreath VW (1976) Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission. *Brain Res* 105:1-20.
- Bouskila Y, Dudek FE (1995) A rapidly activating type of outward rectifier K⁺ current and A-current in rat suprachiasmatic nucleus neurones. *J Physiol* 488:339-50.

- Cermakian N, Monaco L, Pando MP, Dierich A, Sassone-Corsi P (2001) Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. *EMBO J* 20:3967-74.
- Cloues RK, Sather WA (2003) Afterhyperpolarization regulates firing rate in neurons of the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 23:1593-604.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995) Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477-505.
- De Jeu M, Geurtsen A, Pennartz C (2002) A Ba(2+)-sensitive K(+) current contributes to the resting membrane potential of neurons in rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 88:869-78.
- de Jeu MT, Pennartz CM (1997) Functional characterization of the H-current in SCN neurons in subjective day and night: a whole-cell patch-clamp study in acutely prepared brain slices. *Brain Res* 767:72-80.
- Debruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM (2006) A clock shock: mouse *CLOCK* is not required for circadian oscillator function. *Neuron* 50:465-77.
- Duncan GE, Knapp DJ, Breeze GR (1996) Neuroanatomical characterization of *FOS* induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* 713: 79-91.
- Dziema H, Obrietan K (2002) PACAP potentiates L-type calcium channel conductance in suprachiasmatic nucleus neurons by activating the MAPK pathway. *J Neurophysiol* 88:1374-86.
- Fei H, Grygoruk A, Brooks ES, Chen A, Krantz DE (2008) Trafficking of vesicular neurotransmitter transporters. *Traffic* 9:1425-1436.

- Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, Takahashi JS, Weitz CJ (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 280:1564-9.
- Gillespie DC, Gunsoon K, Kandler K (2005) Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nat Neurosci* 8:332-338.
- Green DJ, Gillette R (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res* 245:198-200.
- Groenewegen HJ, Berendse HW (1994) The specificity of the 'nonspecific' midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci* 17:52-7.
- Groos G, Hendriks J (1982) Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro. *Neurosci Lett* 34:283-8.
- Gutierrez R (2000) Seizures induce simultaneous GABAergic and glutamatergic transmission in the dentate gyrus-CA3 system *J Neurophysiol* 84:3088-3090.
- Gutierrez R (2002) Activity-dependent expression of simultaneous glutamatergic and GABAergic neurotransmission from the mossy fibers in vitro. *J Neurophysiol* 87:2562-2570.
- Hamada T, Antle MC, Silver R (2004) Temporal and spatial expression patterns of canonical clock genes and clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*. 19:1741-8.
- Hamaguchi H, Fujimoto K, Kawamoto T, Noshiro M, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Furukawa M, Honma S, Honma K, Kurihara H, Kato Y (2004) Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system. *Biochem J* 382:43-50.
- Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the

retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 17:2637-44.

Hannibal J, Moller M, Ottersen OP, Fahrenkrug J (2000) PACAP and glutamate are co-stored in the retinohypothalamic tract. *J Comp Neurol* 418:147-55.

Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA (1998) International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* 50:265-70.

Herzog ED, Takahashi JS, Block GD (1998) Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat Neurosci* 1:708-13.

Hille B (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. (Sunderland, Ma: Sinauer).

Huang RC (1993) Sodium and calcium currents in acutely dissociated neurons from rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 70:1692-703

Inouye ST, Kawamura H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:5962-6.

Itri J, Colwell CS (2003) Regulation of inhibitory synaptic transmission by vasoactive intestinal peptide (VIP) in the mouse suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 90:1589-97.

Itri JN, Michel S, Vansteensel MJ, Meijer JH, Colwell CS (2005) Fast delayed rectifier potassium current is required for circadian neural activity. *Nat Neurosci* 8:650-6.

Jiang ZG, Yang Y, Liu ZP, Allen CN (1997) Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices. *J Physiol* 499:141-59.

