

03086
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

MODULACION DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA DEL
NUCLEO SUPRAQUIASMATICO POR SUS
AFERENTES VISUALES Y NO VISUALES

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
PRESENTA EL M. EN C.
DANIEL GRANADOS FUENTES

280228

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAUL AGUILAR ROBLERO

MEXICO, D. F.,

2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente tesis se llevó a cabo en el Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, UNAM con el apoyo de los proyectos DGAPA IN-206697 y CONACyT LN0024-N9607 otorgados al Dr. Raúl Aguilar Roblero y del apoyo de PAEP y beca de la DGEP otorgados a Daniel Granados Fuentes.

DEDICO ESTA TESIS A MI ESPOSA TERESA Y MI HIJO OSCAR QUIENES DE DIVERSAS FORMAS ME HAN APOYADO TANTO EN MIS ESTUDIOS, EN AGRADECIMIENTO POR LOS GRATOS MOMENTOS QUE ME HAN DADO Y COMO UNA FORMA DE DECIRLES CUANTO LOS AMO.

TAMBIÉN LA DEDICO A MIS PADRES Y A MIS HERMANOS EN AGRADECIMIENTO DEL APOYO RECIBIDO TODA MI VIDA Y COMO UNA MUESTRA DEL CARÍÑO QUE LES TENGO.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Raúl Aguilar Roblero por todo el apoyo, los consejos y la amistad recibidos por parte de él.

Al comité tutorial formado por el Dr. Hugo Aréchiga, Dra. María Luisa Fanjul, Dra. Limei Zhang, Dra. Carolina Escobar, Dr. León Cintra, Dr. Marcos Velasco y Dr. Raúl Aguilar por sus comentarios para el mejoramiento de la tesis.

A todos mis amigos y compañeros dentro y fuera de laboratorio.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	4
1.1 DEFINICIONES Y PRINCIPIOS BÁSICOS	5
1.2 LOS RITMOS CIRCADIANOS	8
1.2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS	8
1.3 BASES FISIOLÓGICAS DE LOS RITMOS CIRCADIANOS	10
1.3.1 COMPONENTES Y FUNCIONES DEL SISTEMA CIRCADIANO	10
1.4 NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO	14
1.4.1 ORGANIZACIÓN Y FUNCIÓN	14
1.4.2 ANATOMIA DEL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO	14
1.5 ASPECTOS FUNCIONALES DEL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO	16
1.5.1 RITMOS ENDÓGENOS	16
1.6 AFERENTES AL NUCLEO SUPRAQUIASMÁTICO	18
1.6.1 TRACTO RETINO-HIPOTALÁMICO	18
1.6.2 TRACTO GENICULO-HIPOTALÁMICO	21
1.6.3 TRACTO SEROTONINÉRGICO	23
1.6.4 NUCLEO PARAVENTRICULAR TALÁMICO	25
1.7 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	27
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
4. MÉTODO	35
5. RESULTADOS	47
6. DISCUSIÓN	77
7. CONCLUSIONES	85
8. REFERENCIAS	87

RESUMEN

Algunos estudios anatómicos y conductuales han mostrado la interacción de aferentes en el NSQ, sin embargo la relevancia funcional de la aferente originada en el núcleo paraventricular talámico (PVT) y su interacción con el tracto retino-hipotalámico (RHT) no ha sido establecida. Se ha reportado la presencia de canales o vías neuronales en el NSQ involucradas en la integración de información luminosa entre la retina y la hojuela intergeniculada (HIG) en estudios electrofisiológicos previos. Para establecer si existe una organización funcional similar para la retina y el PVT estudiamos los efectos de estimulación independiente y simultánea de estas estructuras sobre la actividad eléctrica espontánea y la inmunoreactividad a C-FOS en el NSQ.

Electrofisiología. Para los experimentos electrofisiológicos habituamos ratas a un ciclo de iluminación 12:12 (encendido de luz a las 8:00 h). Las ratas se anestesiaron (a las 9:00 am) con halotano y un microelectrodo bipolar se colocó en el PVT (P:3.5;L:0;V:5.8). La actividad eléctrica extracelular del NSQ de las ratas se registró con microelectrodos de vidrio y la señal registrada se almacenó en cinta magnética. Los animales recibieron un pulso de luz en la retina o un pulso eléctrico en el PVT y la respuesta se registró en el NSQ. El protocolo de estimulación utilizado consistió de la aplicación de 100 pulsos de sincronía (registro control), 100 pulsos de luz (600 lux) a la retina, 100 pulsos eléctricos (0.6 mA) al PVT y finalmente 100 pulsos de luz y pulsos eléctricos presentados simultáneamente. La duración y la frecuencia de estimulación para los pulsos de luz y los eléctricos fueron de 5 msec y 0.5 Hz respectivamente.

Se registraron un total de 164 neuronas de las cuales 43 se ubicaron dentro del NSQ, las restantes 121 neuronas (no-NSQ) se ubicaron en las áreas hipotalámicas circundantes. Según el análisis CUSUM, 26 de las neuronas del NSQ respondieron a algún tipo de estimulación: 16 respondieron a ambos tipos de estímulos, 4 a la estimulación retinal y 6 a la estimulación del PVT. De las neuronas no-NSQ, 77 respondieron a algún tipo de estímulo: 50 respondieron a ambos tipos de estimulación, 3 a la estimulación retinal y 24 a la estimulación de PVT.

Inmunoreactividad a C-FOS. Para los experimentos de C-FOS se habituaron ratas a un ciclo luz-oscuridad invertido 12:12 (encendido de luces a las 20:00 h), las ratas se anestesiaron con halotano y se colocó un electrodo bipolar soldado a un conector para la estimulación en el PVT. El protocolo de estimulación consistió para el grupo control en tener a las ratas sin ningún tipo de estimulación, un pulso de luz a la retina (600 lux) por 30 min., pulsos eléctricos al PVT (0.3 mA) de 2 msec de duración y una frecuencia de 10 Hz por 30 min., y finalmente un pulso de luz y pulsos eléctricos presentados simultáneamente. La estimulación se aplicó a ZT 16. El tejido cerebral se procesó para inmunoreactividad a C-FOS utilizando el método de avidina-biotina. El número de células inmunoreactivas a C-FOS se contó mediante métodos estereológicos. El área total, la densidad y el número total de células en el NSQ fueron determinados. La luz y los pulsos de luz+pvt indujeron un aumento significativo en la densidad de inmunoreactividad a C-FOS mientras que la estimulación a PVT indujo una fuerte tendencia a la disminución de inmunoreactividad en el NSQ. Más interesante es el hecho que en el NSQ el pulso de luz induce C-FOS casi exclusivamente en la región ventrolateral y que cuando nosotros ponemos juntos los dos estímulos la inmunoreactividad aparece en la región ventrolateral y en la dorsomedial del NSQ.

En conclusión, la evidencia electrofisiológica y de expresión de C-FOS muestra la existencia de convergencia de información en el NSQ que modula la actividad de sus

SUMMARY

Some anatomical and behavioural studies have evidenced an interaction of afferents in the SCN, however the functional relevance of the afferent originated from the paraventricular thalamic nucleus (PVT) and its interaction with the retino-hypothalamic tract (RHT) has not been established. We have reported the presence of neuronal pathways in the SCN involved in the integration of light information from the retina and the intergeniculate leaflet (IGL) from electrophysiological studies. To establish whether a similar functional organisation occurs for retinal and PVT inputs to the SCN, we studied the effects of independent and simultaneous stimulation of these structures on spontaneous electrical activity and C-FOS immunoreactivity in the SCN.

Electrophysiology. For electrophysiological experiments rats were maintained in a 12:12 light-dark cycle (lights on at 8:00 h). The rats were anaesthetised (at 9:00 am) with halothane and a bipolar microelectrode was placed in the PVT (P:3.5;L:0;V:5.8). The extracellular electrical activity at the SCN of rats was recorded with glass microelectrodes and the signal was stored in a magnetic tape. The animals received either a light pulse in the retina or an electrical pulse in the PVT and the response was recorded in the SCN. The stimulation protocol consisted of the application of 100 synchronised pulses (control record), 100 light pulses (600 lux) to the retina, 100 electrical pulses (0.6 mA) to PVT and finally 100 light and electrical pulses presented simultaneously. The duration and a frequency of stimulation for the light and electrical pulses were of 5 msec and 0.5 Hz respectively.

A total of 164 neurons were recorded and 43 of these neurons were located within the SCN, the remaining 121 neurons (non-SCN) were located in the surrounding hypothalamic areas. According to the CUSUM analysis, 26 of the SCN neurons responded to some type of stimulation: 16 responded to both types of stimuli, 4 to retinal stimulation and 6 to PVT stimulation. From non-SCN neurons 77 responded to some type of stimuli, of these neurons: 50 responded to both types of stimuli, 3 to retinal stimulation and 24 to PVT stimulation.

C-FOS immunoreactivity. For C-FOS experiments rats were maintained in an inverted 12:12 light-dark cycle (lights on at 20:00 h), then the rats were anaesthetised with halothane and a bipolar electrode with a connector for stimulation was placed in the PVT. The stimulation protocol consisted of no application of any type of stimulation (control), one light pulse to the retina (600 lux) for 30 min, electrical pulses to PVT (0.3 mA) of 2 msec of duration and a frequency of 10 Hz for 30 min, and finally light and electrical pulses presented simultaneously. The stimulation was applied at ZT 16 (12:00 h). The brain tissue was processed for C-FOS immunoreactivity using the avidin-biotin method. The number of immunoreactive C-FOS cells was counted through stereological methods. The total area as well as the density and the total number of cells in the SCN were determined. Light and light+pvt pulses induced a significative increase in the density of C-FOS immunoreactivity and the PVT stimulation induced a strong tendency to decrease immunoreactivity on the SCN. In the SCN the light pulse induced C-FOS immunoreactivity almost exclusively in the ventrolateral region and with both stimuli the immunoreactivity appeared in the ventrolateral and in the dorsomedial regions of the SCN.

In conclusion, the electrophysiological and C-FOS experiments show strong evidence of information convergence in the SCN that modulates the activity of their neurons, and this modulation is different from that observed in IGL experiments.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de algunos procesos fisiológicos y conductuales ha conducido al cuestionamiento de los conceptos formulados dentro del término de homeostasis y no es sino hasta que muy recientemente han sido propuestas alternativas, que han permitido ampliar nuestra visión acerca de los principios generales de regulación fisiológica. En particular nos referimos al concepto de regulación temporal (Cronostasis).

Existe una gran cantidad de evidencia que muestra que la mayoría de los organismos poseen un sistema fisiológico de regulación temporal endógena que es corregido al tiempo local por señales ambientales (DeCoursey, 1989). El sistema de regulación temporal puede ser usado como un cronómetro consultado continuamente para regular la orientación celestial y la navegación en animales migratorios (Hoffmann, 1982) o para coordinar procesos internos múltiples tanto fisiológicos como conductuales (Pittendrigh, 1993).

Pittendrigh (1993) postuló que los organismos en sus orígenes se sometieron al orden temporal impuesto por el ambiente y conforme éstos evolucionaron dicho orden fue codificado en la información genética dando origen a su propia organización temporal. Así, las semejanzas entre los ciclos ambientales y los biológicos se explicarían porque inicialmente los últimos dependían de los primeros, mientras que sus diferencias se deberían a las características particulares de los organismos para adaptarse al ambiente.

Actualmente es bien conocido que la mayoría de las variables fisiológicas y algunos procesos conductuales presentan variaciones con frecuencias que van desde varios ciclos por segundo hasta un ciclo por año (Aschoff, 1990), a estas variaciones se les conoce como ritmos biológicos. De este espectro, los ritmos biológicos más estudiados son los

circadianos.

1.1 DEFINICIONES Y PRINCIPIOS BASICOS

En cualquier sistema que se examine se pueden encontrar variaciones que no son dadas al azar. Muchos de estos cambios dependientes del tiempo son recurrentes en intervalos regulares lo que da lugar a un ritmo, el cual es en alto grado predecible.

El espectro de variaciones rítmicas que pueden ser encontrados en la naturaleza presenta rangos que van desde las fracciones de segundo como la frecuencia de disparo de neuronas hasta los segundos como en los ciclos cardiaco y respiratorio y pocas horas como ocurre en ciertos parámetros endócrinos. Los ritmos cercanos a las 24 h conocidos como circadianos son encontrados casi en todas las células y parámetros fisiológicos. Las variaciones de oscilaciones con periodos menores a las 24 h (frecuencias altas) son llamadas ritmos ultradianos. Los ritmos que por el contrario presentan un periodo mayor al circadiano son los llamados ritmos infradianos que incluyen entre otros a ritmos con periodos de una semana, ritmos con periodos de un mes y ritmos con periodos cercanos a un año. Debido a que este trabajo aborda el estudio de la regulación circadiana las definiciones y principios básicos se referirán a los ritmos circadianos.

En una oscilación circadiana se pueden determinar las siguientes características: el periodo, la media o MESOR, la amplitud, la forma de la onda, la fase y la relación de fase (Fig. 1).

Un ritmo representa una oscilación recurrente y la unidad de repetición es referida como un ciclo. El tiempo requerido para completar un ciclo es referido como periodo (el cual es recíproco de la frecuencia) comúnmente expresado en unidades de tiempo (Fig.1B).

El valor promedio de un ritmo puede ser representado idealmente por el promedio de todos los valores instantáneos de la variable oscilante dentro de un periodo. Sin embargo, en series de tiempo biológicas las medidas continuas son rara vez encontradas. Los datos disponibles son más frecuentemente puntos de una variable rítmica obtenidos en intervalos discretos. En el último caso, la media aritmética no representará correctamente el promedio del ritmo. El ritmo bajo estudio puede ser aproximado y definido por un modelo matemático como por ejemplo una curva coseno, o por un ajuste de la media del ritmo o MESOR (por Midline Estimating Statistic Of Rhythm). El MESOR por lo tanto representa el valor medio entre el valor más alto y el valor más bajo de la función usada para aproximar el ritmo. En el ajuste de un modelo sinusoidal, el MESOR (Fig. 1a,b,c) será igual a la media aritmética de los datos solo si los datos fueran obtenidos a intervalos iguales sobre un ciclo entero del ritmo (o múltiplos del mismo) (Haus y Touitou, 1994).

La extensión o amplitud de una oscilación puede ser expresada por su rango, es decir por la diferencia entre el valor máximo y mínimo dentro de un periodo. La diferencia entre el punto más alto y más bajo de un modelo matemático (Fig. 1a,b,c) puede ser considerablemente diferente de todo el rango de datos. Esta diferencia puede ser dada a la no "sinusoidalidad" de la variable medida (Haus y Touitou, 1994). La forma de la oscilación puede ser vista como la desviación de la forma respecto a una onda sinusoidal pura.

La fase tiene varios significados, en su definición más estricta se refiere al estado instantáneo de una variable dentro de un ciclo en un tiempo dado (por ejemplo el máximo o el mínimo). La fase de un ritmo nos dice la posición de la variable en el tiempo. Un cambio de fase implica que al mismo tiempo un ritmo retiene su forma original pero es desplazado

a lo largo del eje del tiempo. Un cambio de fase puede ser descrito como un avance o un retraso de fase para describir la dirección del desplazamiento en el tiempo. Así, un avance de fase significa que cada punto del ritmo ocurre un poco más temprano, mientras que el retraso significa que cada punto del ritmo ocurrió más tarde de lo esperado. Si un sistema oscilante contiene más de una variable, una segunda característica importante es la relación de fase entre las variables (Minors y Waterhouse, 1981,1988) (Fig. 1b y c).

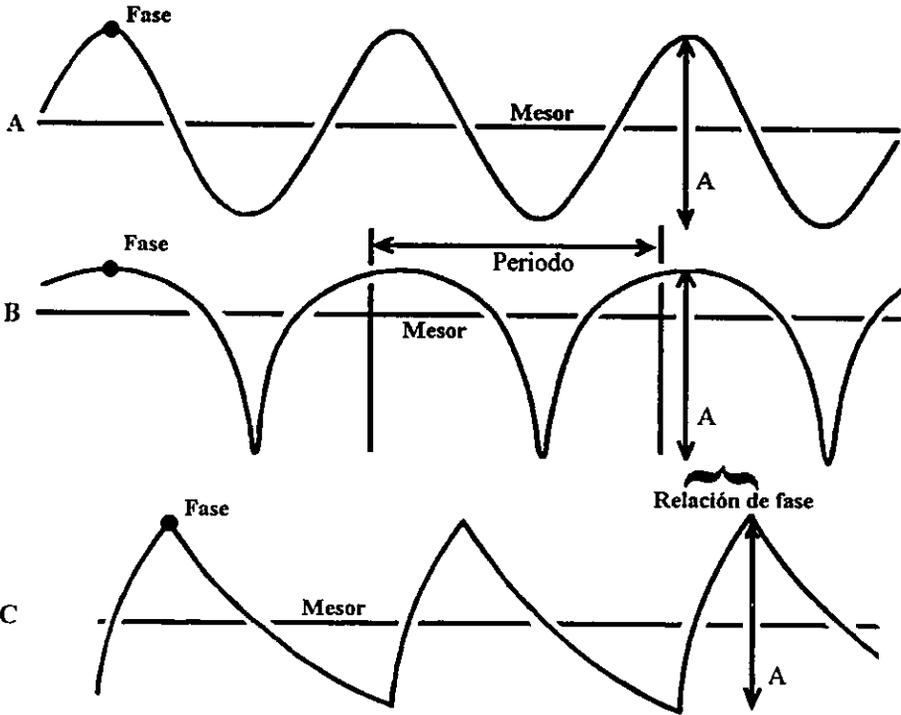


Fig. 1. Representación de tres oscilaciones (A,B y C) que muestran distinta forma, en todas ellas se pueden apreciar el periodo (solo marcado en la oscilación B), la amplitud (A), la fase, la media o MESOR, y la relación de fase que existe entre los puntos de mayor actividad entre la oscilación B y la C.

1.2 LOS RITMOS CIRCADIANOS

1.2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

El término CIRCADIANO (del latín *circa*-cerca y *dies*-día) fue introducido por Franz Halberg (1959) para describir los ritmos biológicos que presentaban un periodo de aparición de aproximadamente 24 h los cuales son generados en forma endógena por los organismos (Moore-Ede, 1982).

El estudio de un ritmo circadiano como una propiedad del organismo vivo se inicia formalmente con el trabajo de Jean Jacques d'Ortous de Mairan en 1729, quien publicó en *L'Academie Royale des Sciences* de París un estudio de los movimientos de las hojas y pedicelos de una planta heliotrópica "sensible" (*Mimosa pudica*). Esta planta abría sus hojas y pedicelos durante el día y los cerraba durante la noche. Cuando de Mairan colocó la planta en un lugar donde la luz solar no la podía alcanzar y la temperatura se mantenía constante, la planta aún abría sus hojas de la misma forma que lo hacía en condiciones naturales. Este fue el primer experimento que demostró la persistencia de los ritmos circadianos en ausencia de señales ambientales externas y dió margen a pensar en la existencia de un reloj endógeno circadiano que regulaba el tiempo interno. Esta observación fue seguida en 1745 por el diseño de un "reloj floral" por K. Linné, quien mostró que a ciertas horas relacionadas con la posición del sol las flores y algunas especies de plantas estaban abiertas mientras que otras permanecían cerradas (Fig. 2).

Más tarde Augustin de Candolle, Dutrochet, Sachs y Hofmeister también se interesaron en el movimiento periódico de las hojas. A partir de sus experimentos concluyeron que dichos movimientos eran causados por la existencia de un ritmo diurno inherente a la planta el cual estaba sincronizado al ciclo luz-oscuridad (LO). Otros

experimentos importantes son los realizados por el mismo de Candoille (1832) utilizando leguminosas mantenidas en luz u oscuridad continua o bajo diferentes esquemas LO. A partir de estos experimentos concluyó que había una tendencia inherente de las plantas a mostrar movimientos periódicos y que además las hojas se abrían una hora ó dos más temprano cada día en condiciones constantes, es decir que desplegaban una periodicidad de 22 a 23 h. Esta fue de las primeras demostraciones que indicaban que el reloj circadiano podía "correr libremente" con su propio periodo endógeno (τ).

Eine Blumen-Uhr



Fig. 2. Reloj floral elaborado por K. Linné.

El fisiólogo vegetal Wilhelm Pfeffer quien fue el primero que introdujo métodos fisicoquímicos en el campo de la fisiología vegetal, originalmente dudó de los resultados obtenidos por los otros autores. En 1873 Pfeffer sugirió que dichos datos habían resultado de experimentos en donde existían fugas de luz en los cuartos oscuros donde se llevaban a cabo las mediciones. Por el año de 1875 sus propias observaciones despejaron sus dudas y corroboró la persistencia del ritmo del movimiento de las hojas en oscuridad constante. Sin embargo, él interpretó sus resultados no como una periodicidad propia de la planta sino más bien como un post-efecto por la exposición previa a un ciclo LO. Darwin en su libro *On the Power of Movement in Plants* (1880) indicó que él creía que la periodicidad diurna del movimiento de las hojas era una propiedad inherente de las plantas.

En 1940, Johnson llevó a cabo experimentos en ratones para ver como era la actividad que presentaban en la presencia de ruedas de ejercicio, Johnson observó que los roedores seguían manteniendo un patrón temporal en presencia ó ausencia de ciclos de iluminación. Este investigador reportó que los ratones parecían tener un reloj para controlar el patrón conductual visto en sus animales. Más tarde, Colin S. Pittendrigh de sus experimentos propuso que todos los organismos tenían relojes y lo más importante era que éstos relojes regulaban la expresión temporal de los ritmos conductuales.

1.3 BASES FISIOLÓGICAS DE LOS RITMOS CIRCADIANOS.

1.3.1 COMPONENTES Y FUNCIONES DEL SISTEMA CIRCADIANO.

Los ritmos endógenos son resultado de una serie de mecanismos fisiológicos encargados de generar y mantener la organización temporal de los organismos, los cuales conforman el denominado sistema circadiano (Pittendrigh, 1993). Los procesos que regula

este sistema son: 1) la generación de las oscilaciones (cronometría); 2) La sincronización de la ritmicidad a los ciclos ambientales; 3) El acoplamiento entre los osciladores del organismo para lograr su funcionamiento coordinado y 4) La transmisión de las oscilaciones a los sistemas efectores que expresan la ritmicidad.

Cronometría.

Un reloj biológico es el componente del sistema circadiano que tiene la capacidad de generar una oscilación utilizada por los organismos para medir el tiempo aún en ausencia de entradas cíclicas ambientales (Aschoff, 1990). En los mamíferos el núcleo supraquiasmático (NSQ) funciona como un oscilador circadiano. La evidencia que apoya esta afirmación consiste en experimentos de lesión, de estimulación eléctrica o química, de persistencia de la ritmicidad eléctrica y metabólica en el NSQ cuando es aislado del resto del organismo y de trasplantes de NSQ fetal a sujetos arrítmicos por la lesión del NSQ que restituyen los ritmos en la conducta locomotora (Klein y cols., 1991).

Sincronización.

En condiciones naturales el ambiente geofísico presenta diversas variaciones cíclicas que afectan a los organismos, por lo que la ritmicidad biológica no muestra su oscilación espontánea. Esto se manifiesta en forma más notable en el periodo de la ritmicidad biológica y su relación de fase con los ciclos ambientales. A este fenómeno se le llama sincronización, es decir, la condición en la cual el periodo endógeno y la fase de un oscilador se ajustan al periodo y la fase de algún estímulo cíclico externo. Su importancia radica en que permite el ajuste o adecuación del tiempo biológico con el geofísico. Se ha

mostrado que una variedad de fenómenos ambientales funcionan como estímulos sincronizadores de los ritmos endógenos, entre los que se encuentran la luz, la temperatura, la disponibilidad de alimento, el sonido y señales sociales. De las anteriores, las variaciones de iluminación del ciclo día-noche presentan la mayor estabilidad en su periodo y fase, lo que los hace más predecibles y la principal señal de sincronización ambiental (Moore-Ede, 1982).

Debido a la importancia del NSQ como el oscilador circadiano en mamíferos, es de suponer que sus conexiones aferentes estén involucradas en los procesos de sincronización. Las principales aferentes del núcleo se originan en la retina formando el tracto retino-hipotalámico (TRH), la hojuela intergeniculada (HIG) formando el tracto genículo-hipotalámico (TGH), el rafé medial, el núcleo paraventricular talámico (PVT) y las áreas hipotalámicas adyacentes las cuales participan en diversos aspectos de sincronización.

Acoplamiento.

Además del NSQ otras estructuras hipotalámicas como el núcleo ventromedial y el hipotálamo lateral, han sido propuestas como osciladores. Esto refleja la concepción contemporánea de un sistema de osciladores múltiples. El funcionamiento óptimo del sistema circadiano resulta de la integración de información entre los distintos osciladores del sistema. Dicha integración se lleva a cabo por un proceso de acoplamiento entre los diferentes osciladores del sistema, donde entendemos por acoplamiento a la capacidad de un oscilador con periodo y fase propia de ajustar dichos parámetros a los de otros elementos osciladores con los que tiene la capacidad de interactuar (Aschoff, 1990; Minors y Waterhouse, 1981).

Con respecto al posible sustrato morfológico de los procesos de acoplamiento, podemos mencionar a la glándula pineal probablemente mediante la hormona Melatonina como un integrador de fase en el proceso de acoplamiento interno del sistema circadiano (Aguilar-Roblero y Vega-González, 1993; Armstrong, 1989).

Transmisión.

La organización temporal de los organismos requiere que las señales internas de referencia temporal que generan los relojes biológicos sean asequibles para el resto del organismo. En organismos superiores los sistemas de comunicación intercelular involucran mecanismos tanto neurales como humorales. Las eferentes neurales del NSQ son necesarias para explicar la gran variedad de ritmos circadianos que parecen depender de la integridad de dicho núcleo. En este sentido algunos estudios (Swanson y Cowan, 1975; Watts y Swanson, 1987; Watts y col., 1987) sugieren que el patrón de proyección del NSQ es predominantemente ipsilateral y puede ser definido por 6 componentes anatómicos que proyectan a blancos intra- y extrahipotalámicos. Brevemente, 1) fibras dirigidas rostralmente hacia el área preóptica, el núcleo periventricular anterolateral y el núcleo preóptico anterodorsal; 2) la mayor proyección que se origina en el borde posterior del NSQ y va dorsocaudalmente hacia el núcleo paraventricular hipotalámico, núcleo ventromedial, núcleo dorsomedial y área hipotalámica rostral; 3) fibras que proyectan caudalmente al área retroquiasmática; 4) fibras hacia los núcleos principal e intrafascicular del núcleo cama de la estría terminalis, núcleo paraventricular talámico y núcleo paratenial; 5) una pequeña proyección hacia el núcleo septal intermedio lateral y 6) una proyección pequeña que termina en la hojuela intergeniculada del núcleo geniculado lateral (Watts,

1991).

En cuanto a la comunicación humoral, un sistema de comunicación difuso y a distancia, como el endócrino, podría participar en el proceso de transmisión de la señal oscilatoria hacia el resto del organismo. Es natural pensar que a cierto nivel de organización, por ejemplo si nos enfocamos en la ritmicidad circadiana de la función glandular, la señal transmitida por una vía neural sería codificada a una señal hormonal (Aguilar-Roblero y Vega González, 1993; Armstrong, 1989).

1.4 NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO

1.4.1 ORGANIZACIÓN Y FUNCIÓN

En mamíferos, el hámster y la rata son las especies en las que más se ha estudiado el NSQ, por lo que la mayoría de las evidencias que se tienen de su organización y función provienen de éstos roedores.

1.4.2 ANATOMÍA DEL NSQ

El NSQ en el hámster y la rata es una estructura bilateral localizada en el hipotálamo ventral anterior, dorsal al tercio caudal del quiasma óptico, rostral a las comisuras supraópticas y ventrolateral al tercer ventrículo (van den Pol, 1980). En la rata macho adulta un solo supraquiasmático presenta un volumen aproximadamente 0.13 a 0.16 mm^3 (Moore, 1983). La dimensión más larga del NSQ es de 950 μm en dirección rostrocaudal con un ancho de 425 μm y una altura de 400 μm aproximadamente. El número estimado de neuronas es de $16,000$ en la estructura completa sin incluir el número de células gliales (van den Pol, 1980).

El NSQ no es una estructura homogénea sino que está subdividido principalmente con base al contenido de neurotransmisores presentes en los cuerpos neuronales, de ésta subdivisión se hablará más adelante.

Las neuronas del supraquiasmático son las más pequeñas del hipotálamo y se encuentran además entre las más pequeñas de todo el cerebro. Las neuronas están estrechamente empaquetadas mostrando amplias regiones de aposición entre ellas. Se puede encontrar grupos de neuronas separadas de las adyacentes por solo un espacio extracelular de 15 a 20 μm .

El neurópilo del NSQ es muy complejo y presenta muchos tipos de interacciones celulares, sin embargo lo más claro que se puede observar es que pequeños axones entran al supraquiasmático de todas direcciones y que algunas dendritas se extienden fuera del núcleo. Con técnicas de Golgi se ha observado que un gran número de neuronas presenta axones con terminaciones locales encargados de la comunicación intranuclear (van den Pol, 1980, 1991)

La subdivisión más actual del NSQ, la cual no ha sido totalmente aceptada menciona dos regiones, el cuerpo y la cápsula, las cuales están arregladas de acuerdo a grupos celulares que presentan neuromoduladores específicos o fibras específicas. El cuerpo está compuesto de neuronas inmunoreactivas a sustancia P (SP). Esta población discreta está rodeada por un plexo denso de fibras inmunoreactivas a serotonina (5HT), solamente la parte dorsolateral del NSQ contiene relativamente pocas fibras serotoninérgicas. Una gran variedad de neuromodulares contribuyen a formar la cápsula, así podemos observar que neuronas inmunoreactivas a vasopresina (VP) se encuentran en el área dorsomedial y las neuronas inmunoreactivas al péptido vasoactivo intestinal (VIP)

ocupan la región ventrolateral. Neuronas que contienen colecistoquinina (CCK) tienen la misma distribución que las fibras de 5HT es decir que se encuentran en la zona de la cápsula. Parte de la cápsula son fibras de SP relativamente escasas dentro del NSQ que también forman un área circular densa alrededor del núcleo. Las fibras se extienden desde el borde dorsal del quiasma óptico hasta la base del tercer ventrículo (Miller y cols., 1996).

Las neuronas VPérgicas tienden a estar situadas dorsomedialmente en el NSQ, mientras que neuronas VIPérgicas y GRPérgicas ocupan la región ventral. Pequeñas poblaciones de neuronas de somatostatina, CCK y SP han sido observadas en la rata pero no son tan densas ni tan localizadas como en el hámster. Una gran cantidad de neuronas del NSQ son GABAérgicas. En la rata las neuronas dorsolaterales del NSQ son caracterizadas por la presencia de importante niveles de calretinina, mientras que otras proteínas que unen calcio como la calbindina están localizadas en la zona central del NSQ de hámster (Miller y cols., 1996).

1.5 ASPECTOS FUNCIONALES DEL NSQ

1.5.1 RITMOS ENDÓGENOS

Anteriormente se han mencionado algunas de las evidencias que apoyan el papel del NSQ como un oscilador endógeno, las cuales se refieren a la persistencia en condiciones constantes de ritmos endógenos del NSQ tales como el de actividad eléctrica y metabólica, de liberación de sustancias neuroactivas, etc.

Ritmo de actividad eléctrica.

Inouye y Kawamura (1982) mostraron que la actividad eléctrica multiunitaria

registrada en la rata presenta un ritmo circadiano, dicha actividad va aumentando durante el periodo de luz y disminuye durante el periodo de oscuridad. La actividad multiunitaria en regiones fuera del NSQ de animales nocturnos presenta un ritmo circadiano impuesto por éste último cuya relación de fase es de aproximadamente 180° en relación con la del NSQ (Kubota y cols., 1981). Cuando el NSQ es aislado del resto del cerebro en una isla hipotalámica por medio de una navaja de Halasz, la actividad multiunitaria se mantiene sólo en las islas que contienen el NSQ y se pierde en el resto del cerebro; así mismo el ritmo puede presentar "libre corrimiento" cuando el animal es mantenido en oscuridad constante y puede ser resincronizado con pulsos de luz cuando la conexión con la retina se deja intacta (Inouye y Kawamura, 1979, 1982; Kubota y cols., 1981; Inouye, 1984).

En trabajos realizados en rebanadas de hipotálamo que contiene al NSQ se ha mostrado también un ritmo circadiano en la actividad eléctrica unitaria (Green y Guillete, 1982; Groos y Hendriks, 1982; Shibata y cols., 1982) con un periodo aproximado de 24 h. Durante el día subjetivo se observa actividad unitaria de frecuencia muy alta de alrededor de 14 Hz o más, aunque también pueden observarse unidades de frecuencia baja de 1 Hz o menos. En la noche subjetiva la actividad generalizada es muy baja, las unidades con frecuencias mayores de 5 Hz son muy raras y la mayor parte de la actividad se encuentra entre 0.5-3.0 Hz, adicionalmente el número de unidades silentes se incrementa. El pico de actividad máxima encontrado en estudios *in vitro* es a la hora circadiana 7 (CT7) y presenta su punto mínimo en CT19.

Ritmo de actividad metabólica.

En 1977, Schwartz determinó un ritmo de utilización de glucosa en la rata, siendo el

NSQ más activo metabólicamente durante la fase de luz y relativamente inactivo en la fase de oscuridad a diferencia de otras regiones cerebrales que no exhiben dicha ritmicidad. Este mismo ritmo de utilización de glucosa ha sido observado en rebanadas *in vitro* de cerebro de rata (Schwartz y Gainer, 1977; Newman y Hospod, 1986; Newman, 1991).

Ritmo de liberación de vasopresina.

Otro de los parámetros que se han estudiado en el NSQ es la liberación de vasopresina (VP) en explantes *in vitro* y cultivos organotípicos de NSQ (Earnest y Sladek, 1986, 1987; Murakami y cols., 1991; Shinohara y cols., 1994). Este ritmo persiste hasta por 4 ciclos mostrando un periodo circadiano. También se ha cuantificado el contenido de VP en el NSQ de ratas y se ha encontrado que muestra un patrón circadiano aún en condiciones de oscuridad continua (Tominaga y cols., 1992).

1.6 AFERENTES AL NSQ

1.6.1 TRACTO RETINO-HIPOTALAMICO

La principal vía por la cual la información luminosa ambiental penetra a los organismos es el tracto retino-hipotalámico (TRH). La porción retinal de éste tracto indica que los fotorreceptores retinales que transducen la información luminosa sincronizadora son una población separada de la que participa propiamente en la formación de imágenes. En ratones mutantes (ratones *rd* y *rd/s*) en los cuales los fotorreceptores presentan una degeneración determinada genéticamente hay una preservación de la sincronización a pesar de la aparente pérdida de todos los fotorreceptores (Foster y cols., 1991). La preservación de la función se ha atribuido a la presencia de un fotorreceptor diferente o bien a la

combinación de fotorreceptores sobrantes (Foster y cols., 1993).

En la rata una subpoblación de células ganglionares proyecta al NSQ y a la HIG pero no lo hace hacia las áreas clásicas de procesamiento visual (Card y cols., 1991). En el hámster las células ganglionares individuales contribuyen al tracto que proyecta al NSQ y a la HIG (Pickard, 1985). Datos recientes (Moore y cols., 1995) indican que las células ganglionares retinales que dan origen al TRH pertenecen a la población de células ganglionares clase III de Perry (Perry, 1979). Estas células están distribuidas por toda la retina con una mayor densidad en la región de la retina temporal que de la retina nasal y representan menos del 1% del total de la población de células ganglionares retinales en la rata (Moore y cols., 1995). Una población similar a la descrita en la rata también ha sido identificada en la retina de gato (Murakami y cols., 1989). Los axones que se originan de las células ganglionares proyectan a través del nervio óptico pasando por el quiasma óptico. Los axones del TRH se cruzan en su mayor parte ($2/3$ del total de axones) y el restante $1/3$ continúa sin cruzarse (Johnson y cols., 1988; Sefton y Dreher, 1995). En la rata el sitio de mayor proyección del TRH es hacia la región ventrolateral del NSQ, sin embargo, se pueden observar también escasas proyecciones hacia la región dorsomedial del NSQ. Adicionalmente el TRH tiene proyecciones hacia un gran número de áreas del hipotálamo medial y lateral, siendo las zonas de mayor innervación el área retroquiasmática, el área preóptica medial, el área hipotalámica anterior, la zona subparaventricular y el hipotálamo tuberal inmediatamente caudal al área retroquiasmática (Johnson y cols., 1988; Levine y cols., 1991). Colaterales del TRH que proyectan al NSQ continúan junto con el tracto óptico para producir innervación bilateral de la HIG (Pickard, 1985).

Con estudios de microscopía electrónica de la región ventral del supraquiasmático

se han observado frecuentemente botones sinápticos del TRH que forman glomérulos con dendritas neuronales del NSQ. Los botones generalmente hacen sinápsis con dendritas distales las cuales en su mayoría forman sinápsis asimétricas (75%) y aproximadamente el 25% restante forma sinápsis simétricas (Güldner y Wolff, 1987).

Transmisores del TRH.

La morfología de las vesículas sinápticas presentes en los botones del TRH dentro del NSQ muestra que son pequeñas, esféricas (lucentes) y presentan además un centro denso, sugiriendo que las terminales sinápticas del TRH contienen una molécula de neurotransmisor pequeña colocalizada con uno ó más péptidos. Todas las evidencias disponibles hasta el momento indican que el glutamato (GLU) es el neurotransmisor del TRH, aunque la fuente de GLU también podría provenir en parte del dipéptido N-acetil aspartil glutamato el cual es rápidamente metabolizado a sus aminoácidos constituyentes, glutamato y aspartato (Moffett y cols., 1990).

El GLU está presente en el TRH (DeVries y cols., 1993; Castel y cols., 1993; van den Pol, 1991) y puede ser liberado después de la estimulación eléctrica de los nervios ópticos. En experimentos de rebanadas hipotalámicas que contienen el NSQ (Liou y cols., 1986), la aplicación de GLU produce respuestas excitatorias de neuronas del NSQ en forma dosis-dependiente (Shirakawa y Moore, 1994). Los antagonistas de los receptores NMDA y no-NMDA para glutamato bloquean los cambios de fase en la actividad locomotora inducidos por pulsos de luz (Colwell y cols., 1990, 1991; Vindlacheruvu y cols., 1992). La aplicación de GLU al NSQ *in vitro* produce cambios de fase presentando una curva de respuesta de fase (PRC) muy similar a la que se obtiene con pulsos de luz

(Shirakawa y Moore, 1994; Ding y cols., 1994), dicho efecto parece depender de la síntesis de óxido nítrico (NOS) ya que antagonistas de NOS como la L-N-Arginina o el L-NAME bloquean los cambios de fase inducidos por el glutámico (Ding y cols., 1994).

Hay otros datos que señalan que algunos de los axones del TRH en la rata contienen SP (Takatsuji y cols., 1991; Mikkelsen y Larsen, 1993). La SP aplicada al NSQ *in vitro* produce un incremento en la frecuencia de disparo de neuronas del NSQ en una forma dosis dependiente y que además potencia las respuestas inducidas por el GLU (Shirakawa y Moore, 1994). La SP también produce cambios de fase en el ritmo de frecuencia de disparo de neuronas del NSQ con una PRC similar a la de la luz (Shibata y cols., 1992). La SP produce efectos funcionales consistentes con lo que se esperaría de un péptido colocalizado con GLU en terminales del TRH (Shirakawa y Moore, 1994).

1.6.2 TRACTO GENICULO-HIPOTALAMICO.

Se sabe que la información fótica tiene acceso al NSQ a través de la proyección directa del TRH y a través de una vía indirecta que pasa por la hojuela intergeniculada (HIG) (Zhang y Rusak, 1989; Harrington y Rusak, 1989,1991) la cual a su vez proyecta a través del tracto geniculo-hipotalámico (TGH) hacia el NSQ. Cuando los animales son lesionados de la HIG y se inducen cambios de fase por cambios en el fotoperíodo la velocidad de resincronización disminuye (Johnson y cols., 1989). Los efectos de las lesiones son más obvios en condiciones de luz constante (LL). Normalmente bajo LL el período circadiano se alarga, en contraste cuando se lesiona la HIG se bloquean los efectos de LL sobre el período (Pickard y cols., 1987; Harrington y Rusak, 1986). Las lesiones de la HIG aparentemente reducen la respuesta del sistema circadiano a estímulos fóticos

tónicos, sin embargo algunos estudios en los cuales la mayoría de las proyecciones visuales incluyendo la proyección retinointergeniculada son destruidas se obtienen resultados diferentes. Tal es el caso de los experimentos en donde la proyección retinal directa a la HIG es destruida sin lesionar el TRH los animales tienden a tener periodos circadianos muy largos (Rusak, 1977; Rusak y Boulos, 1981) y otros en los que la destrucción de la proyección retinal a la HIG o la destrucción de las neuronas de la misma estructura inicialmente no tiene efectos obvios en la fase del ritmo sincronizado (Johnson y cols., 1989; Pickard y cols. 1987; Harrington y Rusak, 1986).

En el hámster al menos 4 diferentes tipos de neuronas se han identificado en la HIG (Morin y Blanchard, 1995); neuronas inmunoreactivas a NPY y encefalinas (ENK) que proyectan al NSQ, neuronas inmunoreactivas a ENK que no proyectan al NSQ (Card y Moore, 1989) y finalmente el cuarto tipo que no se ha asociado con un neuromodulador específico, sin embargo, se piensa que éstas son probablemente GABAérgicas como en la rata (Moore y Speh, 1993).

La posibilidad de que la HIG regule la fase de un ritmo es apoyada por experimentos en los que se aplica NPY directamente al NSQ modificando la fase del ritmo registrado (Albers y Ferris, 1984; Albers y cols., 1984). Un resultado similar se ha observado en experimentos de estimulación química o eléctrica de la HIG (Johnson y cols., 1989; Rusak y cols., 1989). En cada caso se asume que la estimulación de neuronas que contribuyen al TGH produce la liberación y disponibilidad de NPY en el NSQ y que por lo tanto modula la fase del reloj endógeno.

La posición estructural de la HIG dentro del sistema visual sugiere una función mucho más amplia que la de un simple mecanismo secundario que modula la respuesta del

rítmo a la luz. Se ha visto que la HIG y el TGH también podrían estar jugando un papel importante en la regulación no-fótica de los ritmos circadianos. Cuando el triazolam (benzodiazepina de corta duración) es administrada a los hámsters en LL ó OO, se induce un cambio de fase en el ritmo de actividad locomotora a través de un aumento en la misma actividad y dichos cambios son muy parecidos a los producidos por pulsos de actividad (Turek y Losee-Olson, 1986). Los cambios de fase inducidos por la inyección de triazolam son bloqueados por la lesión de la HIG (Johnson y cols., 1988). Finalmente se tienen reportes de que la HIG participa en la regulación de los cambios de fase inducidos por pulsos de actividad ya que su lesión evita o atenúa los cambios de fase producidos por estímulos no-fóticos (Johnson y cols., 1988; Janik y Mrosovsky, 1994; Wickland y Turek, 1994).

1.6.3 TRACTO SEROTONINÉRGICO AL NSQ

La vía serotoninérgica del mesencéfalo es otra de las aferentes al NSQ (Morin, 1992). A pesar de la robusta presencia de serotonina (5HT) en el NSQ hay relativamente pocos trabajos acerca de la participación de la misma en la regulación de los ritmos circadianos.

Los estudios anatómicos han mostrado que hay una pérdida total de fibras inmunoreactivas a 5HT en el NSQ después de la administración de la 5,7-DHT, esto fue asociado con la pérdida de aproximadamente 91% de fibras serotoninérgicas en el rafé dorsal (Smale y cols., 1990; Morin y Blanchard, 1991). En otros trabajos se mostró mas específicamente por trazadores retrógrados y anterógrados que el rafé medial proyecta al NSQ pero no a la HIG y que el rafé dorsal proyecta a la HIG pero no al NSQ (Meyer-

Bernstein y Morin, 1996), así la destrucción específica de neuronas 5HT en el rafé dorsal elimina la innervación serotoninérgica de la HIG pero no del NSQ (Meyer-Bernstein y Morin, 1996).