- Jiao YY, Lee TM, Rusak B (1999) Photic responses of suprachiasmatic area neurons in diurnal degus (*Octodon degus*) and nocturnal rats (*Rattus norvegicus*). *Brain Res* 817:93-103.
- Jiao YY, Rusak B (2003) Electrophysiology of optic nerve input to suprachiasmatic nucleus neurons in rats and degus. *Brain Res* 960:142-51.
- Jo YH, Schlichter R (1999) Synaptic co-release of ATP and GABA in cultured spinal neurons *Nat Neurosci* 2:241-245.
- Jobst EE, Allen CN (2002) Calbindin neurons in the hamster suprachiasmatic nucleus do not exhibit a circadian variation in spontaneous firing rate. *Eur J Neurosci* 16:2469-74.
- Jonas P, Bischofberger J Sandkühler J (1998) Co-release of two fast neurotransmitters at a central synapses. *Science* 281:419-424.
- Jonson MD (1994) Synaptic glutamatergic release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture. *Neuron* 12:433-442.
- Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Iwata T, Fujimoto K, Furukawa M, Miyazaki K, Honma S, Honma K, Kato Y (2004) A novel autofeedback loop of *Dec1* transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 313:117-24.
- Kim YI, Dudek FE (1992) Intracellular electrophysiological study of suprachiasmatic nucleus neurons in rodents: inhibitory synaptic mechanisms. *J Physiol* 458:247-60.
- Kim YI, Dudek FE (1993) Membrane properties of rat suprachiasmatic nucleus neurons receiving optic nerve input. *J Physiol* 464:229-43.
- Klein, D.C., Moore, R.Y. & Reppert, S.M. (1991) Suprachiasmatic nucleus. In: *The Mind's Clock*. New York: Oxford Univ. Press.

- Kononenko NI, Dudek FE (2004) Mechanism of irregular firing of suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slices. *J Neurophysiol* 91:267-73.
- Kononenko NI, Kuehl-Kovarik MC, Partin KM, Dudek FE (2008) Circadian difference in firing rate of isolated rat suprachiasmatic nucleus neurons. *Neurosci Lett* 436:314-6.
- Kotak VC, Korada S, Schwartz IR, Sanes DH (1998) A developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission in the central auditory system. *J Neurosci* 18:4646-4655.
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98:193-205.
- Lall GS, Biello SM (2003) Attenuation of circadian light induced phase advances and delays by neuropeptide Y and a neuropeptide Y Y1/Y5 receptor agonist. *Neuroscience* 119:611-8.
- Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M, Bittman EL (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *J Neurosci*. 7:1626-38.
- Lewin B (2000) *Genes VIII*. (Oxford: University Press).
- Li W C, Soffe SR, Roberts A (2004) Glutamate and acetylcholine co-release at developing synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15488-15493.
- Liou SY, Shibata S, Iwasaki K, Ueki S (1986) Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res Bull* 16:527-31.

- Lundberg JM, Hökfelt T (1983) Coexistence of peptides and classical neurotransmitters. *TINS* 6:325-333.
- Maher BJ, Westbrook GL (2008) Co-transmission of dopamine and GABA in periglomerular cells. *J Neurophysiol* 99:1559-1564.
- Michel S, Itri J, Colwell C (2002) Excitatory Mechanisms in the Suprachiasmatic Nucleus: The Role of AMPA/KA Glutamate Receptors. *J Neurophysiol* 88:817–828.
- Miller JD, Fuller CA (1990) The response of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and serotonergic stimulation. *Brain Res* 515:155-62.
- Moga MM, Moore RY (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 389:508-34.
- Moga MM, Weis RP, Moore RY (1995) Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 359:221-38.
- Moore RY, Leak RK (2001) Cap.6. Suprachiasmatic nucleus. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology Circadian Clocks*; Vol.12; J.S. Takahashi, F.W. Tore, R.Y. Moore (eds.); Kluwer Academic, Plenum Publishers; New York; 7-35.
- Moore RY, Eichler VB (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 42:201-206.
- Nabekura J, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Shibata S, Matsubara A, Jinno S, Mizoguchi Y, Sasaki A, Ishibashi H (2004) Developmental switch from GABA to glycine release in single central synaptic terminals *Nat Neurosci* 7:17-23.
- Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O (2005) Mammalian motor neurons co-release glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5245-5249.

- Novak CM, Nunez AA (1998) Daily rhythms in Fos activity in the rat ventrolateral preoptic area and midline thalamic nuclei. *Am J Physiol* 275:1620-6.
- Novak CM, Smale L, Nunez AA (2000) Rhythms in Fos expression in brain areas related to the sleep-wake cycle in the diurnal *Arvicanthis niloticus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:1267-74.
- Osborne NN (1979) Is Dale's principle valid? *TINS* 2:73-75.
- Paxinos G, Watson C (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (San Diego: Academic Press).
- Pennartz CM, Bierlaagh MA, Geurtsen AM (1997) Cellular mechanisms underlying spontaneous firing in rat suprachiasmatic nucleus: involvement of a slowly inactivating component of sodium current. *J Neurophysiol* 78:1811-25.
- Pennartz CM, de Jeu MT, Bos NP, Schaap J, Geurtsen AM (2002) Diurnal modulation of pacemaker potentials and calcium current in the mammalian circadian clock. *Nature* 416:286-90.
- Pennartz CM, Hamstra R, Geurtsen AM (2001) Enhanced NMDA receptor activity in retinal inputs to the rat suprachiasmatic nucleus during the subjective night. *J Physiol* 532:181-94.
- Pickard GE (1994) Intergeniculate leaflet ablation alters circadian rhythms in the mouse. *Neuroreport* 5:2186-8.
- Pitts GR, Ohta H, McMahon DG (2006) Daily rhythmicity of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ currents in suprachiasmatic nucleus neurons. *Brain Res* 1071:54-62.
- Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 110:251-60.

- Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-8.
- Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418:935-41.
- Roig JA, Granados-Fuentes D, Aguilar-Roblero R (1997) Neuronal subpopulations in the suprachiasmatic nuclei based on their response to retinal and intergeniculate leaflet stimulation. *Neuroreport* 8:885-9.
- Saeb-Parsy K, Dyball RE (2003) Defined cell groups in the rat suprachiasmatic nucleus have different day/night rhythms of single-unit activity in vivo. *J Biol Rhythms* 18:26-42.
- Salazar-Juárez A, Escobar C, Aguilar-Roblero R (2002) Anterior paraventricular thalamus modulates light-induced phase shifts in circadian rhythmicity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: 897-904.
- Sato TK, Yamada RG, Ukai H, Baggs JE, Miraglia LJ, Kobayashi TJ, Welsh DK, Kay SA, Ueda HR, Hogenesch JB (2006) Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. *Nat Genet* 38:312-9.
- Schwartz WJ, Gainer H (1977) Suprachiasmatic nucleus: use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science* 197:1089-91.
- Seal RP, Edwards RP (2006) Functional implications of neurotransmitter co-release: glutamate and GABA share the load. *Curr Opin Pharmacol* 6:114-119.
- Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271:216-9.
- Shibata S, Oomura Y, Kita H, Hattori K (1982) Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res* 247:154-8.

- Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN (1996) A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 382:810-3.
- Stanewsky R (2003) Genetic analysis of the circadian system in *Drosophila melanogaster* and mammals. *J Neurobiol* 54:111-47.
- Stephan FK, Zucker I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:1583-6.
- Strecker GJ, Wuarin JP, Dudek FE (1997) GABAA-mediated local synaptic pathways connect neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 78:2217-20.
- Su HS, Bentivoglio M (1990) Thalamic midline cell populations projecting to the nucleus accumbens, amygdala, and hippocampus in the rat. *J Comp Neurol* 297:582-93.
- Tecuapetla F, Carrillo-Reid L, Bargas J, Galarraga E (2007) Dopaminergic modulation of short-term synaptic plasticity at striatal inhibitory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10258-63.
- Teshima K, Kim SH, Allen CN (2003) Characterization of an apamin-sensitive potassium current in suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuroscience* 120:65-73.
- Triqueneaux G, Thenot S, Kakizawa T, Antoch MP, Safi R, Takahashi JS, Delaunay F, Laudet V (2004) The orphan receptor Rev-erb alpha gene is a target of the circadian clock pacemaker. *J Mol Endocrinol* 33:585-608.
- Uchigashima M, Fukaya M, Watanabe M, Kamiya H (2007) Evidence against GABA release from glutamatergic mossy fiber terminals in the developing hippocampus. *J Neurosci* 27:8088-8100.

- van den Pol AN, Strecker GJ, Dudek FE (1996) Excitatory and inhibitory amino acids and synaptic transmission in the suprachiasmatic nucleus. *Prog Brain Res* 111:41-56.
- Vindlacheruvu RR, Ebling FJ, Maywood ES, Hastings MH (1992) Blockade of Glutamatergic Neurotransmission in the Suprachiasmatic Nucleus Prevents Cellular and Behavioural Responses of the Circadian System to Light. *Eur J Neurosci* 4:673-679.
- Vitaterna MH, Selby CP, Todo T, Niwa H, Thompson C, Fruechte EM, Hitomi K, Thresher RJ, Ishikawa T, Miyazaki J, Takahashi JS, Sancar A (1999) Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12114-9.
- Weber ET, Rea MA (1997) Neuropeptide Y blocks light-induced phase advances but not delays of the circadian activity rhythm in hamsters. *Neurosci Lett* 231:159-62.
- Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* 14:697-706.
- Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 302:1408-12.
- Yu W, Nomura M, Ikeda M (2002) Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. *Biochem Biophys Res Commun* 290:933-41.
- Zhang L, Aguilar-Roblero R, Barrio RA (1992) A new pattern of neuronal firing in the suprachiasmatic nucleus in vitro and a possible mechanism which induces rhythmicity. *Bol Estud Med Biol* 40:31-40.

Zhang L, Kolaj M, Renaud LP (2006) Suprachiasmatic nucleus communicates with anterior thalamic paraventricular nucleus neurons via rapid glutamatergic and gabaergic neurotransmission: state-dependent response patterns observed in vitro. *Neuroscience* 141:2059-66