La lesión de la vía serotoninérgica al NSQ con la neurotoxina selectiva 5,7-DHT produce casi inmediatamente después de la administración un avance de fase en el inicio de actividad, retardo del fin de actividad y alargamiento de la fase de actividad (Smale y cols., 1990). El alargamiento de la fase de actividad persiste en oscuridad constante sin que la pérdida de 5HT afecte el periodo circadiano. Este cambio es característico de animales con lesión de la vía serotoninérgica ya sea por administración intraventricular (Morin, 1992; Smale y cols., 1990; Morin y Blanchard, 1991) ó por la inyección directa de la neurotoxina sobre los núcleos del rafé (Meyer-Bernstein y Morin, 1996). En luz constante el periodo se alarga y la ritmicidad circadiana se pierde rápidamente. Así, el papel de la 5HT endógena indica que puede funcionar como un inhibidor tónico de la sensibilidad a la luz. En ausencia de 5HT, los cambios rítmicos vistos bajo luz constante en el animal normal son hiperexpresados (Morin y Blanchard, 1991).

Se han observado ritmos circadianos en la recaptura de 5HT en el NSQ (Meyer y Quay, 1976), en el metabolito de la serotonina ácido 5-hydroxyindolacético (5HIAA) (Faradji y cols., 1983; Glass y cols. 1992), en la sensibilidad de neuronas del NSQ a la administración iontoforética de 5HT (Mason, 1986), todas estas variables están en fase y presentan niveles máximos (acrofases) durante el periodo de oscuridad. La persistencia del ritmo de contenido de 5HT en el NSQ y de liberación de 5HT en rebanadas de NSQ (Cagampang e Inouye, 1994) en condiciones constantes sugiere que la liberación de este transmisor está bajo control circadiano por eferentes del NSQ. En contraste, el contenido

de 5HT en todo el hipotálamo anterior parece estar dirigido por el ciclo LO (Ferraro y Steger, 1990) ya que en condiciones de oscuridad constante los niveles de 5HT no oscilan.

La elevación de niveles sinápticos de 5HT por la administración sistémica de clorgilina que es un inhibidor de la monoamino-oxidasa o por la imipramina que es un bloqueador de la recaptura de 5HT produce retrasos de fase en los ritmos de actividad locomotora (Wirz-Justice y Campbell, 1982). La disminución de los niveles de 5HT por la administración de para-clorofenilalanina (PCPA) produce avances de fase en los ritmos de actividad locomotora y de secreción de corticosterona (Hiroshige y Honma, 1979; Honma y cols., 1979).

Una prueba más directa de la acción de la 5HT en el NSQ es la administración directa de agonistas como la quipazina a el NSQ en preparaciones in vitro (Prosser y cols., 1990). Estos estudios han mostrado que la quipazina administrada a rebanadas del NSQ en lo que corresponde al periodo de luz produce avances de fase, mientras que la quipazina administrada en el periodo de oscuridad produce retrasos de fase.

1.6.4 NÚCLEO PARAVENTRICULAR TALÁMICO

El PVT es un constituyente talámico que provee de un componente de regulación a los circuitos basales ganglio-talamocorticales implicados en conductas cognitivas, emocionales o viscerales (Otake y cols. 1995). Algunos estudios sugieren la participación funcional del PVT en respuestas conductuales y autonómicas implicadas con diversas formas de estrés (Bot y Chahl, 1996), sin embargo, el papel jugado por este núcleo talámico en control autonómico permanece casi sin explorarse. Por muchos años los núcleos de la línea media y los intralaminares se han colocado dentro de los núcleos no-

específicos ó del sistema talamocortical difuso, un componente importante en el sistema activador reticular ascendente (Moruzzi y Magoun, 1949; Steriade y McCarley, 1990). Estudios anatómicos recientes han estado en desacuerdo con la noción de no especificidad demostrando distintos campos terminales corticales para cada uno de éstos núcleos (Bentivoglio y cols., 1991; Groenewegen y Berendser, 1994). Proyecciones de la formación reticular terminan más densamente en los núcleos intralaminares que en los núcleos de la línea media sugiriendo que el PVT juega un papel menor en la activación cortical tónica (Jones y Yang, 1985).

El PVT anterior manda conexiones a las capas profundas del área prefrontal cortical con las cuales modula las influencias corticoestriatales y recibe aferencias del núcleo preóptico medial, el periventricular, paraventricular hipotalámico, ventromedial y dorsomedial del hipotálamo así como del área hipotalámica lateral (Saper, y cols., 1997). Estudios de transporte retrógrado han mostrado células marcadas en el PVT después de inyecciones de trazadores en la corteza infralímbica (Freedman y Cassel, 1991), el septum lateral (Luiten y cols., 1982; Staiger y Nürnberger, 1989), el núcleo cama de la estria terminalis, el área preóptica medial, el NSQ, el estriado ventral, la amígdala, el hipocampo, etc. Estudios con trazadores anterógrados confirman que el PVT proyecta al cortex y estriado y recientemente se ha observado que también a la amígdala (Cornwall y Phillipson, 1988; Chen y Su, 1990).

Desde el punto de vista de regulación temporal el PVT recibe conexiones sinápticas de todos los componentes mayores del sistema circadiano que incluyen a la retina a través de una conexión multisináptica, al NSQ y a la hojuela intergeniculada. El PVT tiene conexiones recíprocas con el NSQ, específicamente el PVT anterior es la región que

proporciona la mayor cantidad de fibras aferentes al NSQ y el PVT posterior es la región que recibe la mayor cantidad de eferentes provenientes del NSQ. Se piensa que el PVT podría funcionar como un componente de entrada (vía de sincronización), un componente de salida (efector) y/o como un componente de "feedback" del sistema circadiano (Moga y cols., 1995), sin embargo, hasta el momento no se tiene un dato concreto de la participación de PVT en la regulación de la actividad del NSQ.

1.7 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.

Los estudios electrofisiológicos han establecido que la información luminosa ambiental es la principal señal sincronizadora de una gran variedad de conductas rítmicas expresadas en los organismos. La información luminosa se transmite al NSQ a través de sus dos principales aferentes que son el Tracto Retino-hipotalámico y el Tracto Geniculo-hipotalámico, de ésta manera se ha observado que las células del supraquiasmático cambian su frecuencia de disparo frente a la estimulación de las aferentes fóticas, a las células que responden a éstos estímulos se les ha llamado neuronas visuales del NSQ (Groos y Mason, 1978, 1980; Sawaky, 1979; Meijer y cols., 1986). La respuesta observada en las neuronas visuales del NSQ es un aumento o una disminución en la frecuencia de disparo encontrándose en mayor proporción las neuronas que responden con un aumento en la frecuencia de disparo que con una disminución.

Las neuronas visuales que responden a la estimulación con luz alteran su frecuencia de disparo como función monotónica del nivel de iluminación. Los umbrales para las respuestas visuales son 10 lux en el hámster y 0.1 lux en la rata, ocurriendo la saturación a 500 lux (Meijer y Rietveld, 1989). La localización de las células que responden a la

estimulación fótica coincide con los campos terminales de las vías aferentes fóticas principalmente en la región ventral. Es importante hacer notar que en estos estudios el estímulo al cual las neuronas responden con mayor efectividad no son las transiciones de iluminación sino que son los estímulos fóticos que se presentan por periodos prolongados o que son directamente presentados en la retina completa (Card y Moore, 1991; Meijer, 1991).

Tanto las neuronas activadas como las suprimidas mantienen su respuesta hacia el estímulo aún cuando se ha lesionado el TGH, lo cual sugiere que el TRH es el único que media los dos tipos de respuesta (Meijer, 1991).

Por otra parte se ha establecido que la estimulación fótica de hasta 30 minutos de duración puede producir cambios de fase en ritmos de actividad locomotora o de ingesta de agua, de acuerdo a la hora circadiana en la que se aplican lo cual podría ser el resultado de un cambio en la actividad eléctrica generalizada del NSQ.

Utilizando la técnica de inmunoreactividad a C-FOS en el NSQ se ha observado que la exposición a la luz durante el periodo de oscuridad de un ciclo LO, resulta en un aumento en la expresión de C-FOS en el núcleo supraquiasmático de las ratas y hámsters (Schwartz y cols., 1994; Rusak y cols., 1992; Abe y Rusak, 1992; Rea, 1992; Earnest y cols., 1990; 1992; 1993; Rea y cols., 1993), este mismo efecto es observado en la hojuela intergeniculada (Rusak y cols., 1992). El nivel mínimo de iluminación requerido para producir una mayor cantidad de expresión de C-FOS es la misma que se necesita para producir cambios de fase en el ritmo de actividad locomotora o de ingesta de agua en el sistema circadiano del hámster y la rata (Rusak y cols., 1990; Kornhauser y cols., 1990). En contraste, la inducción de C-FOS mediada por la luz es dependiente de la hora circadiana

en el NSQ pero no en la HIG (Park y cols., 1993)

La estimulación eléctrica del nervio óptico o la aplicación directa de agonistas de glutamato al NSQ en preparaciones *in vitro* produce en ratas una PRC equivalente a la producida por estimulación fótica (Shirakawa y Moore, 1994; Takatsuji y cols. 1991; Shibata y Moore, 1993; Shibata y cols., 1994). En contraste, la estimulación de la HIG (Johnson y cols., 1989; Meyer y cols., 1993) o la aplicación directa de neuropéptido Y al NSQ (Albers y Ferris, 1984; Albers y cols., 1984) produce una PRC que es muy similar a la producida por pulsos de oscuridad o actividad locomotora. De manera parecida la estimulación serotoninérgica del NSQ produce una PRC parecida a la de pulsos de oscuridad.

La interacción anatómica de la proyección glutamatérgica proveniente de la retina, con la proyección proveniente de la HIG que contiene NPY y la proyección serotoninérgica proveniente del rafé en el NSQ (Bosler y Beaudet, 1985; Guy y cols., 1987; Tanaka y cols., 1993) sugiere que además de la interacción en las neuronas postsinápticas podría haber una interacción presináptica entre ellas.

Por otro lado en cuanto a la interacción del TRH e HIG se han observado cambios de fase potenciados en respuesta a la luz después de la administración de un anticuerpo contra el NPY aplicado directamente al NSQ (Biello, 1995), en analogía a los efectos de la denervación de 5HT (Morin y Blanchard, 1991). La luz puede recíprocamente bloquear los avances de fase inducidos por la administración de NPY, aun cuando el pulso de luz es dado a tiempo circadiano cuando la luz no produce cambios de fase en el reloj circadiano (Biello y Mrosovsky, 1995). Esto sugiere que la estimulación fótica del TRH y la liberación de glutamato podrían interactuar con la vía de transducción del NPY en las neuronas del

NSQ proximales al punto al cual el glutamato induce cambios de fase.

En datos de nuestro laboratorio estudiamos la interacción entre las aferentes del NSQ provenientes de la retina y de la HIG. En resumen, reportamos la presencia de 4 poblaciones neuronales en el NSQ, la primera corresponde a neuronas que responden a la estimulación de las dos aferentes, es decir son neuronas en donde existe convergencia de aferentes, la segunda población que responde exclusivamente a la estimulación de la retina, la tercera población que responde exclusivamente a la estimulación de la HIG y finalmente una cuarta población que no responde a ningún tipo de estimulación. Adicionalmente en algunas neuronas se observó un cambio en el patrón de disparo cuando se estimularon simultáneamente las dos aferentes lo cual sugiere una regulación moduladora de la actividad del NSQ por la interacción sináptica entre sus aferentes visuales (Roig y cols., 1997). De este trabajo se propone el modelo de interacción de aferentes en el NSQ que se muestra en la figura 3.

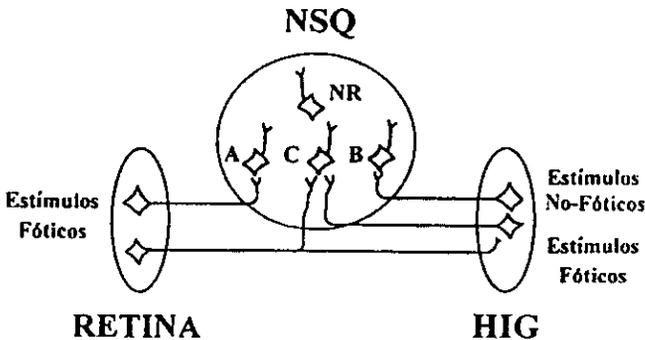


Figura 3. Modelo de canales o vías presentes en el NSQ propuesto a partir de los resultados de estimulación de la retina y la HIG. Las poblaciones representadas son: A población que responde exclusivamente a la estimulación de la retina, B población que responde exclusivamente a la estimulación de la HIG, C población en la que se observa la convergencia de aferentes y NR población que no responde a ningún tipo de estimulación. Además se señala el tipo de estímulos que son regulados por cada una de las aferentes al NSQ.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los resultados descritos anteriormente muestran que las neuronas del NSQ pueden responder a estímulos luminosos dirigidos a la retina y a estímulos químicos aplicados a otras aferentes, sin embargo, hasta el momento los pocos experimentos electrofisiológicos realizados, se han llevado a cabo en preparaciones *in vitro*. En estos experimentos lo que se ha hecho es estimular eléctricamente los nervios ópticos o estimular farmacológicamente con glutamato que es el neurotransmisor del TRH y ver como se modifica la respuesta generada cuando posteriormente se administran agonistas o antagonistas del NPY y de la 5HT que son los neurotransmisores de otras aferentes al NSQ. A este respecto se ha discutido que en experimentos en rebanadas de cerebro es difícil estudiar la interacción de aferentes pues en la rebanada se cortan fibras que en el animal completo pudieran estar participando en la modulación de otras neuronas. Debido a este hecho, en nuestro laboratorio en los experimentos previos de interacción del TRH y de la HIG se ha utilizado al animal anestesiado con el fin de tener una idea general de cómo pueden estar interactuando las dos aferentes en el sistema circadiano completo. Además hemos utilizado la estimulación fótica y la estimulación eléctrica de las aferentes en lugar de las estimulaciones de tipo farmacológico para tener una visión más fisiológica de los procesos de interacción de las aferentes. Es importante mencionar que la técnica de registro de actividad eléctrica unitaria nos permitirá observar a corto plazo los cambios en la excitabilidad eléctrica vistos como respuestas de excitación o inhibición en neuronas individuales del NSQ.

Por esto, siguiendo el modelo utilizado anteriormente proponemos estudiar cómo interactúan algunas aferentes dentro del NSQ estudiando el efecto de la estimulación con

pulsos de luz de corta duración (5 ms) aplicados directamente a la retina de la rata y el efecto de la estimulación eléctrica directa del PVT sobre la actividad eléctrica unitaria del NSQ cuando se aplican en forma independiente o en forma simultánea.

Adicionalmente, utilizando otra técnica para explorar la interacción de las dos aferentes y complementar los resultados de electrofisiología se propone estudiar el efecto de la estimulación fótica de la retina y eléctrica del PVT en forma independiente o simultánea sobre la expresión de la proteína C-FOS. En este caso la técnica se utilizará para observar cambios a largo plazo en la excitabilidad neuronal general del NSQ. Con esta técnica podremos tener información de zonas específicas dentro del NSQ que respondan a la estimulación de alguna de las aferentes, es decir, tendremos un panorama de la localización espacial de neuronas inmunoreactivas a C-FOS.

El uso de las dos técnicas no pretenden ser comparables, mas bien son complementarias para que nos brinden un panorama más amplio del problema que estamos abordando.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis General.

- El NSQ está organizado en canales o vías neuronales específicas a través de los cuales la información proveniente de las diversas aferentes puede modular la actividad de grupos neuronales distintos. Si es cierto esto, se podrán discriminar poblaciones neuronales con base a su conectividad funcional.

Objetivos Generales.

La comprobación de la hipótesis general se resolverá cumpliendo con los siguientes objetivos:

- Mediante la estimulación eléctrica de las aferentes al NSQ caracterizar dentro del mismo núcleo los procesos de integración de la información de sus aferentes a través del análisis de los cambios en la excitabilidad de neuronas del supraquiasmático producidos por la estimulación individual y simultánea de sus aferentes en registros de actividad eléctrica unitaria para observar cambios rápidos y a nivel neuronal individual y utilizando la expresión de C-FOS como otra técnica para observar cambios a largo plazo y a escala general del supraquiasmático.

Hipótesis Específicas.

- La estimulación eléctrica de las aferentes al NSQ modificará la excitabilidad de grupos neuronales específicos.
- La respuesta a la estimulación fótica de la retina de estos grupos de neuronas del NSQ será modulada por la estimulación simultánea de otras aferentes del supraquiasmático.

Objetivos Específicos.

Las hipótesis específicas podrán estudiarse a través de la realización de los siguientes experimentos electrofisiológicos y de expresión de C-FOS:

Registrando la actividad eléctrica espontánea del NSQ,

- Determinar el efecto de la estimulación fótica de la retina, de la estimulación eléctrica del núcleo paraventricular talámico y de la estimulación fótica de la retina y eléctrica del núcleo paraventricular talámico en forma simultánea identificando las respuestas generadas.

Sobre el patrón de expresión de C-FOS dentro del NSQ,

- Determinar el efecto de la estimulación fótica de la retina, de la estimulación eléctrica del núcleo paraventricular talámico y de la estimulación fótica de la retina y eléctrica del núcleo paraventricular talámico en forma simultánea identificando los patrones de distribución de la inmunoreactividad.

4. METODO

EXPERIMENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Animales y Cirugía

Para los experimentos de registro de actividad eléctrica se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de 200-220 gr de peso, las cuales se colocaron en caja plexiglas de 5x10x15 cm. (fondo x largo x ancho). Se formaron grupos de cuatro a cinco animales por caja mantenidos en un cuarto con ciclo de iluminación LO 12:12 (inicio de fotoperiodo a las 8:00 hr) desde el nacimiento hasta el día del experimento, con agua y comida *ad libitum*. La intensidad luminosa durante el periodo de luz en promedio se mantuvo al nivel de la caja en 450 lux.

Estimulación del núcleo Paraventricular Talámico

La cirugía se llevó a cabo en condiciones asépticas. Las ratas se anestesiaron con halotano lo cual nos permitió mantener un nivel de anestesia adecuado durante todo el experimento. Los experimentos iniciaban a las 10:00 hr (ZT2) y terminaban entre las 14:00 (ZT6) y 16:00 hr (ZT8).

Una vez anestesiados los animales, se colocaron en un aparato estereotáxico (David Kopf). Después de montar a los animales en el estereotáxico se hicieron incisiones en la piel de las ratas para exponer el cráneo y se realizaron tres trepanaciones para colocar: a) microelectrodo de registro de actividad unitaria del NSQ en P:0; L:0; V:6.2, b) electrodo de estimulación de PVT en P:3.5; L:0; V:5.8 de acuerdo a las coordenadas de Paxinos (1982) y c) electrodo indiferente en el hueso etmoidal.

El microelectrodo de registro de actividad unitaria se colocó de acuerdo a las coordenadas descritas con la ayuda de un microposicionador hidráulico (David Kopf). Para la estimulación del PVT se utilizó un electrodo bipolar elaborado de alambres de cromo-níquel aislados con teflón, cuyo diámetro de cada una de las puntas fue de 300 μm . El electrodo se colocó en una torre de estereotáxico y se dirigió al PVT, una vez colocado en el sitio de estimulación se procedió a fijarlo al cráneo con cemento dental. A modo de ser utilizado como electrodo indiferente se colocó un pequeño tornillo de acero inoxidable en el hueso etmoidal.

Registro de actividad unitaria

Se utilizaron microelectrodos de vidrio llenos de una solución de acetato de sodio 3M para el registro de la actividad eléctrica extracelular. La señal amplificada (preamplificador A.C. Grass Instruments) fue filtrada a una banda final de entre 300 y 10,000 Hz.

El microelectrodo de registro se colocó 1 ó 2 mm por arriba del borde dorsal del NSQ, desde éste punto el electrodo se fue bajando en pasos de 10 μm por medio del microposicionador hasta encontrar una neurona con actividad eléctrica espontánea. Cuando se detectó actividad espontánea se registró por dos minutos después de lo cual se registró la respuesta neuronal provocada por la estimulación fótica de la retina, por la estimulación eléctrica del PVT y por la estimulación simultánea de la retina y el PVT. Toda la actividad eléctrica registrada se grabó en cinta magnética para su análisis posterior.

Estimulación de las vías aferentes

La retina de la rata se estimuló con pulsos de luz aplicados por medio de una lámpara estroboscópica que se colocó 15 cm por enfrente de los ojos del animal. La estimulación del PVT consistió de la aplicación de pulsos cuadrados de corriente directa (DC).

El protocolo de estimulación consistió en la aplicación de 100 pulsos de sincronía (registro control); 100 pulsos de luz (600 lux) a la retina con una duración de 5 ms a una frecuencia de 0.5 Hz; 100 pulsos eléctricos (0.6 mA) al PVT con una duración de 5 ms a una frecuencia de 0.5 Hz y finalmente 100 pulsos eléctricos y de luz presentados simultáneamente. Al final del protocolo de estimulación el microelectrodo de registro se avanzó 100 μm y se buscó una nueva neurona con actividad espontánea. Este procedimiento permitió asegurarnos que se estaba registrando una neurona diferente a la registrada anteriormente. El trayecto del microelectrodo de registro finalizó cuando se llegaba a la porción medial del quiasma óptico.

Al final del experimento la posición de los electrodos de estimulación y de la última posición del electrodo de registro de actividad eléctrica se marcó con una lesión electrolítica de la siguiente forma: con un estimulador (Grass Instruments S8800) se aplicó un pulso de corriente directa a través de una unidad de corriente constante (Grass Instruments CCU1A). Para el microelectrodo de registro del NSQ se aplicó un pulso de corriente de 0.5 mA de intensidad con una duración de 2 segundos, mientras que para el electrodo de estimulación del PVT se aplicó un pulso de corriente de 1 mA de intensidad con una duración de 5 segundos.

Histología

Ya terminado el experimento, el animal recibió una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundió por vía transcardiaca con 100 ml de una solución de NaCl al 0.9 % seguida de 300 ml de formalina al 10 % en agua destilada.

El cerebro de la rata se removió de la cavidad craneana y se post-fijo con la misma formalina a 4°C por 24 hr. Después de esto, el tejido se transfirió a soluciones de sacarosa en concentraciones crecientes (10 %, 20 % y 30 %) hasta que el cerebro se sumergiera en el recipiente contenedor. Después de la sacarosa al 30 %, los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40 μm de espesor en un criostato (Reichert-Jung) a -15°C. Los cortes obtenidos se colocaron en buffer fosfatos 0.1M a pH 7.2 y se montaron en portaobjetos con gelatina al 0.2%.

Tinción de los cortes

Los cortes se tificaron con violeta de cresilo y se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (70 %; 95 % y abs.). Los cortes se aclararon en xilol y se cubrieron con Permout (Baxter).

La localización de los electrodos se verificó por el análisis histológico de secciones coronales seriales de 40 μm de grosor. La localización de las neuronas registradas se estimó al comparar la posición del electrodo al momento del registro contra la bitácora del experimento. El sitio de lesión fue determinado en dibujos realizados bajo la cámara lúcida. La localización del electrodo de estimulación del PVT se determinó directamente de los dibujos obtenidos en la cámara lúcida. De acuerdo a la localización de las neuronas registradas, éstas se dividieron en neuronas que estaban dentro ó fuera del NSQ.

Análisis de resultados

El análisis de resultados se llevó a cabo en una sesión independiente utilizando el programa Experimenter's Workbench (Brain Wave). La señal grabada en cinta magnética se digitalizó a 20 Khz. El potencial de acción ó unidad a analizar se seleccionó con una ventana discriminatoria, una vez seleccionada la unidad se llevó a cabo la estimación de la frecuencia de disparo promedio antes de la estimulación y la construcción de histogramas peri-estimulo (PETH), histogramas de intervalos interespigas (IIH) e histogramas de frecuencia a lo largo del tiempo (FH). Los PETH representan el número de disparos neuronales ó cuentas en lapsos de tiempo regulares (bins) antes y después de la presentación de un estímulo específico; los IIH representan los intervalos de tiempo que transcurren entre cada disparo neuronal y finalmente los FH representan la frecuencia de disparo de una neurona determinada a lo largo de un periodo fijo de tiempo.

A partir de los PETH se determinó si alguna neurona respondía a un estímulo específico mediante el análisis CUSUM (Ellaway, 1978) y con la prueba estadística U de Mann-Withney (SigmaStat).

Brevemente, el poder del CUSUM reside en la capacidad de detectar cambios en el nivel promedio del número de cuentas después de la aplicación de un estímulo; es un proceso estadístico simple el cual involucra solo sumas y restas. El CUSUM se obtiene de la siguiente forma: se obtiene un valor de referencia (k) que representa a la media del número de cuentas previas a la estimulación considerado como periodo control, en la figura 4 sería el denominado como área 1. Este nivel de referencia es abstraído de cada una de las series de valores de los puntos del histogramas o bins (x_i). A partir de esta substracción

se obtiene una nueva serie de puntos (S_i) que es formada añadiendo estas diferencias consecutivamente, de tal manera que:

$$S_1 = (x_1 - k)$$

$$S_2 = (x_1 - k) + (x_2 - k)$$

$$S_3 = (x_1 - k) + (x_2 - k) + (x_3 - k)$$

Finalmente, se grafican en forma secuencial los valores S_i para formar la suma acumulativa (ver fig. 4b), esta serie se puede expresar por la ecuación:

$$S_i = \sum_{j=1}^i (x_j - k)$$

En la gráfica, los periodos de cambio en el nivel de la media (respuestas excitatorias o inhibitorias) son indicados por cambios en la pendiente (fig. 4b, área 2 indicada por las flechas) de la recta, siendo el valor de la pendiente la diferencia entre el nivel de la media de un periodo específico y el nivel de referencia (k). Una vez que los periodos de cambio de pendiente se han hecho visibles e identificado, se pueden utilizar para comparar el número de cuentas en estos periodos contra las cuentas de los periodos previos a la estimulación, utilizando una estadística convencional (como la U de Mann-Withney). De esta forma obtenemos un valor de significancia con el cual podemos asegurar que las respuestas que observamos en los PETH son producidas por la estimulación.

Respuestas generadas por la estimulación

Las respuestas a los diferentes tipos de estimulación de neuronas NSQ y no-NSQ fueron clasificadas en excitatorias ó inhibitorias de acuerdo al PSTH que mostraban y al análisis CUSUM. A su vez, cada tipo de respuesta fue clasificado como simple o complejo, el primero se refiere a aquel que mostró un solo componente de respuesta, ya sea excitación

ó inhibición y el segundo se refiere a aquel que mostró mas de un componente de excitación o de inhibición. En el caso de las respuestas complejas se tomo solo el primer componente para su clasificación.

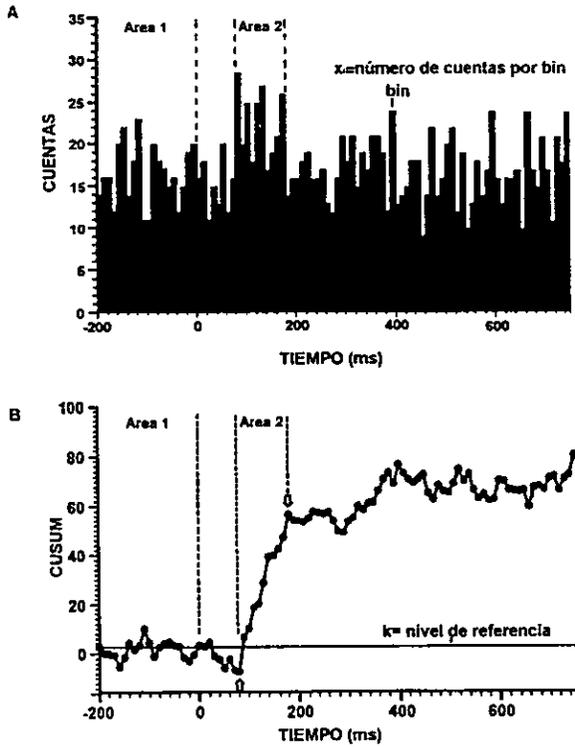


Figura 4. Análisis CUSUM. En A se muestra un PETH donde el área 1 representa el periodo previo a la estimulación y el área 2 representa la respuesta de excitación producida por la estimulación. En B se muestra la suma acumulativa obtenida a partir del histograma peri-estimulo (ver texto para mayor explicación), donde se encuentra la excitación (área 2) se puede ver claramente el cambio abrupto de la pendiente de la recta marcado por las dos flechas. La identificación del periodo donde cambia la pendiente nos permite establecer la latencia a la respuesta y la duración de la misma. La dirección de la pendiente positiva nos indica que en este caso se trata de una excitación y en el caso de que fuera una pendiente negativa se trataría de una inhibición (Modificado de Cui y Dyball, 1996).

EXPERIMENTOS DE C-FOS

Animales y Cirugía

Para los experimentos de expresión de C-FOS en el NSQ y en el hipotálamo circundante se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200-220 gr de peso, las cuales se colocaron en caja plexiglas de 5x10x15 cm. (fondo x largo x ancho). Se pusieron cuatro animales por caja mantenidos en un cuarto con ciclo de iluminación LO 12:12 (inicio de fotoperiodo a las 8:00 hr) con agua y comida *ad libitum*. Mas tarde las ratas al azar se asignaron a alguno de los cuatro siguientes grupos: A) grupo control; B) estimulación de luz; C) estimulación de PVT y D) estimulación de luz y PVT.

Estimulación del PVT

Para llevar a cabo la estimulación eléctrica del PVT, a la rata se le implantó un electrodo bipolar igual al utilizado en los experimentos electrofisiológicos para estimulación. La cirugía se llevó a cabo en condiciones asépticas. Las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral (1 mg/kg.) para llevar a cabo la cirugía. Una vez anestesiados los animales se colocaron en un aparato estereotáxico (David Kopf). Después de montar a los animales en el estereotáxico se realizó una incisión en la piel de las ratas para exponer el cráneo y se realizó una trepanación para colocar el electrodo de estimulación en el PVT (P:3.5; L:0; V:5.8) de acuerdo a las coordenadas de Paxinos (1982). El electrodo bipolar se soldó a un conector Winchester y se fijó con cemento dental.

Después de dos días de recuperación las ratas fueron transferidas a un ciclo de iluminación invertido OL 12:12 (encendido de las luces a las 20:00 hr) por lo menos dos semanas antes del experimento.

Los experimentos se realizaron a ZT 16, es decir 4 hr después del apagado de la luz en el ciclo de luz invertido (las 12:00 hr). En este caso los experimentos se llevaron a cabo a esta hora pues la inducción de C-FOS por pulsos de luz se puede llevar a cabo solo durante el periodo de oscuridad. A ZT16 los niveles de expresión de C-FOS inducidos por pulsos de luz permitirán observar aumentos o disminuciones de los mismos cuando se estimulen las aferentes. Los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital y fueron perfundidos intracardiamente con salina (0.9%) seguida del fijador PLP (Paraformaldehído, Lisina, Periodato) un animal de cada grupo al mismo tiempo.

El grupo A no recibió ni estímulo luminoso ni estímulo eléctrico; el grupo B recibió solamente un pulso de luz (600 lux) por un periodo de 30 min; el grupo C recibió solamente estimulación eléctrica (0.3 mA) de PVT de 2 ms de duración a una frecuencia de 10 Hz por un periodo de 30 min y finalmente el grupo de luz y PVT recibió simultáneamente el pulso luminoso y los pulsos eléctricos con las características antes mencionadas. Los animales que recibieron estimulación permanecieron otros 15 min sin estimulación dentro de su caja, lo cual permitió obtener niveles óptimos de expresión de C-FOS.

Los cerebros fueron extraídos de la cavidad craneal, se postfijaron en PLP por 24 hr y se crioprotegieron en concentraciones crecientes de sacarosa (10%, 20% y 30%). Los cerebros se cortaron en un plano coronal a 40 μ m en el criostato y se tomaron uno de cada 3 cortes que se iban obteniendo. Los cortes obtenidos fueron incubados durante 72 hr a 4 °C con un anticuerpo anti C-FOS (Santa Cruz) a una dilución 1:2500. La inmunoreactividad a C-FOS fue detectada por el método de avidina-biotina (Vector) (Hsu y cols. 1981). El número de neuronas inmunoreactivas a C-FOS dentro y fuera del NSQ se determinó por

métodos estereológicos. El término estereología es en sentido clásico un conjunto de métodos matemáticos que relacionan cantidades globales como el volumen, área y longitud así como el número de objetos para la obtención de medidas en secciones de una estructura. Los métodos estereológicos apropiados permiten una mejor aproximación en nuestro caso del número de células inmunoreactivas calculadas (West, 1999).

Conteo de neuronas inmunoreactivas a C-FOS

Los cortes de cerebro con inmunoreactividad a C-FOS se observaron con un analizador de imágenes (MCID). Las regiones anatómicas que se analizaron fueron el NSQ, el hipotálamo lateral (LH) y el hipotálamo anterior (AHA). Sobre la imagen digitalizada de la región anatómica a analizar se superpuso una rejilla (fig. 5) la cual mostraba los cubos en donde se llevo a cabo el conteo ($40 \times 40 \times 40 \mu\text{m}$; equivalente a $6.4 \times 10^{-5} \text{ mm}^3$). Los cubos fueron numerados de tal forma que fuera posible identificar cada uno ellos y ubicarlos espacialmente en los cortes de cerebro. Los cubos del lado izquierdo se marcaron con números impares y los derechos con números pares como lo muestra la figura. Se hizo lo mismo para las otras regiones estudiadas. Las neuronas que expresaban C-FOS y que quedaban dentro de los cubos son las que se marcaban para el conteo, todo esto se hizo en volúmenes equivalentes en todos los cerebros (ver resultados). El conteo se realizó en dirección antero-posterior. Se calcularon los volúmenes de las regiones estudiadas a partir de la fórmula prismoidal $V = h/6 (A_0 + 4M + A_1)$ (Flanders y cols. 1973), donde en nuestro caso h = longitud del eje anteroposterior del NSQ; A_0 = área de la sección más anterior del NSQ; M = área de la sección media del NSQ; A_1 = área de la sección más posterior del NSQ.

Las áreas de las secciones (A_0 , M y A_1) para resolver la fórmula, fueron directamente calculadas con el analizador de imágenes.

A partir de los datos de conteo de células inmunoreactivas a C-FOS y del cálculo de volúmenes se obtuvieron las siguientes variables: densidad promedio de células por cubo de $6.4 \times 10^{-5} \text{ mm}^3$, cálculo del número total de células contenidas en el volumen total calculado y volumen total de cada una de las estructuras estudiadas. Los cálculos se realizaron de la misma forma para los cuatro grupos experimentales. Las diferencias en el número de neuronas inmunoreactivas se compararon con la prueba estadística de ANOVA de una vía, con un análisis pos hoc de Tukey.

Adicionalmente se crearon mapas de distribución de células inmunoreactivas en los cerebros de los cuatro grupos experimentales.

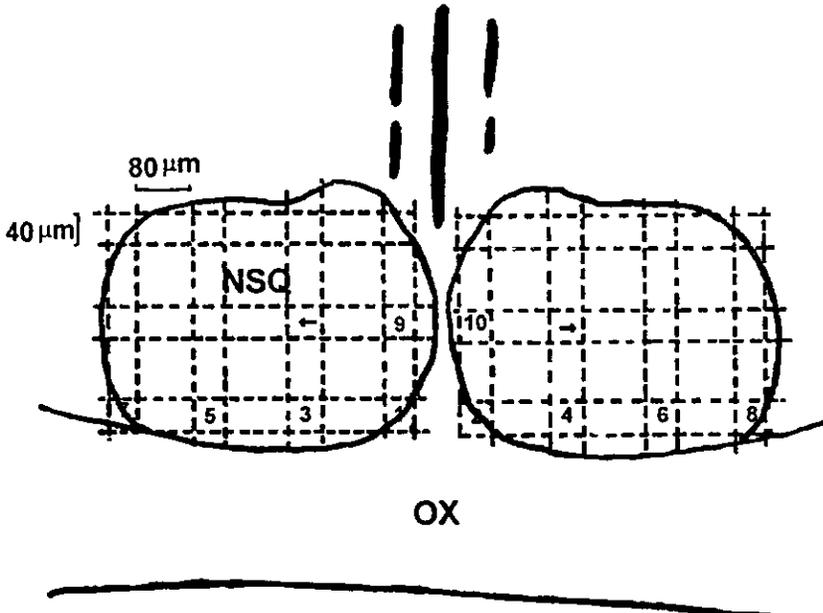


Figura 5. Para el conteo de neuronas inmunoreactivas a C-FOS se utilizó la rejilla que se muestra en el dibujo (ver texto), la rejilla permitió identificar los sitios de conteo para ubicarlos dentro del NSQ. La dimensión de los cubos numerados es de 40x40x40 μm (alto x ancho x profundidad) y la separación entre cada uno de ellos es de 80 μm. NSQ, núcleo supraquiasmático; OX, quiasma óptico.

5. RESULTADOS

Experimentos Electrofisiológicos

Se registraron un total de 164 neuronas en 33 animales. El examen histológico mostró que 43 (26.2%) neuronas del total se localizaron dentro del supraquiasmático (NSQ), las restantes 121 (73.8%) neuronas se localizaron en el hipotálamo circundante (no-NSQ) (ver fig. 6). Las neuronas del NSQ presentaron una frecuencia espontánea de descarga de 2.36 ± 1.6 Hz, mientras que las neuronas no-NSQ presentaron una frecuencia espontánea de descarga de 2.93 ± 2.41 Hz, sin una diferencia significativa. 26 (60.4%) de 43 neuronas del NSQ respondieron a algún tipo de estimulación. De las neuronas que responden, 16 (61.5%) respondieron a ambos tipos de estimulación, 4 (15.4%) respondieron únicamente a la estimulación retinal y 6 (23.1%) respondieron a la estimulación del PVT. De las neuronas no-NSQ, 77 (63.6%) respondieron a algún tipo de estimulación, de estas últimas neuronas, 50 (64.9%) respondieron a ambos tipos de estímulos, 3 (3.9%) respondieron únicamente a la estimulación de la retina y 24 (31.2%) respondieron únicamente a la estimulación de PVT. A partir del análisis de las respuestas con el CUSUM se determinó el número de respuestas excitadoras e inhibitoras para cada una de las condiciones de estimulación (ver tabla 3). La descripción detallada se hará mas adelante.

Descripción de las respuestas

El análisis de los histogramas peri-estimulo mostró que las respuestas generadas en las neuronas NSQ y no-NSQ fueron inhibiciones o excitaciones simples o complejas; las respuestas simples presentaron un solo componente de respuesta, ya sea excitación (fig. 7a) o inhibición (fig. 7b) y las complejas tuvieron mas de un componente de respuesta (fig. 7c), a veces

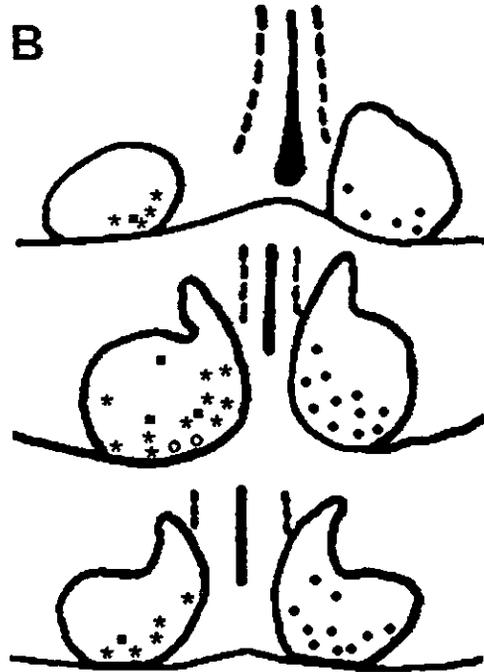
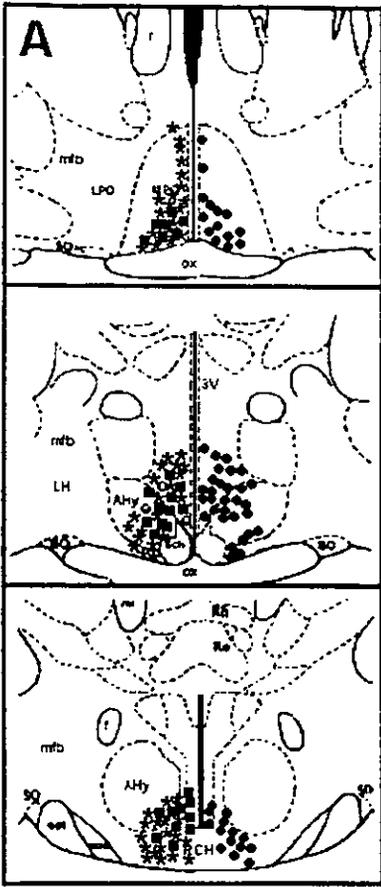


Figura 6. Localización de los sitios de registro. En A se representan los cortes seriales del hipotálamo marcando los sitios de registro de las neuronas no-NSQ y en B los cortes seriales del NSQ a tres niveles para señalar los sitios de registro de las neuronas NSQ (el mas anterior es el primer corte de arriba a abajo). En A y B en el lado derecho de las figuras están marcadas las neuronas que no respondieron (●) y en el lado izquierdo están marcadas las neuronas que respondieron a algún tipo de estimulación, de estas últimas los * representan a las neuronas que respondieron a ambos estímulos, los (○) representan a las neuronas que respondieron exclusivamente a la estimulación de la luz y finalmente los (■) representan a las neuronas que respondieron exclusivamente a la estimulación del PVT. OX, quiasma óptico; 3V, tercer ventrículo; Sch, núcleo supraquiasmático; AHy, hipotálamo anterior; RCH, región retroquiasmática.

los componentes se encontraban uno inmediatamente después de otro y en otras ocasiones los componentes se encontraban separados algunos milisegundos. En el caso de las respuestas complejas se tomo solo el primer componente para los análisis posteriores con el fin de facilitar el manejo de datos.

A partir de la figura 8 a la 11 se muestran algunos ejemplos de neuronas del NSQ que responden a algún tipo de estimulación. En la figura 8 se observa un ejemplo de una neurona que respondió con una excitación a la estimulación de la retina con pulsos de luz. En B y B' se muestra claramente la respuesta tanto en el PETH como en el CUSUM y en D y D' se ve la misma respuesta que no se modifico por la estimulación de las dos aferentes al mismo tiempo ($p=0.59$, U de Mann-Whithney), por lo tanto se consideró que la neurona solamente responde a la estimulación de la luz. La figura 9 es un ejemplo de una neurona que responde con una excitación a la estimulación exclusivamente del PVT. La estimulación con luz no produce ningún cambio (B y B'). En C y C' el PETH muestra una respuesta rápida y muy evidente confirmada con el CUSUM como un cambio de pendiente abrupto indicado por las flechas. En este caso cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo (D y D'), la respuesta obtenida es exactamente la misma a la obtenida en C pues no hay diferencias significativas ($p=0.7$, U de Mann-Whithney) entre estas dos condiciones de estimulación y por lo tanto se consideró que la neurona respondió solo a la estimulación de PVT. En la figura 10 se observa una neurona en donde hay convergencia de aferentes, se puede ver que durante la estimulación con luz (B y B') tanto en el PETH como en el CUSUM no se observa ninguna respuesta, mientras que cuando se estimula el PVT (C y C') se obtiene una respuesta compleja que en orden de aparición tiene los componentes de inhibición, excitación, inhibición, excitación. Los cuatro componentes de la respuesta se encuentran dentro del intervalo señalado por las dos flechas. En la siguiente condición (D y D') al estimular las dos aferentes al mismo tiempo se encontraron diferencias significativas en el primer componente

(inhibición; $Z=2.18$, $p=0.03$; U de Mann-Whithney), en el segundo componente (excitación; $Z=2.2$, $p=0.03$; U de Mann-Whithney) y en el cuarto componente (excitación; $Z=2.61$, $p=0.009$; U de Mann-Whithney) respecto a los mismos componentes en la condición de estimulación de PVT. La interpretación que se da a estas diferencias es que la luz modifica la expresión del segundo componente y que por lo tanto se puede hablar de que existe una interacción entre las dos aferentes. En las figuras 11 y 12 se muestran otros dos ejemplos de neuronas que muestran convergencia, en el primer caso la neurona responde a la estimulación con pulsos de luz y del PVT en forma separada y cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo no aparece respuesta alguna lo cual podría llevar a pensar que la estimulación de ambas aferentes al mismo tiempo cancelan cualquier tipo de respuesta; en el caso de la fig. 12 el convergencia es distinta, ya que la neurona responde a la estimulación de las dos aferentes en forma separada y cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo se ve que prevalece una sobre la otra.

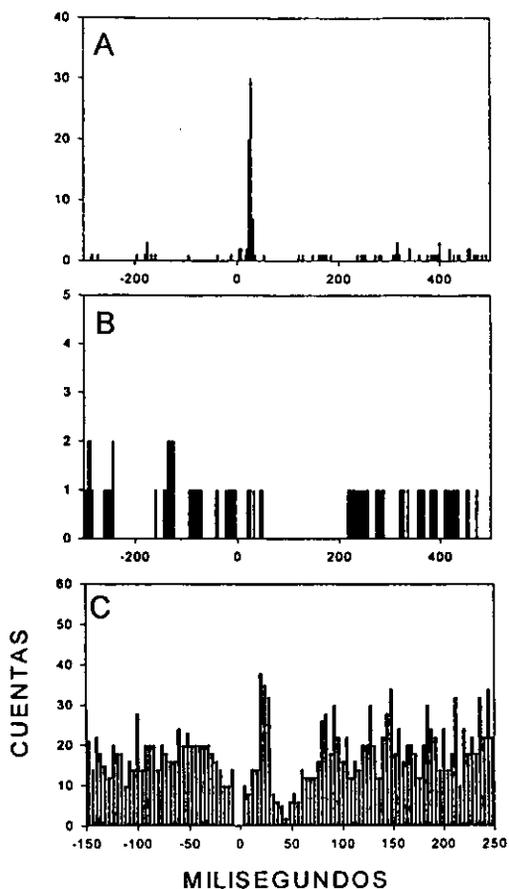


Figura 7. Tipos de respuesta generados por la estimulación de las aferentes en neuronas NSQ y no-NSQ. En A se muestra una respuesta simple de excitación, en B aparece una respuesta simple de inhibición y finalmente en C aparece una respuesta compleja, en este caso es una excitación seguida de una inhibición con una tercera respuesta sostenida de excitación.

Respuestas de convergencia.

Una vez que se analizaron todas las respuestas producidas por la estimulación de las aferentes bajo los distintos esquemas de estimulación, el siguiente paso fue identificar exclusivamente las respuestas en donde se observaron las respuestas de convergencia pues es importante para el trabajo establecer como se llevan a cabo estas interacciones entre aferentes. El análisis de las respuestas en neuronas que mostraron convergencia permitió establecer las siguientes interacciones entre las dos aferentes sobre neuronas NSQ como neuronas no-NSQ:

- a) Una neurona responde a la estimulación de una sola aferente y a la otra no (puede responder a la luz o al PVT), sin embargo cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo la respuesta producida se modifica, es decir, que no es igual a la que se produce con la estimulación de una sola aferente.
- b) Una misma neurona responde a la estimulación de la retina y el PVT en forma separada pero cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo no aparece respuesta alguna.
- c) Una misma neurona responde a la estimulación de la retina y a la estimulación del PVT en forma separada pero cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo alguna de las dos es la que prevalece.
- d) Particularmente para una neurona no-NSQ la estimulación de la retina y del PVT en forma separada no producen ninguna respuesta, sin embargo al estimular simultáneamente las dos aferentes se genera una respuesta.

Por otra parte si analizamos la latencia y duración de las respuestas (independientemente de que las latencias sean cortas o largas) también parece ser que en estas variables es posible observar interacción entre las aferentes pues en algunos casos no solamente cambia el tipo de respuesta sino que también la latencia y duración de las respuestas cambian al estimularse las dos aferentes al mismo tiempo, en otras palabras coincide que algunas de las neuronas que cambian su tipo de

respuesta van acompañadas de cambios en latencia y duración de las respuestas cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo, esto puede ser observado en las tablas 1 y 2.

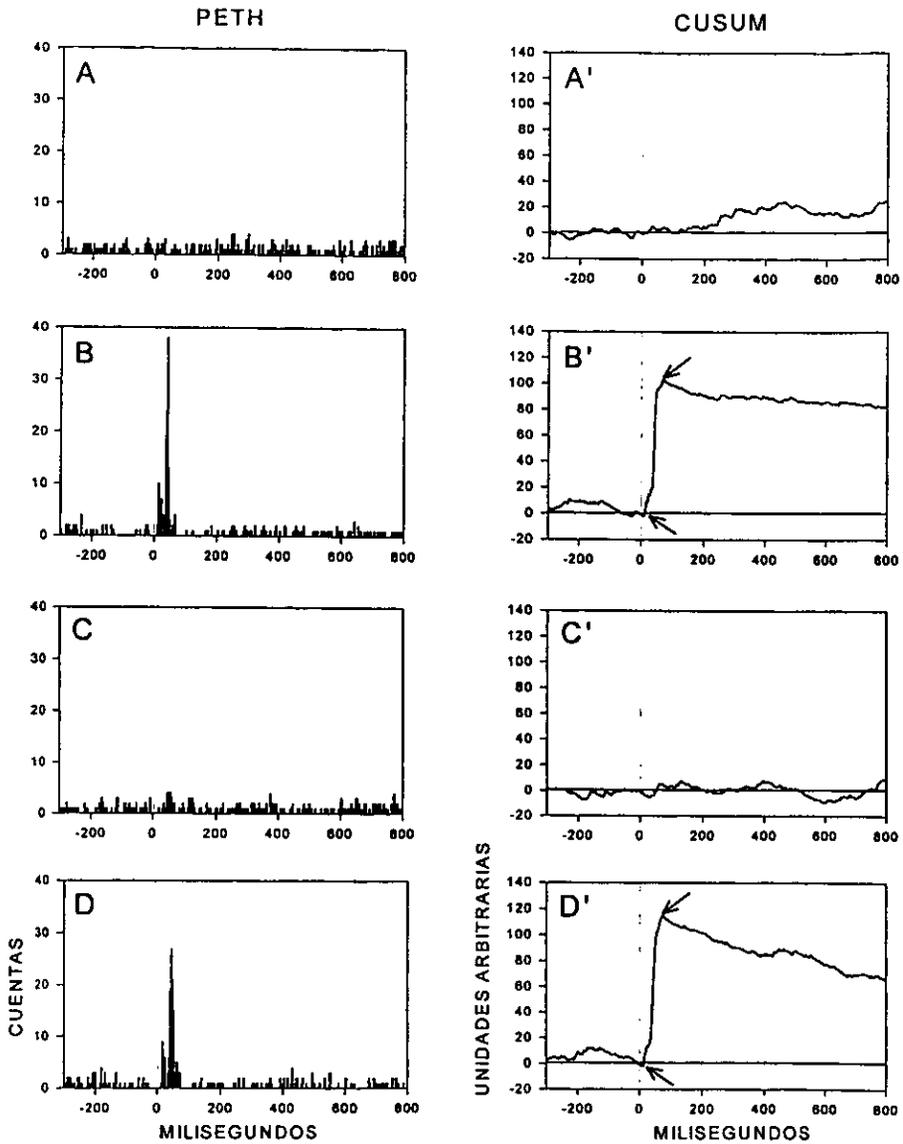


Figura 8. Se muestran los histogramas periestímulo (PETH) y el análisis CUSUM de una neurona registrada dentro del NSQ. La neurona responde con una excitación solamente a la estimulación con luz. A y A' registro control; B y B' estimulación con luz; C y C' estimulación de PVT; D y D' estimulación de L+PVT. En los análisis CUSUM las flechas indican el inicio y el fin de la primera respuesta generada por la estimulación.

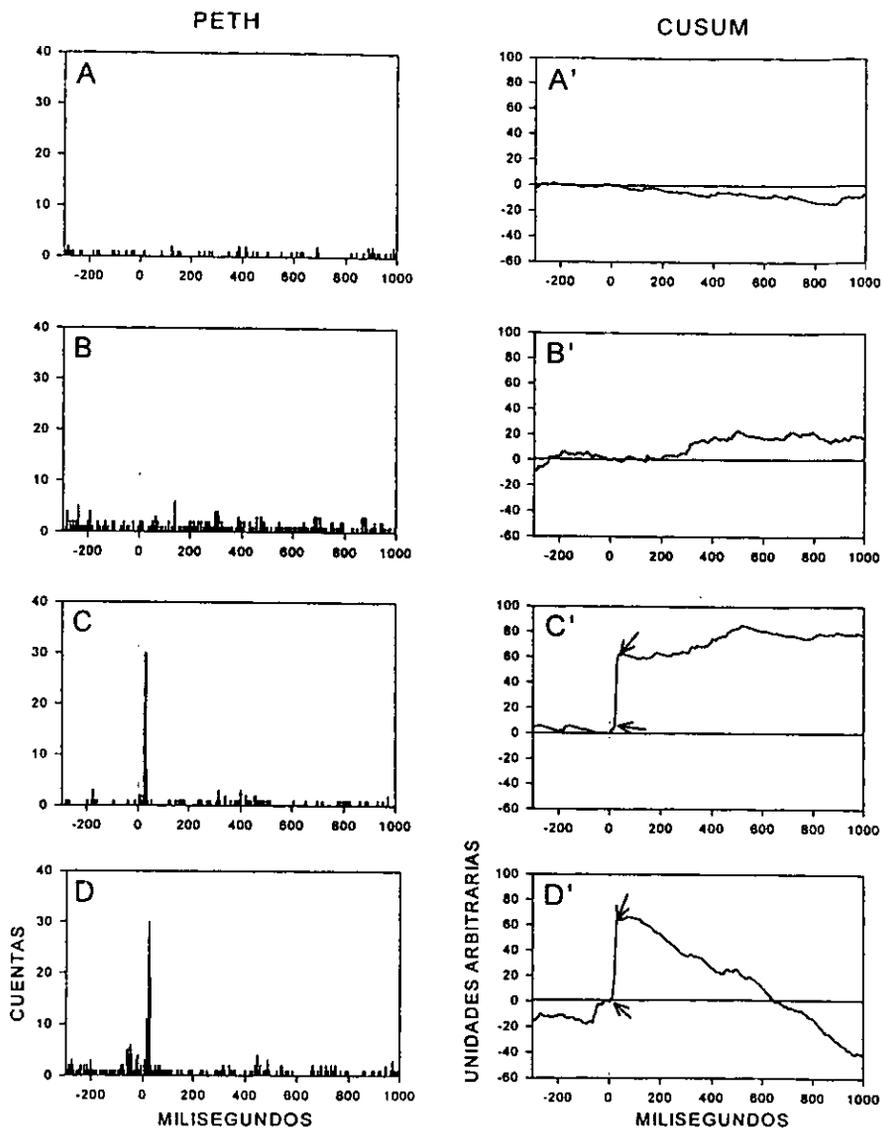


Figura 9. PETH y CUSUM de una neurona registrada dentro del NSQ que responde con una excitación a la estimulación del PVT. Las indicaciones de la figura son las mismas son los mismos que las de la fig. 8.

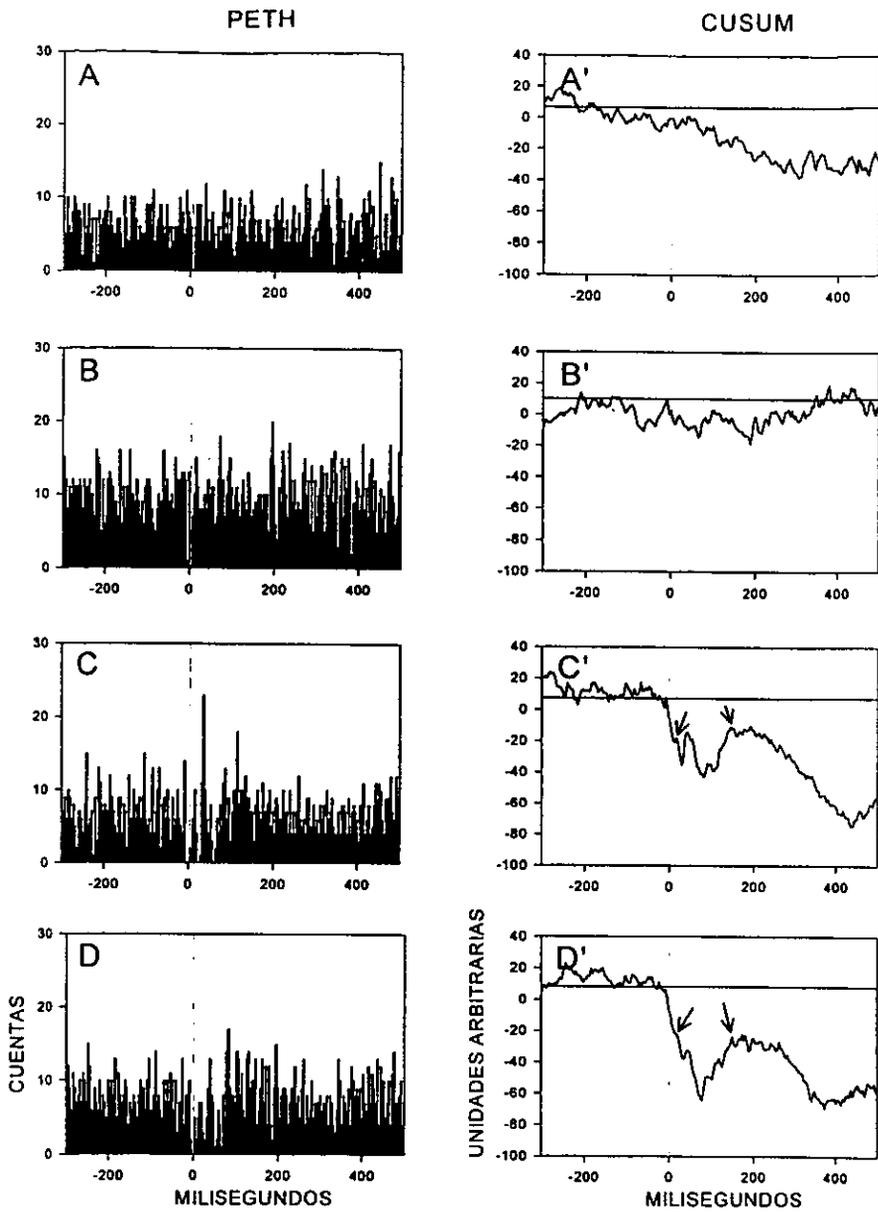


Figura 10. PETH y análisis CUSUM de una neurona registrada dentro del NSQ. En este caso es una neurona que responde a la estimulación con luz pero no responde a la estimulación de PVT, sin embargo cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo la respuesta a la estimulación del PVT es modulada por el estímulo de luz. Las indicaciones de la figura son las mismas que las de la fig. 8

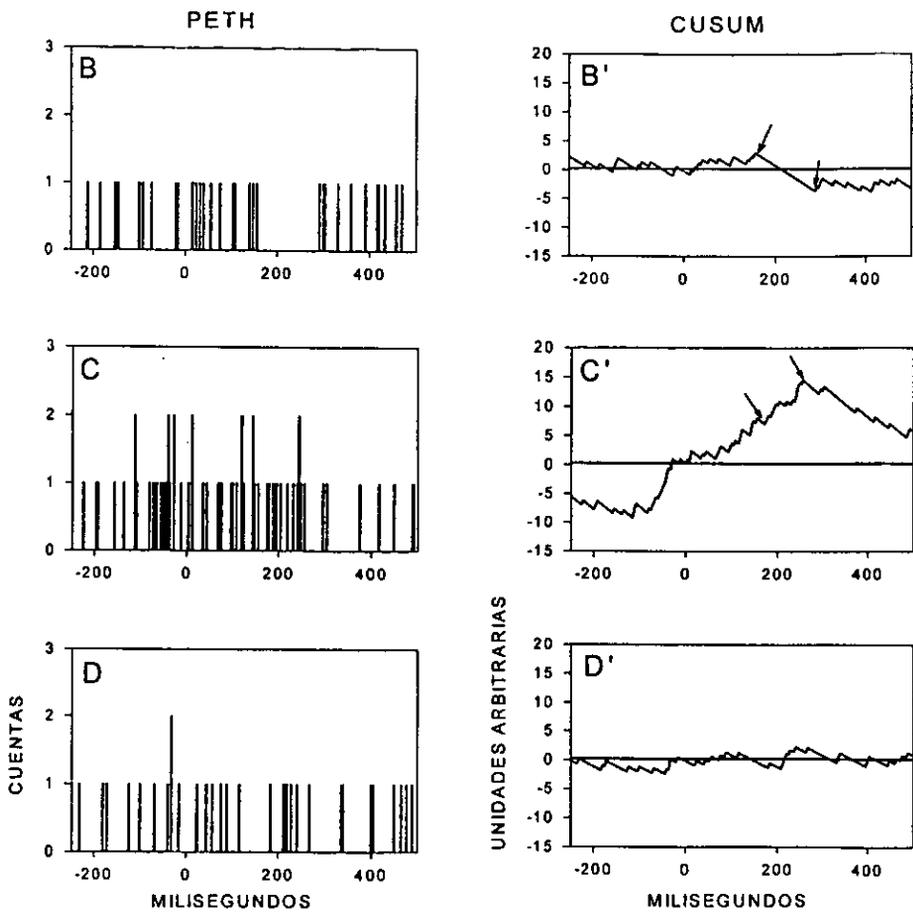


Figura 11. PETH y CUSUM de una neurona del NSQ que responde tanto a la estimulación de luz como a la estimulación de PVT de forma separada y cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo no aparece ningún tipo de respuesta. En este ejemplo no se puso el registro control por lo tanto la serie de paneles empieza en B y B'.

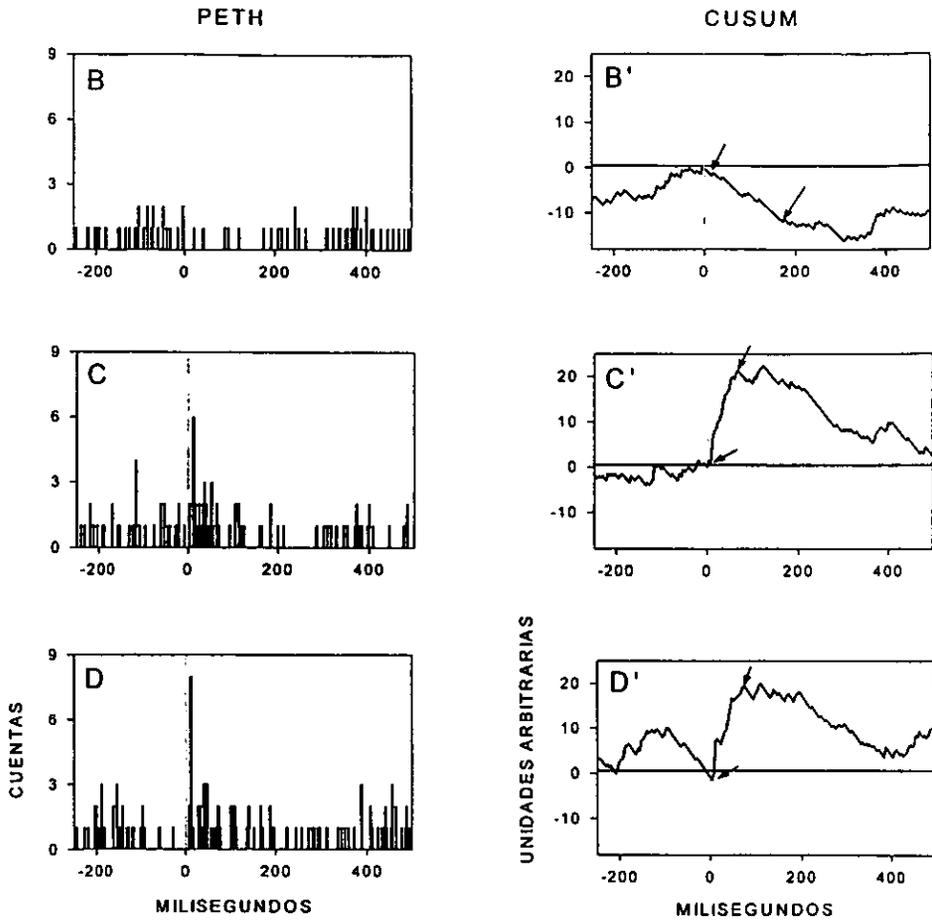


Figura 12. PETH y CUSUM de una neurona del NSQ que responde tanto a la estimulación de luz como a la estimulación de PVT de forma separada y cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo prevalece la respuesta generada por la estimulación de PVT. En este ejemplo tampoco se puso el registro control por lo tanto la serie de paneles empieza en B y B'.

En los siguientes análisis que son: tipos de respuesta, secuencias de los componentes de las respuestas complejas y latencia y duración de las respuestas solo se tomaron en cuenta las neuronas que presentaron latencias de respuesta menores a los 30 ms por considerar que dichas respuestas en el rango de respuestas monosinápticas y que por lo tanto involucran un efecto directo sobre la regulación de la actividad eléctrica de las neuronas del núcleo supraquiasmático.

Tipos de respuesta

Con base a la identificación de las respuestas obtenidas por la estimulación de las aferentes se puede mencionar mas específicamente que en neuronas NSQ la estimulación con luz produjo 2 respuestas de excitación que fueron respuestas simples, mientras que cuando se estimulo el PVT se obtuvieron 3 excitaciones y 2 inhibiciones, en el caso de las excitaciones todas fueron respuestas complejas y en el caso de las inhibiciones 1 fue compleja

1 fue simple. Cuando se estimularon las dos aferentes al mismo tiempo se obtuvieron 5 excitaciones y 4 inhibiciones, en el primer caso 3 fueron respuestas complejas y 2 fueron simples, en el segundo caso 2 fueron respuestas complejas y 2 fueron simples. Lo que se puede observar con estos datos es que cuando se estimula con luz se produjeron solo respuestas de excitación y que las dos fueron simples. En los otros casos de estimulación, para el PVT se produjeron casi igual número de respuestas excitadoras e inhibitorias pero en el caso de las excitaciones todas fueron respuestas complejas y juntando todas las respuestas generadas por la estimulación de PVT se pudo apreciar que las respuestas complejas son las que prevalecen; cuando se estimula con luz+PVT el número de excitaciones e inhibiciones es casi el mismo así como el número de respuestas complejas y simples (tabla 3).

A

LATENCIAS (ms)

NEURONA	LUZ	PVT	L+PVT
10B2254	252	340	56
24B1244	188	16	32
25B2504	244	108	14
25B2546	372	172	18
32B2048	14	12	18

B

DURACIÓN (ms)

NEURONA	LUZ	PVT	L+PVT
A2605	230	105	300
B2145	60	400	420
10B2254	80	48	32
24B1244	212	30	4
24B1711	95	55.5	41.6
25B2504	4	76	12
25B2546	92	62	496
32B2048	364	52	68
48B1847	28	56	76
49B1335	24	144	360

Tabla 1. Neuronas registradas dentro del NSQ en donde se modifican la latencia (A) y duración (B) de las respuestas cuando son estimuladas las dos aferentes al mismo tiempo.

A

LATENCIAS (ms)

NEURONA	LUZ	PVT	L+PVT
4A1199	96	112	104
5A396	624	588	508
5B3442	76	20	256
20B1875	24	52	18
21B176	32	60	16
23B0	256	20	36
24B532	14	68	80
25B1844	660	12	24
34B111	14	18	43
35B1261	94	500	420
38B1735	66	260	20
46B746	18	24	48
49B1185	384	552	12

B

DURACIÓN (ms)

NEURONA	LUZ	PVT	L+PVT
5A396	40	28	60
5B3442	96	12	108
18B1205	596	168	161
20B1875	16	52	4
21B176	12	156	4
23B0	24	16	36
24B1004	88	40	68
32B2048	364	52	68
34B111	106	142	280
37B120	512	984	208
37B160	52	752	704
40B1998	24	428.6	4
46B746	20	48	27
47B354	72	84	32
47B821	532	48	60

Tabla 2. Neuronas no- NSQ que también modifican la latencia (A) y duración (B) de las respuestas cuando son estimuladas las dos aferentes al mismo tiempo.

En cuanto a las neuronas no-NSQ se puede mencionar que las que respondieron solo a la estimulación con luz fueron 2 neuronas que mostraron 1 respuesta de excitación compleja y 1 respuesta de inhibición que también fue compleja; de las que respondieron solo a la estimulación de PVT se obtuvieron 8 excitaciones de las cuales 7 fueron respuestas complejas y 1 fue respuesta simple, además se obtuvieron 10 inhibiciones de las cuales 8 fueron respuestas complejas y 2 fueron simples. Finalmente al estimular las dos aferentes al mismo tiempo se obtuvieron 13 excitaciones de las cuales 11 fueron respuestas complejas y 2 respuestas simples y 8 inhibiciones de las cuales 6 fueron respuestas complejas y 2 fueron respuestas simples. En estas neuronas no-NSQ se observó que cualquier condición de estimulación produjo en su mayoría respuestas complejas sin importar si se trataba de inhibiciones o excitaciones (tabla 3).

RESPONDEN A	NSQ	no-NSQ
LUZ	Excitación 2 (2S) Inhibición ---	Excitación 1 (1C) Inhibición 1 (1C)
PVT	Excitación 3 (3C) Inhibición 2 (1C,1S)	Excitación 8 (7C,1S) Inhibición 10 (8C, 2S)
LUZ+PVT	Excitación 5 (3C,2S) Inhibición 4 (2C,2S)	Excitación 13 (11C,2S) Inhibición 8 (6C,2S)
Total responden	16	41

Tabla 3. Número de neuronas que responden a algún tipo de estimulación indicando también el tipo de respuestas obtenidas. Se incluyen solo las neuronas que presentaron latencias menores a los 30 ms. En paréntesis se marca el número de neuronas que presentaron un tipo específico de respuesta y las letras señalan si fue compleja (c) o simple (S).

Análisis de secuencias de los componentes de las respuestas complejas

Se observó que algunas neuronas NSQ y no-NSQ presentaron de 2 a 8 componentes, en el caso de las neuronas que presentaban más de 3 componentes solo se analizó la secuencia de respuestas excitadoras e inhibitoras de las primeras 2. Así tenemos que para las neuronas NSQ las secuencias más frecuentes fueron:

E-I (3), I-E (1), I-I (1); donde I= Inhibición, E= Excitación y el número entre paréntesis es el número de veces que apareció la combinación. En estas neuronas del NSQ podemos apreciar que la secuencia que se encontró con mayor frecuencia es una excitación seguida de una inhibición. Las neuronas después de las secuencias mencionadas podían presentar diversas combinaciones.

En las neuronas no-NSQ las secuencias más frecuentes fueron:

E-E (7), I-E (5), E-I (3), I-I (2); en este caso la secuencia más frecuente fue de 2 excitaciones, sin embargo analizando las otras respuestas podemos apreciar que la secuencia E-I e I-E aparecieron también en muchas de las respuestas.

Latencia y duración de las respuestas

Como se mencionó anteriormente para este análisis solo se tomaron en cuenta los valores de latencia de las neuronas NSQ y no-NSQ que estaban por abajo de los 30 ms, los valores de duración de estas mismas neuronas son los que se utilizaron en el análisis. Debido a que en algunas condiciones de estimulación se tienen muy pocos valores de latencia y duración solo se hizo una descripción de los valores obtenidos. Como se puede observar en la figura 13 las

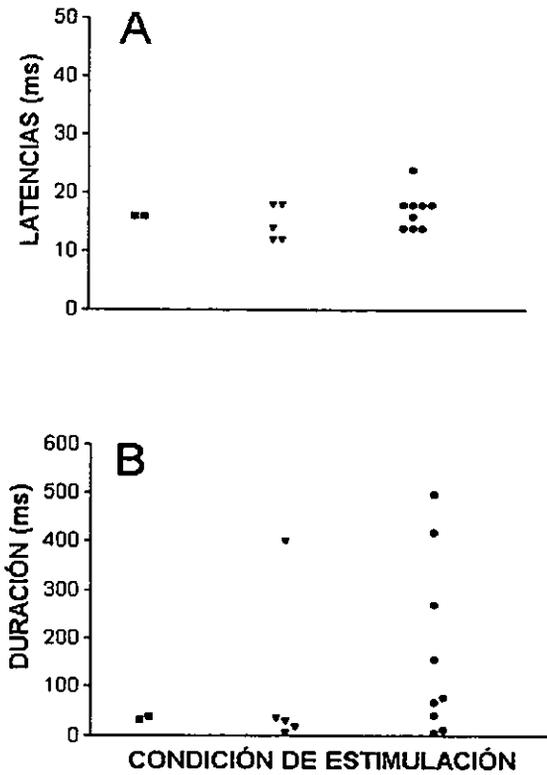


Figura 13. Valores de latencia (A) y duración (B) de las respuestas producidas por la estimulación de las aferentes. Se muestran los valores individuales para las neuronas registradas dentro del NSQ. ■ respuestas excitadoras e inhibitoras producidas por la estimulación con luz; ▼ respuestas excitadoras e inhibitoras producidas por la estimulación de PVT; ● respuestas excitadoras e inhibitoras producidas por la estimulación de L+PVT.

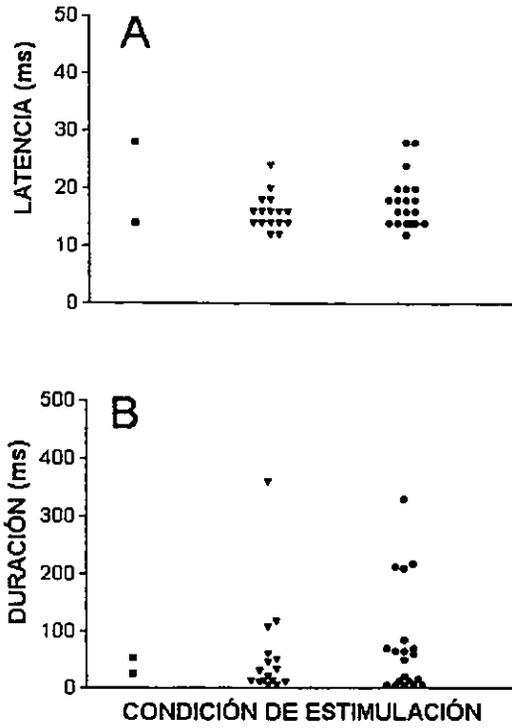


Figura 14. Valores de latencia (A) y duración (B) de las respuestas producidas por la estimulación de las aferentes. Se muestran los valores individuales para las neuronas no-NSQ. ■ respuestas excitadoras e inhibitoras producidas por la estimulación con luz; ▼ respuestas excitadoras e inhibitoras producidas por la estimulación de PVT; ● respuestas excitadoras e inhibitoras producidas por la estimulación de L+PVT.

neuronas NSQ que respondieron exclusivamente a la estimulación con luz no importando si fueron respuestas inhibitorias o excitadoras presentaron latencias de 16 ms, en el caso de neuronas que respondieron a la estimulación del PVT los valores se encontraron aproximadamente entre los 12 y los 19 ms. Los valores de latencia para las neuronas que respondieron a luz+PVT se encontraron en su mayoría entre los 14 y 19 ms y solo un valor se encontró mas allá de los 20 ms (fig. 13a). En el caso de los valores de duración se observó que para las neuronas que respondieron solo a la luz las duraciones fueron muy cortas de alrededor de 20 ms, para las neuronas que respondieron a la estimulación del PVT también la mayoría de valores de duración fueron muy cortos (de 4 a 20 ms) y solo hubo un valor de duración largo que fue de 400 ms. En las neuronas que respondieron a luz+PVT la distribución de valores de duración fue mas amplia como se observa en la figura 13b, hubo valores de duración cortos desde los 4 hasta los 80 ms aproximadamente y después varios valores de duración larga que estuvieron entre los 150 y los 500 ms (fig. 13b).

Los valores de latencia de respuesta para las neuronas no-NSQ que responden exclusivamente a la estimulación con luz presentaron dos valores, de 13 y de 28 ms, en este caso una respuesta parece ser mas rápida que otra. Las neuronas que respondieron exclusivamente a la estimulación de PVT mostraron valores que en su mayoría se agruparon entre los 14 y los 20 ms habiendo un solo valor de latencia mayor a los 20 ms. De manera similar para las neuronas que respondieron a luz+PVT también la mayoría de valores se agruparon entre los 14 y los 20 ms, otros 3 valores se encontraron por arriba de los 20 ms (fig. 14a). Los valores de duración para las neuronas que respondieron exclusivamente a la luz se encontraron entre los 30 y 60 ms de duración. Las neuronas que respondieron exclusivamente a la estimulación de PVT presentaron valores que en su mayoría se agruparon entre los 4 y los 70 ms, los restantes tres valores se encontraron después de los 100 ms, hasta los 380 ms. En el caso de las neuronas que respondieron a

la estimulación de las dos aferentes los valores se agruparon aquellos de muy corta duración que estuvieron entre los 4 y los 20 ms, valores un poco mas largos de los 50 a lo 90 ms aproximadamente y finalmente duraciones mucho mas largas de los 200 a los 350 ms aproximadamente (fig 14b).

Histogramas inter-espigas

El análisis de histogramas inter-espigas (HII) nos permite saber el patrón de disparo que presentaron las neuronas registradas, en este caso los HII mostraron que solo se presento un tipo de patrón de disparo el cual consistió de una distribución asimétrica semejante a la distribución de Poisson (fig. 15). El patrón de distribución de Poisson señalaría que todas las neuronas registradas disparaban irregularmente. En todos los casos el patrón mostrado por las neuronas permaneció sin cambio después de los diferentes tipos de estimulación lo cual indica que no cambia en patrón de disparo aún cuando se estimulan las dos aferentes al mismo tiempo, esto a diferencia de lo encontrado en un estudio previo (Roig y cols., 1997) en donde la estimulación simultánea de la retina y de la hojuela intergeniculada puede inducir un cambio en el patrón de disparo.

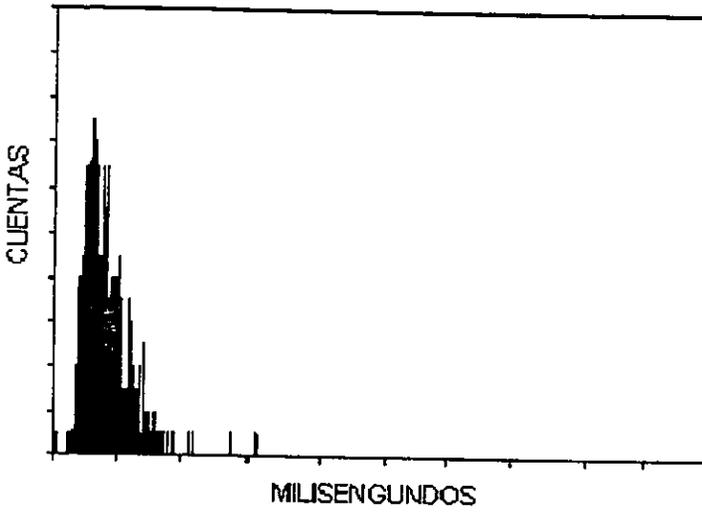


Figura 15. Histograma de intervalos que muestra un patrón asimétrico semejante a una distribución de Poisson para todas las neuronas tanto NSQ como no-NSQ. Este patrón se mantuvo en todas las condiciones de estimulación.

Experimentos de inmunohistoquímica

A partir del conteo estereológico mencionado en material y métodos se obtuvo el número de neuronas inmunoreactivas a C-FOS en el NSQ, el AHA y el LH; adicionalmente con el analizador de imágenes se obtuvo directamente el volumen de las estructuras mencionadas. Tanto el número de neuronas como el volumen calculado permitió establecer la densidad de neuronas por unidad de área estudiada.

Núcleo Supraquiasmático

Los datos mostraron que al comparar el volumen calculado para el NSQ de los cuatro grupos estudiados no hubo diferencias significativas ($p=0.098$, $F_{3,12}=2.62$) entre ellos, lo cual significa que los volúmenes utilizados para las comparaciones entre grupos son equivalentes (fig. 16a). Los volúmenes promedio fueron de 0.105 ± 0.19 mm³ para el grupo control; de 0.098 ± 0.027 mm³ para el grupo de estimulación con luz; 0.079 ± 0.017 mm³ para el grupo de estimulación de PVT y de 0.111 ± 0.011 mm³ para el grupo de luz+PVT. En cuanto a la densidad promedio de neuronas inmunoreactivas a C-FOS en un volumen de 6.4×10^{-5} mm³ (que como se mencionó en material y método corresponde al volumen de un cubo de muestreo) no se encontraron diferencias entre los grupos control (1.45 ± 0.21 céls/ 6.4×10^{-5} mm³) y PVT (1.2 ± 0.38 céls/ 6.4×10^{-5} mm³), mientras que en los grupos de luz (2.64 ± 0.57 céls/ 6.4×10^{-5} mm³) y luz+PVT (2.8 ± 0.78 céls/ 6.4×10^{-5} mm³) la densidad aumenta significativamente ($p=0.002$, $F_{3,12}=9.35$) (fig. 16b) con respecto al grupo control y PVT, sin encontrarse diferencias entre el grupo de luz y luz+PVT. El número total de neuronas que expresan C-FOS estimado para todo el NSQ mostró resultados parecidos a los encontrados en la densidad pues no se encontraron diferencias entre el grupo control (2240 ± 694 neuronas/NSQ) y el grupo PVT (1497 ± 577 neuronas/NSQ) pero se vio un cambio en los grupos de

luz (4086 ± 1477 neuronas/NSQ) y luz+PVT (4941 ± 1636 neuronas/NSQ) en donde aumentó significativamente ($p=0.005$, $F_{3,12}=9.35$) el número total de neuronas que expresan C-FOS, sin que hubiera diferencias significativas entre estos últimos grupos. Una observación importante es que cuando comparamos visualmente los grupos control y PVT parece haber una tendencia a que en el grupo PVT haya menos células inmunoreactivas (fig. 16c), también es importante señalar que cuando se comparan solamente estos dos grupos mediante una t-Student si se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos ($t=3.19$; $p=0.02$).

Tratando de hacer un análisis más fino del número de neuronas inmunoreactivas a C-FOS por zonas del NSQ, el supraquiasmático se dividió en tres niveles, el primero de ellos fue el nivel ventral que corresponde a los cubos del 1 al 7 para el lado izquierdo y del 2 al 8 para el lado derecho; el siguiente nivel fue el medio que corresponde a los cubos 9 a 15 (lado izquierdo) y 10 a 16 (lado derecho); finalmente el tercer nivel fue el dorsal que corresponde a los cubos 17 a 23 (lado izquierdo) y 18 a 24 (lado izquierdo) según la figura 5. Cada uno de los niveles se comparó en los cuatro grupos experimentales para ver si había diferencias en el número de neuronas inmunoreactivas de acuerdo a zonas específicas del NSQ. Los resultados mostraron que en la zona ventral del NSQ hubieron diferencias significativas entre el grupo control vs. los grupos luz y luz+PVT y entre el grupo PVT vs. luz y luz+PVT ($p=0.002$, $F_{3,12}=8.9$), pero no hubo diferencias entre los grupos control y PVT ni entre los grupos luz y luz+PVT. En la parte media del NSQ las diferencias fueron las mismas que en la región ventral ($p=0.004$, $F_{3,12}=7.73$). Solamente al comparar la parte dorsal del NSQ no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos ($p=0.3$, $F_{3,12}=1.3$). Con lo cual podemos señalar que los cambios se realizaron principalmente en la región ventral y media del NSQ.

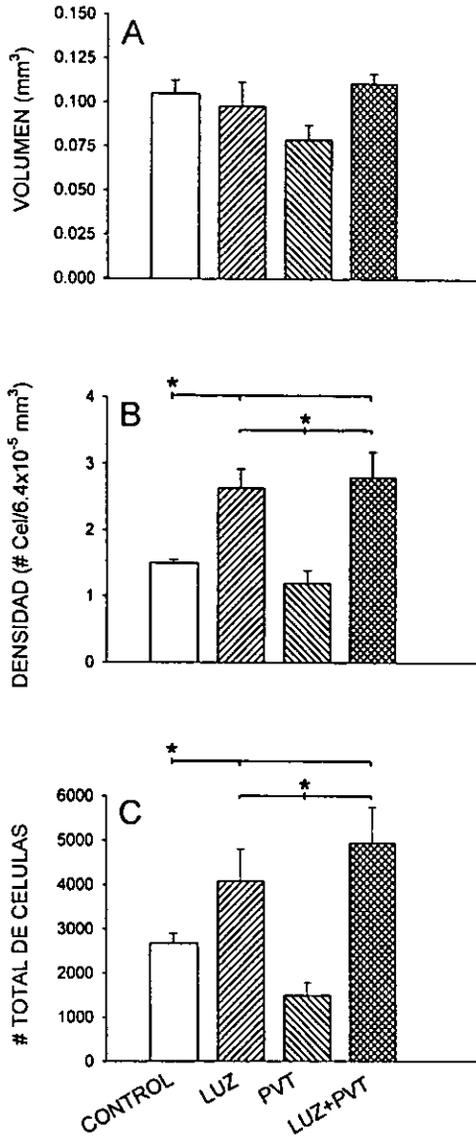


Figura 16. Variables (promedios) del volumen, densidad y # total de células inmunoreactivas a C-FOS dentro del NSQ en los cuatro grupos estudiados. Los * muestran los grupos en los que hay diferencias significativas en las comparaciones pos hoc.

Hipotálamo Anterior.

Al igual que para el NSQ, el volumen del AHA obtenido no mostró diferencias significativas ($p=0.175$, $F_{3,12}=1.94$) (fig.17a), así tenemos que el volumen de grupo control fue de 0.079 ± 0.01 mm³, de 0.08 ± 0.01 mm³ para el grupo de luz, de 0.07 ± 0.01 mm³ para el grupo PVT y de 0.094 ± 0.01 mm³ para el grupo de luz+PVT. Cuando analizamos la densidad de células inmunoreactivas pudimos observar un aumento significativo ($p=0.001$, $F_{3,12}=10.65$) solamente en el grupo de luz+PVT (2.5 ± 0.6 céls/ 6.4×10^{-5} mm³) (fig.17b) pues los valores del grupo control (1.23 ± 0.22 céls/ 6.4×10^{-5} mm³), del grupo de luz (1.23 ± 0.7 céls/ 6.4×10^{-5} mm³) y del grupo PVT (1.4 ± 0.35 céls/ 6.4×10^{-5} mm³) fueron muy parecidos. En el número total de células inmunoreactivas calculado también se observó un aumento significativo ($p=0.00004$, $F_{3,12}=21.1$) solamente en el grupo de luz+PVT (3576 ± 527 neuronas/NSQ) mientras que los otros grupos se mantuvieron sin cambios (control, 1490 ± 299 ; luz, 1548 ± 187 ; PVT, 1732 ± 601 neuronas/NSQ) (fig. 17c).

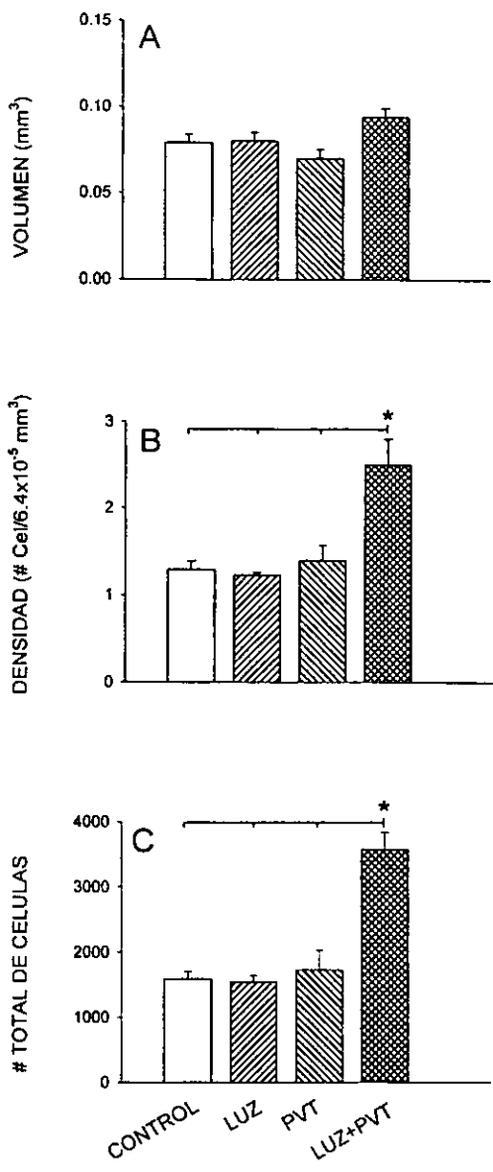


Figura 17. Variables (promedios) de volumen, densidad y # total de células inmunoreactivas a C-FOS en el AHA en los cuatro grupos estudiados. Los * muestran los grupos en los que hay diferencias significativas en las comparaciones pos hoc.

Hipotálamo Lateral.

El volumen del LH se mantuvo sin cambios ($p=0.15$, $F_{3,12}=2.12$) en los cuatro grupos experimentales (control, 0.91 ± 0.035 ; luz, 0.85 ± 0.083 ; PVT, 1.2 ± 0.23 y luz+PVT, 0.95 ± 0.21 mm³) (fig.18a). En la densidad y el número total de células tampoco se observaron cambios significativos en los cuatro grupos ($p=0.09$, $F_{3,12}=2.68$) (control, 1.17 ± 0.05 ; luz, 1.15 ± 0.062 ; PVT, 1.23 ± 0.04 y luz+PVT, 1.4 ± 0.26 céls/ 6.4×10^{-5} mm³) y ($p=0.19$, $F_{3,12}=1.84$) (control, $13,016\pm 6493$; luz, $15,493\pm 1737$; PVT, $23,226\pm 3736$ y luz+PVT, $21,237\pm 6868$ neuronas/NSQ) respectivamente (figs, 18b y c), sin embargo, en ambas variables se observó una tendencia al aumento de las mismas en el grupo de luz+PVT.

Mapas de distribución de neuronas inmunoreactivas a C-FOS

Los mapas de distribución de neuronas que expresan C-FOS durante las diferentes condiciones de estimulación se muestran en la figura 19. Se pudo observar en la figura claramente que en el grupo control (a) hubo poca inmunoreactividad la cual estuvo distribuida homogéneamente en todo el NSQ, al estimular con luz (b) la inmunoreactividad aumentó considerablemente en la región ventral y media pero no en la parte dorsal del supraquiasmático. El patrón de inmunoreactividad del grupo PVT fue muy similar al del grupo control, aunque a simple vista parecería que en la región ventral hubo menos inmunoreactividad que en el control, como se mencionó en párrafos anteriores al comparar específicamente esta zona del supraquiasmático no se encontraron diferencias significativas entre estos dos grupos. Finalmente en el grupo de luz+PVT se observó un patrón de distribución muy parecido al encontrado en el grupo de estimulación de luz.

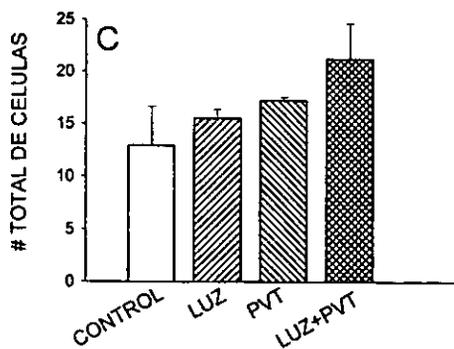
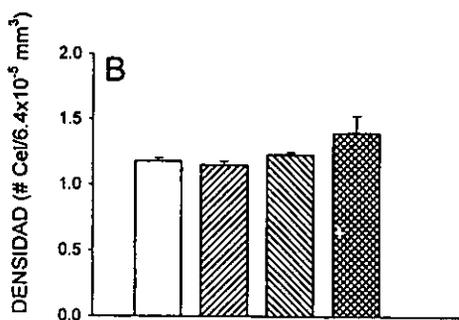
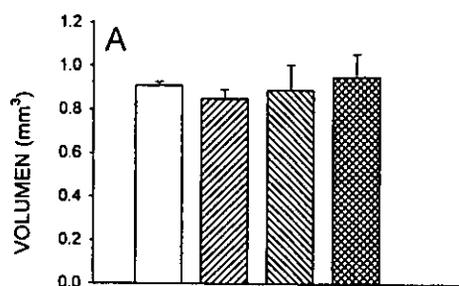


Figura 18. Variables (promedios) de volumen, densidad y # total de células inmunoreactivas a C-FOS en el LH de los cuatro grupos estudiados. Los * muestran los grupos en los que hay diferencias significativas en las comparaciones pos hoc.

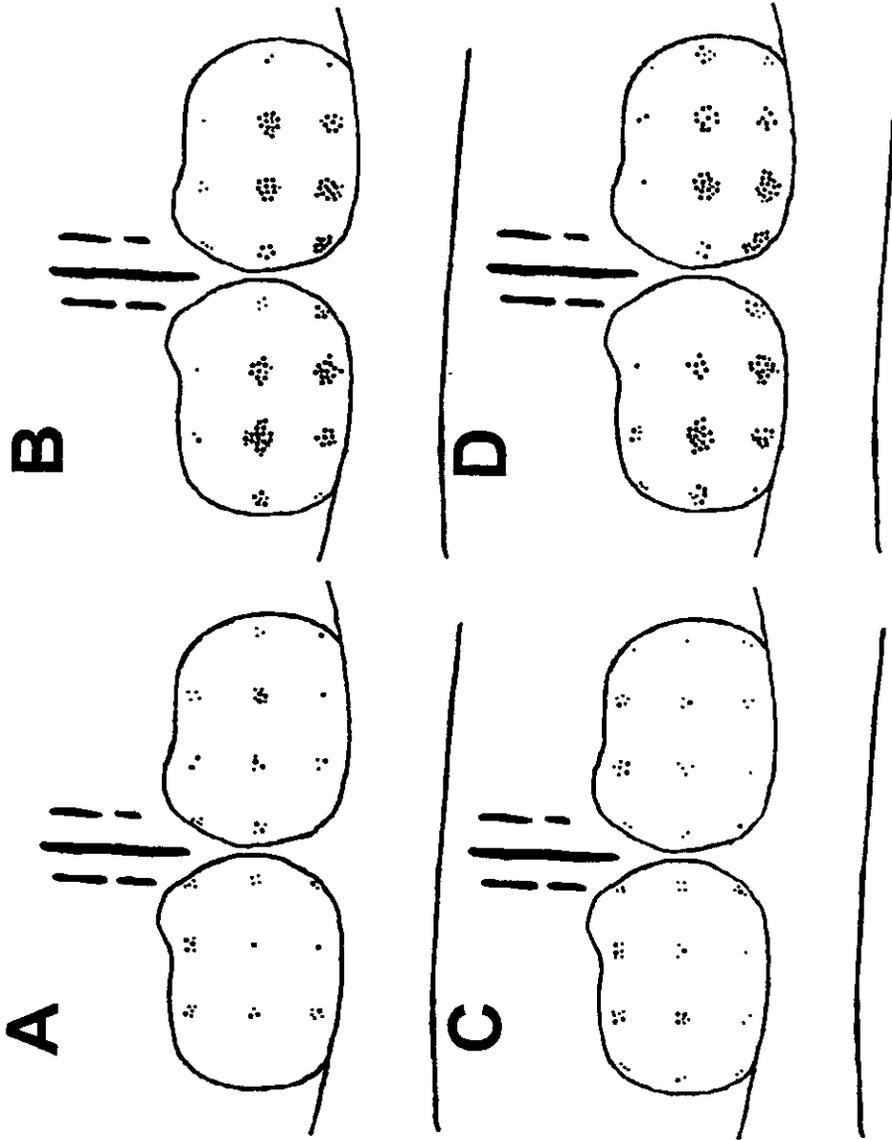


Figura 19. Mapas de distribución de neuronas inmunoreactivas a C-FOS en el NSQ. Se muestra el número de neuronas solamente en las áreas en donde se hizo el muestreo. Los círculos grandes representan a 5 neuronas y los círculos pequeños a una sola neurona. Las condiciones de estimulación son A) control, B) estimulación con luz, C) estimulación de PVT y D) estimulación de luz y PVT simultáneas.

6. DISCUSION

Experimentos electrofisiológicos

Al igual que los resultados obtenidos en experimentos anteriores con la estimulación de la HIG, los presentes datos muestran la presencia de 4 grupos neuronales dentro del NSQ en los experimentos de estimulación de PVT. El primer grupo corresponde a las neuronas que responden a ambos tipos de estimulación siendo el 37.2 % de toda la muestra de neuronas del NSQ, el segundo grupo (9.4 %) corresponde a neuronas que responden exclusivamente a la estimulación de la retina, el tercer grupo (13.9%) responde exclusivamente a la estimulación del PVT y finalmente el 39.5% agrupa a las neuronas que no responden a ningún tipo de estimulación.

La información visual proveniente de la retina puede llegar a 2 poblaciones neuronales diferentes, la que recibe información exclusivamente de la retina y la población que presenta convergencia entre la retina y del PVT, de igual forma la información proveniente del PVT incide en dos poblaciones, la que responde exclusivamente a la estimulación del PVT y la que responde a ambos estímulos.

En el caso específico de la población de neuronas que muestran convergencia se identificaron 3 tipos de interacción entre las dos aferentes que se describen en la sección de resultados y que al parecer no parecen estar asociados a ninguna condición de estimulación. Otro punto importante a considerar es que la interacción de las dos aferentes parece que no solo modula las respuestas generadas por neuronas del NSQ si no que también parece estar modulando otras características de las respuestas como son la latencia y duración.

En general podemos mencionar que 9 de las neuronas del NSQ que responden a la estimulación con luz se encuentra principalmente en la parte ventral lo cual coincide con

los reportes que se tienen en cuanto a que la mayor inervación que recibe el supraquiasmático por sus aferentes es en la parte ventral del mismo. Para el PVT se ha reportado (Moga y cols., 1995) que este núcleo inerva todo el supraquiasmático, es decir que la inervación es más homogénea y no hay una zona en donde exista mayor inervación, sin embargo, en el presente trabajo las neuronas que responden a la estimulación del PVT y a la estimulación de luz+PVT también en su mayoría se encuentran en la región ventral. Por lo tanto no parece haber una distribución específica de neuronas que responden a la estimulación de una aferente en particular.

Se ha reportado que la proporción de neuronas que responden dentro del NSQ es de aproximadamente el 32% (Meijer y cols., 1986) valor que difiere un poco del reportado en el presente trabajo que es del 60.4 % posiblemente por el método de análisis utilizado o por las diferentes condiciones de estimulación. Algunos resultados de otros autores (Groos y Mason, 1978, 1980; Inouye, 1984) indican predominancia de respuestas excitadoras después de la estimulación retinal, esto coincide con nuestros resultados aunque tenemos muy pocas neuronas que responden a la luz como para asegurar dicha conclusión.

De las neuronas registradas fuera del NSQ aproximadamente el 60% también presentó algún tipo de respuesta. Las neuronas no-NSQ que responden a algún tipo de estímulo se encuentran principalmente en el hipotálamo lateral, hipotálamo anterior y región retroquiasmática lo cual también coincide con los reportes que se tienen de la inervación del TRH y del PVT a otras zonas del hipotálamo (Moga y cols., 1995).

Al analizar las respuestas obtenidas en neuronas del NSQ en las distintas condiciones de estimulación se observaron respuestas simples y complejas, en el caso de la estimulación con luz parecería que solo se generan respuestas simples, sin embargo, es

difícil sacar una conclusión clara debido como ya se mencionó anteriormente se tienen pocas neuronas que responden exclusivamente a la luz. En el caso de la estimulación de PVT si parece ser que predominan las respuestas complejas, mientras que cuando se estimula con luz+PVT el número de respuestas complejas y simples es más o menos el mismo. Esto también parece resaltar el hecho de que al interactuar las dos aferentes las respuestas generadas se modulan de manera diferente a que si se estimula una sola aferente.

Los datos de latencias de respuesta después de la estimulación con luz y de L+PVT obtenidos en el presente trabajo difieren con los reportados en el trabajo previo de estimulación de HIG. En el trabajo previo reportamos que la actividad multiunitaria registrada en fibras del quiasma óptico justamente por abajo del NSQ presenta una ola de activación cuya latencia es de aproximadamente 30 ms después de la estimulación fótica de la retina. Las latencias más cortas que obtuvimos después de la estimulación fótica de la retina tienen valores de 14 ms, por lo tanto tenemos valores mucho menores de lo esperado. Esta diferencia se podría explicar considerando que la determinación de la latencia de 30 ms no se hizo utilizando el análisis CUSUM, si no que se determinó por métodos visuales que no permiten obtener un valor muy exacto de la latencia. En otros estudios se habían reportado latencias cortas de excitación que se encontraban entre los 50 a los 140 ms (Groos y Mason, 1978, 1980; Sawaki, 1979) y latencias largas de excitación de los 200 ms hasta los 20 seg (Meijer y cols., 1986. Como se puede ver algunos de los valores que nosotros reportamos son muy parecidos a los reportados por otros autores, sin embargo otros no lo son quizá debido a la diferencia en los métodos de estimulación y de determinación de latencias lo cual es un punto importante que hay que tomar en cuenta cuando se hacen las comparaciones.

Se ha sugerido que la latencia larga de respuestas registradas en el NSQ podrían estar dadas por una combinación del retardo en la red neuronal de la retina y la baja velocidad de conducción de las fibras del RHT (Groos y Mason, 1978). Existe un retraso de alrededor de 15 ms el cual excede el tiempo de conducción de impulsos desde las células ganglionares hasta el NSQ excepto para aquellas neuronas que respondieron exclusivamente a la estimulación de la retina, en tal caso se podría asumir que el retraso corresponde a un circuito intrínseco del NSQ con varias sinápsis de por medio, sin embargo, la posibilidad de la existencia de fibras de conducción lenta no puede desecharse completamente.

Se tienen solo 2 reportes en los que se han observado latencias de potenciales postsinápticos excitatorios (PPE) menores a los 50 ms. En el trabajo de Kim y Dudek (1991) se realizaron registros intracelulares de neuronas del NSQ se reporta que la estimulación del nervio óptico a una distancia aproximada de 2.5 mm del quiasma óptico produce PPE con latencias de 6.2 ms, esta latencia es mucho menor que la que se ha reportado en otros trabajos, sin embargo hay que considerar que se está estimulando directamente el nervio óptico y no ocurre el retraso que implica el paso de información a través de todas las capas de la retina. Senseman y Rea (1994) mediante una técnica que involucra la utilización de un colorante sensible a cambios de voltaje establecieron la presencia de 2 tipos de potenciales postsinápticos excitatorios poblacionales (PPEP), el primero de ellos lo denominaron PPEP temprano y su latencia de aparición es de alrededor de 16 ms, el segundo tipo denominado PPEP tardío aparece alrededor de los 40 ms. Los autores concluyen que posiblemente los PPEP tempranos están representando las neuronas del NSQ que son activadas por una vía monosináptica por la latencia corta observada,

mientras que los PPEP tardíos estén representando a las neuronas del NSQ que son activadas a través de una vía polisináptica.

El análisis de histogramas de intervalos de los experimentos de estimulación de HIG mostró neuronas con histogramas de intervalos con una distribución de Poisson y con una distribución armónica (fig. 20). Cuando se estimulaba la retina y la HIG simultáneamente se podía inducir cambios en el patrón de una distribución de Poisson a una armónica (fig.21). En el presente trabajo solo se registraron neuronas que presentaban histogramas de intervalos con una distribución de Poisson sin que se produjeran cambios en la distribución con la estimulación simultánea de la retina y el PVT. Esto se podría explicar considerando que el porcentaje de neuronas que presentan una distribución armónica es bajísimo al igual que el de las neuronas que cambian su patrón de disparo con la estimulación simultánea de las aferentes, por lo tanto la probabilidad de registrarlas es muy baja.

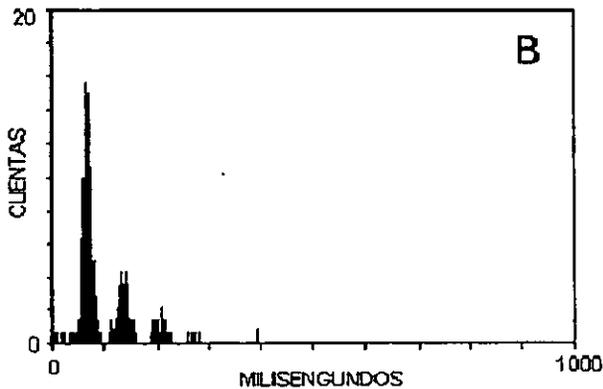


Figura 20. Distribución armónica reportada en los experimentos de estimulación de HIG.

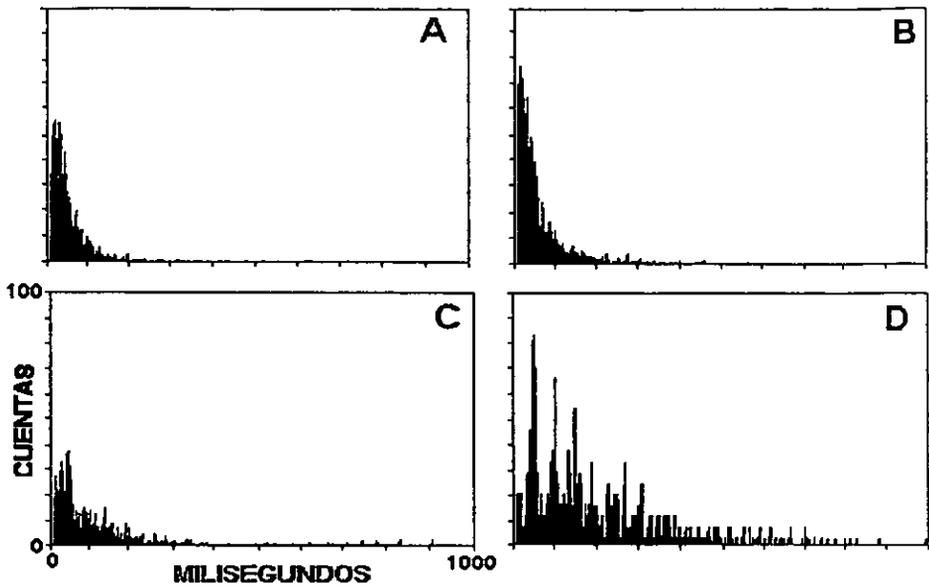


Figura 21. Histogramas de intervalos de una neurona registrada dentro NSQ en la cual se puede observar el cambio del patrón de disparo de una distribución asimétrica a una distribución armónica cuando se estimulan simultáneamente de las dos aferentes (D). En A se muestra el registro control, en B la estimulación con luz y en C la estimulación de la HIG.

Experimentos de expresión de C-FOS.

Se ha reportado que hay un ritmo diario de expresión de C-FOS dependiente del ciclo luz-oscuridad (Aronin y Schwartz, 1991). Cuando se estimula con luz la inmunoreactividad es dependiente de la fase lo cual quiere decir que se pueden obtener niveles altos de C-FOS si se estimula durante la noche subjetiva pero se obtienen niveles

bajos cuando se estimula en el día subjetivo (Rusak y cols., 1992; Schwartz, 1994). Nosotros pudimos observar expresión espontánea de C-FOS en los grupos control y expresión inducida por estimulación de la retina en el grupo de estimulación de luz lo cual concuerda con los datos reportados. Sin embargo, hasta el momento no se tenían datos acerca del efecto de la estimulación de PVT y de la estimulación simultánea de retina y PVT sobre la inducción de C-FOS, siendo el presente trabajo el primero que aporta datos.

Los mapas de distribución de inmunoreactividad muestran que en el grupo control existe escasa expresión espontánea de C-FOS y que su distribución es homogénea, es decir que se encuentra en la parte dorsomedial y ventrolateral del NSQ. La estimulación de luz por 30 min induce un aumento en la inmunoreactividad, en la parte ventrolateral, siendo muy escasa en la región dorsolateral. Por otra parte, la estimulación del PVT no induce aumento en la expresión de C-FOS en el NSQ pero parecería que existe una tendencia a que la parte ventrolateral presente menos neuronas inmunoreactivas que el grupo control aunque la ANOVA no muestre estas diferencias, esto podría deberse a la variabilidad del número de neuronas inmunoreactivas a C-FOS entre individuos que componen un grupo. Finalmente la estimulación simultánea de las aferentes induce una expresión de C-FOS que es muy parecida a la de la estimulación de luz. En este sentido pareciera ser que la inducción de C-FOS para ver cambios de excitabilidad a nivel poblacional y a largo plazo no es un buen indicador para estudiar la convergencia de aferentes y por lo tanto la interacción de las mismas para modular la actividad eléctrica del NSQ.

En cuanto a la inmunoreactividad de las otras dos zonas hipotalámicas estudiadas solamente en el AHA se observó un aumento en la densidad y en el número de células cuando se estimularon simultáneamente las dos aferentes, esto es muy interesante ya que

como se ve en la figura 17b y c solo durante la estimulación simultánea es cuando se ve este efecto. Estos datos de C-FOS y los datos electrofisiológicos nos permiten observar que también fuera del NSQ se lleva a cabo la interacción de las aferentes para modular la excitabilidad neuronal.

De manera general se puede decir que el diseño experimental que hemos utilizado nos ha permitido confirmar que las aferentes al NSQ como es el caso del PVT modulan junto con el tracto retino-hipotalámico la actividad eléctrica del NSQ a través de microcircuitos dentro del NSQ en respuesta a estímulos luminosos ambientales y tal vez a señales temporales internas del propio organismo que posiblemente sirvan para generar respuestas adaptativas de organismo a las señales temporales de su medio.

Como se menciono en la introducción el PVT es un constituyente talámico que participa en respuestas conductuales y autonómicas que relacionadas con stress y conductas neurocognitivas emocionales (Bot y Chahl, 1996; Otake y cols., 1995), sin embargo en el caso de su participación en algún aspecto de la regulación de ritmos circadianos se tiene muy poca información, solamente se sabe que el PVT recibe conexiones sinápticas con diversos componentes del sistema circadiano como la retina, la HIG y además con el NSQ con el cual presenta conexiones reciprocas. Finalmente se ha propuesto que el PVT podría funcionar como un componente de sincronización, como un componente efector y/o como un componente de "feedback" del sistema circadiano. Debido a esto, el trabajo realizado aporta algunos datos que pretenden ayudar a comprender el funcionamiento del sistema circádico.

7. CONCLUSIONES

Electrofisiología

- Las neuronas del NSQ responden a la estimulación con pulsos de luz de corta duración aplicados a la retina y a la estimulación eléctrica del PVT con pulsos eléctricos de corta duración produciendo tanto respuestas excitadoras como inhibitoras.
- Se observó la presencia de 4 poblaciones neuronales dentro del NSQ que responden solo a determinados estímulos, éstas poblaciones permiten establecer la presencia de canales o vías neuronales funcionales encargadas de transmitir la información a cada una de ellas.
- La presencia de una población que responde a la estimulación de ambas aferentes dentro del NSQ establece la existencia de convergencia de información proveniente de la retina y el PVT que modula el tipo de respuestas generadas y en algunos casos también modula la latencia y duración de las respuestas.
- La presencia de neuronas que responden a la estimulación de las aferentes y que en algunos casos muestran convergencia confirma funcionalmente que existe una radiación de información al hipotálamo circundante, cuya importancia no ha sido estudiada.
- La técnica de registro de actividad unitaria dentro del NSQ permitió discriminar

efectivamente respuestas rápidas a nivel neuronal.

C-FOS

- Las neuronas del NSQ responden a la estimulación con pulsos de luz aplicados a la retina y a la estimulación eléctrica del PVT con pulsos eléctricos produciendo expresión de C-FOS de acuerdo al estímulo aplicado.
- No se vio una modulación muy clara de la expresión de C-FOS dentro del NSQ cuando las dos aferentes se estimularon al mismo tiempo.
- A diferencia de lo observado en el NSQ, en el hipotálamo lateral la estimulación de las dos aferentes al mismo tiempo produjo un aumento de expresión de C-FOS, lo cual sugiere una fuerte modulación hipotálamo lateral por las dos aferentes estudiadas, sin embargo la importancia de esta modulación aún no está estudiada.

7. REFERENCIAS.

- Abe, H. and Rusak, B. (1992) Stimulation of the hamster ventral lateral geniculate nucleus induces Fos-like immunoreactivity in suprachiasmatic nucleus cells. *Neurosci. Lett.* 148:185-189.
- Aguilar-Roblero, R. and Vega-González, A. (1993) Splitting of locomotor circadian rhythmicity in hamsters is facilitated by pinealectomy. *Brain Res.* 605:229-236.
- Albers, H.E. and Ferris, C.F. (1984) Neuropeptide Y: role in light-dark entrainment of hamster circadian rhythms. *Neurosci. Lett.* 50:163-168.
- Albers, H.E., Ferris, C.F., Leeman, S.E., et. al. (1984) Avian pancreatic polypeptide phase shifts hamster circadian rhythms when microinjected into the suprachiasmatic region. *Science* 223:833-835.
- Armstrong, S.M. (1989) Melatonin: the internal Zeitgeber of mammals?. *Pineal Res. Rev.* 7:157-202.
- Aschoff, J. (1990) A survey on biological rhythms. En: *Handbook of behavioral neurobiology* Vol. 4. Biological Rhythms. Aschoff, J. Ed. Plenum Press. Pp 3-10.
- Bentivoglio, M., Balercia, G. and Kruger, L. (1991) The specificity of the nonspecific thalamus: The midline nuclei. *Prog. Brain Res.* 87:53-80.
- Biello, S.M. (1995) Enhanced photic phase shifting after treatment with antiserum to neuropeptide Y. *Brain Res.* 673:25-29.
- Biello, S.M. and Mrosovsky, N. (1995) Blocking the phase-shifting effect of neuropeptide Y with light. *Proc. R. Soc. Lond.* 259:179-187.
- Bosler, O. and Baudet, A. (1985) VIP neurons as prime synaptic targets for serotonin afferents in the rat suprachiasmatic nucleus radioautographic and immunocytochemical study. *J. Neurocytol.* 14:749-763.
- Bot, G. and Chahl, L.A. (1996) Induction of Fos-like immunoreactivity by opioids in guinea-pig brain. *Brain Res.* 731:45-56.
- Cagampang, F.R.A. and Inouye, S.I.T. (1994) Diurnal and circadian changes of serotonin in the suprachiasmatic nuclei: regulation by light and an endogenous pacemaker. *Brain Res.* 639:175-179.
- Card, J.P. and Moore, R.Y. (1989) Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J. Comp. Neurol.* 284:135-147.
- Card, J.P. and Moore, R.Y. (1991) The organization of visual circuits influencing the circadian activity of the suprachiasmatic nucleus. En: *Suprachiasmatic Nucleus. The*

Mind's Clock (Klein, D.C., Moore, R.Y. and Reppert, S.M. eds.) Oxford University Press. Pp 51-76.

- Card, J.P., Whealy, M.E., Robbins, A.K., et. al. (1991) Two herpesvirus strains are transported differentially in the rodent visual system. *Neuron* 6:957-969.
- Castel, M., Belenkey, S., Cohen S., et. al. (1993) Glutamate-like immunoreactivity in retinal terminals of the mouse suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 5:368-381.
- Chen, S. and Su, H.-S. (1990) Afferent connections of the thalamic paraventricular and paratenial nuclei in the rat. A retrograde tracing study with iontophoretic application of Fluorogold. *Brain Res.* 522:1-6.
- Colwell, C.S., Ralph, M.R. and Menaker, M. (1990) Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior?. *Brain Res.* 523:117-120.
- Colwell, C.S., Foster, R.G. and Menaker, M. (1991) NMDA receptor antagonists block the effects of light on circadian behavior in the mouse. *Brain Res.* 554:105-110.
- Cornwall, J. and Phillipson, O.T. (1988) Afferent projections to the dorsal thalamus of the rat as shown by retrograde lectin transport. II. The midline nuclei. *Brain Res. Bull.* 21:147-161.G
- Cui, L-N. and Dyball, R.E.J. (1996) Synaptic input from the retina to the suprachiasmatic nucleus changes with the light-dark cycle in the Syrian hamster. *J Physiol.* 497:483-493.
- DeVries, M.J., Cardozo, B.N., van der Waut J., et. al. (1993) Glutamate immunoreactivity in terminals of the retinohypothalamic tract of the brown Norwegian rat. *Brain Res.* 612:231-237.
- Ding, J.M., Chen, D., Weber, E.T., et. al. (1994) Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. *Science.* 266:1713-1117.
- Earnest, D.J. and Sladek, C.D. (1986) Circadian rhythms of vasopressin release from the individual rat suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Res.* 382:129-133.
- Earnest, D.J. and Sladek, C.D. (1987) Circadian vasopressin release from perfused rat suprachiasmatic explants in vitro: effects of acute stimulation. *Brain Res.* 422:398-402.
- Earnest, D.J., Iadarola, M., Yeh, H.H. and Olschowka, J.A. (1990) Photic regulation of c-fos expression in neuronal components governing the entrainment of circadian rhythms. *Exp. Neurol.* 109:353-361.

- Earnest, D.J., Ouyang, S. and Olschowka, J.A. (1992) Rhythmic expression of Fos-related proteins within the rat suprachiasmatic nucleus during constant retinal illumination. *Neurosci. Lett.* 140:19-24.
- Earnest, D.J., Di Giorgio, S. and Olschowka, J.A. (1993) Light induces expression of Fos-related proteins within the rat gastrin-releasing peptide neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 627:205-209.
- Faradji, H., Jouvet, M. and Cespuglio, R. (1983) Voltammetric measurements of 5-hydroxyindole compounds in the suprachiasmatic nuclei: circadian fluctuations. *Brain Res.* 279:111-119.
- Ferraro, J.S. and Steger, R.W. (1990) Diurnal variations in brain serotonin are driven by the photic cycle and are not circadian in nature. *Brain Res.* 512:121-124.
- Foster, R.G., Provencio, I., Hudson, D., et. al. (1991) Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (*rd/rd*). *J. Comp. Physiol. [A]*. 169:39-50.
- Foster, R.G., Argamaso, S., Coleman, S., et. al. (1993) 1. Photoreceptors regulating circadian behavior: a mouse model. *J. Biol. Rhythms.* 8:517-523.
- Glass, J.D., Randolph, W.W., Ferreira, S.A., et. al. (1992) Diurnal variation in 5-hydroxyindole-acetic acid output in the suprachiasmatic region of the siberian hamster assessed by in vivo microdialysis: evidence for nocturnal activation of serotonin release. *Neuroendocrinol.* 56:582-590.
- Glass, J.D., Selim, M., and Rea, M.A. (1994) Modulation of light-induced c-fos expression in the suprachiasmatic nuclei by 5-HT_{1A} receptor agonist. *Brain Res.* 638:235-242.
- Green, D.J. and Guillete, R. (1982) Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Res.* 245:198-200.
- Groenewegen, H.J. and Berendse, H.W. (1994) The specificity of the "nonspecific" midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci.* 17:52-57.
- Groos, G.A. and Hendriks, J. (1982) Circadian rhythm of firing in electrical discharges of rat suprachiasmatic neurons recorded in vitro. *Neurosci. Lett.* 34:283-288.
- Groos, G.A. and Mason, R. (1978) Maintained discharge of rat suprachiasmatic neurons at different adaptation levels. *Neurosci. Lett.* 8:59-64.
- Groos, G.A. and Mason, R. (1980) The visual properties of rat and cat suprachiasmatic neurons. *J. Comp. Physiol.* 135:149-356.
- Güldner, F.H. and Wolff, J.R. (1987) Retinal afferents form gray type I and type II synapses in the suprachiasmatic nucleus. *Exp. Brain Res.* 32:83-89.

- Guy, J., Boster, O., Dusticier, G., Pelletier, G. and Calas, A. (1987) Morphological correlates of serotonin-neuropeptide Y interactions in the rat suprachiasmatic nucleus: combined radioautographic and immunocytochemical data. *Cell Tissue Res.* 250:657-662.
- Harrington, M.E. and Rusak, B. (1986) Lesion of the thalamic intergeniculate leaflet alter hamster circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 1:309-325.
- Harrington, M.E. and Rusak, B. (1989) Photic responses of geniculo-hypothalamic tract neurons in the Syrian hamster. *Vis. Neurosci.* 2:367-375.
- Harrington, M.E. and Rusak, B. (1991) Luminance coding properties of intergeniculate leaflet neurons in the golden hamster and the effect of chronic clorgyline. *Brain Res.* 554:95-104.
- Haus, E. and Touitou, Y. (1994) Principles of clinical chronobiology. In: *Biological Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine.* (Haus, E. and Touitou, Y. eds.). Springer-Verlag, New York. Pp 6-34.
- Hiroshige, T. and Honma, K. (1979) Internal and external synchronization of endogenous rhythms in the rat and involvement of brain biogenic amines. In: *Biological rhythms and their control mechanisms* (Suda, M., Hayaishi, O., Nakagawa, H. eds.). Amsterdam: Elsevier. Pp 232-245.
- Honma, K., Watanabe, K. and Hiroshige, T. (1979) Effects of parachlorophenylalanine and 5,6-dihydroxytryptamine on the free-running rhythms of locomotor activity and plasma corticosterone in the rat exposed to continuous light. *Brain Res.* 169:531-544.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in the immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histo. Cyto.* 29:577-580.
- Huang, S. and Pan, J. (1993) Potentiating effects of serotonin and vasoactive intestinal peptide on the action of glutamate on suprachiasmatic neurons in brain slices. *Neurosci. Lett.* 159:1-4.
- Inouye, S.I.T. and Kawamura, H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:5962-5966.
- Inouye, S.I.T. and Kawamura, H. (1982) Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *J. Comp. Physiol.* 146:153-160.
- Inouye, S.I.T. (1984) Light responsiveness of the suprachiasmatic nucleus within the island with the retino-hypothalamic tract spared. *Brain Res.* 294:263-269.

- Johnson, R.F., Morin, L.P. and Moore, R.Y. (1988) Retinohypothalamic projections in the hamster and the rat demonstrated using cholera toxin. *Brain Res.* 462:301-312.
- Johnson, R.F., Moore, R.Y. and Morin, L.P. (1989) Lateral geniculate lesions alter activity rhythms in the hamster. *Brain Res. Bull.* 22:411-422.
- Jones, B.E. and Yang, T.-Z. (1985) The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J. Comp. Neurol.* 242:56-92.
- Klein, D.C., Moore, R.Y. and Reppert, S.M. (1991) *Suprachiasmatic Nucleus: The mind's Clock.* New York, Oxford University Press. P 476.
- Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayo, K.E. and Takahashi, J.S. (1990) Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Neuron.* 5:127-134.
- Kubota, A., Inouye, S.I.T. and Kawamura, H. (1981) Reversal of multiunit activity outside the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Neurosci. Lett.* 27:303-308.
- Levine, J.D., Weiss, M.L., Rosenwasser, A.M., et. al. (1991) Retinohypothalamic tract in the female albino rat: a study using horseradish peroxidase conjugated to cholera toxin. *J. Comp. Neurol.* 306:344-360.
- Liou, S.Y., Shibata, S., Iwasaki, K., et. al. (1986) Optic nerve stimulation induced release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res. Bull.* 16:527-531.
- Lovenberg, T.W., Baron, B.M., de Lecea, L., et. al. (1993) A novel adenylate cyclase-activating serotonin receptor (5-HT₇) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* 11:449-458.
- Mason, R. (1986) Circadian variation in sensitivity of suprachiasmatic and lateral geniculate neurons to 5-hydroxytryptamine in the rat. *J. Physiol.* 377:1-13.
- Medanic, M. and Guillete, M.U. (1992) Serotonin regulates the phase of the rat suprachiasmatic circadian pacemaker in vitro only during the subjective day. *J. Physiol.* 450:629-642.
- Meijer, J.H., Groos, G.A. and Rusak, B. (1986) Luminance coding in a circadian pacemaker: the suprachiasmatic nucleus of the rat and the hamster. *Brain Res.* 382:109-118.
- Meijer, J.H. and Rietveld, W.J. (1989) Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol. Rev.* 69:671-707.

- Meijer, J.H. (1991) Integration of visual information by the suprachiasmatic nucleus. .En: Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock (Klein, D.C., Moore, R.Y. and Reppert, S.M. eds.) Oxford University Press. Pp 107-119.
- Meyer, D.C. and Quay, W.B. (1976) Hypothalamic and suprachiasmatic uptake of serotonin in vitro: twenty four-hour changes in male and proestrus female rats. *Endocrinology* 98:1160-1165.
- Meyer-Bernstein, E.L. and Morin, L.P. (1996) Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J. Neurosci.* 16:2097-2111.
- Meyer, E.L., Harrington, M.E., and Rahamani, T.A. (1993) A phase-response curve to the benzodiazepine chlordiazepoxide and the effect of geniculo-hypothalamic tract ablation. *Physio. & Behav.* 53:237-243.
- Mikkelsen, J.D. and Larsen, P.J. (1993) Substance P in the suprachiasmatic nucleus of the rat: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Histochemistry.* 100:3-16.
- Miller, J.D. and Fuller, C.A. (1990) The response of suprachiasmatic neurons of the rat hypothalamus to photic and serotonergic stimulation. *Brain Res.* 515:155-162.
- Miller, J.D., Morin, L.P., Schwartz, W.J. and Moore, R.Y. (1996) New insights into the mammalian circadian clock.. *Sleep.* 19:641-667.
- Minors, D.S. and Waterhouse, J.M. (1981) Introduction and methods of study. En: *Circadian rhythms and the human* (Minors, D.S. y Waterhouse, J.M. eds) Wright PSG, London. Pp 1-24.
- Minors, D.S. and Waterhouse, J.M. (1988) Mathematical and statistical analysis of circadian rhythms. *Psychoneuroendocrinology.* 13:443-464.
- Moffett, J.R., Williamson, L., Palkovits, M., et. al. (1990) N-Acetylaspartylglutamate: a transmitter candidate for the retinohypothalamic tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:8065-8069.
- Moore-Ede, M.C. (1982) A physiological system measuring time. En: *The clocks That Time Us.* Moore-Ede, M.C., Sulzman, F.M. y Fuller, C.A. eds. Harvard University Press. Pp 1-112.
- Moore, R.Y. (1983) Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed. Proc.* 42:2783-2789.
- Moore, R.Y. and Spoh, J.C. (1993) GABA is the principal transmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* 150:112-116.

- Moore, R.Y., Speh, J.C. and Card, J.P. (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 352:351-366.
- Moore, R.Y. (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 352:351-366.
- Morin, L.P. (1992) Serotonergic reinnervation of the hamster suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet without functional circadian rhythm recovery. *Brain Res.* 599:98-104.
- Morin, L.P. and Blanchard, J. (1991) Depletion of brain serotonin by 5,7-DHT modifies hamster circadian rhythm response to light. *Brain Res.* 566:173-185.
- Morin, L.P. and Blanchard, J. (1995) Organization of the hamster intergeniculate leaflet: NPY and ENK projections to the suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet and posterior limitans nucleus. *Vis. Neurosci.* 12:57-67.
- Moruzzi, G., and Magoun, H.W. (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1:455-473.
- Murakami, D.M., Miller, J.D. and Fuller, C.A. (1989) The retinohypothalamic tract in the cat: retinal ganglion cell morphology and pattern of projection. *Brain Res.* 482:283-296.
- Murakami, N., Takamura, M., Takahashi, K., Utunomiya, K., Kuroda, H. and Etoh, T. (1991) Long-term cultured neurons from rat suprachiasmatic nucleus retain the capacity for circadian oscillation of vasopressin release. *Brain Res.* 545:347-350.
- Newman, G.C. and Hospod, F.E. (1986) Rhythm of suprachiasmatic nucleus 2-deoxyglucose uptake in vitro. *Brain Res.* 381:345-350.
- Newman, G.C. (1991) SCN metabolic activity in vitro. En: *Suprachiasmatic Nucleus. The Mind's Clock* (Klein, D.C., Moore, R.Y. and Reppert, S.M. eds.) Oxford University Press. Pp 155-177.
- Otake, K., Ruggiero, D.A. and Nakamura, Y. (1995) Adrenergic innervation of forebrain neurons that project to the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *Brain Res.* 697:17-26.
- Park, H.T., Baek, S.Y., Kim, B.S., Kim, J.B. and Kim, J.J. (1993) Profile of Fos-like immunoreactivity induction by light stimuli in the intergeniculate leaflet is different from that of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 610:334-339.
- Perry, V.H. (1979) The ganglion cell layer of the retina of the rat: a Golgi study. *Proc. R. Soc. Lond.* 204:363-375.

- Pickard, G.E. (1985) Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminate in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci. Lett.* 55:211-217.
- Pickard, G.E., Ralph, M.R. and Menaker, M. (1987) The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *J. Biol. Rhythms* 2:35-56.
- Pittendrigh, C.S. (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu. Rev. Physiol.* 55:17-54.
- Prosser, R.A., Heller, H.C. and Miller, J.D. (1994) Serotonergic phase advances of the mammalian circadian involve protein kinase A and K⁺ channel opening. *Brain Res.* 644:67-73.
- Prosser, R.A. and Guillete, M.U. (1989) The mammalian circadian clock in the suprachiasmatic nuclei is reset in vitro by cAMP. *J. Neurosci.* 9:1073-1081.
- Prosser, R.A., Miller, J.D. and Heller, H.C. (1990) A serotonin agonist phase shifts of the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Brain Res.* 534:336-339.
- Prosser, R.A., Miller, J.D. and Heller, H.C. (1992) Serotonergic phase shifts of the mammalian circadian clock: effects of tetrodotoxin and high Mg²⁺. *Brain Res.* 573:336-340.
- Prosser, R.A., Edgar, D.M., Dean, R., et. al. (1993) Serotonin and the mammalian circadian system. I. In vitro phase shifting by serotonergic agonists and antagonists. *J. Biol. Rhythms* 8:17-31.
- Prosser, R.A., Macdonald, E.S. and Heller, H.C. (1994) c-fos mRNA in the suprachiasmatic nuclei in vitro shows a circadian rhythm and responds to a serotonergic agonist. *Mol. Brain Res.* 25:151-156.
- Rea, M.A. (1992) Different populations of cells in the suprachiasmatic nuclei express c-fos in association with light-induced phase delays and advances of the free-running activity rhythm in hamsters. *Brain Res.* 579:107-112.
- Rea, M.A., Buckley, B., and Lutton, L.M. (1993) Local administration of EAA antagonists blocks light-induced phase shifts and c-fos expression in hamster SCN. *Am. J. Physiol.* 265:R1191-R1198.
- Rea, M.A., Glass, J.D. and Colwell, C.S. (1994) Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J. Neurosci.* 14:3635-3642.
- Rusak, B. (1977) Involvement of the primary optic tracts in the mediation of light effects on hamster circadian rhythms. *J. Comp. Physiol.* 118:165-172.

- West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *TINS*. 22:51-61.
- Wirz-Justice, A. and Steger, R.W. (1982) Antidepressant drugs can slow or dissociate circadian rhythms. *Experientia* 38:1301-1309.
- Ying, S. and Rusak, B. (1994) Effects of serotonergic agonists on firing rates of photically responsive cells in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* 651:37-46.
- Zhang, D.X. and Rusak, B. (1989) Photic sensitivity of geniculate neurons that project to the suprachiasmatic nuclei or the contralateral geniculate. *Brain Res.* 504:161-164.